# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Michael Amling

# Die Rolle von Calcitonin und seines Rezeptors im Knochenstoffwechsel

- Untersuchungen an gentechnisch modifizierten Mausmodellen

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von

Johannes Hermann Keller aus Illertissen

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 8.3.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter:

PD Dr. Thorsten Schinke

Prüfungsausschuss, 3 Gutachterin:

PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

1 E	Einleitung	
1.1	Knochenzellen	8
	1.1.1 Osteoklasten	8
	1.1.2 Osteoblasten	10
	1.1.3 Osteozyten und Knochenbelegzellen	10
1.2	Knochenwachstum	11
1.3	Knochenumbau	12
	1.3.1 Systemische Kontrolle des Knochenumbaus	13
	1.3.2 Neuronale Kontrolle des Knochenumbaus	13
	1.3.3 Lokale Kontrolle des Knochenumbaus	14
1.4	Calcitonin	14
1.5	Calcitoninrezeptor	19
1.6	Verwendete Mausmodelle	21
	1.6.1 Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse	21
	1.6.2 Andere verwendete Mausmodelle	22
2	Aufgabenstellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
	3.1.1 Chemikalien und Enzyme	24
	3.1.2 Puffer und Lösungen	24
3.2	Methoden	28
	3.2.1 Molekularbiologische Methoden	28
	3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	28
	3.2.1.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	28
	3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
	3.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus 4 ml Kulturen (Miniprep)	28
	3.2.1.5 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen	28

4

3.2.1.6 Isolierung genomischer DNA aus Osteoklasten und	
Osteoblasten von Zellkulturschalen	29
3.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
3.2.1.8 Genotypisierung	30
3.2.1.9 Sequenzierung von DNA	30
3.2.1.10 Isolierung von RNA aus Geweben	30
3.2.1.11 Isolierung von RNA aus Zellkulturen	31
3.2.1.12 Reverse Transkription (RT)	31
3.2.1.13 Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	31
3.2.1.14 Quantitaitve Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	32
3.2.1.15 Northern-Blot-Analyse	33
3.2.1.16 Affymetrix-Genchip-Analyse	33
3.2.1.17 Serumanalysen	34
3.2.2 Histologie und Morphologie	34
3.2.2.1 Kontaktradiographie	34
3.2.2.2 Acrylat-Histologie	34
3.2.2.3 Paraffin-Histologie	35
3.2.2.4 Von Kossa/van Gieson Färbung	35
3.2.2.5 Toluidinblau Färbung	35
3.2.2.6 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) Färbung	35
3.2.2.7 Immunhistologie an Gewebeschnitten	35
3.2.2.8 Histomorphometrie	36
3.2.3 Zellkultur	36
3.2.3.1 Generierung von Osteoklasten in vitro	36
3.2.3.2 Dentinresorption	36
3.2.3.3. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-Färbung an	
Osteoklastenkulturen	36
3.2.3.4 Generierung primärer Osteoblasten in vitro	37
3.2.3.5 Von Kossa/van Gieson Färbung an Osteoklastenkulturen	37
3.2.3.6 Radioliganden-Bindungsassay	37
3.2.4 Maushaltung	38
Ergebnisse	39
Die Deletien von Even Quind 7 dae Opter Quine führt zum unlichter "	

4.1 Die Deletion von Exon 6 und 7 des <i>Calcr</i> -Gens führt zum vollständigem		
	Verlust eines funktionellen Calcitoninrezeptors.	39
4.2	Der inhibitorische Einfluss von Calcitonin auf die Funktion und Formation	
	von Osteoklasten ist in Calcr-defizienten Kulturen nicht nachweisbar.	41

4.3	Die Deletion des Calcitoninrezeptors führt zu einer gesteigerten	
	Knochemasse.	42
4.4	Die Abwesenheit des Calcitoninrezeptors resultiert sowohl in einer	
	gesteigerten Knochenresorption als auch in einer gesteigerten	
	Knochenformation.	43
4.5	Es gibt keine Hinweise für eine sekundäre Ursache des Knochenphänotyps	
	von Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen.	45
4.6	Veränderte Stoffwechselparameter in weiblichen Calcr <sup>-/-</sup> -Mäusen.	47
4.7	In vitro Experimente an Osteoklasten ohne Calcitoninrezeptor bestätigen	
	Hinweise auf einen bislang nicht identifizierten Rezeptor für Amylin.	48
4.8	Die Expressionsanalyse des Calcitoninrezeptors zeigt mögliche Mediatoren	
	des Effekts von Calcitonin auf Osteoblastenaktivität.	50
4.9	Die transgene Cre-Expression unter Kontrolle des Camk2a-Promotors und	
	des LysM-Promotors führt zu einer zellspezifischen Deletion des Calcitonin-	
	rezeptors in Mäusen mit gefloxtem Calcr-Allel.	51
4.10	Die Deletion des Calcitoninrezeptors in hypothalamischen Neuronen resultiert	
	in keinem ausgeprägten Knochenphänotyp und hat weder einen Effekt auf	
	die Knochenformation noch auf die Knochenresorption.	52
4.11	Die zellspezifische Deletion des Calcitoninrezeptors in Osteoklasten resultiert	
	in erhöhter Knochenmasse aufgrund gesteigerter Knochenformationsrate.	54
4.12	Der Effekt von Calcitonin auf die Genexpression in Osteoklasten.	55
4.13	Cyp24A1 – eine Verbindung zwischen Calcitonin und Vitamin D.	58
4.14	Svs7, ein Osteoklasten-spezifisches Protein mit osteoanaboler Wirkung?	59
4.15	Spns2 als möglicher Vermittler des hemmenden Effekts von Calcitonin auf	
	die Knochenformation.	60
4.16	S1pr3-defiziente Mäuse haben eine erniedrigte Knochenmasse aufgrund	
	gestörter Knochenformation.	63
5.	Diskussion	66
5.1	Die homozygote Deletion des Calcitoninrezeptors ist nicht embryonal letal.	66
5.2	Der Knochenphänotyp von <i>Calcr⁻</i> ′-Mäusen.	66
5.3	Die Funktion des Calcitoninrezeptors in Hypothalamus und Osteoklasten.	67
5.4	Mögliche Kopplungsmechanismen – Spns2, Cyp24A1 und Svs7.	69
5.5	Die endokrine Funktion des Calcitoninrezeptors.	72
5.6	Amylin in <i>Calcr<sup>-/-</sup>-</i> Mäusen.	73
5.7	Calcitonin im Menschen und im Nagetier - ein Vergleich.	74

11.	Eidesstattliche Erklärung	95
10.2	Lebenslauf	93
10.1	Danksagung	93
10.	Anhang	93
9.	Literaturverzeichnis	83
8.	Abkürzungsverzeichnis	81
7.	Zusammenfassung	79
6.	Ausblick	76

# 1. Einleitung

Wie wichtig ein gesunder und intakter Knochen für ein befreites Leben ist, haben diejenigen Menschen erfahren, die sich schon einmal den Arm oder das Bein gebrochen haben und ans Bett gefesselt auf Heilung hoffen mussten. Ebenso wichtig wie die Lunge zum Atmen oder das Herz zum Pumpen ist der Knochen des Menschen stützendes Gerüst, welches jeden Tag der Schwerkraft trotzt und es ermöglicht, aufrecht durch die Welt zu marschieren und nicht in einer undefinierten Masse aus Weichteilgewebe zu zerfließen. Während weitverbreitet die Meinung vorherrscht, Knochen sei eine Form von mineralisiertem Stein, simpel in seiner Architektur und zu keiner Wandlung fähig, ist dieses Gewebe in Wirklichkeit durch eine erstaunliche Komplexität und Dynamik gekennzeichnet, die eine Anpassung an wechselnde Beanspruchungen jederzeit ermöglicht. Sportarten mit hohen mechanischen Beanspruchungen wie beispielsweise Joggen oder Gewichtheben führen zu einem reaktiven Anstieg der Knochenmasse (Suominen, 2006), während die Erde umkreisende Astronauten in Schwerelosigkeit innerhalb weniger Wochen einen massiven Knochenmasseverlust erfahren (Vico et al., 1998). Die Fähigkeit des Knochens, auf wechselnde Beanspruchungen rasch und akkurat reagieren zu können, basiert auf zwei unterschiedlichen Prozessen, die Knochenresorption und Knochenformation genannt werden. Normalerweise sind diese beiden Mechanismen präzise aufeinander abgestimmt, sodass eine gleichbleibende Knochenmasse aufrechterhalten wird. Kommt es im gesunden Organismus zum Abbau von Knochen, wird der resorbierte Anteil nachfolgend durch neuen Knochen ersetzt. Dieser stetige Umbau des Knochengewebes ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität des Knochens, da eine ständige Belastung zur Ermüdung des Knochens führt und durch neues, widerstandsfähiges Gewebe ersetzt werden muss (Martin & Seeman, 2008). Der Knochenumbau wird durch hochspezialisierte Zellen realisiert, die sich anhand ihrer Differenzierungsprozesse, ihrer Morphologie und ihrer Funktionsweise deutlich voneinander unterschieden (Abb. 1).

# 1.1 Knochenzellen

# 1.1.1 Osteoklasten

Die einzigen Zellen im Organismus, die die Fähigkeit zur Knochenresorption besitzen, sind Osteoklasten (Zaidi et al., 2003; Bar-Shavit, 2007). Diese Zellen besitzen mehrere große Zellkerne und entstehen durch die Fusion von mononukleären Vorläufern der Monozyten/Makrophagen-Linie. Die Formation von Osteoklasten (Osteoklastogenese) ist ein komplexer Prozess, bei dem viele verschiedene lokale und auch systemische Faktoren eine Rolle spielen. Ein Schlüsselelement stellt hierbei das von Osteoblasten sezernierte RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa-B ligand) dar, welches den auf Vorläuferzellen exprimierten RANK-Rezeptor (receptor activator of NF- $\kappa$ B) aktiviert und die

#### Einleitung

Zelldifferenzierung zu Osteoklasten veranlasst. Dieser Prozess ist durch OPG (*osteoprotegerin*) antagonisierbar, welches ebenfalls von Osteoblasten produziert wird. OPG ist ein lösliches Rezeptorprotein, das mit hoher Affinität RANKL bindet, dessen Aktivität neutralisiert und somit die Osteoklastogenese regulieren kann (Khosla et al., 2001). Neben diesen lokal produzierten Faktoren sind auch systemisch wirksame Hormone wie Calcitonin, Parathormon und Vitamin D an der Regulation der Osteoklastenformation beteiligt.

Reife Osteoklasten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Calcitoninrezeptoren exprimieren, reich an TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) sind und die Fähigkeit besitzen, Knochen resorbieren zu können. Dafür erfolgt zuerst die Bindung der Osteoklasten an die Knochenoberfläche durch die charakteristische "sealing zone", einem apikalen Ring aus Aktin, wodurch ein abgeschlossenes Kompartiment entsteht, in welchem später die Knochenresorption stattfindet. An der Kontaktfläche zum Knochen bilden die Zellen dann eine wellige Plasmamembran (ruffled border) aus, die eine hohe Anzahl an Protonenpumpen enthält. Diese transportieren H<sup>+</sup>-Ionen nach extrazellulär und führen so zu einer Ansäuerung des abgeschlossenen Kompartiments zwischen Knochen und Osteoklast. Durch den niedrigen pH-Wert von unter 4 lösen sich die Hydroxyapatitkristalle des Knochens und das hierbei freigesetzte Calcium wird vom Blut abtransportiert. Parallel zu den H<sup>+</sup>-Ionen sezernierte Peptidasen wie beispielsweise Cathepsin K können in dieser sauren Umgebung die helikalen und Telopeptid- Regionen von Kollagen spalten und somit die organische Knochenmatrix abbauen (die Menge der im Serum und Urin nachweisbaren Kollagenabbauprodukte wird heutzutage als zuverlässiger Indikator der Osteoklastenaktivität benutzt) (Teitelbaum, 2000). Die Degradation der Knochenmatrix durch den Osteoklasten resultiert schließlich in einer Resorptionslakune, deren Substanzdefekt im gesunden Organismus durch anrückende Osteoblasten mit neuem Knochen gefüllt wird. Obwohl Osteoklasten durch ihre Aktivität Knochen zerstören, sind sie für die Integrität dieses Gewebes von entscheidender Bedeutung. Durch ihre Aktivität werden durch Mikrorisse mechanisch ermüdete Knochenanteile entfernt und mit neuem, belastbarem Gewebe ersetzt. Kommt es zu einer Unterfunktion der Osteoklasten, so spricht man vom Krankheitsbild der Osteopetrose. Die fehlende Resorption von Knochen führt zu einer enorm erhöhten Knochenmasse, sodass in ausgeprägten Fällen das blutbildende Knochenmark verdrängt wird und die Patienten an Splenomegalie (extramedulläre Blutbildung), Ausfällen von Hirnnerven (Einengung von Nervenaustritts-Foramina) und Hydrozephalus (Immobilisation der Knochenfontanellen) leiden (Del Fattore et al., 2008). Gleichermaßen sind die verdichteten Knochen spröde und unelastisch, sodass häufig Spontanfrakturen auftreten. Heilung kann in diesen Fällen nur durch eine Knochenmarktransplantation erreicht werden, welche den Patienten wieder funktionierende Osteoklasten zuführt.

#### 1.1.2 Osteoblasten

Im gesunden Organismus wird resorbierter Knochen durch knochenbildende Osteoblasten erneuert, sodass eine gleichbleibende Knochenmasse gewährleistet ist. Diese Zellen stammen von mesenchymalen Stammzellen ab, welche sich unter dem Einfluss mehrerer hochspezifischer Proteine zu Osteoblasten entwickeln. Wingless-ints (Wnts) und bone morphogenic proteins (BMPs) leiten die initiale Umwandlung der mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen ein, die mit einer hohen Expression von Hormon- und Zytokinrezeptoren einhergeht. Von besonderer Bedeutung für die weitere Zelldifferenzierung ist der Transkriptionsfaktor runt-related transcription factor 2 (Runx2). Dieses Protein bindet als Monomer oder auch als Untereinheit eines heterodimerischen Komplexes an die DNA und reguliert die für die Osteoblastogenese benötigte Genexpression. Mutationen von Runx2 äußern sich im Krankheitsbild der kleidokranialen Dysplasie, welche durch fehlende Osteoblasten und sukzessive Knochenunter – und Fehlentwicklung gekennzeichnet ist (Otto et al., 2003). Osteoblasten exprimieren die Alkalische Phosphatase (AP) und sezernieren eine extrazelluläre Matrix, die zu 95% aus Typ-I-Kollagen besteht und weitere knochenspezifische Proteine wie osteocalcin (OCN) und bone sialoprotein (BSP) enthält. Anhand der ins Blut abgegebenen Menge von AP und Osteocalcin lässt sich die Aktivität von Osteoblasten bestimmen. was besonders in der klinischen Diagnostik von Knochenerkrankungen mit osteoblastärer Beteiligung hohe Bedeutung genießt. Reife Osteoblasten haben eine charakteristische kuboidale Form und sind durch Cadherin-11 und N-Cadherin fest mit neu geformter Proteinmatrix (Osteoid) verankert. Erst etwa zwei Wochen nach Ablagerung des frisch gebildeten Osteoids wird Kalziumphosphat eingelagert, sodass es zur Mineralisation des Knochens kommt. Interessanterweise sind Osteoblasten nicht nur für die Knochenneubildung verantwortlich, sondern nehmen auch an der Regulation des Glukosemetabolismus teil. Über die Freisetzung von unterkarboxyliertem Osteocalcin können Osteoblasten die Insulinausschüttung stimulieren und zudem Fettzellen zur Produktion von Adiponektin anregen, welches die Wirkung von Insulin verbessert (Lee et al., 2007).

#### 1.1.3 Osteozyten und Knochenbelegzellen

Werden mineralisierende Osteoblasten in die niedergelegte Knochenmatrix eingebettet, so differenzieren sie zu dem terminalen Zelltyp der Osteoblastenlinie, dem Osteozyt. Diese Zellen exprimieren im Gegensatz zu Osteoblasten keine Alkalische Phosphatase, produzieren aber Osteopontine und andere Matrixproteine. Die zellulären Fortsätze bilden ein außerordentlich feines und den ganzen Knochen durchziehendes Netzwerk, welches eine etwa 10-fach größere Oberfläche als das Alveolarsystem der Lunge bedeckt. Die Zellen sind in der Lage, Wachstumsfaktoren zu produzieren und somit Osteoblasten und

Knochenbelegzellen zu stimulieren. Osteozyten befinden sich im Knochen in ausgezeichneter Position, um jegliche Art mechanischer Belastung wahrzunehmen. Durch Gap-Junctions können Osteozyten miteinander kommunizieren und koordiniert auf Veränderungen auf Druck-, Zug- oder Scherkräfte reagieren.

Der vierte Zelltyp im Knochen sind Knochenbelegzellen, flach geformte Zellen, die aus terminal differenzierten Osteoblasten entstehen und die gesamte Knochenoberfläche bedecken. Diese Zellen sind verantwortlich für eine umgehende Freisetzung von Kalzium aus Knochen bei akuter Hypokalzämie. Zudem schützen sie den Knochen von im Blut enthaltenen Substanzen wie beispielsweise Pyrophosphat, welches die Hydroxyapatit-Kristalle der anorganischen Knochenmatrix auflösen kann.



**Abb. 1. Histologische Bilder von Knochenzellen. Links**: In der TRAP-Färbung sind multinukleäre Osteoklasten (Ocl) rot angefärbt. Werden Knochentrabekel (Tb) von Osteoklasten abgebaut, so rücken Osteoblasten (Obl) an, die den Knochen neu aufbauen. Zwischen den Trabekeln findet sich Knochenmark (KM), welches Vorläuferzellen von Osteoklasten und Osteoblasten enthält. **Rechts:** In Knochenmatrix eingebettete Osteozyten (Ocy) in der Toluidin-Färbung. Der Zellkern ist deutlich dunkler angefärbt als das hellblaue Zytoplasma, welches durch multiple radiale Zellausläufer sternförmig erscheint.

# 1.2 Knochenwachstum

Die Entwicklung von Knochen im wachsenden Organismus erfolgt auf zwei verschiedene Arten, die beide den Umbau von primitivem kollagenösem Bindegewebe zu Knochen gemeinsam haben. Die Entwicklung der Röhren-, Wirbel, Becken- und Schädelbasisknochen erfolgt über ein kontinuierlich wachsendes Knorpelmodell, welches graduell durch Resorption zerstört und anschließend durch neugeformten Knochen ersetzt wird (Enchondrales Knochenwachstum). Der Knochen der Kopfkalotte, des Kiefers sowie des Schlüsselbeins dagegen entwickelt sich ohne knorpeliges Vorläufermodell. Hier findet sich eine direkte Ablagerung von Knochen in primitivem mesenchymalem Bindegewebe (Desmales Knochenwachstum). Beide Formen der Knochenentwicklung führen vorerst zur Bildung von mechanisch instabilem Geflechtknochen, in dem eine willkürliche Organisation der Kollagenfasern vorliegt. Erst durch nachfolgenden Knochenumbau wird der Geflechtknochen in lamellären Knochen umgewandelt, in dem die Kollagenfasern schichtartig in regelmäßigen, parallelen Strängen angeordnet sind und welcher durch eine hohe Widerstandsfähigkeit und Elastizität gekennzeichnet ist.

# 1.3 Knochenumbau

Mit dem Ende des Knochenwachstums beginnt der stetige Zyklus des Knochenumbaus, bei dem Knochenresorption von Knochenformation gefolgt ist und alter Knochen durch neuen ersetzt wird (Abb. 2). Knochenresorption und Knochenformation müssen nicht nur quantitativ, sondern auch zeitlich und räumlich aufeinander abgestimmt sein. Dieser Prozess findet asynchron an vielen Stellen der Knochenoberfläche innerhalb diskret abgrenzbarer Einheiten statt, die aufgrund ihres anatomisch-temporären Zusammenhangs als bone multicellular units (BMUs) bezeichnet werden. Fällt das akkurate Zusammenspiel zwischen Resorption und Formation aus, kann es zu verschiedenen Knochenerkrankungen kommen. Die häufigste Erkrankung des Knochens ist die Osteoporose, die entweder durch eine erhöhte Knochenresorption, eine unzureichende Knochenformation oder eine Kombination aus beidem verursacht wird (Seeman, 2003). Charakterisiert ist die Osteoporose durch eine erniedrigte Knochenmasse, die mit einer verminderten Knochenstabilität und einer erhöhten Frakturneigung einhergeht. Da diese Erkrankung häufig ältere Menschen mit niedrigem Regenerationspotential betrifft, können osteoporotische Frakturen aufgrund Immobilisation und damit verbundenen Komplikationen zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen führen, und stellen daher eine große Belastung für das Gesundheitssystem dar.



Abb. 2. Schema des Knochenumbaus. Durch die Resorptionsaktivität von Osteoklasten wird organische und anorganische Knochenmatrix zerstört. Die gebildete Resorptionslakune wird durch knochenbildende Osteoblasten mit Osteoid gefüllt, das später durch die Ablagerung von Kalziumphosphat mineralisiert. Diejenigen Osteoblasten, welche durch niedergelegte Knochenmatrix eingebettet werden, differenzieren zu Osteozyten. Knochenbelegzellen besiedeln die Knochenfläche, welche nicht dem Knochenumbau unterliegt.

Um potentielle Therapieansätze für dieses Krankheitsbild zu entwickeln, ist ein möglichst genaues Verständnis des Knochenstoffwechsels nötig. Die Funktion der verschiedenen

Knochenzellen unterliegt einer äußerst komplexen Regulation, an der systemische, neuronale und lokale Mechanismen beteiligt sind.

# 1.3.1 Systemische Kontrolle des Knochenumbaus

Ein wichtiger Regulator des Knochenumbaus ist beispielsweise Parathormon (PTH). Dieses Protein wird in der Nebenschilddrüse gebildet und als Reaktion auf niedrige Kalziumspiegel in das Blut abgegeben. PTH stimuliert die Knochenresorption durch Osteoklasten und erhöht die Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese und die tubuläre Kalzium-Rückresorption in der Niere, sodass es zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration im Blut kommt. Kontinuierlich erhöhte PTH-Spiegel, wie sie typischerweise beim primären Hyperparathyreoidismus zu finden sind, führen allerdings nicht nur zu einer gesteigerten Knochenresorption, sondern auch zu einer simultan erhöhten Knochenformation. Diese Entdeckung hat dazu geführt, dass PTH heutzutage in der Therapie der Osteoporose Anwendung findet. Wird PTH intermittierend (d.h. eine subkutane Injektion pro Tag) verabreicht, kommt es einzig zu einer Steigerung der Knochenformation, während die Knochenresorption unverändert bleibt (Hock & Gera, 1992). Nicht minder bedeutsam für den Knochenstoffwechsel ist das Steroidhormon Vitamin D. Cholesterin wird in der Haut unter UV-Einstrahlung zu 7-Dehydrocholesterol umgewandelt, welches in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> metabolisiert wird. 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> an sich besitzt nur wenig biologische Aktivität, fungiert aber als Speicherform des Hormons in Leberzellen und im Blut. In der Niere wird diese Vorstufe durch die 1-Hydroxylase (Cyp27B1) zum aktiven 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> umgewandelt, das essentiell für die intestinale Kalziumabsorption ist und zudem knochenbildende Osteoblasten stimuliert. Bei Mangelsituation kommt es zum klinischen Bild der Rachitis bzw. Osteomalazie, die durch Hypokalzämie und unzureichende Knochenmineralisation gekennzeichnet ist (Wolff et al.,

# 2008).

Östrogene, die ebenfalls zu den Steroidhormonen gehören, sind gleichermaßen von entscheidender Bedeutung für den Knochenstoffwechsel. Über ihren Kernrezeptor vermitteln sie multiple und bislang noch unzureichend verstandene Effekte auf Knochenzellen, die letztendlich in einer verbesserten Knochenqualität resultieren. Ähnlich wie die Ovarektomie (operative Entfernung der Eierstöcke) zu Knochenmasseverlust führt, ist die postmenopausale Osteoporose auf einen Östrogenmangel zurückzuführen (Raisz, 2005).

# **1.3.2 Neuronale Kontrolle des Knochenumbaus**

Neben systemisch wirksamen Hormonen ist auch das zentrale Nervensystem am Knochenumbau beteiligt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Leptin, ein von Adipozyten ausgeschüttetes Hormon, über Bindungsstellen auf hypothalamischen Neuronen die Aktivität peripherer sympathischer Nervenfasern steigert und somit Knochenformation

inhibiert (Ducy et al., 2000; Takeda et al., 2002). Osteoblasten exprimieren den ß2adrenergen Rezeptor, der durch Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenfasern aktiviert wird und die Funktion von Osteoblasten hemmt (Elefteriou et al., 2005). Ob diese zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels auch im Menschen von physiologischer Bedeutung ist, konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden. Wie sehr Nervenaktivität jedoch den Knochenmetabolismus beeinflussen kann, zeigt sich eindrucksvoll im Falle der Sympathischen Reflexdystrophie (Morbus Sudeck). Dieses Krankheitsbild ist durch massiv entgleisten Knochenumbau aufgrund von Fehlregulation der sympathischen Nervenaktivität charakterisiert. letztendlich multiplen was zu Knochenläsionen und einer Atrophie des betroffenen Gewebes führt (Staunton, 2006).

#### 1.3.3 Lokale Kontrolle des Knochenumbaus

Abgesehen von der Regulation des Knochenstoffwechsels durch übergeordnete Zentren ist auch die lokale Kommunikation zwischen den verschiedenen Knochenzellen von hoher Relevanz. Während Osteoblasten über die Sekretion von RANKL und OPG die Knochenresorption regulieren können, ist es umgekehrt auch Osteoklasten möglich, Osteoblastenaktivität zu beeinflussen. Im Zuge der Knochenformation werden transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) sowie insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in die Knochenmatrix eingebettet, beides knochenanabole Proteine, die durch resorbierende Osteoklasten wieder freigesetzt werden und dadurch Osteoblastenaktivität stimulieren (Martin & Sims, 2005). Zudem gibt es mehr und mehr Studien, die den Osteoklasten als Quelle von aktiv produzierten und sezernierten Substanzen identifizieren (Boyce & Xing, 2006). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Osteoklasten über die Produktion von Cardiotrophin-1 einen stimulierenden Effekt auf die Knochenformation ausüben können (Walker et al., 2008). Gleichermaßen wurde von Osteoklasten sezerniertes Sphingosin-1-Phosphat als möglicher Kopplungsfaktor postuliert (Pederson et al., 2008). Ein drastisches Beispiel dafür, wie Osteoklasten die Knochenformation beeinflussen können, bietet der Morbus Paget. Hier finden sich stark vergrößerte und dauerhaft aktivierte Osteoklasten, die Osteoblasten zu überschießender Knochenformation stimulieren, sodass es in den betroffenen Arealen zu einer Verdickung und zu Instabilitäten des Knochengewebes kommt.

# 1.4 Calcitonin

Der Gegenspieler des systemisch wirksamen PTH ist das Peptidhormon Calcitonin (CT), welches den Haupt-Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit darstellt. CT wird im Gegensatz zu PTH aufgrund einer hohen Konzentration von Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Plasma ausgeschüttet und kann zu einer Senkung des Kalziumspiegels im Blut führen. Die Substanz wurde im Jahr 1961 von Copp und Mitarbeitern aus Schilddrüsenextrakten von Hunden isoliert und

aufgrund ihrer hypokalzämischen Wirkung auf den Namen Calcitonin getauft (Copp & Cameron, 1961). Kurz danach wurde der Nachweis erbracht, dass CT primär von den parafollikulären C-Zellen (clear-cells) der Schilddrüse produziert wird (Foster et al., 1964). Als Ursache der hypokalzämischen Wirkung von CT wurde bald die Hemmung der Knochenresorption ausgemacht, da zahlreiche in vitro Experimente den Nachweis lieferten, dass CT einer der potentesten Hemmer von Osteoklasten ist und somit einer Freisetzung von Kalzium aus Knochengewebe entgegenwirken kann. Dieser Umstand erklärt die Tatsache, dass CT als physiologischer Gegenspieler von PTH betrachtet wird und vor der Einführung von Bisphosphonaten (hochpotente Medikamente, die Osteoklasten in die Apoptose treiben oder deren Funktion nachhaltig inhibieren) jahrzehntelang in der Therapie von Knochenerkrankungen Verwendung fand. Neben dem Einsatz in der Osteoporosetherapie zeigte synthetisches CT besonders in der Behandlung des Morbus Paget gute Resultate (Huang et al., 2006).

Im Organismus wird das 32 Aminosäuren lange Peptidhormon CT durch das *Calca*-Gen kodiert, aus dem durch alternatives Spleißen auch das verwandte Protein *alpha calcitonin gene-related peptide* ( $\alpha$ CGRP) hervorgehen kann (Abb. 3). Während in den C-Zellen der Schilddrüse primär CT synthetisiert wird, entsteht im zentralen und peripheren Nervensystem nach Transkription des *Calca*-Gens  $\alpha$ CGRP, ein äußerst potenter Vasodilator. CT und  $\alpha$ CGRP teilen zwar keine enge Sequenzhomologie, ähneln sich aber in ihrer sekundären Peptidstruktur. Diese ist durch ein C-terminales Prolinamid und eine N-terminale Disulfidbrücke gekennzeichntet und stellt das Charakteristikum der Calcitoninfamilie dar, zu der neben CT und  $\alpha$ CGRP auch  $\beta$ CGRP (*beta calcitonin gene-related peptide*), Amylin, Adrenomedullin und Intermedin gezählt werden.



**Abb. 3. Alternatives Spleißen des Calca-Gens in der Maus.** In den C-Zellen der Schilddrüse resultiert alternatives Spleißen am Exon 4 in der Synthese von Calcitonin, während Neuronen des zentralen (ZNS) und peripheren (PNS) Nervensystems CGRPα bilden (Abbildung nach Hoff et al., 2002).

Die Freisetzung von CT wird primär durch erhöhte Kalziumspiegel im Plasma ausgelöst, kann aber auch durch Gastrin und einige andere gastrointestinale Hormone stimuliert werden. Über das Blut wird CT dann zu verschiedenen Zielorganen transportiert und vermittelt dort über den Calcitoninrezeptor verschiedene biologische Effekte. In der Niere stimuliert CT die Kalzium-Ausscheidung, steigert die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Synthese und erniedrigt die Rückresorption von Phosphat (Pondel, 2000). Im Knochen hingegen sorgt CT für eine Hemmung der knochenresorbierenden Osteoklasten, sodass eine Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen unterbunden wird. Schon femtomolare Konzentrationen von CT hemmen die Aktivität (quiescence, Q-Effekt) und verursachen eine Retraktion der marginalen Zellfortsätze der Osteoklasten (margin retraction, R-Effekt) (Zaidi et al., 1990). Neben der ausgeprägten Wirkung auf die Osteoklastenfunktion konnte zusätzlich ein hemmender Effekt auf die Formation von reifen Osteoklasten in vitro demonstriert werden (Granholm et al., 2007). Die physiologische Bedeutung von CT jedoch lässt sich nur begrenzt aus in vitro Experimenten ableiten, zumal bei vielen Studien Lachs-Calcitonin (salmon calcitonin, sCT) in supraphysiologischen Konzentrationen verwendet wurde. sCT hat die höchste Affinität zum Calcitoninrezeptor und wirkt bis zu 50 mal potenter als endogenes Calcitonin.

Verschiedene klinische Beobachtungen lassen an einer physiologisch relevanten Funktion von CT zweifeln. Zum einen lässt sich die hypokalzämische Wirkung von CT nur in Menschen mit gesteigertem Knochenumbau wie beispielsweise im Wachstum oder bei Knochenmetastasen nachweisen. Zum anderen scheint es immer noch ein Rätsel, wieso Patienten mit chronisch erhöhten CT-Spiegeln aufgrund eines C-Zell Karzinoms keine Osteopetrose entwickeln, und auch erniedrigte CT-Konzentrationen nach Entfernung der Schilddrüse keine Osteoporose verursachen (Zaidi et al., 2002). Auch im Tiermodel gestaltete es sich schwierig, eine entscheidende Rolle von CT im Knochenumbau zu demonstrieren. Mäuse, die das Onkogen Ret (*rearranged during transfection*) überexprimieren und dadurch ein C-Zell Karzinom mit einer stark erhöhten CT-Produktion entwickeln, haben einen ebenso blanden Knochenphänotyp wie Menschen mit der gleichen Erkrankung (Abb. 4). Nur die Überexpression des hochpotenten sCT führt zu ausgeprägten Veränderungen der Knochenstruktur und verdeutlicht die unterschiedliche Wirkungsweise von körpereigenem CT und dem pharmakologisch genutzten sCT.

Erst die Analyse von Calcitonin-defizienten Mäusen (*Calca<sup>-/-</sup>*) konnte Licht auf die physiologische Bedeutung von CT werfen (Hoff et al., 2002). Anstatt der erwarteten Osteoporose aufgrund fehlender Hemmung von Osteoklasten imponierten 3 Monate alte *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit einer deutlich erhöhten Knochenmasse. Während keine Anzeichen einer erhöhten Knochenresorption zu beobachten waren, konnte eine stark gesteigerte Knochenformationsrate festgestellt werden (Abb. 5). Der Anstieg der Knochenformation

wirkte sogar Östrogenmangel entgegen, sodass der sonst zu beobachtende Knochenmasseverlust nach Ovariektomie nicht eintrat.



**Abb. 4. Unterschiedliche Wirkung von rCT und sCT auf den Knochen. A.** Der Knochen von Mäusen mit medullärem Schilddrüsenkarzinom aufgrund Ret-Mutation (MEN2A) weist trotz deutlich erhöhter CT-Konzentrationen im Plasma keine veränderte Morphologie der Knochenstruktur auf. Trotz einer erniedrigten Knochenformationsrate (*Bone formation rate per bone surface*, BFR/BS) kommt es in diesem Mausmodell mit Überschuss an körpereigenem CT zu keiner veränderten Knochenmasse (*Bone volume per tissue volume*, BV/TV) oder zu einer erniedrigten Anzahl an knochenresorbierenden Osteoklasten (*Number of osteoclasts per bone perimeter*, NOc/Bpm). **B.** Einzig die Überexpression des hochpotenten sCT unter Kontrolle des leberspezifischen Promotors ApoE (sCT<sup>ApoE</sup>) resultiert in einem morphologisch auffälligen Knochenphänotyp, der durch eine erhöhte Knochenmasse aufgrund erniedrigter Osteoklastenanzahl gekennzeichnet ist (modifiziert nach Dissertation von Antje Huebner: Untersuchungen zur Funktion von Calcitonin im Knochen an Modellen der Maus).

In einer sukzessiven Studie wurde dann gezeigt, dass in den Calca-/--Mäusen ab dem Alter von 6 Monaten auch die Knochenresorption ansteigt und im Alter von 12 Monaten etwa vierfach gegenüber den Wildtypkontrollen erhöht ist (Huebner et al., 2006). Erstaunlicherweise führt die Abwesenheit von Calca auch in 6 und 12 Monaten alten Mäusen zu einer erhöhten Knochenformationsrate, sodass trotz gesteigerter Knochenresorption eine hohe Knochenmasse zu beobachten ist. Der markante Phänotyp der Calca<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigt, zumindest in der Maus, von physiologischer Bedeutung für dass CT, den Knochenstoffwechsel ist und in Übereinstimmung mit in vitro Studien an Osteoklasten als Inhibitor der Knochenresorption fungiert. Allerdings konnte bislang keine Erklärung für die erhöhte Knochenformationsrate gefunden werden, die mit der Deletion des Calca-Gens einhergeht. Ein direkter hemmender Effekt von CT auf knochenbildende Osteoblasten ist unwahrscheinlich, da diese Zellen keine Bindungsstellen für CT aufweisen (Lee et al., 1995; Nicholson et al., 1986). Nachdem in den Calca<sup>-/-</sup>-Mäusen neben CT auch  $\alpha$ CGRP nicht mehr gebildet werden kann, lag die Vermutung nahe, dass die hohe Knochenformationsrate möglicherweise mit dem Fehlen von  $\alpha$ CGRP zusammenhängt. Dies wurde letztendlich durch die Analyse eines Mausmodells widerlegt, in dem selektiv die Produktion von  $\alpha$ CGRP geblockt war, CT aber noch synthetisiert werden konnte ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>). Der Phänotyp von  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen war durch eine milde Osteopenie aufgrund erniedrigter Knochenformation gekennzeichnet, was auf eine knochenanabole Funktion von  $\alpha$ CGRP schließen lässt (Schinke et al., 2004). Nachdem  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse die eigentliche Kontrolle der Calca<sup>-/-</sup>-Mäuse darstellen, ist es nur noch erstaunlicher, dass in diesen trotz der Abwesenheit von  $\alpha$ CGRP eine hohe Knochenformationsrate und eine gesteigerte Knochendichte beobachtet werden konnten.



**Abb. 5. Phänotyp von Calca**<sup>-/-</sup> und  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen. A. Die Wirbelkörper und die Tibiae weisen in der von Kossa Färbung deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mausmodellen im Vergleich zur Wildtypkontrolle auf. B. Die Abwesenheit des *Calca*-Gens, und somit von CT und  $\alpha$ CGRP, führt in allen untersuchten Altersklassen (3, 6, und 12 Monate) zu einer erhöhten Knochenmasse, während der alleinige Verlust von CGRP $\alpha$  in einer Osteopenie resultiert. C. *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen im Alter von 12 Monaten eine vierfach erhöhte Anzahl von Osteoklasten auf, wohingegen die Knochenresorption in  $\alpha$ CGRP-defizienten Mäusen nicht betroffen ist. D. Obwohl das Fehlen von  $\alpha$ CGRP in verminderter Knochenzuwachsrate resultiert, ist die Osteoblastenaktivität in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht (modifiziert nach Huebner et al., 2006).

Auch die Analyse der wichtigsten, am Knochenstoffwechsel beteiligten Substanzen lieferte keine Erklärung der erhöhten Knochenzuwachsrate in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen, da die Serumkonzentrationen von Kalzium, Phosphat, PTH, Vitamin D und Thyroxin keine Veränderungen aufzeigten. Eine mögliche Ursache lieferte eine Genexpressionsanalyse der Hypothalami von *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen, die eine zehnfache Induktion des *Calcb*-Gens im

Vergleich zur Wildtypkontrolle zeigte. Das *Calcb*-Gen kodiert für Calcitonin gene-related peptide beta ( $\beta$ CGRP), einem engen Verwandten des knochenanabolen  $\alpha$ CGRP. Weitere Analysen konnten eine verstärkte Expression von *Calcb* auch in Knochen und verschiedenen anderen Geweben von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen demonstrieren. Allerdings führte die Deletion von *Calcb* zu keinem ausgeprägten Knochenphänotyp mit normaler Knochenresorption und Knochenformation, sodass eine entscheidende Rolle von *Calcb* für den Knochenstoffwechsel eher unwahrscheinlich ist (Huebner et al., 2008). Nichtsdestotrotz wäre eine gesteigerte Osteoblastenaktivität aufgrund Überexpression von  $\beta$ CGRP in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht ausgeschlossen.

#### **1.5 Calcitoninrezeptor**

CT vermittelt seine verschiedenen Effekte über den Calcitoninrezeptor (CTR), ein G-Proteingekoppelter Zelloberflächenrezeptor mit sieben membrandurchspannenden Domänen (Goldring et al., 1993; Strader et al., 1995). 1991 gelang die Expressionsklonierung des CTR aus porcinen Nierenepithelzellen (Lin et al., 1991), gefolgt von der Klonierung aus anderen Spezies. Neben einem hohen Expressionslevel des CTR in renalen Epithelzellen konnten Bindungsstellen für CT unter anderem im zentralen Nervensystem, Muskeln, Mammae, Ovarien, Plazenta und Lymphozyten demonstriert werden. Die höchste Dichte an Rezeptoren weisen jedoch Osteoklasten auf, die mehr als 10<sup>7</sup> Bindungsstellen für CT pro Zelle exprimieren (Pondel, 2000).

Sowohl in der Maus als auch im Menschen ist das Gen des CTR (*Calcr* bzw. *CALCR*) komplex strukturiert (Abb. 6). Dieses Gen umfasst ca. 70 kb und besteht aus wenigstens 14 Exons, die durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen des Rezeptors bilden können (Gorn et al., 1992; Gorn et al., 1995; Kuestner et al., 1994; Nishikawa et al., 1999) (Abb. 6). Die in der Maus am häufigsten vorkommenden Isoformen des CTR sind die Spleißvarianten C1a und C1b, die sich durch die Abwesenheit (C1a) oder das Vorhandensein (C1b) eines 37 Aminosäure langen Inserts in der zweiten extrazellulären Domäne unterscheiden (Yamin et al., 1994). Im Osteoklasten ist die dominant exprimierte Form die C1a Variante, während die C1b Form nur in geringen Mengen gebildet wird (Pondel, 2000).

Åhnlich wie andere Zelloberflächenrezeptoren vermittelt auch der CTR seine intrazellulären Effekte über die Aktivierung von G-Proteinen. Abhängig vom Zelltyp und der dort dominant exprimierten Spleißvariante kann der CTR alle drei bekannten G-Proteine aktivieren. Durch die Aktivierung von  $G_s$  kommt es durch Stimulation der Adenylat-Cyclase zur Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), während die Aktivierung von  $G_i$  den gegenteiligen Effekt hervorruft. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, durch die in Osteoklasten der q-Effekt verursacht wird. Die Kopplung des CTR an  $G_q$  hingegen führt über die Bildung

von Inositol-3-Phosphat und Diacylglycerol zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Aktivierung der Proteinkinase C, was in Osteoklasten den R-Effekt bewirkt (Chakraborty et al., 1991; Chen et al., 1998; Moonga et al., 1992; Zaidi et al., 1990).



Abb. 6. cDNA und Struktur des Calcitoninrezeptors in der Maus. Die Isoform C1b ist im Gegensatz zu C1a durch ein zusätzliches Insert von 37 Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Domäne charakterisiert. Im Mensch hat die  $CT_{(b)}$ -Variante zusätzliche 16 Aminosäuren in der ersten intrazellulären Domäne.

Eng verwandt zum CTR ist der CRLR (*calcitonin receptor-like receptor*), der die biologischen Effekte von einigen anderen Peptiden der Calcitoninfamilie vermittelt (Pondel, 2000). Eine Besonderheit des CTR und des CRLR ist ihre Fähigkeit, mit RAMPs (*receptor activity modifying proteins*) Heterodimere zu bilden (McLatchie et al., 1998). RAMPs sind einfach membrandurchspannende Proteine, die die Spezifität von Rezeptoren für bestimmte Liganden steuern können. Assoziert sich beispielsweise der CRLR mit RAMPs, werden Bindungsstellen für CGRP und Adrenomedullin gebildet. Kommt es dagegen zur Komplexbildung zwischen RAMPs und dem CTR, so werden, zumindest nach klassischer Sichtweise, Rezeptoren für Amylin (Amy) generiert (Tab. 1). Amy ist ein Peptid aus der Calcitoninfamilie und wird mit Insulin aus pankreatischen β-Zellen ko-sekretiert. Neben pleiotrophen Effekten auf den Glukosehaushalt vermittelt Amy, ähnlich wie CT, eine hemmende Wirkung auf knochenresorbierende Osteoklasten.

Obwohl zahlreiche *in vitro* Studien an transfizierten Zelllinien den Calcitoninrezeptor als essentiellen Bestandteil der Amylinrezeptoren postuliert haben (Muff et al., 1999; Tilakaratne et al., 2000; Morfis et al., 2008), konnten diese Ergebnisse bislang *in vivo* nicht bestätigt werden, da Amy-defiziente Mäuse einen entgegengesetzten Knochenphänotyp zu CTR-defizienten Mäusen aufweisen (Dacquin et al., 2004). Die homozygote Defizienz des Calcitoninrezeptors führte in diesem Mausmodell zu embryonaler Letalität, sodass nur heterozygote Mäuse analysiert werden konnten. Während die Deletion von Amy in erhöhter Knochenresorption resultierte, führte der Verlust eines Allels von *Calcr* zu gesteigerter

Knochenformation bei unveränderter Knochenresorption. Dies weist auf die mögliche Existenz eines bislang nicht identifizierten Rezeptors hin, der, zumindest im Knochen, die biologischen Effekte von Amy vermittelt.

Rezeptorname	Molekulare Komponenten
CGRP <sub>1</sub>	CRLR + RAMP1
AM <sub>1</sub>	CRLR + RAMP2
AM <sub>1</sub>	CRLR + RAMP3
CTR	CTR
AMY <sub>1</sub>	CTR + RAMP1
AMY <sub>2</sub>	CTR + RAMP2
AMY <sub>3</sub>	CTR + RAMP3

Tab. 1. Nomenklatur und molekulare Bestandteile der Rezeptoren für die Calcitonin-Peptidfamilie. Der Calcitoninrezeptor (CTR) kann nicht nur Calcitonin binden, sondern fungiert nach klassischer Sichtweise auch als Amylinrezeptor (AMY), wenn er Heterodimere mit RAMPs bildet. Ebenso kann der Calcitonin-receptor-likereceptor (CRLR) durch Assoziation mit verschiedenen RAMPs Rezeptoren für Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP) Adrenomedullin (AM) bilden und (modifiziert nach Lerner, 2006).

# 1.6. Verwendete Mausmodelle

# 1.6.1 Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse

Durch die Analyse der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben sich neue und interessante Fragen zur Bedeutung und zur Funktion von CT ergeben. Allerdings lassen sich an diesem Mausmodell nur schwerlich die zellulären und molekularen Mechanismen verstehen, die für die Entstehung des Knochenphänotyps verantwortlich sind. Um ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus von Calcitonin zu erlangen, bietet sich deshalb die Analyse von CTR-defizienten Mäusen an.

Ein Mausmodell mit zellspezifisch deletierbarem CTR (*Calcr<sup>#/#</sup>*-Mäuse) wurde in der Arbeitsgruppe von meiner geschätzten Vorgängerin Antje Huebner generiert und stand bei Beginn dieser Arbeit zur Verfügung (Abb. 7). Um das Problem der zuvor beschriebenen embryonalen Letalität zu umgehen, wurden CTR-defiziente Mäuse (*Calcr<sup>-/-</sup>*) mit der *Cre/LoxP*-Strategie generiert (Gu et al., 1994). Hierzu wurde die genomische Sequenz von Exon 6 und 7 des *Calcr*-Gens von loxP-sites (locus of crossingover of P1 phage) flankiert, welche für die sowohl in der C1a als auch in der C1b Spleißvariante des CTR vorhandene extrazelluläre Domäne des Rezeptors kodiert. LoxP-sites sind spezifische DNA-Sequenzen, die von dem bakteriellen Enzym Cre-Rekombinase (Cre) erkannt werden. Wird in einer Zelle Cre exprimiert und liegen gleichzeitig mit loxP-sites flankierte (gefloxte) Genabschnitte in der genomischen DNA vor, schneidet Cre die markierte Gensequenz aus und fügt die DNA an den Exzisionsstellen wieder zusammen.



**Abb. 7. Generierung von Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen. A.** Embryonale Stammzellen wurden mit dem Zielvektor transfiziert, der loxP-Sequenzen (gelbe Pfeile) und ein von frt-Sequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen enthielt. **B.** Homologe Rekombination wurde durch Southern Blot Analyse nach Hind III (H) Verdau und durch PCR mit den angegebenen Primern (rote Pfeile) bestätigt. **C.** Nach Entfernung des Neomycin-Resistenzgens durch Flp-Rekombination wurden Mäuse mit zwei gefloxten Allelen generiert und mit *Cre<sup>CMV</sup>*-Mäusen verpaart, was zur heterozygoten Deletion des CTR führte. **D.** Nachkommen von *Calcr<sup>+/-</sup>*-Elterntieren wurden durch Southern Blot und durch PCR mit den angegebenen Primer-Paaren identifiziert.

Für die globale Deletion von Exon 6 und 7 des Calcitoninrezeptors wurden Mäuse mit gefloxtem *Calcr*-Allel mit transgenen Mäusen verpaart, die Cre unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Zytomegalie-Virus) überexprimieren. Der CMV-Promotor unterliegt in allen Zellen des Organismus starker Induktion, sodass es in einigen Mäusen auch in den Keimbahnzellen zur Deletion des gefloxten Allels kam und schließlich Cre-negative, *Calcr*<sup>+/-</sup>Nachkommen identifiziert werden konnten.

# 1.6.2 Andere verwendete Mausmodelle

Für die zellspezifische Deletion des CTR in Osteoklasten und in hypothalamischen Neuronen wurden *Calcr<sup>fuff</sup>*-Mäuse mit transgenen Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Lysm-Cre Promotors bzw. des CamK2a-Cre Promotors überexprimieren. S1pr3-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Bodo Levkau vom Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

# 2. Aufgabenstellung

Die gentechnische Ablation von Calca führt zu einem markanten Knochenphänotyp, der auf eine entscheidende Bedeutung von CT im Knochenstoffwechsel schließen lässt. Insbesondere die Beobachtung, dass die Deletion des Calca-Gens nicht zu einer Osteoporose, sondern zu einer erhöhten Knochenmasse aufgrund gesteigerter Knochenformation führt, verdeutlicht die Tatsache, dass die Wirkungsweise von CT bei weitem noch nicht verstanden ist. Um die Funktion von CT im Knochenstoffwechsel näher zu charakterisieren, sollten in dieser Arbeit CTR-defiziente Mäuse untersucht werden. Hier sollte anhand von in vivo und in vitro Studien untersucht werden, ob die Deletion von Exon 6 und 7 des Calcr-Gens zu einem vollständigen Verlust eines funktionellen CTR und zu einem vergleichbaren Knochenphänotyp wie die Abwesenheit des Calca-Gens führt. Um mögliche Gewebe zu identifizieren, über die CT seinen hemmenden Effekt auf die Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten vermittelt, sollten Mäuse mit einer zellspezifischen Deletion des CTR analysiert werden. Dafür sollten Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit transgenen Mäusen verpaart werden, die die Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promotor exprimieren. Darüberhinaus sollten mögliche molekulare Mechanismen untersucht werden, über die CT seine biologische Wirkung vermittelt.

# 3. Material und Methoden

# **3.1 Material**

# 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen BIO-RAD (München), MERCK (Darmstadt), ROCHE (Mannheim), CARL ROTH GMBH (Karlsruhe), GIBCO (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Steinheim) verwendet. Die Enzyme wurden von den Firmen NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main) und ROCHE (Mannheim) bezogen.

# 3.1.2 Puffer und Lösungen

Chromalaunlösung:	4 g Kaliumchrom-3-sulfat 100 ml dest. Wasser, filtrieren, bei 4°C aufbewahren
Citratpuffer (Immunhistologie):	9 ml 0,1 M Zitronensäure (Stammlösung A) 41 ml 0,1 M Na-Citrat (Stammlösung B) ad 500 ml dest. Wasser, pH 6,0
DEPC-H <sub>2</sub> O:	1000 $\mu$ l Diethylpyrokarbonat ad 500 ml H <sub>2</sub> O, ü.N. bei 37°C inkubieren, autoklavieren
10 x DNA-Gel-Ladepuffer:	50 % Glyzerin 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau in TE
20 % EDTA (Entkalkung v. Knochen):	200 g Titriplex III (MERCK #108418) ad 1000 ml $H_2O$ , mit konz. NaOH lösen und auf pH 7,2 einstellen
Eosin-Lösung (HE-Färbung):	0,25 g Eosin G (MERCK #115935) 250 ml dest. Wasser 5 Tropfen Eisessig
0,1 % Gelatine:	0,1 g Gelatine ad 100 ml $H_2O$
Gelatinelösung :	0,5 g Gelatine in 50 ml dest. Wasser (< 60°C) lösen 2 ml Chromalaunlösung zugeben

Gießlösung (Acrylat-Histo):	1000 ml Methylmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet, 100 ml LPG (Nonyl-Phenol, SIGMA- ALDRICH #74430),direkt vor dem Gießen 500 µl N,N Dimethyl-p-Toluidin/100 ml Gießlösung hinzufügen
van Gieson-Lösung:	2,5 g Säurefuchsin (MERCK #105231) 900 ml gesättigte Pikrinsäure (SIGMA-A.#80456) 100 ml Glycerin 5 ml konz. Salpetersäure
Hybridisierungspuffer (Northern):	250 mM Dinatriumhydrogenphosphate 250 mM Natriumdihydrogenphosphat 1 mM EDTA 1 % BSA 6,6 % SDS
Infiltrationslösung I (Acrylat-Histo):	1000 ml Methylmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet
Infiltrationslösung II (Acrylat-Histo):	1000 ml Methylmethacrylat (Merck #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet 100 ml LPG (Nonyl-Phenol, SIGMA-ALDRICH #74430)
von Kossa-Lösung:	3 g Silbernitrat (MERCK #1.01512.0100) auf 100 ml dest. Wasser
LB/Amp-Medium:	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin

LB-Medium:	INVITROGEN, Karlsruhe #12780-052
LB-Agar:	INVITROGEN, Karlsruhe #22700-025
Mausschwanz-Lysis-Puffer:	50 mM Tris, pH 8,0
	100 mM EDTA, pH 8,0
	100 mM NaCl
	1% SDS
MEF-Medium:	500 ml DMEM (GIBCO #61965026)
	50 ml FCS (GIBCO #10270106)
	5,5 ml MEM (GIBCO #11140035)
	5,5 ml Pen/Strep (5000 IU Pen, 5000 μg
	Strep/ml, GIBCO #15070022)
5% Natriumthiosulfatlösung:	5 g Natriumthiosulfat auf 100 ml dest. Wasser
1 x PBS:	137 mM NaCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM KCl
	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Proteinase K-Lösung:	10 mg/ml, -20°C
20 % SDS:	200 g SDS in 900 ml H <sub>2</sub> O auf 68 °C erhitzen,
	auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 I H2O
3% Silbernitratlösung:	3 g Silbernitrat auf 100 ml dest. Wasser
Sodaformollösung:	12,5 g Natriumkarbonat
	187 ml dest. Wasser
	62,5 ml 37%ige Formalinlösung
20 x SSC:	3 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat
	pH 7,0, autoklavieren

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Azetat 50 mM EDTA, pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
10 x TE-Puffer:	0,1 M Tris/HCl 10 mM EDTA, pH 7,5
Tail-Lyse-Puffer:	50 mM Tris, pH 8,0 100 mM EDTA, pH 8,0 100 mM NaCl 1% SDS
Toluidinlösung:	1 g Toluidinblau O 100 ml dest. Wasser pH 4,5
TRAP-Lösung:	5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 μl N,N Dimethylformamid lösen und mit 50 ml TRAP-Puffer mischen; 30 mg Fast Red Violet LB Salt darin lösen und sofort für die Färbung verwenden
TRAP-Puffer:	40 mM Azetat 10 mM Natriumtartrat, pH 5,0, bei 4°C aufbewahren
1 M Tris-HCI:	21,1 g Tris, gewünschten pH mit HCI einstellen
X-Gal:	40mg/ml in DMF, bei -20°C dunkel lagern

# 3.2 Methoden

# 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

# 3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Abhängig von den zu erwartenden Bandengrößen wurden 0,9 bis 2%ige Agarosegele gegossen, welche vor dem Aushärten mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid zur Darstellung von Nukleinsäuren versetzt worden waren. Die PCR-Proben wurden mit 1/25 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt, in die Geltaschen pipettiert, und bei 60-140 Volt in horizontalen Gelkammern (BIO-RAD, München) in 1 x TAE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden die Agarosegele mit einem UV-Transilluminator fotografiert, wobei eine 1kb-DNA-Leiter (INVITROGEN, #15615-024) zur Bestimmung der Bandengröße benutzt wurde.

# 3.2.1.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agaroseblöckchen nach Elektrophorese wurden mit dem QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, #20051) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei erfolgt eine spezifische Bindung von Nucleinsäuren mit einer Mindestlänge von 40 bp an eine Silica-Gel-Matrix bei hohen Salzkonzentrationen. Mit subsequenten Reinigungsschritten werden dann u.a. Oligonukleotide entfernt. Anschließend erfolgt eine Eluierung der gereinigten DNA bei einer geringen Salzkonzentration von den Partikeln.

# 3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit einem NanoDrop-Spektrometer (Biotechnologie GmbH).

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

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

# 3.2.1.5 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Ein etwa 2 mm langes Stück Mausschwanz wurde zu einem Gemisch aus 700  $\mu$ l Tail-Lyse-Puffer und 50  $\mu$ l Proteinase K Lösung hinzugegeben und bei 55°C über Nacht im Heizblock inkubiert. Diesem Ansatz wurden 750  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl (Roth, Karlsruhe, #A156.2) hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch kräftig geschüttelt und dann für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. 650  $\mu$ l der oberen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit weiteren 650  $\mu$ l P/C/I vermengt. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm) wurden diesmal 550  $\mu$ l der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 550  $\mu$ l Isopropanol vorsichtig vermengt. Daraufhin wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Verdampfen des Ethanols wurde das Pellet in 50  $\mu$ l TE Puffer aufgenommen und über mehrere Stunden bei Raumtemperatur resolubilisiert.

# 3.2.1.6 Isolierung genomischer DNA aus Osteoklasten und Osteoblasten von Zellkulturschalen

Es wurden 700µl Tail-Lyse-Puffer und 50µl Proteinase K Lösung pro Vertiefung hinzugegeben und die gesamte Platte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55°C im Wärmeschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Zelllysat mit Zellschabern von den Vertiefungen abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die weitere Aufreinigung der DNA erfolgte wie unter 3.2.1.5 beschrieben.

# 3.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein enzymatisches Verfahren zur *in vitro*-Synthese von vordefinierten DNA-Sequenzen. Hierbei wird doppelsträngige DNA durch Hitzeeinwirkung denaturiert, sodass die komplementären Einzelstränge frei vorliegen. Dies ermöglicht den Oligonukleotid-Primern sich an ihre komplementären DNA-Sequenzen anzulagern, sodass der zu amplifizierende Genabschnitt nun von den Primern flankiert ist. Durch die thermostabile DNA-Polymerase kommt es zur Synthese von komplementären DNA-Strängen, ausgehend von den jeweiligen Oligonukleotid-Primern. Durch wiederholte Folge von Template-Denaturierung, Anlagerung der Primer und nachfolgender DNA-Synthese erreicht man eine exponentielle Amplifizierung der flankierten Gensequenz. Thermostabile Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und Reaktionspuffer für alle PCR-Amplifikationen stammten von ROCHE (Mannheim). Alle PCR-Reaktionen wurden entweder im iCycler von BIO-RAD (München) oder im T3 Thermocycler von BIOMETRA (Göttingen) ausgeführt.

Für einen Standardansatz mit 50 μl Gesamtvolumen wurden typischerweise verwendet: 40 μl aqua dest, 5 μl Taq-Polymerasepuffer, 0,5 μl DMSO, 1 μl dNTPs (2,5mM), 1 μl Forward-Primer (10μM), 1 μl Reverse-Primer (10μM), 0,5 μl Taq-Polymerase, 1 μl Template-DNA (ca. 100ng)

# 3.2.1.8 Genotypisierung

Die Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben. Die gewonnene DNA wurde anschließend für die Genotypisierung mittels Southern-Blot-Analyse oder PCR verwendet. Folgende Primer-Paare wurden zur Identifikation der Genotypen durch PCR verwendet:

Name	Forwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Calcr <sup>fl/fl</sup>	5`-TCCTGGGCTGCTGAGAAAGTATC-3'	5`-ATGTGATTGGCTGGGCACTG-3'
Calcr <sup>-/-</sup>	5`-AAGACAGATGGTGAGGGCTGACTG-3'	5`-ACCATGCATGAGTGTGGAGA-3'
Lysm Cre-	5`-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'	5`-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'
Lysm Cre+	5`-CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGTCC-3'	5`-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'
CamK2a Cre-	5`-GGTTCTCCGTTTGCACTCAGGA-3'	5`-CTGCATGCACGGGACAGCTCT-3'
CamK2a Cre+	5`-CCTGTTGTTCAGCTTGCACCAG-3'	5`-CTGCATGCACGGGACAGCTCT-3'
S1pr3 <sup>+/+</sup>	5`-CACAGCAAGCAGACCTCCAGA-3'	5'-ATCGATACCGTCGATCGACCT-3'
S1pr3⁻∕-	5`-TGGTGTGCGGCTGTCTAGTCAA-3'	5`-ATCGATACCGTCGATCGACCT-3'

# 3.2.1.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger in der Sequenzier-Einrichtung des UKE durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Ansatz gewählt: 500 ng DNA (bei einem PCR-Produkt 50-100 ng) in Aqua dest. gelöst, 15 pM Primer, 2 µl Big Dye, 6 µl 2,5x Puffer, ad 20 µl Aqua dest.

Folgendes PCR-Programm wurde zur Sequenzierung verwendet: Primärdenaturierung 2 min 96°C Denaturierung 10 s 96°C Hybridisierung 5 s 50°C bei M13 Synthese 4 min 60°C x 25 Endsynthese 5 min 60°C Aufbewahrung  $\approx$  4°C

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 80  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l 3 M Natriumazetat, pH 6,0, und 300  $\mu$ l absolutem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, RT) wurde das Pellet getrocknet und in 15  $\mu$ l Sequenzierungspuffer gelöst.

# 3.2.1.10 Isolierung von RNA aus Geweben

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die zu untersuchenden Gewebe wurden rasch herauspräpariert, umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Gewebeproben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden die tiefgefrorenen Proben in 2 ml Trizol (INVITROGEN # 15596-018) mit einem Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE, Staufen) homogenisiert. Knochengewebe wurde vor der Homogenisierung in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert. Der Ultra-Turrax wurde nach jeder Probe sorgfältig mit 1% SDS in DEPC-Wasser gereinigt und mehrmals mit DEPC-Wasser gespült.

Das Homogenat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 400  $\mu$ l Chloroform ausgeschüttelt und anschließend zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4°C). Die obere Phase wurde mit 500  $\mu$ l Isopropanol vermengt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% EtOH (in DEPC-Wasser) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 10.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet getrocknet und, je nach Größe, in 20 bis 50  $\mu$ l DEPC-Wasser für 20 Minuten bei Raumtemperatur resolubilisiert. Isolierte RNA wurde bei - 80°C gelagert.

# 3.2.1.11 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mittels des RNeasy Kits (Qiagen) nach Standardprotokoll des Herstellers.

# 3.2.1.12 Reverse Transkription (RT)

Für die reverse Transkribtion von RNA in copy DNA (cDNA) wurde der Cloned AMV First-Strand Synthese Kit von Invitrogen (#12328-040, Karlsruhe) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden wahlweise 0,5-3  $\mu$ g RNA in cDNA pro Ansatz umgeschrieben.

# 3.2.1.13 Reverse Transkribtion-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit der RT-PCR ist es möglich, die Expressionsstärke bestimmter Zielgene abzuschätzen. Dazu vergleicht man die Expression des Zielgens mit der eines Haushaltsgens (z.B. GAPDH oder  $\beta$ -Actin). Für die RT-PCR wurde folgender Ansatz verwendet: 2,5  $\mu$ l 10x Taq-Puffer, 1  $\mu$ l dNTP (2,5 mM), 1  $\mu$ l Forward-Primer, 1  $\mu$ l Reverse-Primer, 1  $\mu$ l cDNA (ca. 5 ng), 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase, ad 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>0.

Für die zu vergleichenden Proben wurde die gleiche Menge cDNA pro Ansatz benutzt. Als Haushaltsgen diente *gapdh* (Glyzerinaldehyd-6-Phosphat-Dehydrogenase). Folgende Primerpaare wurden verwendet:

Name	Forwärtsprimer	Rückwärtsprimer
1110067D22Rik	5'-GGCAAGCATGTGTAACTCAGCA-3'	5'-TTTGACCTCTCAGGCTGAGGAG-3'
2310016C08Rik	5'-CAGGCATCACAGCTTCAGCAT-3'	5'-ATCCATTCTCCCAACAGCTGG-3'
Calcb	5'-TAGACCTGGGCACCCTCGGC-3'	5'-GCCCACATCGGTGGGCACAA-3'
Calcr	5'-TGAAGCCACCCCAAGCATT-3'	5'-TTGCCTGCTTTCCTACGAACAC-3'
Car3	5'-GGAGAAGCAGTCACATGCAA-3'	5'-TGGTAAGGTCCGCATACTCC-3'
CD14	5'-TGACTGGCCCAGTCAGCTAAAC-3'	5'-CCAGGAGGATGCAAATGTTCC-3'
Crem	5'-GTGAACTCTAATCGGGGCAG-3'	5'-GCTTGGTAATGTGAGGGGAG-3'
Cyp24A1	5'-GCGTGCGCCAAAAGAGGTGC-3'	5'-CTGGGGATGCGCGCTCTCTG-3'
Cyp27B1	5'-TCCCTGAGAGGAGCATCAATCT-3'	5'-CCTGAGGAATGATCAGGAGAGG-3'
Fhod3	5'-ATCTTTGCGAAGGACCTTGAAG-3'	5'-ATGTCAATGCGCAACGGTG-3'
Myo1b	5'-CAACCAAGCTGTATCGCACGA-3'	5'-CCCAAACATACAGTGAACCCCA-3'
Pip5k1b	5'-ATAAGTGAAAGCGGCAGCCAC-3'	5'-TAGCGCTTCCCAGTCCAAAAG-3'
Pscdbp	5'-CAATTCTGAGTCATGCCGATTC-3'	5'-CATCTACGCCGAGGCTAACAA-3'
S1pr1	5'-GGCTTATCTGGTCCCTCCTC-3'	5'-CTTTGGCCTCAGCAAATAGC-3'
S1pr2	5'-CCCCCTTCCATAAACAACCT-3'	5'-CCCATACTGCCTCACCTGAT-3'
S1pr3	5'-TCTGCTTTCACACAACAGCC-3'	5'-GCAAGTAGCCAAGGTTGCTC-3'
S1pr4	5'-GCAGAAGTCTCCACGTCCTC-3'	5'-GCTGAGTGACCGAGAAGTCC-3'
S1pr5	5'-TATGGCTGCAGCAGAAATTG-3'	5'-TTCCTCTGTAGCCAGCCACT-3'
Spns2	5'-GATGACCCAAGAGTCCTTTCCA-3'	5'-AAGGTGACTAAGGTGGCTGCAG-3'
Svs7	5'-CTGGTGAATCATGCAGTACCGT-3'	5'-GGCCATCATGGAAATCGAGTAG-3'
Svs7 cDNA	5'-CCTTTACCTCAAGCTGCCTT-3'	5'-AGGAAAGCAAGTTCCTCATC-3'
Taf9b	5'-GGTCTCAGCACTTGCCTTTC-3'	5'-AACCAACGGACTGGTTCAAG-3'
Tspan13	5'-AGTCTGTCAGGATTGCATCCC-3'	5'-CATCCCATTTTGAGAGCTGAAG-3'
Gapdh	5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'	5'-CTCCTGTTATTATGGGGGTCTGG-3'

# 3.2.1.14 Quantitaitve Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR (auch Realtime- PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen cDNA anhand von Fluoreszenz-Messungen ermöglicht. Da die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt kann am Ende eines Laufs mit den erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden. Hierzu werden sogenannte FRET-Sonden (Fluorescence resonance energy transfer) verwendet, bei denen ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch eine Lichtquelle angeregt wird und einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) abgibt. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten TaqMan-Sonden besitzen an einem Ende einen Quencher, an dem anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, sodass sich durch die Aktivität der Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut und sich dadurch Quencher

und Fluorophor voneinander entfernen und eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann.

Um den Anfang der exponentiellen Phase bestimmen zu können, wurde der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) verwendet, der denjenigen Zyklus beschreibt, an dem erstmalig ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz über die Hintergrund-Fluoreszenz messbar ist. Als interne Kontrolle diente Gapdh, dessen Expression während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung nicht variiert. Eine unterschiedliche Expression verschiedener Proben wurde dann als n-fache Expression mit Hilfe des  $\Delta\Delta$ Ct-Wertes angegeben. Hierbei werden die Ct-Werte voneinander abgezogen ( $\Delta$ Ct), die beiden  $\Delta$ Ct-Werte der einzelnen Proben voneinander abgezogen ( $\Delta\Delta$ Ct-Wert) und in die Gleichung n-fache Expression (Probe A zu Probe B) = 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> eingesetzt.

# 3.2.1.15 Northern-Blot-Analyse

Aus Geweben und Zellkulturen gewonnene RNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zuerst 5 Minuten mit DEPC-H2O und dann 2-mal in 10x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Über Nacht erfolgte dann der Transfer auf eine HyBond-N-Membran (Amersham Biosciences) mittels Kapillarkräften. Am nächsten Tag wurde die Membran dann bei Raumtemperatur in 5x SSC gewaschen, für 60 min bei 80°C gebacken und mit UV-Licht zur Vernetzung der RNA bestrahlt. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation im Hybridisierungspuffer bei 65°C, woraufhin eine mit 32P-dCTP-markierte Sonde hinzugefügt wurde und sich eine weitere Hybridisation über Nacht bei 65°C anschloss. Vor dem Detektieren der Signale wurde überschüssige Sonde durch Waschen mit 2x SSC und 0,1 % SDS bei 25°C, gefolgt von Waschen mit 0,1x SSC und 0,1 % SDS bei 65°C entfernt. Die Filme wurden mit dem Gerät Optimax (Typ TR, MS Laborgeräte) entwickelt.

# 3.2.1.16 Affymetrix-Genchip-Analyse

Mittels der Affymetrix-Genchip-Analyse ist eine vergleichende Expressionsanalyse aller Gene zwischen zwei oder mehr Proben möglich. In dieser Arbeit wurde die Microarray-Genchip-Analyse angewendet, um den Effekt von Calcitonin auf die Genexpression in Osteoklasten zu untersuchen. Dazu wurden Osteoklasten für 6 Stunden mit 10<sup>-7</sup>M Calcitonin stimuliert, die RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Mit der cDNA wurden die Genchips hybridisiert, auf denen nahezu alle der etwa 30.000 Gene einer Maus mehrfach repräsentiert sind. Bei der Hybridisierung entstehen Signale, die mit spezieller Software von Affymetrix in die Expressionsstärke des jeweiligen Gens umgerechnet werden können. Die Hybridisierung und die Auswertung der Genchips wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Streichert (Klinische Chemie, UKE) durchgeführt.

# 3.2.1.17 Serumanalysen

Die Mäuse wurden mit Ether getötet und das Blut anschließend aus dem Brustkorb nach Herzschnitt entnommen. Nachdem das Blut bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es zweimal für 4 Minuten bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das gewonne Serum wurde für weitere Untersuchungen bei –80°C gelagert. Folgende Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet: QuantiChromTM Calcium Assay Kit (BioAssay Systems), Mouse Intact PTH ELISA Kit (Immuntopics), Quantikine Mouse TRANCE/RANK Ligand Immunoassay (R&D Systems), Quantakine® Mouse OPG (R&D Systems), Calcitonin (Rat) EIA-Kit (Phoenix Pharmaceuticals), Serotonin ELISA (Alpco).

Die Messung von  $1,25(OH)_2$  Vitamin  $D_3$  erfolgte im Zentrallabor der klinischen Chemie des UKE. Glukose, Insulin, Triglyzeride, Cholesterin, unterkarboxyliertes Osteocalcin und Adiponektin wurden durch Dr. Andreas Niemeier an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie des UKE gemessen.

# 3.2.2 Histologie und Morphologie

# 3.2.2.1 Kontaktradiographie

Die fixierten Skelette wurden bei 35 kV für 2 Sekunden im Kontakt-Röntgengerät (Faxitron Xray, FAXITRON XRAY CORP., Wheeling Illinois, USA; ) auf Röntgenfilmen belichtet, die anschließend in einem Entwicklergerät (Optimax Typ TR, MS Laborgeräte) entwickelt wurden.

# 3.2.2.2 Acrylat-Histologie

Nach dem Töten der Tiere wurden Haut und innere Organe größtenteils entfernt. Die Skelette wurden gestreckt auf eine Korkplatte gespannt und für mindestens einen Tag in frischem 3,7 % gepuffertem Formaldehyd fixiert, bevor sie in 80 % Ethanol überführt wurden. Anschließend wurden von jeder Maus die oberen 4 Lumbalwirbel und die rechte Tibiae herauspräpariert und über Nacht im Autotechnikon entwässert (2 x 60 min 70 % EtOH, 3 x 60 min 80 % EtOH, 3 x 60 min 96 % EtOH, 4 x EtOH absolut). Der nicht-entkalkte Knochen wurde nach der Entwässerung für je einen Tag bei 4°C mit der Infiltratioslösung I und II infiltriert. Anschließend wurden die Knochenstücke in Glasgefäße mit Gießlösung eingebettet, welche über Nacht bei 4°C im Wasserbad polymerisierte. Am Rotationsmikrotom (MICROTEC CUT 4060E) wurden 3 µm Schnitte für die von Kossa Färbung und 12 µm Schnitte zur Erfassung der Knochenformationsrate mittels Calceinmarkierung hergestellt und mit Hilfe eines Pinsels auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Das Strecken der Schnitte erfolgte mit 80 % Isopropanol, welchem ein Tropfen Butylether hinzugefügt worden war. Zum Trocknen wurden die Schnitte in eine Presse eingespannt und über Nacht bei 60 °C in einen Wärmeschrank gestellt.

# 3.2.2.3 Paraffin-Histologie

Wirbelkörper- und Tibiapräparation erfolgte wie bei der Acrylathistologie. Der Knochen wurde über Nacht bei 37°C in 20% EDTA entkalkt. Die Entwässerung erfolgte ebenso über Nacht im Autotechnikum ( $2 \times 60 \text{ min } 70\%$  EtOH, 60 min 80% EtOH,  $2 \times 60 \text{ min } 96\%$  EtOH,  $2 \times 60 \text{ min } 70\%$  EtOH, 60 min 80% EtOH,  $2 \times 60 \text{ min } 96\%$  EtOH,  $2 \times 60 \text{ min } 2 \times 60 \text{ min } 70\%$  EtOH,  $3 \times 60 \text{ min } 96\%$ C). Nachdem der Knochen in Paraffin eingebettet wurde, konnten am Schlittenmikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt werden.

# 3.2.2.4 Von Kossa/van Gieson-Färbung

Zum Lösen des Kunststoffes wurden die nicht entkalkten Schnitte für 3 x 10 Minuten in 2-(Methoxyethyl)-acetat (Merck #806061) getaucht. Anschließend erfolgte die Bewässerung der Präparate in absteigender Alkoholreihe und die eigentliche Färbung: 5 min 3 % Silbernitratlösung, 10 min aqua dest., 5 min Sodaformollösung, 10 min fließendes Leitungswasser, 5 min 5% Natriumthiosulfatlösung, 10 min fließendes Leitungswasser, 20 min van Gieson-Lösung. Die Präparate wurden danach wieder in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und 3 x 5 min in Xylol gebadet. Anschließend wurden die Schnitte mit DPX (SIGMA-ALDRICH #44581) und dünnen Glasplättchen eingedeckt.

# 3.2.2.5 Toluidinblau-Färbung

Das Lösen des Kunstoffes, Be-bzw. Entwässerung und Eindecken der Schnitte erfolgte wie bei der von Kossa-Färbung. Zum eigentlichen Färben wurden die nicht entkalkten Präparate für 30 Minuten in die Toluidinlösung gestellt.

# 3.2.2.6 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-Färbung

Aktive Osteoklasten können histologisch mit der Trap-Färbung dargestellt werden, welche am entkalkten Knochenpräparat durchgeführt wird. Dazu wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe bewässer. Nach einstündiger Inkubation in TRAP-Puffer wurden die Schnitte für 30 min in der TRAP-Lösung gefärbt. Nachdem die Präparate mit destilliertem Wasser abgespült wurden, erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 10-60 Sekunden. Danach wurden die Schnitte für etwa 10 Minuten fließend gewässert und schließlich mit wässrigem Eindeckmedium (Faramount Mounting Medium, Aqueous, DAKO # S3025) eingedeckt.

# 3.2.2.7 Immunhistologie an Gewebeschnitten

Die Immunhistologie mit Calcitoninrezeptor-spezifischen Antikörpern wurde freundlicherweise durch Dr. Antje Huebner am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

# 3.2.2.8 Histomorphometrie

Zur Quantifizierung von Knochenvolumen (*bone volume per tissue volume*, BV/TV), Anzahl der Trabekel (*trabecular number*, TbN), Abstand der Trabekel (*trabecular spacing*, TbSp), und Dicke der Trabekel (*trabecular thickness*, TbTh) wurde ein standardisiertes Protokoll des Bioquant-Systems angewandt. Die Messung erfolgte an von Kossa gefärbten Acrylatschnitten. Osteoblasten- und Osteoklastenanzahl (*number of osteoblasts per bone parameter*, NOb/Bpm; *number of osteoclasts per bone perimeter*, NOc/Bpm) wurden von Philipp Catala mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System (OSTEOMETRICS INC., Atlanta, Georgia, USA) an Toluidinblau gefärbten Acrylatschnitten bestimmt, während die Knochenzuwachsrate (*bone formation rate*, BFR) anhand der beiden Calceinbanden von ungefärbten 12 µm Schnitten vermessen wurde.

# 3.2.3 Zellkultur

# 3.2.3.1 Generierung von Osteoklasten in vitro

Hierzu wurde das Knochenmark aus den Diaphysen von Femur und Tibia mit steril filtriertem  $\alpha$ -MEM (pH 6,9; SIGMA-ALDRICH #M0644) ausgespült und gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, resuspendiert, und anschließend über einem Zellsieb (100 µm) in ein neues Gefäß überführt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer ungefähren Dichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> in 6-Well oder 12-Well Zellkulturplatten ausplattiert. Die Zellen wurden dann in  $\alpha$ -MEM mit 10% hiFCS (*heat-inactivated fetal calf serum*) kultiviert, wobei alle 2 Tage ein Mediumwechsel erfolgte.

Zur Osteoklastengenerierung wurden dem Medium die Osteoklasten-spezifischen Differenzierungsfaktoren hinzugefügt: 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (10 nM) ab Tag 0, RANK-L (40ng/ml) und M-CSF (20 ng/ml) ab Tag 5.

# 3.2.3.2 Dentinresorption

Um die Resorptionsaktivität der Osteoklasten zu bestimmen, wurden Knochenmarkszellen auf Dentinscheibchen ausplattiert und wie oben beschrieben zu Osteoklasten differenziert. An Tag 15 wurden dann die Dentinscheibchen entnommen und mit Toludinblau gefärbt. Die Auswertung der Resorptionsspuren erfolgte mit Adobe Photoshop.

# 3.2.3.3 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-Färbung an Osteoklasten

Am Ende der Differenzierungsreihe wurden Osteklasten mit eiskaltem Methanol für 5 min fixiert, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und 30 min mit der TRAP-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit Aqua dest. gewaschen und TRAP-positive,
multinukleäre (mehr als drei Nuklei) Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Rasters ausgezählt.

#### 3.2.3.4 Generierung primärer Osteoblasten in vitro

Hierzu wurden die Schädeldächer von 3-5 Tage alten Mäusen in einer 0,1 % Kollagenase/ 0,2 % Dispase-Lösung für 20 min inkubiert und der Überstand anschließend verworfen. Danach erfolgte eine zweite Inkubation der Schädeldächer in der gleichen Lösung. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und in einer Dichte von 50.000 Zellen pro 12 Well ausplattiert. Sobald das Zellwachstum 80 % -ige Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen durch die Zugabe von β-Glycerolphosphat (10 mM) und Ascorbat (50  $\mu$ g/ml) zu Osteoblasten differenziert und für die Dauer von 15 Tagen kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 Tage mit frischem Kulturmedium versorgt.

#### 3.2.3.5 Von Kossa Färbung an Osteoklastenkulturen

Am Tag 15 der Differenzierung wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 10 min mit Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Wasser gewaschen und für 30 min in 5 % Silbernitrat unter Lichtbestrahlung inkubiert. Nach einem erneutem Waschvorgang mit Wasser wurde die Reaktion mit 10 % Natriumthiosulfat gestoppt. Mineralisierte Substanz wurde durch die Software von Bioquant quantifiziert.

#### 3.2.3.6 Radioliganden-Bindungs-Assay

Für die Bindung radioaktiver Liganden an intakte Zellen wurden Osteoblasten- und Osteoklasten-Zellkulturen in 12 Well-plates angelegt. Unmittelbar vor Durchführung der Bindunganalyse wurden die Kulturen zweimal mit 0,1 % BSA in PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 0,5 ml PBS/0,1 % BSA für 2 Stunden bei 4°C inkubiert, welches zuvor mit radioaktivem Liganden (10<sup>-10</sup> M) oder, zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, mit unmarkiertem Liganden (10<sup>-7</sup> M) versetzt wurde. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS (0,1% BSA) gewaschen und anschließend mit 0,5 ml 0,5 ml 0,5 M NaOH pro Well bei 55 °C inkubiert. Das Zelllysat wurde abgesaugt und in ein neues Gefäß überführt. Vor der Aktivitätsmessung wurden die Wells jeweils mit 0,5 ml 0,5 M NaOH ausgespült, welches dann dem zuvor abgesaugten Zelllysat hinzugegeben wurde. Die Radioaktivität wurde in einem Gammacounter bestimmt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

<sup>125</sup>I-Calcitonin (Salmon) und <sup>125</sup>I-Amylin (Rat) sowie die unmarkierten Kompetitoren (Salmon-Calcitonin, Rat-Amylin) stammten von PHOENIX PHARMACEUTICALS, Burlingame, California.

#### 3.2.4 Maushaltung

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

### 4. Ergebnisse

## 4.1 Die Deletion von Exon 6 und 7 des *Calcr*-Gens führt zu vollständigem Verlust eines funktionellen Calcitoninrezeptors.

Für die Analyse von CTR-defizienten Mäusen wurden *Cre<sup>-</sup>/Calcr<sup>-/-</sup>*-Tiere verwendet, in denen die Rekombination von *Calcr* in den Keimbahnzellen der Elterntiere stattgefunden hatte. Dadurch wurde sichergestellt, dass der Calcitoninrezeptor unabhängig von der Cre-Rekombinase in allen Zellen des Organismus komplett deletiert ist. Im Gegensatz zu dem von Daquin et al. (Daquin et al., 2004) beschriebenen Mausmodell mit Deletion von Exon 6 und 7 des *Calcr*-Gens führte in dem Mausmodell unserer Arbeitsgruppe die Abwesenheit der gleichen Exons auf beiden Allelen nicht zu embryonaler Letalität. Die Nachkommen von *Calcr*<sup>+/-</sup>-Mäusen wurden nach den Mendelschen Regeln geboren (Abb. 8) und wiesen keine offensichtlichen Anomalitäten auf (Daten nicht gezeigt).



Abb. 8. Die Deletion des Calcitoninrezeptors ist nicht embryonal letal. Die Vererbung des Calcr-Allels mutierten an männliche und weibliche Nachkommen von Calcr<sup>+/-</sup>-Mäusen erfolgt in Übereinstimmung mit den Mendelschen Regeln. Im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen ist die homozygote Deletion von Exon 6 und 7 des Calcr-Gens nicht embryonal letal.

Zur Überprüfung des Erfolgs der gewählten Deletionsstrategie wurden immunhistologische Färbungen des CTR mithilfe eines spezifischen Antikörpers angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass in *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen das CTR-Protein in Niere und Hypothalamus, zwei bekannten Expressionsgeweben des Rezeptors, nicht mehr detektierbar ist (Abb. 9A). Nachdem die Deletion von Exon 6 und 7 zu einer strukturell anormalen, weiterhin aber aktiven Form des Rezeptors führen könnte, die durch den verwendeten Antikörper nicht detektierbar ist, wurde die Abwesenheit eines funktionellen CTR *in vitro* untersucht.

Zum einen wurden aus Röhrenknochen gewonnene Knochenmarkszellen zu Osteoklasten und Osteoblasten differenziert und die Expression des CTR anhand der Bindung von radioaktiv markiertem Lachs-Calcitonin (<sup>125</sup>I-sCT) untersucht. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die Zellen mit I<sup>125</sup>-sCT in Kombination mit unmarkiertem sCT in tausendfach höherer molarer Konzentration inkubiert. In Übereinstimmung mit bislang veröffentlichten Studien zeigte <sup>125</sup>I-sCT eine spezifische Bindung an *Calcr<sup>+/-</sup>*-Osteoklasten, während eine signifikant erniedrigte I<sup>125</sup>-sCT Bindung an *Calcr<sup>+/-</sup>*-Osteoklasten und ein vollständiger Verlust der spezifischen Bindung an *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten zu beobachten

waren. Osteoblastenkulturen aus *Calcr*<sup>+/-</sup>-, *Calcr*<sup>+/-</sup>- und *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen wiesen keinerlei Bindung von I<sup>125</sup>-sCT auf (Abb. 9B).

Zum anderen wurden *Calcr*<sup>+/+</sup>- und *Calcr*<sup>-/-</sup>-Osteoklasten mit sCT und rCT (Ratten-Calcitonin) inkubiert und die hervorgerufene intrazelluläre Signaltransduktion anhand der Messung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bestimmt. cAMP ist das Produkt der Adenylylcyclase, die durch die Bindung von Calcitonin an seinen Rezeptor aktiviert wird, und spiegelt das Ausmaß der hervorgerufenen intrazellulären Signaltransduktion wider (Pondel, 2000).



Abb. 9. Abwesenheit eines funktionellen Calcitoninrezeptors in Calcr<sup>-/-</sup> Mäusen. A. Immunhistologie der Nieren und des Nucleus ventromedialis der Hypothalami von Calcr<sup>-/-</sup> und Calcr<sup>-/-</sup> -Mäusen mittels eines CTR-spezifischen Antikörpers (grüne Färbung in Wildtypgewebe). In Calcr<sup>-/-</sup> Mäusen ist das Rezeptorprotein in beiden untersuchten Geweben nicht mehr nachweisbar. **B.** In einer Bindungsstudie mit <sup>125</sup>I-sCT zeigt sich eine hochspezifische Bindung an Calcr<sup>+/-</sup>-und Calcr<sup>f/x/f/x</sup>Osteoklasten, während Calcr<sup>+/-</sup>-Osteoklasten eine signifikant erniedrigte Bindung aufweisen. In Osteoklasten von Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die spezifische Bindung von <sup>125</sup>I-sCT komplett aufgehoben. Weder in Calcr<sup>+/+</sup>- noch in Calcr<sup>+/-</sup> oder Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoblasten lässt sich eine Bindung von <sup>125</sup>I-sCT nachweisen. **C.** Calcr<sup>+/+</sup>-Osteoklasten weisen einen deutlichen intrazellulären cAMP-Anstieg nach Stimulation mit Lachscalcitonin (sCT) und Rattencalcitonin (rCT) auf, der in Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten nicht mehr nachweisbar ist. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 3)

Die Stimulation mit sCT und rCT führte zu einem rapiden Anstieg der intrazellulären Konzentration von cAMP in *Calcr*<sup>+/+</sup>-Osteoklasten, wobei sCT, wie in anderen Studien zuvor beschrieben, potenter war als rCT. Im Gegensatz dazu war kein signifikanter Anstieg der

intrazellulären cAMP-Konzentration in Osteoklasten von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu beobachten (Abb. 9C).

## 4.2 Der inhibitorische Einfluss von Calcitonin auf die Funktion und Formation von Osteoklasten ist in *Calcr*-defizienten Kulturen nicht nachweisbar.

Da CT ein potenter Inhibitor der Osteoklastenfunktion ist, wurde der Effekt von sCT und rCT auf die Resorptionsleistung von Osteoklasten untersucht. Hierzu wurden Osteoklasten auf Dentinscheibchen kultiviert und ihre Aktivität anhand von Resorptionsspuren bestimmt. Während sCT und rCT in *Calcr*<sup>+/+</sup>-Osteoklasten einen stark hemmenden Effekt auf die Resorption des Dentins aufwiesen, war dieser nahezu aufgehoben in Osteoklasten aus *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 10A).



Abb. 10. Calcitonin hat keinen Effekt auf Osteoklasten ohne funktionellen Calcitoninrezeptor in vitro. A. Resorptionsanalyse von Calcr<sup>+/+</sup>- und Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten, die 12 Tage lang auf Dentinscheibchen kultiviert wurden. Während sCT und rCT eine deutliche Hemmung der Dentinresorption von Calcr<sup>+/+</sup>-Osteoklasten hervorrufen, ist dieser Effekt in Osteoklasten von Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen nahezu aufgehoben. B. TRAP-Färbung von Osteoklastenkulturen an Tag 15 der Differenzierung zur Untersuchung des Effekts von Calcitonin auf die Osteoklastogenese. Die Osteoklastenformation aus Calcr<sup>+/+</sup>-Knochenmarkszellen wird durch sCT und rCT deutlich inhibiert. Der hemmende Einfluss von CT auf die Formation von Osteoklasten ist in Knochenmarkskulturen aus Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen aufgehoben. (\*p < 0,05 im t-Test; n = 6)

Anschließend wurden Knochenmarkszellen in der Anwesenheit von sCT und rCT zu Osteoklasten differenziert und der Einfluss von CT auf die Osteoklastenformation analysiert.

Am Ende der Zelldifferenzierung konnte anhand der Anzahl von TRAP-positiven, multinukleären Osteoklasten der Effekt von Calcitonin beurteilt werden. Obwohl sCT und rCT einen stark inhibitorischen Effekt auf die Osteoklastogenese von *Calcr*<sup>+/+</sup>-Zellen ausübten, wurde die Formation von Osteoklasten aus Zellen von *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Calcitonin nicht beeinflusst (Abb. 10B).

Nachdem die Deletion von Exon 6 und 7 des *Calcr*-Gens zum Verlust der lang bekannten und oftmals reproduzierten Wirkung von CT auf die Funktion und die Formation von Osteoklasten führt, stellen die von Antje Hübner generierten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse ein exzellentes Modell dar, um den Effekt von CT auf den Knochenstoffwechsel *in vivo* näher zu untersuchen.

#### 4.3 Die Deletion des Calcitoninrezeptors führt zu einer gesteigerten Knochemasse.

Um die Auswirkungen des abwesenden CTR auf die Knochenhomeostase *in vivo* zu untersuchen, wurden von Kossa-Färbungen von nicht-dekalzifizierten Schnitten der Lendenwirbelkörper 3, 6 und 12 Monate alter *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse angefertigt. Der Verlust des CTR führte zu einem markanten Phänotyp, der in allen untersuchten Zeitpunkten eine deutlich veränderte Trabekelstruktur aufwies (Abb. 11).



**Abb. 11. Nicht-dekalzifizierte Schnitte der Lendenwirbelkörper von** *Calcr<sup>-/-</sup>***-Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten in der von Kossa Färbung.** Mineralisierter Knochen erscheint schwarz. Die Trabekel der *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse sind in allen Alterstufen feiner strukturiert als die der Kontrollgruppe. Im Alter von 3 und 6 Monaten weisen Mäuse ohne funktionellen CTR eine deutlich gesteigerte Knochenmasse in den Wirbelkörpern auf.

Die histomorphometrische Analyse zeigte eine gesteigerte Knochenmasse im Alter von 3 und 6 Monaten, die von einer erhöhten Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N) und einem erniedrigten Trabekelabstand (*trabecular spacing*, Tb.S) begleitet war. Die Dicke (*trabecular thickness*, Tb.Th) war in diesen Alterstufen unverändert. Im Alter von 12 Monaten war in

*Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen die Anzahl der Trabekel erhöht, während die Knochenmasse, die Trabekeldicke und auch der Trabekelabstand im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert waren (Abb. 12).



**Abb. 12. Strukturelle Knochenparameter von** *Calcr<sup>-/-</sup>***-Mäusen im Alter von 3, 6 und 12 Monaten.** Schon im Alter von 3 Monaten imponieren *Calcr<sup>-/-</sup>***-**Mäuse mit einer erhöhten Knochenmasse, die bis zum Alter von 6 Monaten nachweisbar ist und von einer erhöhten Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N) und einem erniedrigten Trabekelabstand (*trabecular spacing*, Tb.S) begleitet wird. Die Dicke der Trabekel (*trabecular thickness*, Tb.Th) ist in dieser Altersstufe nicht verändert. Im Alter von 12 Monaten findet sich einzig eine erhöhte Trabekelanzahl. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

## 4.4 Die Abwesenheit des Calcitoninrezeptors resultiert sowohl in einer gesteigerten Knochenresorption als auch in einer gesteigerten Knochenformation.

Obwohl die Analyse von 3 und 6 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen keinen Anhalt für eine gesteigerte Knochenresorption bot, führte die Defizienz von *Calcr* im Alter von 12 Monaten zu hyperostotischen Läsionen in der Kortikalis der Tibia, was kennzeichnend für eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung ist (Abb. 13 A). Gleichermaßen imponierten 12 Monate alte *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit einem signifikant erhöhten Serumspiegel von TRAP, einem Marker für erhöhte Knochenresorption (Abb. 13 B). Gegenläufig dazu war in 12 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen überraschenderweise eine signifikant erniedrigte Osteoklastenanzahl in den Wirbelkörpern zu beobachten (Abb 13 C).



**Abb. 13. Erhöhte Knochenresorption in** *Calcr*<sup>-/-</sup>**-Mäusen. A.** Die von Kossa Färbung der Tibia zeigt eine aufgelockerte und von Läsionen durchsetzte Knochenkortikalis in 12 Monate alten *Calcr*<sup>-/-</sup>Mäusen (oben). Die weitere Untersuchung anhand der TRAP-Färbung ergibt, dass es sich hierbei um hyperostotische Läsionen aufgrund erhöhter Osteoklastenaktivierung handelt (unten). **B.** Obwohl im Alter von 3 und 6 Monaten noch kein Unterschied erkennbar ist, führt die Abwesenheit des CTR in 12 Monate alten Mäusen zu erhöhten Serumwerten des Osteoklastenmarkers TRAP (Tracp5b). **C.** Interessanterweise lässt sich eine erniedrigte trabekuläre Anzahl an Osteoklasten in 12 Monate alten *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisen. In jüngeren Altersstufen ist keine Veränderung feststellbar. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

Ähnlich wie die Abwesenheit von Calcitonin führte auch die Deletion des Calcitoninrezeptors zu einer erhöhten Knochenformationsrate (Abb. 14). Die histomorphometrische Analyse ergab eine signifikant gesteigerte Knochenformation im Alter von 3, 6, und 12 Monaten.



**Abb. 14. Erhöhte Knochenformationsrate in** *Calcr<sup>-/-</sup>***-Mäusen. A.** Die Intensität der Calceinmarkierung ist in 6 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>***-Mäusen** deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (oben). Gleichermaßen findet sich ein vergrößerter Abstand der beiden Calceinbanden zueinander (unten). **B.** Die histomorphometrische Auswertung der Calceinbanden ergibt eine gesteigerte Knochenformationsrate in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen, die in allen untersuchten Altersklassen vorhanden ist. **C.** Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche. Trotz der gesteigerten Knochenformationsrate ist die Anzahl der Osteoblasten (*number of osteoblasts per bone perimeter*, NOb/BPm) in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht verändert. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

Die unterschiedliche Knochenformationsrate zeigt sich am Abstand und an der Intensität der beiden Calcein-Markierungen, die den Knochenzuwachs innerhalb von 5 Tagen repräsentieren (Abb. 14 A, B). Da die Osteoblastenanzahl in allen untersuchten Altersklassen nicht verändert war, ist als Ursache der gesteigerten Knochenzuwachsrate eine erhöhte Osteoblastenaktivität anzunehmen (Abb. 14 C).

## 4.5 Es gibt keine Hinweise für eine sekundäre Ursache des Knochenphänotyps von Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen.

Der Phänotyp von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen ist im Alter von 12 Monaten durch erhöhten Knochenumbau gekennzeichnet. Da ein Hyperparathyreoidismus ebenfalls zu erhöhtem Knochenumbau führt und CT als physiologischer Gegenspieler des PTHs gilt, mussten erhöhte PTH-Spiegel und eine damit verbundene Hyperkalzämie als Ursache des *Calcr<sup>-/-</sup>*-Phänotpys in Betracht gezogen werden. Die Serumanalysen von Kalzium und PTH ergaben jedoch in allen untersuchten Altersstufen keine Unterschiede (Abb. 15 A). Gleichermaßen fanden sich im Alter von 6 Monaten unveränderte Serumspiegel für Serotonin, einem von Darmzellen produzierten Hormon mit hemmendem Effekt auf die Osteoblastenaktivität (Yadav et al., 2008) (Abb. 15 B). Die Werte für Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of NF-κB Ligand (Rankl) zeigten in dieser Altersstufe ebenfalls keine Unterschiede (Abb. 15 D).

Da einige Studien einen Effekt von CT auf die Synthese von Vitamin D zeigen konnten (Murayama et al., 1999; Shinki et al., 1999; Zhong et al., 2009), wurde anschließend die Metabolisierung dieses Steroidhormons in Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen evaluiert. CT gilt als ein starker Aktivator der Expression von Cyp27B1, einem Enzym aus der Cytochrom P450-Enzym-Superfamilie. Cyp27B1 hydroxyliert in der Niere das Prohormon 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> zu 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und wandelt es dadurch in eine biologisch aktive Form um. Zum Ausschluss einer veränderten Produktion von Cyp27B1 wurde die Expressionsstärke dieses Gens in den Nieren von Calcr<sup>+/+</sup>- und Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert. Da 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> einer starken Metabolisierung unterliegt, wurde parallel dazu die renale Expression von Cyp24A1 untersucht. Cyp24A1 ist ebenfalls ein Enzym aus der Cytochrom P450-Enzym-Superfamilie und katalysiert nach klassischer Sichtweise den Abbau von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin  $D_3$  zum inaktiven 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin  $D_3$  (Sakaki et al., 2005). Während die Expression von Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen den Nieren von unbeeinflusst blieb. Cvp24A1 in konnten überraschenderweise eine erhöhte Expression von Cyp27B1 und tendenziell gesteigerte Serumspiegel von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> beobachtet werden (Abb. 15 C). Dies ist widersprüchlich zu den Studien, die einen stimulierenden Effekt von Calcitonin auf die Expression von Cyp27B1 in Nierenzellen beschrieben haben, da Calcr<sup>/-</sup>-Mäuse eigentlich



erniedrigte  $1,25(OH)_2$  Vitamin D<sub>3</sub> Werte aufweisen müssten. Interessanterweise scheint es also nicht der CTR zu sein, der diese Induktion vermittelt.

Abb. 15. Keine Hinweise auf eine sekundäre Ursache des Knochenphänotyps von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen. A. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt lässt sich eine veränderte Konzentration von Kalzium oder Parathormon (PTH) im Serum feststellen. B. Eine erniedrigte Konzentration des Osteoblastenhemmenden Serotonins liegt ebenfalls nicht vor. C. Während die Expression von Cyp24A1 in den Nieren von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht verändert ist, zeigt die RT-PCR eine Überexpression von Cyp27B1, die von tendenziell erhöhten Serumspiegeln von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (1,25 Vit D) begleitet ist. D. Die Serumkonzentrationen von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of NF-KB Ligand (Rankl) zeigten keine Auffälligkeiten. E. Abgesehen von einer tendenziellen Überexpression im Alter von 6 Monaten ist in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen keine signifikant erhöhte Serumkonzentration von CT zu beobachten. F. Die RT-PCR Analyse verschiedener Gewebe zeigt, dass *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse im Gegensatz zu *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen (Huebner et al., 2008) keine Überexpression des *Calcb*-Gens aufweisen. (\*p < 0,05 im t-Test, n > 5)

Häufig kommt es bei gentechnisch veränderten Mausmodellen mit defekten Rezeptorproteinen aufgrund verschiedener Feedback-Mechanismen zu einer kompensatorischen Überproduktion des Rezeptorliganden, sodass in den hier untersuchten Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen ein reaktiv erhöhter CT-Spiegel möglich wäre. Gleichermaßen besteht theoretisch die Möglichkeit, dass es einen bislang nicht identifizierten, zweiten Rezeptor für CT gibt, der Einfluss auf den Knochenmetabolismus nehmen könnte. Kompensatorisch erhöhte CT-Konzentrationen und die Existenz eines solchen Rezeptors könnten daher eine

Erklärung liefern, wieso es in 12 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu einer erniedrigten trabekulären Anzahl von Osteoklasten kommt. Abgesehen von tendenziell erhöhten CT-Werten in 6 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen konnten jedoch keine wesentlichen Unterschiede zu der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 15 E).

Da *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine Überexpression von *Calcb* aufweisen, ist es denkbar, dass auch in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine gesteigerte Expression dieses Gens vorliegt. Obwohl die Deletion von *Calcb* zu keinem ausgeprägten Knochenphänotyp führt, ist die Überexpression von *Calcb* als mögliche Ursache der erhöhten Knochenformation in *Calcr<sup>-/-</sup>*- und *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht ausgeschlossen (siehe Einleitung). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden RT-PCR Analysen verschiedener Gewebe durchgeführt, bei denen keine gesteigerte Expression von  $\beta$ CGRP in *Calcr<sup>-/-</sup>*- Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb. 15 F).

#### 4.6 Veränderte Stoffwechselparameter in weiblichen Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Nachdem viele Studien bislang eine Regulation des Knochenstoffwechsels durch systemisch zirkulierende Hormone beschrieben haben, konnte 2007 auch gezeigt werden, dass Knochen selbst als endokrines Organ fungiert (Lee et al., 2007). Mit Osteocalcin wurde ein knochenspezifisches Hormon gefunden, welches von Osteoblasten sezerniert wird und Einfluss auf die Regulation des Energiestoffwechsels nehmen kann. Unterkarboxyliertes Osteocalcin fördert die Insulinproduktion in pankreatischen ß-Zellen und verbessert die Glukosetoleranz. Zudem stimuliert es Fettzellen zur Sekretion von Adiponektin, das die Wirkung von Insulin in Zielzellen verbessert. Da die gesteigerte Osteoblastenaktivität in Calcr/--Mäusen mit einem veränderten Glukosemetabolismus einhergehen könnte, wurden Serumanalysen der wichtigsten Stoffwechselparameter durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse über Nacht nüchtern gehalten, um einen bestmöglichen Vergleich der basalen Parameterkonzentrationen zu ermöglichen. In der Tat wiesen 3 Monate alte Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant erniedrigte Glukosekonzentration auf, die von tendenziell erhöhten Insulinspiegeln begleitet wurde und nur in weiblichen Tieren auftrat. Während kein Unterschied des Cholesterinspiegels zu beobachten war, fand sich eine erniedrigte Konzentration von Triglyzeriden, die ebenfalls nur in weiblichen Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb. 16 A). In Anbetracht der veränderten Stoffwechselparameter wurde das Körpergewicht von Calcr<sup>-/-</sup>- und Kontrolltieren verglichen. Obwohl im Alter von 3 und 6 Monaten noch keine Unterschiede feststellbar waren, zeigten 12 Monate alte, weibliche Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht (Abb. 16 B). Um zu überprüfen, ob ein veränderter Glukosestoffwechsel tatsächlich durch eine gesteigerte Osteoblastenaktivität hervorgerufen werden könnte, wurden die Serumspiegel von Osteocalcin und Adiponektin gemessen. Sowohl unterkarboxyliertes Osteocalcin als



auch Adiponektin waren in *Calcr<sup>-/-</sup>-*Mäusen signifikant erhöht, wiederum aber nur in Weibchen (Abb. 16 C).

Abb. 16. Veränderte Stoffwechselparameter in weiblichen *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen. A. Obwohl in 3 Monate alten Männchen keine Auffälligkeiten zu beobachten sind, imponieren *Calcr<sup>-/-</sup>*-Weibchen mit einer signifikant erniedrigten Glukosekonzentration und tendenziell erhöhten Insulinspiegeln im Serum. Gleichermaßen ist nur in Weibchen eine erniedrigte Konzentration von Triglyzeriden festzustellen, während der Cholesterinspiegel nicht beeinflusst ist. **B.** Das Körpergewicht von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe im Alter von 3 Monaten (3M) und 6 Monaten (6M) unverändert, in 12 Monate (12M) alten Weibchen allerdings signifikant erniedrigt. **C.** Sowohl unterkarboxyliertes Osteocalcin als auch Adiponektin sind in weiblichen *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant erhöht. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 3)

## 4.7 *In vitro* Experimente an Osteoklasten ohne Calcitoninrezeptor bestätigen Hinweise auf einen bislang nicht identifizierten Rezeptor für Amylin.

Ein interessanter Nebenaspekt dieser Arbeit ist durch die Tatsache begründet, dass der CTR anhand von *in vitro* Experimenten als essentieller Bestandteil des Amylinrezeptors postuliert wurde (Morfis et al., 2008). Ausgehend von *in vivo* Untersuchungen stellten Daqucin et al. diese Hypothese jedoch in Frage und folgerten, dass es nicht der CTR sei, der die Effekte von Amy im Knochen vermittelt (Daqucin et al., 2004). Da Amy ein etablierter Inhibitor der Knochenresorption ist, wurde zunächst der Effekt von Amy auf die Funktion und Formation von Osteoklasten untersucht. Während Amy einen hemmenden Effekt auf die Dentinresorption von Osteoklasten mit funktionellem Calcitoninrezeptor aufwies, war dieser in Osteoklasten aus *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen aufgehoben (Abb 17 A, B). Als anschließend Knochenmarkszellen von *Calcr<sup>+/+</sup>*-Mäusen in der Anwesenheit von Amy zu Osteoklasten differenziert wurden und hiernach die Anzahl der TRAP-positiven, multinukleären Zellen bestimmt wurde, zeigte sich in Übereinstimmung mit bisher publizierten Studien eine

Hemmung der Osteoklastogenese. Erstaunlicherweise hatte Amy bei Knochenmarkszellen von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen immer noch einen stark inhibitorischen Effekt auf die Formation von Osteoklasten (Abb. 17 C, D). Um zu überprüfen, ob der hemmende Effekt auf *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten über einen Proteinkinase A abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird, wurde die intrazelluläre cAMP Konzentration nach Stimulation mit Amy gemessen. Überraschenderweise war der in *Calcr<sup>+/+</sup>*-Osteoklasten vorhandene Anstieg an intrazellulärem cAMP auch in Osteoklasten ohne funktionellen CTR zu beobachten (Abb. 17 E).



Abb. 17. Effekt von Amylin auf *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten. Toluidinblau Färbung von Dentinscheibchen (A) und statistische Auswertung der Resorptionsspuren von Osteoklasten (B), die in der Anwesenheit Amylin (Amy) kultiviert wurden. Während Amy einen hemmenden Effekt auf die Dentinresorption von Osteoklasten mit funktionellem CTR ausübt, ist dieser Effekt auf *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten nicht nachweisbar. **C**, **D**. TRAP-Färbung an Osteoklastenkulturen und Auszählung von TRAP-positiven, multinukleären Zellen pro Sichtfeld bei 40x Vergrößerung (/SF). Deutlich zu erkennen ist der inhibitorische Effekt von Amy auf die Formation von Osteoklasten mit funktionellem CTR. Der hemmende Effekt von Amy auf die Osteoklastogenese ist in Knochenmarkskulturen aus *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen interessanterweise auch vorhanden. **E.** Die Stimulation von *Calcr<sup>+/+</sup>*-Osteoklasten mit Amy führt zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, was erstaunlicherweise auch in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten zu beobachten ist. Nach klassischer Sichtweise ist der CTR essentieller Bestandteil des Amylinrezeptors, sodass Amy keinen Effekt auf *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten ausüben sollte. (\* bedeutet p < 0,05 im t-Test; n > 3)

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der CTR nicht für alle biologischen Effekte von Amy auf Osteoklasten essentiell ist. Die Tatsache, dass trotz totaler Abwesenheit des CTR ein signifikanter Anstieg von intrazellulärem cAMP hervorrgerufen wird, lässt darauf schließen, dass dieser bislang nicht identifizierte Rezeptor von Amy ein G-Protein gekoppelter Oberflächenrezeptor ist. Leider misslang der Versuch, die Identität dieses Rezeptors über eine enzymatische Vernetzung mit radioaktiv markiertem <sup>125</sup>I-Amylin und nachfolgender Sequenzierung näher zu charakterisieren.

## 4.8 Die Expressionsanalyse des Calcitoninrezeptors zeigt mögliche Mediatoren des Effekts von Calcitonin auf Osteoblastenaktivität.

Nachdem die Knochenformationsrate in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen ähnlich gesteigert ist wie die in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen, ist dieses Phänomen höchstwahrscheinlich durch die fehlende Interaktion von CT mit dem CTR und nicht durch einen etwaigen zellautonomen Defekt bedingt. Daher kann das Expressionsmuster des CTR Hinweise auf das Organ liefern, welches für den hemmenden Effekt von CT auf die Osteoblastenaktivität verantwortlich ist. Diesbezüglich wurde die Expression von *Calcr* in verschiedenen Organen und Zelltypen mittels RT-PCR analysiert. Es konnte eine spezifische Produktion von *Calcr* in Niere, Hypothalamus und Knochen nachgewiesen werden, wobei die Expression in Knochenzellen exklusiv auf Osteoklasten beschränkt war (Abb. 18).



Abb. 18. Expressionsanalyse des *Calcr*-Gens mit semi-quantitativer RT-PCR. Neben der Expression von *Calcr* in Niere und Hypothalamus ist auch ein positives Signal in Knochengewebe zu erkennen. Deutlich zeigt sich eine Expression des CTR in Osteoklastenkulturen (Ocl) ab Tag 6 der Differenzierung, während Osteoblastenkulturen aus Schädeldächern (Obl) zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung ein positives Signal zeigen.

Diese Expressionsanalyse deutete auf zwei potentielle Mediatoren des Effekts von CT auf knochenbildende Osteoblasten hin. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Leptin über Bindungsstellen im zentralen Nervensystem die Aktivität des sympathischen Nervensystems reguliert und dadurch einen hemmenden Effekt auf die Knochenformation ausüben kann, ist aufgrund der starken Expression von *Calcr* im Hypothalamus ein ähnlicher Mechanismus für CT denkbar. Gleichermaßen ist es aufgrund der hohen Expression von *Calcr* in Osteoklasten

möglich, dass CT in diesen Zellen die Produktion oder Freisetzung von Substanzen hemmt, die normalerweise die Aktivität von Osteoblasten stimulieren und somit die Knochenneubildung nach erfolgter Knochenresorption induzieren. Um eine potentielle Beteiligung von hypothalamischen Neuronen oder Osteoklasten am Effekt von CT auf die Osteoblastenfunktion zu untersuchen, wurde nachfolgend der CTR mithilfe der *Cre/LoxP*-Strategie in diesen beiden Zelltypen selektiv deletiert.

# 4.9 Die transgene Cre-Expression unter Kontrolle des *Camk2a*-Promotors und des *LysM*-Promotors führt zu einer zellspezifischen Deletion des Calcitoninrezeptors in Mäusen mit gefloxtem *Calcr*-Allel.

Um eine Deletion des CTR in den gewünschten Zielgeweben zu erreichen, wurden Mäuse mit gefloxtem *Calcr*-Allel (*Calcr*<sup>*fl*/*fl*</sup>) mit transgenen Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promotor exprimieren. Dies führt im Idealfall dazu, dass das gefloxte Allel nur in demjenigen Zelltyp deletiert wird, in dem der Promotor auch tatsächlich aktiviert wird. Eine Cre-Expression im Hypothalamus kann unter Kontrolle des *Camk2A*-Promotors (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii alpha*) erreicht werden, für den eine Expression in Hippocampus, Kortex, Amygdala, Striatum, Thalamus, und Hypothalamus beschrieben wurde (Casanova et al., 2001). Eine Cre-Expression unter Kontrolle des *LysM*-Promotors (*lysozyme M*) dagegen findet sich in Granulozyten und besonders in Monozyten, aus denen sich Osteoklasten entwickeln (Clausen et al., 1999).

Um den Erfolg dieser Strategie zu überprüfen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Geweben und Zellkulturen extrahiert und auf die Rekombination des gefloxten Allels hin untersucht. Hier zeigte sich, dass in *Cre<sup>Camk2</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen das *Calcr*-Gen vorwiegend im Hypothalamus deletiert wurde, was von einer mäßigen Deletion im Kortex des Gehirns begleitet war. Außerhalb des zentralen Nervensystems konnte keine Rekombination von *Calcr* detektiert werden. Auch die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des LysM-Promotors zeigte eine hohe Spezifität. Neben der Deletion des CTR in reifen Osteoklastenkulturen konnte in *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen eine Rekombination nur in der Milz festgestellt werden. Die Milz enthält neben Erythrozyten viele Monozyten und Makrophagen, die die Vorstufe der Osteoklasten darstellen (Abb. 19 A).

Nachfolgend wurde die Spezifität der *Cre*-vermittelten Deletion in *Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen auf Proteinebene überprüft. Immunhistologische Färbungen mit einem spezifischen Antikörper bestätigten die Deletion des CTR im Hypothalamus von *Cre*<sup>*Camk2*</sup>/*Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen, wohingegen die Expression des Rezeptorproteins in diesem Gewebe in *Cre*<sup>*LysM*</sup>/*Calcr*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen unbeeinflusst blieb (Abb. 19 B). Gleichermaßen zeigten nur *Cre*<sup>*LysM*</sup>/*Calcr*<sup>fl/fl</sup>-Osteoklasten eine signifikant erniedrigte Bindung von <sup>125</sup>I-sCT, während die Affinität von <sup>125</sup>I-sCT zu Osteoklasten aus *Cre*<sup>*Camk2*</sup>/*Calcr*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen nicht verändert war (Abb. 19 C).



Abb. 19. Untersuchung der Spezifität von konditionalen Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen. A. PCR Untersuchung von genomischer DNA aus  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ - und  $Cre^{LysM}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen. Die PCR mit Primern spezifisch für das gefloxte *Calcr*-Allel (rote Pfeile) und das rekombinierte *Calcr*-Allele (roter und blauer Pfeil) zeigen, dass die Cre-vermittelte Rekombination unter Kontrolle des Camk2a-Promotors nur in Hypothalamus und Kortex stattgefunden hat, während  $Cre^{LysM}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäuse eine spezifische Deletion des CTR in Milz und differenzierten Osteoklasten aufweisen. Als Kontrolle dienen  $Calcr^{-/-}$ -Mäuse **B.** Immunhistologie von Hypothalami mit einem CTR-spezifischen Antikörper. In  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ - Mäusen zeigt sich eine spezifische Deletion des Rezeptors nur im Hypothalamus, wohingegen die Expression in  $Cre^{LysM}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen in diesem Gewebe unbeeinflusst bleibt. Als Kontrolle dienen  $Cre^{-}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäuse. **C.** Die Bindungsstudie mit <sup>125</sup>I-sCT an Osteoklasten zeigt eine spezifische Deletion des CTR in  $Cre^{LysM}/Calcr^{fl/fl}$ -Osteoklasten, ersichtlich an der signifikant erniedrigten <sup>125</sup>I-sCT Bindung, während die Bindung an Osteoklasten aus  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Als Kontrolle dienten  $Cre^{-}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäuse. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 3)

# 4.10 Die Deletion des Calcitoninrezeptors in hypothalamischen Neuronen resultiert in keinem ausgeprägten Knochenphänotyp und hat weder einen Effekt auf die Knochenformation noch auf die Knochenresorption.

Die Mäuse mit selektiver Ablation des CTR im Hypothalamus wiesen einen außerordentlich blanden Knochenphänotyp auf (Abb. 20 A). Anhand von strukturellen Knochenparametern ließ sich eine milde Osteopenie in 6 Monate alten *Cre<sup>Camk2</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen feststellen, wobei die restlichen Knochenparameter wie Anzahl, Dicke, und Abstand der Trabekel nicht verändert waren. Im Alter von 12 Monaten war keinerlei Unterschied der untersuchten Strukturparameter feststellbar (Abb. 20 B). Die dynamische Histomorphometrie ergab eine unveränderte Knochenzuwachsrate in beiden untersuchten Altersklassen (Abb. 21 A). Im Gegensatz zu 12 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen waren die Serumwerte für den Osteoklastenmarker TRAP zu diesem Zeitpunkt in *Cre<sup>Camk2</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen unverändert (Abb. 21 B).



Abb. 20. Knochenhistologien und Strukturparameter in 6 und 12 Monate alten  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen. A. Abgesehen von einer milden Osteopenie im Alter von 6 Monaten hat die Deletion des CTR im Hyopthalamus keinen Einfluss auf die Knochenmasse und die Morphologie der Wirbelkörper. B. Die histomorphometrische Auswertung der Strukturparameter ergibt eine leichte Verminderung der trabekulären Knochenmasse in 6 Monate alten  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen (+) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $Cre^{-}/Calcr^{fl/fl}$ , -), die im Alter von 12 Monaten unbeeinflusst ist. Ansonsten sind in beiden Altersklassen keine Unterschiede bezüglich der Anzahl, der Dicke und des Abstands der Trabekel zu beobachten. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

Nachdem *Cre<sup>Camk2</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine veränderte Knochenformation oder Knochenresorption aufweisen, scheint die Expression des CTR im Hypothalamus für den Knochenstoffwechsel von geringer Bedeutung und macht eine kausale Beteiligung am markanten Phänotyp der *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen unwahrscheinlich.



Abb. 21. Die Hypothalamus-spezifische Deletion des Calcitoninrezeptors beeinflusst weder die Knochenresorption noch die Knochenformation. Die Bestimmung der Knochenformationsrate anhand der Calceinmarkierung (A) und die Messung von TRAP im Serum (B) geben keinen Hinweis auf eine veränderte Knochenformation oder Knochenresorption in  $Cre^{Camk2a}/Calcr^{fl/fl}$ - Mäusen (+) im Vergleich zu den  $Cre^{-/Calcr^{fl/fl}}$ -Mäusen (Kontrolle, -). (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

## 4.11 Die zellspezifische Deletion des Calcitoninrezeptors in Osteoklasten resultiert in erhöhter Knochenmasse aufgrund gesteigerter Knochenformationsrate.

Während in 6 Monaten alten *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen keine morphologischen oder strukturellen Auffälligkeiten der Wirbelkörper zu beobachten waren, brachte die Analyse von 12 Monate alten Mäusen mit Osteoklasten-spezifischer Deletion von *Calcr* einen ausgeprägten Phänotyp zum Vorschein, der die Trabekelstruktur von *Calcr<sup>-/-</sup>*- und *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen widerspiegelte. (Abb. 22 A). Anhand der strukturellen Knochenparameter ließ sich eine signifikant gesteigerte Knochenmasse in 12 Monate alten *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen beobachten, welche von einer erhöhten Trabekelanzahl begleitet war. Die restlichen Strukturparameter blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe in dieser Altersgruppe unverändert (Abb. 22 B).



Abb. 22. Knochenhistologien und Strukturparameter von 6 und 12 Monate alten *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen. A. In der von Kossa Färbung der Lendenwirbel sind im Alter von 6 Monaten keine Auffälligkeiten zu beobachten, während 12 Monate alte Mäuse mit Osteoklasten-spezifischer Deletion des *Calcr*-Gens eine erhöhte Knochenmasse und eine feinere Trabekelstruktur aufweisen. B. Die histomorphometrische Analyse der Wirbelkörper ergibt ein signifikant gesteigertes Knochenvolumen in 12 Monate alten *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen (+), welches von einer Erhöhung der Trabekelanzahl begleitet ist. Alle anderen Strukturparameter weichen in beiden Altersklassen nicht von denen der *Cre<sup>-</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>* (Kontrolle, -) ab. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

Die histomorphometrische Auswertung der Calceinmarkierungen konnte eine zu allen untersuchten Zeitpunkten gesteigerte Knochenformationsrate in *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen demonstrieren, was die erhöhte Knochenmasse im Alter von 12 Monaten erklärt (Abb. 23 A). Nachdem es in 12 Monate alten *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen zu einem tendenziellen Anstieg der Serumwerte von TRAP kommt, die für eine Erhöhung der Knochenresorption sprechen (Abb. 23 B), rekapitulieren Mäusen mit Osteoklasten-spezifischer Deletion von *Calcr* in dieser Altersstufe den Knochenphänotyp von *Calcr<sup>-/-</sup>*-und *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöhte Knochenformationsrate in *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen

identifizieren den Osteoklasten als Vermittler des hemmenden Effekts von CT auf die Osteoblastenfunktion.



Abb. 23. Die spezifische Deletion des Calcitoninrezeptors in Osteoklasten führt zu einer gesteigerten Knochenformation. A. Die duale Calceinmarkierung zeigt eine gesteigerte Knochenzuwachsrate in 6 und 12 Monate alten  $Cre^{LysM}/Calcr^{fl/fl}$ -Mäusen (+) gegenüber  $Cre^{-/Calcr^{fl/fl}}$ -Mäusen (-). B. Die Deletion von *Calcr* in Osteoklasten führt im Alter von 12 Monaten zu einem tendenziellen Anstieg des Osteoklastenmarkers TRAP. (\*p < 0,05 im t-Test; n > 5)

#### 4.12 Der Effekt von Calcitonin auf die Genexpression in Osteoklasten.

Da die Deletion des CTR in Osteoklasten mit einer erhöhten Knochenformationsrate in vivo assoziiert ist, scheint CT über Calcr die Freisetzung von osteoanabolen Substanzen aus Osteoklasten die Osteoblastenfunktion zu inhibieren. Um ein genaueres Verständnis der Wirkung von CT am CTR zu erlangen, wurden Osteoklasten mit CT stimuliert und auf etwaige Veränderungen der Genexpression mittels einer Microarray-Analyse untersucht. Hierdurch lassen sich zwei verschiedene Dinge simultan näher analysieren. Zum einen können mögliche molekulare Mechanismen aufgedeckt werden, über die der CTR die Inhibition der Knochenresorption vermittelt. Obwohl der Effekt von CT auf Osteoklasten gut dokumentiert wurde, sind die molekularen Mechanismen auf genomischer-Ebene noch verhältnismäßig unklar. Beim Abschluss dieser Arbeit war einzig bekannt, dass CT die Expression von Calcr in Osteoklasten reprimiert und die von Crem induziert. Zum anderen können Rückschlüsse auf die Identität von Substanzen gezogen werden, die die Kopplung von Knochenformation an die Osteoklastenaktivität erklären könnten. Ausgehend von der Analyse der Mäuse mit Osteoklasten-spezifischer Calcr-Deletion müsste die Expression derartiger Substanzen durch CT in Calcr<sup>+/+</sup>-Osteoklasten reduziert werden, in Calcr<sup>-/-</sup> Osteoklasten dagegen unbeeinflusst bleiben.

Für die Microarray-Analyse wurden daher Osteoklasten mit und ohne funktionellen Calcitoninrezeptor mit 10<sup>-7</sup>M rCT stimuliert und die RNA nach 6h Inkubation auf eine veränderte Genexpression hin untersucht.

Gen	+/+			-/-			
	Kontrolle	rCT	SLR	Kontrolle	rCT	SLR	Funktion
Tracp5	9897	11302	+0,2	9454	10597	+0,1	Osteoklastenmarker
Ctsk	11124	11389	+0,2	10011	10884	+0,1	Abbau von Kollagen im Knochen
Clcn7	779	705	-0,1	850	893	+0,1	Osteopetrose Mutation
Tcirg1	2992	3543	+0,1	2332	3119	+0,1	Osteopetrose Mutation
Sqstm1	5409	5574	+0,1	5393	5797	+0,1	Mutation in M. Paget
Pscdbp	89	692	+3,7	94	91	-0,1	Hämatopoese
2310016C08Rik	311	2360	+2,8	288	307	+0,1	unbekannt
Fhod3	39	129	+1,5	25	24	+0,2	Aktin Organisation
Ramp3	150	389	+1,3	143	147	+0,2	Co-Rezeptor für den Calcitoninrezeptor
Got1	967	2299	+1,2	945	1089	+0,1	Aminosäure Metabolismus
Crem	237	599	+1,2	244	285	+0,1	Makrophagen-/Osteoklastenfuktion
Tspan13	315	661	+1,0	299	310	0	Differenzierung von Prä-Osteoklasten
Cd14	2408	4579	+1,0	3320	3214	0	Co-Rezeptor für LPS-Erkennung
Gpr35	65	107	+0,9	80	71	-0,2	Onkogen?
Uck2	216	436	+0,9	186	179	0	DNA und RNA Synthese
Pip5k1b	109	18	-2,4	73	75	+0,1	Aktin Umbau/Phagozytose
Mst1r	326	131	-1,3	300	340	+0,2	Makrophagen Regulation
Calcr	339	142	-1,3	25	28	0	Osteoklastenhemmung
Svs7	81	35	-1,3	84	101	+0,2	unbekannt
Taf9b	240	97	-1,0	188	194	0	unbekannt
Car3	112	44	-0,9	75	63	-0,1	Ionentransport und pH Hämostase
Spns2	331	183	-0,8	293	305	+0,2	S1P Transport
Myo1b	316	199	-0,7	254	289	+0,2	Aktin Motilität
1110067D22Rik	332	209	-0,7	289	298	+0,1	unbekannt
Kbtbd11	2617	1462	-0,7	2102	2577	+0,2	unbekannt
Cyp24A1	1977	1468	-0,4	2507	2395	-0,1	Vitamin D Stoffwechsel

Tab. 2. Microarray-Analyse des Effekts von Ratten-Calcitonin (rCT) auf die Genexpression von Osteoklasten. Als Kontrolle wurden Osteoklasten mit deletiertem Calcitoninrezeptor benutzt (-/-). Wie in den oberen Reihen dargestellt, hat CT keinen Effekt auf die Expression verschiedener Gene, die von essentieller Bedeutung für Osteoklastenformation und -funktion sind. Die mittleren Reihen zeigen eine Auswahl von Genen, deren Expression in Calcr<sup>+/+</sup>-Osteoklasten durch CT induziert wird. Unten sind diejenigen Gene dargestellt, deren Expression durch CT in *Calcr*<sup>+/+</sup>-Osteoklasten reprimiert wird. Gezeigt sind nur die Gene, deren Expression in Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten unbeeinflusst blieb und deren Regulation durch CT in einem separaten Experiment mittels RT-PCR bestätigt werden konnten (für eine Auswahl siehe Abb. 17). Tracp5 (Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b), Ctsk (Cathepsin K), Clcn7 (Chloride channel 7), Tcirg1 (T-cell, immune regulator 1, ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A3), Sqstm1 (Sequestosome 1), Pscdbp (Pleckstrin homology, Sec7 and coiledcoil domains, binding protein), 2310016C08Rik (RIKEN cDNA 2310016C08 gene), Fhod3 (formin homology 2 domain containing 3), Ramp3 (receptor activity modifying protein 3), Got1 (glutamate oxaloacetate transaminase 1), Crem (cAMP responsive element modulator), Tspan13 (tetraspanin 13), Cd14 (CD14 antigen), Gpr35 (G protein-coupled receptor 35), Uck2 (uridine-cytidine kinase 2), Pip5k1b (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta), Mst1r (macrophage stimulating 1 receptor), Calcr (Calcitoninreceptor), Svs7 (seminal vesicle secretory protein 7), Taf9b (TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein-associated factor ), Car3 (carbonic anhydrase 3), Inppl1 (inositol polyphosphate phosphatase-like 1), Spns2 (spinster homolog 2), Myo1b (myosin IB ), 1110067D22Rik (RIKEN cDNA 1110067D22 gene), Kbtbd11 (kelch repeat and BTB domain containing 11), Cyp24A1 (cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1)

Bei der Auswertung der Proben zeigte sich interessanterweise, dass CT keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von verschiedenen Genen ausübt, die essentiell für die Funktion von Osteoklasten sind. Hierzu zählen beispielsweise *Ctsk, Clcn7* oder *Tcirg*, deren Mutation

im Menschen und im Tiermodel zu einer Osteopetrose führt. Obwohl CT ein potenter Inhibitor der Knochenresorption ist und sowohl die Funktion als auch die Formation von Osteoklasten hemmt, wurde die Expression dieser Gene durch Calcitonin nicht verändert (Tab. 2, obere Reihe).

Als nächstes wurden diejenigen Gene analysiert, deren Expression durch CT entweder verstärkt oder vermindert wurde. In die nähere Auswahl gelangten nur solche Gene, die in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten keiner Regulation durch CT unterlagen und deren Expressionsverhalten sich in einem separaten Experiment bestätigen ließ (eine Auswahl davon findet sich in Abb. 24, linke Spalte). *Crem* und *Calcr*, die einzigen bislang bekannten Zielgene von CT in Osteoklasten (Inoue et al., 1999; Yang & Kream 2008;), zeigten auch in diesem Experiment ein entsprechendes Expressionsverhalten, sodass davon auszugehen ist, dass die Genchip-Analyse funktioniert hat. Neben *Crem* und *Calcr* konnte noch eine Reihe von anderen Genen identifiziert werden, deren Expression durch CT induziert (Tab. 2, mittlere Reihe) bzw. vermindert wird (Tab. 2, untere Reihe).



Abb. 24. RT-PCR Untersuchung von Genen, die durch Calcitonin reguliert werden. Die in der Microarray-Analyse identifizierten Gene werden in Osteoklasten auch in einem separaten Experiment durch Ratten-Calcitonin (rCT) und Lachs-Calcitonin (sCT) reguliert (linke Spalte). In einer Auswahl verschiedener Gewebe zeigen bis auf Pip5k1b alle untersuchten Gene eine deutliche Expression im Knochen, werden ansonsten aber auch unspezifisch in anderen Geweben exprimiert (mittlere Spalte). Während Crem und Pscdbp sowohl in Osteoklasten als auch in Osteoblasten zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung exprimiert werden, ist die Produktion von 2310016C08Rik auf Osteoklastenvorläufer beschränkt. Die Expression von Tspan13 nimmt im Laufe der Osteoklastendifferenzierung ab, zeigt aber kein charakteristisches Profil während der Osteoblastendifferenzierung. Im Gegensatz dazu steigt die Expression von Fhod3 interessanterweise im Laufe der Osteoblastendifferenzierung deutlich an. 1110067D22Rik und Myo1b werden sowohl in Osteoklasten als auch in Osteoblasten exprimiert, während Car3-mRNA vorwiegend und in allen Stadien der Osteoblastendifferenzierung produziert wird. Die Expression von Taf9b steigt während der Osteoklastenund Osteoblastendifferenzierung an, wohingegen die von Pip5k1b während der Osteoklastendifferenzierung reduziert wird (rechte Spalte).

Um die identifizierten Gene näher zu charakterisieren, wurde für eine Auswahl ein Expressionsmuster in verschiedenen Geweben erstellt und die Expression in kultivierten Knochenzellen näher untersucht. Während alle untersuchten Gene eine positive Expression in Knochengewebe zeigten, konnte für die meisten keine Spezifität bezüglich des Expressionsgewebes festgestellt werden (Abb. 24 mittlere Spalte). Im Gegensatz dazu konnte ein spezifisches Expressionsmuster für einige Gene innerhalb von differenzierten Osteoklasten- und Osteoblastenkulturen beobachtet werden (Abb. 24 rechte Spalte). Da aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen *in vivo* Daten primär potentielle Kopplungsfaktoren identifiziert werden sollten, wurden diejenigen Gene, deren Expression durch CT reprimiert wird, einer ausführlichen Literaturrecherche unterzogen. Dabei konnten mindestens drei potentiell anabole Substanzen identifiziert werden, die für eine Kopplung von Knochenformation an die Knochenresorption in Frage kommen.

#### 4.13 Cyp24A1 – eine Verbindung zwischen Calcitonin und Vitamin D.

Ein Zielgen von CT in Osteoklasten ist überraschenderweise *Cyp24A1*, welches eine wichtige Rolle im Metabolismus von Vitamin D spielt. Cyp24A1 ist ein intrazelluläres Enzym aus der Cytochrom P450 Familie und katalysiert die Umwandlung von  $1,25(OH)_2$  Vitamin D<sub>3</sub> zu  $1,24,25(OH)_3$  Vitamin D<sub>3</sub>. Interessanterweise konnte für *Cyp24A1* eine spezifische Expression in Osteoklastenkulturen ab Tag 6 der Differenzierung nachgewiesen werden, wohingegen Osteoblasten zu keinem Zeitpunkt ein positives Signal aufwiesen (Abb. 25). Für Cyp27B1, welches für die Umwandlung 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> zu  $1,25(OH)_2$  Vitamin D<sub>3</sub> verantwortlich ist, konnte einzig in Nierengewebe eine Expression nachgewiesen werden. Nachdem in einer 2006 veröffentlichten Studie ein stark osteoanaboler Effekt von  $1,24,25(OH)_3$  Vitamin D<sub>3</sub> auf Osteoblasten über die Expression von *Cyp24A1* die extrazelluläre Konzentration von  $1,24,25(OH)_3$  Vitamin D<sub>3</sub> regulieren und somit eine parakrine Wirkung auf die Knochenformation ausüben.





#### 4.14 Svs7, ein Osteoklasten-spezifisches Protein mit osteoanaboler Wirkung?

Im Gegensatz zu vielen Genen, deren Expression durch CT in Osteoklasten vermindert wird, ist Svs7 (seminal vesicle secretory protein 7) aufgrund seiner Struktur ein wasserlösliches Peptid und wird in den extrazellulären Raum sekretiert (Luo et al., 2001). Da somit ein direkter parakriner Einfluss von Osteoklasten auf Osteoblasten möglich wäre, ist dieses Protein ein interessanter Kandidat für die Kopplung von Knochenformation an Knochenresorption. Die Expressionsanalyse von *Svs7* in verschiedenen Geweben mittels Northern Blot zeigte ein hochspezifisches Signal in Prostata und Samenbläschen, wobei keine Expression in Osteoklasten nachweisbar war (Abb. 26 A). Jedoch konnte in der sensitiveren RT-PCR gezeigt werden, dass *Svs7* in einer Auswahl von Geweben spezifisch im Knochengewebe und dort nur in den Osteoklasten exprimiert wird (Abb. 26 B).



Abb. 26. Expressionsanalyse von Svs7 und Generierung eines Konstrukts zur leberspezifischen Überexpression. Die Northern Blot Analyse mit einer Svs7-spezifischen Sonde zeigt eine hochspezifische Expression von Svs7 in Prostata und Samenbläschen (A), wohingegen die sensitivere RT-PCR (B) Svs7-mRNA auch in Knochengewebe (links) und dort exklusiv in Osteoklasten (rechts) nachweist. C. Der reprimierende Effekt von CT auf die Expression von Svs7 wurde in einem separaten Experiment bestätigt. D. Kopplung der Svs7-cDNA an den Leberspezifischen Promotor ApoE. NotI und Spel sind die Schnittstellen, mit denen später das Konstrukt aus dem Vektor zur Injektion in Pronuclei ausgeschnitten wurde.

Desweiteren wurde der regulatorische Effekt von CT auf die mRNA-Produktion dieses Gens in einem separaten Experiment bestätigt (Abb. 26 C). Die spezifische Expression in Osteoklasten lässt auf eine mögliche Rolle von Svs7 im Knochenstoffwechsel schließen. Um diese näher zu charakterisieren, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das *Svs7* unter Kontrolle des leberspezifischen Promotors ApoE überexprimiert (Abb. 26 D). Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnten leider keine transgenen Nachkommen identifiziert werden.

## 4.15 Spns2 als möglicher Vermittler des hemmenden Effekts von Calcitonin auf die Knochenformation.

Neben Cyp24A1 und Svs7 konnte mit Spns2 (spinster homolog 2) ein weiteres Gen identifiziert werden, dessen Expression durch Calcitonin reprimiert wird und deshalb Teil eines möglichen Kopplungsmechanismus zwischen Osteoblasten und Osteoklasten darstellen könnte. Spns2 ist ein Transmembranprotein, das den Transport von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) von intra- nach extrazellulär erlaubt (Kawahara et al., 2009). S1P ist ein Phospholipid, das durch die Sphingosin-1-Kinase produziert wird und an der Regulation von verschiedenen intra- und extrazellulären Prozessen teilnimmt. Dieses verhältnismäßig kleine Molekül steuert beispielsweise Angiogenese, T-Zell Migration und Zellproliferation (Kim et al., 2009). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression der Sphingosine-1-Kinase während der Osteoklastogenese kontinuierlich ansteigt und S1P aufgrund osteoanaboler Eigenschaften eine mögliche Rolle in der Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten spielt (Pederson et al., 2008). Demnach ist es vorstellbar, dass CT über die Expression von Spns2 in Osteoklasten den Auswärtstransport von S1P reguliert und somit die Knochenformation steuern kann. Um den Effekt von CT auf Spns2 näher zu untersuchen, wurden Osteoklasten für eine Dauer von 3, 12 und 24 Stunden mit CT stimuliert und danach die Expression von Spns2 mittels Real-Time PCR gemessen. Als Kontrolle diente die Expression von Calcr, einem bekannten Zielgen von CT in Osteoklasten, welche schon nach einem Zeitraum von 3 Stunden signifikant reduziert und sich einem basal niedrigen Spiegel innerhalb von 24 Stunden angenähert hatten. Während eine deutliche Suppression von Spns2 in Calcr<sup>+/+</sup>-Osteoklasten zu allen untersuchten Zeitpunkten beobachtbar war, hatte die Stimulation von Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten mit CT keinen Effekt mehr auf die Expression von Spns2 (Abb. 27 A).

Um zu überprüfen, ob der beschriebene Anstieg der Sphingosin-1-Kinase während der Osteoklastendifferenzierung mit einer erhöhten extrazellulären Konzentration von S1P assoziiert ist, und ob CT diese beeinflussen kann, wurde die S1P-Konzentration in konditionierten Medien von Osteoklastenvorläufern (Kontrolle) und reifen Osteoklasten verglichen. In der Tat wies das Medium von reifen *Calcr<sup>+/+</sup>*- und *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten eine deutlich erhöhte Konzentration an S1P im Vergleich zum Medium der Kontrollgruppe auf. Gleichermaßen zeigte sich, dass die Konzentration von S1P im Medium von *Calcr<sup>+/+</sup>*-

Osteoklasten nach Stimulation mit CT abnahm, während der Gehalt von S1P im Medium von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten keine Veränderung aufwies (Abb. 27 B).

Ausgehend vom Phänotyp der *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse ist es ersichtlich, dass Osteoklasten einen stimulierenden Effekt auf Osteoblasten durch osteoanabole Substanzen ausüben, deren Freisetzung durch CT gehemmt wird. Eine solche Substanz könnte S1P sein, die von reifen Osteoklasten durch die Sphingosin-1-Kinase produziert und deren Sekretion durch CT reguliert wird. Sollte S1P, zumindest zum Teil, die Kopplung von Knochenformation an Knochenresorption vermitteln, so müsste, aufgrund der darin enthaltenen S1P-Konzentration, das Medium von reifen Osteoklasten einen stärkeren Effekt auf die Osteoblastenaktivität aufweisen als das Medium von Osteoklastenvorläufern (Kontrolle) oder mit CT behandelten



Abb. 27. Spns2 als möglicher Vermittler des hemmenden Effekts von Calcitonin auf die Knochenformation *in vitro*. A. Die Expressionsanalyse von *Spns2* in *Calcr<sup>+/+</sup>*- und *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten nach Stimulation mit 10<sup>-7</sup>M CT (rCT) für 0, 3, 12, und 24 Stunden mittels qRT-PCR Analyse bestätigt die Ergebnisse aus dem Microarray. Während CT die Expression von *Spns2* in *Calcr<sup>+/+</sup>*-Osteoklasten nachhaltig herunter reguliert, ist dieser Effekt in Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten komplett aufgehoben. Als Kontrolle wurde parallel die Expression von *Calcr*, einem bekannten Zielgen von Calcitonin, in *Calcr<sup>+/+</sup>*-Osteoklasten untersucht. **B.** Die Konzentration von S1P ist im Überstand von reifen Osteoklasten in der Anwesenheit von CT kultiviert, kommt es nur noch im Medium von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten zu einem signifikanten Anstieg der S1P Konzentration. **C.** Konditioniertes Medium von reifen Osteoklastenkulturen (-) übt im Gegensatz zu konditioniertem Medium von undifferenzierten Knochenmarkszellen (K) einen stark mineralisationsfördernden Effekt auf Osteoklasten unter Zugabe von CT, ist der osteoanabole Effekt des konditionierten Mediums nicht mehr zu beobachten. (\*p < 0,05, n > 3)

überprüfen, Osteoklasten. Um diese Hypothese zu wurde der Effekt von Osteoklastenmedium auf die Mineralisationseigenschaften primärer Osteoblasten analysiert. Im Vergleich zum Medium der Kontrolle zeigte das Medium von reifen Osteoklasten eine stark stimulierende Wirkung auf primäre Osteoblasten, sodass eine gesteigerte Mineralisation zu beobachten war (Abb. 27 C). Medium von reifen Osteoklasten, die mit CT behandelt wurden, hatte dagegen keinen osteoanabolen Effekt mehr. Die Behandlung primärer Osteoblastenkulturen mit Rankl, M-CSF und CT hatte keinen Effekt auf die Mineralisationseigenschaften der Zellkulturen und hat somit den beobachteten Effekt nicht verfälscht (Daten nicht gezeigt). Nachdem der Effekt des konditionierten Mediums auf die Mineralisation primärer Osteoblasten mit der darin enthaltenen S1P-Konzentration korreliert, erscheint eine Rolle von S1P für die Knochenformation durchaus plausibel. Da die Sekretion von S1P vom Transporterprotein Spns2 abhängig ist, wurde das Expressionsmuster von Spns2 in einer Auswahl verschiedener Gewebe und Knochenzellen untersucht. Obwohl Spns2 in allen untersuchten Gewebeproben und auch in Osteoblasten detektierbar war, zeigte sich dennoch ein deutlicher Anstieg der Expression von Tag 0 zu Tag 6 während der Osteoklastendifferenzierung, was neben dem beschriebenen Anstieg der Sphingosine-1-Kinase die unterschiedlichen S1P-Konzentrationen im Medium von Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten erklärt (Abb. 28).

Sollte von Osteoklasten sezerniertes S1P tatsächlich Einfluss auf die Knochenformation nehmen können, so müssten Osteoblasten einen Rezeptor für dieses Molekül exprimieren. Bislang konnten fünf G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren für S1P (S1pr1-5) identifiziert werden, deren Expression in verschiedenen Geweben und in Knochenzellen nachfolgend analysiert wurde (Abb. 28). S1pr1 und S1pr2 zeigten eine nahezu ubiquitäre Expression in den untersuchten Proben, was nicht auf eine spezifische Rolle dieser Rezeptoren in der Regulation der Knochenformation schließen lässt. Interessanterweise eine kontinuierlich zunehmende Expression von S1pr3 während konnte der Osteoblastendifferenzierung nachgewiesen werden, die von einem spezifischen Signal im Knochengewebe, Niere und Milz begleitet war. S1pr4 und S1pr5 hingegen wurden nicht in Osteoblasten exprimiert, sodass ein direkter Einfluss dieser beiden Rezeptoren auf die Aktivität von knochenbildenden Osteoblasten unwahrscheinlich ist.



Abb. 28. Expressionsanalyse von Spns2 und den Rezeptoren für S1P (S1pr1-5). Obwohl Spns2 eine unspezifische Expression in allen untersuchten Geweben zeigt, ist ein tendenzieller Anstieg während der Osteoklastendifferenzierung und eine Expression in allen Stadien der Osteoblastendifferenzierung zu beobachten. Während S1pr1 und S1pr2 nahezu ubiquitär exprimiert werden, zeigt S1pr3 ein spezifisches Expressionsmuster in Niere, Milz und Knochen. Interessanterweise steigt die Expression in Osteoklasten- und Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert und zeigt eine mäßige Expression im Knochengewebe und der Milz. Eine Expression von S1pr5 konnte vorwiegend in Hirngewebe, Leber und Milz detektiert werden, wohingegen kein Signal in Knochengewebe oder Knochenzellen vorhanden war.

## 4.16 *S1pr3*-defiziente Mäuse haben eine erniedrigte Knochenmasse aufgrund gestörter Knochenformation.

Da das spezifische Expressionsmuster von *S1pr3* auf eine mögliche Rolle dieses Rezeptors im Knochenstoffwechsel hindeutet, wurde anschließend der Knochenphänotyp von *S1pr3*defizienten Mäuse analysiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe imponierten 6 Monate alte *S1pr3*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer deutlichen Osteopenie, die sowohl in den histologischen Schnitten als auch in der 3-dimensionalen Darstellung mittels  $\mu$ CT zu beobachten war (Abb. 29 A). Die histomorphometrische Auswertung zeigte eine signifikant erniedrigte Knochenmasse, die durch eine verminderte Dicke, eine reduzierte Trabekelanzahl und einen erhöhten Trabekelabstand charakterisiert war (Abb. 29 B). Die veränderte Knochenstruktur in *S1pr3*<sup>-/-</sup> Mäusen führte dazu, dass die Knochen bei biomechanischer Testung weniger Kraft bis zum Bruch aushielten (Abb. 29 C).



Abb. 29. Knochenstruktur von 6 Monate alten  $S1pr3^{-7}$ -Mäusen. A. Die von Kossa Färbung der Lendenwirbel beweist eine erhebliche Osteopenie in  $S1pr3^{-7}$ -Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (oben). Auch in der 3-dimensionalen Darstellung mittels µCT weisen Wirbel von S1pr3-defizienten Mäusen eine stark reduzierte Knochenmasse auf (unten). B. Die histomorphometrische Auswertung ergibt ein signifikant erniedrigtes Knochenvolumen, das von einer erniedrigten Anzahl und Dicke der Trabekel mit erhöhtem Abstand voneinander begleitet ist. C. In Übereinstimmung mit der veränderten Knochenstruktur tolerieren die Wirbelknochen von  $S1pr3^{-7}$ -Mäusen weniger Kraft bis zum Bruch ( $F_{max}$ ). (\*p < 0,05, n = 4)

Als Ursache der erniedrigten Knochenmasse konnte anhand der dualen Calceininjektion eine verminderte Knochenzuwachsrate identifiziert werden, die aufgrund einer unveränderten trabekulären Osteoblastenanzahl durch eine erniedrigte Osteoblastenaktivität verursacht war (Abb. 30 A). Da auch die trabekuläre Osteoklastenanzahl keine Unterschiede aufwies, ist Knochenresorption als Ursache der erniedrigten erhöhte Knochenmasse eine unwahrscheinlich (Abb 30 B). Sollten S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erniedrigte Knochenformation aufweisen, da die Osteoblasten nicht mehr auf anabole Stimuli von Osteoklasten reagieren können, so dürfte konditioniertes Medium von Osteoklasten keinen Effekt mehr auf S1pr3<sup>-/-</sup>-Osteoblasten ausüben.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *S1pr3*<sup>-/-</sup>-Osteoblasten in der Anwesenheit von konditioniertem Osteoklastenmedium kultiviert. Tatsächlich waren S1pr3<sup>-/-</sup>-Osteoblasten für den osteoanabolen Effekt von konditioniertem Osteoklastenmedium unempfindlich (Abb. 30 C). Ebenso wenig ließ sich ein Unterschied zwischen dem Medium von unbehandelten und mit CT behandelten Osteoklasten nachweisen.



**Abb. 30. Die Deletion von** *S1pr3* führt zu einer gestörten Knochenformation. **A.** Die Auswertung der Calceinmarkierung in 6 Monate alten  $S1pr3^{-/}$ -Mäusen ergibt eine signifikant erniedrigte Knochenformationsrate *in vivo*. Die Osteoblastenanzahl ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert. **B.** Die Anzahl der Osteoklasten in 6 Monate alten  $S1pr3^{-/}$ -Mäusen weist keine Auffälligkeiten auf. **C.** Von Kossa Färbung von Osteoblastenkulturen am Differenzierungstag 15. Der osteoanabole Effekt von konditioniertem Osteoklastenmedium (-) im Vergleich zu undifferenzierten Knochenmarkszellen (Kontrolle, K) lässt sich in  $S1pr3^{-/}$ -Osteoblasten nicht mehr beobachten. Gleichermaßen ist kein Unterschied mehr zwischen dem Effekt von Medium unbehandelter und mit CT supplementierten Osteoklastenkulturen (rCT) nachweisbar. (\*p < 0,05, n > 3)

### 5. DISKUSSION

#### 5.1 Die homozygote Deletion des Calcitoninrezeptors ist nicht embryonal letal.

2004 publizierten Daguin et al. die Analyse eines Mausmodells, bei dem die heterozygote Deletion von Exon 6 und 7 des Calcr-Gens, ähnlich wie in Calca<sup>-/-</sup>-Mäusen, zu erhöhter Knochenformation führte. Da die Abwesenheit von Calcr auf beiden Allelen, im Gegensatz zum Fehlen von Calca-, in embryonaler Letalität resultierte, wurde die Existenz von zusätzlichen Liganden für den CTR diskutiert, die essentiell für die Embryogenese seien. Die in unserer Arbeitsgruppe generierten Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen sind lebensfähig, werden nach der erwarteten Mendelschen Ratio geboren und zeigen keinerlei äußere Auffälligkeiten. Der Unterschied in der Letalität ist schwer zu erklären, da in beiden Mausmodellen Exon 6 und 7 des Calcr-Gens deletiert wurden. Eine unvollständige Rekombination dieser Exone als Ursache der ausbleibenden Letalität ist ausgeschlossen, da in dieser Arbeit Cre<sup>-</sup>/Calcr<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet wurden, bei denen die Deletion in den Keimbahnzellen der Elterntiere stattgefunden haben muss. Ebenso wurde durch verschiedene Experimente bestätigt, dass die gewählte Deletionsstrategie zum vollständigen Verlust eines funktionellen CTR führt. Erstens konnte mittels Immunhistochemie kein CTR mehr in Niere und Hypothalamus nachgewiesen werden. Zweitens war die spezifische Bindung von <sup>125</sup>I-sCT an Calcr<sup>-/-</sup> Osteoklasten komplett aufgehoben. Drittens konnte nach Stimulation mit CT kein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten beobachtet werden. Viertens hatte CT keinen Effekt mehr auf die Resorption von Dentin und auf die Formation von Osteoklasten der Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse. Demnach unterbindet die homozygote Deletion von Exon 6 und 7 des Calcr-Gens die Formation eines funktionellen Genprodukts, sodass dieses Mausmodell ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der physiologischen Funktion von CT darstellt. Auch ist dadurch die Hypothese widerlegt, dass der CTR neben CT andere für die Embryogenese essentielle Liganden bindet. Möglicherweise ist die frühe Letalität der Mäuse von Daguin et al. durch die eingefügte Neomycin-Kassette zu erklären, die in dem Mausmodell unserer Arbeitsgruppe vor der Injektion entfernt worden war.

#### 5.2 Der Knochenphänotyp von Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Da CT seine Effekte über den CTR vermittelt, sollten *Calca<sup>-/-</sup>* und *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse einen nahezu identischen Phänotyp aufweisen. Ähnlich wie die Abwesenheit von Calcitonin führt auch die Abwesenheit des CTR zu einer erhöhten Knochenmasse, die allerdings nur im Alter von 3 und 6 Monaten zu beobachten ist (Abb. 12).

In Übereinstimmung mit den *in vitro* Untersuchungen, die eindeutig gezeigt haben, dass CT keinen Effekt mehr auf Osteoklasten mit deletiertem CTR ausübt, führt auch die Abwesenheit des CTR *in vivo* zu einem Anstieg der Knochenresorption. Diese setzt allerdings später ein als es in den *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen der Fall ist und scheint insgesamt weniger stark gesteigert zu

sein. Während *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäuse schon im Alter von 6 Monaten einen Anstieg der Knochenresorption aufweisen, finden sich in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen erst im Alter von 12 Monaten Anzeichen für eine gesteigerte Osteoklastenaktivität (Abb. 13). Zu diesem Zeitpunkt führt die Abwesenheit des CTR zu hyperostotischen Läsionen in der Knochenkortikalis und zu erhöhten TRAP-Werten im Serum. Allerdings ist die Anzahl der trabekulären Osteoklasten in 12 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant erniedrigt, wohingegen sie in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu diesem Zeitpunkt vierfach erhöht war.

Berücksichtig man dabei den Einfluss von αCGRP, welches in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen abwesend, in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen jedoch vorhanden ist, so findet sich keine zufriedenstellende Erklärung dieser Differenzen, da das Protein *in vivo* ausschließlich die Knochenformation zu regulieren scheint. Eine plausible Erklärung könnte die Existenz eines zweiten, bislang nicht identifizierten Rezeptors sein, der unabhängig von *Calcr* einige der biologischen Effekte von CT auf die Knochenresorption vermittelt. Da die Generierung von Osteoklasten *in vitro* bestimmten Einschränkungen unterliegt, ist es möglich, dass die Existenz eines solchen Rezeptors in den Zellkultur-Studien an *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten nur schwerlich nachweisbar ist oder dieser Rezeptor nur *in vivo* exprimiert wird.

Wendet man sich der Knochenformation zu, so finden sich hier enge Parallelen zwischen den beiden Mausmodellen. Wie für CT-defiziente Mäuse beschrieben, führt auch die Abwesenheit des CTR zu einer erhöhten Knochenformation, die die gesteigerte Knochenmasse in 3 und 6 Monate alten *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen erklärt (Abb. 14). In Übereinstimmung mit der knochenanabolen Wirkung von CGRPα lässt sich in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine noch höhere Knochenformationsrate als in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen beobachten (1,9-fach versus 1,4-fach im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe), die dieses Protein nicht mehr bilden können. Wie in *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen war trotz gesteigerter Knochenzuwachsrate in allen untersuchten Altersstufen die Anzahl der Osteoblasten nicht verändert, sodass in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen von einer gesteigerten Funktion der knochenbildenden Zellen auszugehen ist.

#### 5.3 Die Funktion des Calcitoninrezeptors im Hypothalamus und in Osteoklasten.

Ausgehend vom Expressionsmuster von *Calcr* wurde der CTR mit der Cre/LoxP Strategie selektiv im Hypothalamus oder in Osteoklasten deletiert (Abb. 19). Sowohl in *Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*- als auch in Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäusen konnte eine spezifische Rekombination von *Calcr* festgestellt werden, sodass beide Mausmodelle einen wertvollen Ansatz zur Untersuchung der Funktion von CT in den jeweiligen Zielgeweben darstellen. Fraglich allerdings ist, wie effizient die Deletion von *Calcr* erfolgte. Obwohl die Immunhistologie scheinbar die vollständige Abwesenheit des CTR im Hyopthalamus von *Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Osteoklasten zwar signifikant reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben. Bei der Interpertation der

Knochenphänotypen dieser Mäuse ist daher die Möglichkeit einer unvollständigen Deletion von *Calcr* zu bedenken.

Die Analyse der beiden Mausmodelle zeigt zum ersten Mal *in vivo*, dass der CTR in hypothalamischen Neuronen keinen wesentlichen Einfluss auf die Knochenhämostase ausübt und es vielmehr Osteoklasten sind, über die CT die Funktion von Osteoblasten reguliert. *Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse zeigen einzig im Alter von 6 Monaten eine milde Osteopenie, die in 12 Monate alten Mäusen nicht mehr vorhanden war. Nachdem keine Anzeichen für eine erniedrigte Knochenformation oder für eine erhöhte Knochenresorption vorhanden sind, ist diese transiente Osteopenie schwer zu erklären. Da die intrazerebrale Administration von CT die Nahrungsaufnahme und Magenentleerung regulieren kann (Reidelberger et al., 2002), wäre eine mögliche Mangelernährung oder Malassimilation als Ursache der verminderten Knochenmasse denkbar.

Im Gegensatz zum blanden Phänotyp der Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse weisen Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse im Alter von 12 Monaten eine markante Knochenstruktur auf, die durch ihre erhöhte Knochenmasse und die feine Trabekelarchitektur das morphologische Äquivalent zu Calcr<sup>-/-</sup>-Calca<sup>-/-</sup>-Mäusen und darstellt (Abb. 14. Abb. 15). Darüberhinaus ist die Knochenformationsrate in allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht, was die gesteigerte Knochenmasse in 12 Monate alten Mäusen erklärt. Das Ausbleiben einer hohen Knochenmasse in 6 Monate alten Mäusen könnte möglicherweise durch eine unvollständige Deletion von *Calcr* bedingt sein, die schon in den Bindungsstudien mit <sup>125</sup>I-sCT an *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Osteoklasten* beobachtet wurde. Passend dazu wäre die Beobachtung, dass 12 Monate alte Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse nur tendenziell gesteigerte Serum-TRAP Werte aufweisen, die zwischen denen von Calcr<sup>+/+</sup>- und Calcr<sup>-/-</sup>-Tieren liegen.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit zahlreichen Beobachtungen, die auf eine wichtige Funktion der Osteoklasten in der Regulation der Knochenformation schließen lassen. So findet sich in gentechnisch veränderten Mäusen, die keine Osteoklasten haben, eine deutlich reduzierte Knochenformation (Koh et al., 2005; Martin & Sims, 2005). Auch der knochenanabole Effekt von intermittierendem Parathormon scheint von Osteoklasten abhängig zu sein, da die gleichzeitige Gabe von Calcitonin oder Bisphosphonaten zu einem Verlust der therapeutischen Wirkung führt (Delmas et al., 1995; Black et al., 2003; Finkelstein et al., 2003, Gooi et al., 2010). Interessanterweise wurde auch der Morbus Paget vor der Einführung von Bisphosphonaten erfolgreich mit CT behandelt, welches die exzessive Aktivität der Osteoblasten normalisiert, obwohl diese nachweislich keinen Calcitoninrezeptor exprimieren (Whyte, 2006). Genauso wie Osteoblasten über die Sekretion von Rankl und Opg die Knochenresorption regulieren können, scheinen Osteoklasten über die Produktion von osteoanabolen Substanzen die Knochenformation beeinflussen zu können. Dieses Modell konnten wir und andere Arbeitsgruppen auch *in vitro* bestätigen

(Boyce & Xing, 2006; Martin & Sims, 2005; Karsdal et al., 2008), da das konditionierte Medium von Osteoklastenkulturen einen stimulierenden Effekt auf Osteoblastenkulturen aufweist. In Übereinstimmung mit dem Phänotyp von Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäusen war dieser anabole Effekt des Mediums aufgehoben, wenn die Osteoklasten in Anwesenheit von CT kultiviert wurden. Da in den verwendeten Osteoklastenkulturen keine Dentinscheibchen oder Knochen vorhanden waren, konnten keine osteoanabole Substanzen aus Zahn- oder Knochenmatrix gelöst werden, die den beobachteten Effekt erklären könnten. Folglich sezerniert der Osteoklast aktiv Osteoblasten-stimulierende Substanzen, deren Freisetzung durch Calcitonin gehemmt wird. Anhand der Affymetrix-Genchip Analyse konnten mit *Spns2*, *Cyp24A1* und *Svs7* drei Zielgene von Calcitonin identifiziert werden, die potentielle Kopplungsfaktoren zwischen Osteoklasten und Osteoblasten darstellen.

#### 5.4 Mögliche Kopplungsmechanismen – Spns2, Cyp24A1 und Svs7.

#### Spns2

CT reprimiert in Osteoklasten die Expression von Spns2, welches ein Transporterprotein für die Ausschleusung von S1P kodiert. Interessanterweise konnte in zwei kürzlich erschienen Publikationen gezeigt werden, dass S1P eine wichtige Rolle in der Kopplung von Knochenformation an Knochenresorption spielt und einen positiven Einfluss auf die Mineralisation von Osteoblasten ausübt (Ryu et al., 2006; Pederson et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese und zeigen zudem eine mögliche Rolle für CT als Regulator dieses Kopplungsmechanismus. Während der Osteoklastendifferenzierung konnte ein starker Anstieg der extrazellulären S1P-Konzentration gemessen werden, der, wie die Expression von Spns2, durch CT gehemmt wurde. Parallel dazu hatte konditioniertes Medium von Osteoklasten, die mit CT behandelt wurden, keinen stimulierenden Effekt mehr auf Osteoblasten. Nachdem der anabole Effekt von konditioniertem Osteoklastenmedium in S1pr3<sup>-/-</sup>-Osteoblasten eliminiert ist, und S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Osteopenie aufgrund erniedrigter Knochenformation aufweisen, ist eine Beteiligung des verhältnismäßig spezifisch exprimierten S1pr3 durchaus wahrscheinlich. Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass Calcitonin über den reprimierenden Effekt auf Spns2 die Ausschleusung von S1P aus Osteoklasten reguliert und durch verminderte Signalübertragung an S1pr3 auf Osteoblasten die Knochenformation hemmt.

#### Cyp24A1

Ein weiteres Zielgen von CT in Osteoklasten ist *Cyp24A1*, ein intrazellulär lokalisiertes Enyzm, welches die Hydroxylierung des C24 am Steroidgerüst von Vitamin D katalysiert. Ist das Substrat 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> oder 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, kommt es zur Produktion von 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, zwei Substanzen, die lange Zeit als metabolische Abbauprodukte von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> ohne biologische Wirkung angesehen wurden. Allerdings wurde für diese Metabolite auch ein positiver Einfluss auf den Knochenstoffwechsel beschrieben. Beispielsweise wurde unter  $24,25(OH)_2$  Vitamin D<sub>3</sub> und 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> eine verbesserte Frakturheilung beobachtet (Seo et al., 1997), und es konnte sogar einem Knochenmasseverlust durch Ovarektomie entgegengewirkt werden (Erben et al., 1997). Van Driel und Mitarbeiter zeigten zudem einen stark stimulierenden Effekt von 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> auf Osteoblasten *in vitro*, der ausgeprägter als der von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> war. Nachdem Cyp24A1 im Knochen, ähnlich wie Calcr, exklusiv von Osteoklasten exprimiert wird, ist es denkbar, dass diese Zellen über die Umwandlung von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> zu 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> einen stimulierenden Einfluss auf Osteoblasten ausüben. Im Gegensatz zu Osteoklasten ist die Expression von Cyp24A1 in Nieren von Calcr<sup>/-</sup>-Mäusen nicht verändert. Allerdings führt die Abwesenheit des CTR in diesem Gewebe zu einer Überexpression von Cyp27B1, sodass Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse einen tendenziell erhöhten 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel aufweisen. Fasst man diese Beobachtungen zusammen, vermittelt der CTR also einen hemmenden Effekt auf die Expression von Cyp27B1 in der Niere und auf die Expression von Cyp24A1 in Osteoklasten. Demnach ist theoretisch denkbar, dass Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine gesteigerte Cyp27B1 Expression mehr  $1,25(OH)_2$  Vitamin  $D_3$  in der Niere produzieren, welches dann in Osteoklasten durch gesteigerte Cyp24A1 Expression zu supraphysiologischen Spiegeln von 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt werden könnte. Lokal erhöhte 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentrationen liefern eine potentielle Erklärung für die gesteigerte Knochenformation in Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen. Desweiteren ist denkbar, dass aufgrund erhöhter Cyp24A1 Aktivität in Osteoklasten die Serumspiegel von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> in Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Auch das Ausbleiben der erhöhten Knochenmasse in 6 Monate alten Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäusen könnte so erklärt werden, da die Osteoklasten-spezifische Deletion des CTR vermutlich nicht zu einer erhöhten Expression von Cyp27B1 in der Niere führt. Leider konnte diese Hypothese bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht weiter überprüft werden, da keine Messinstrumente zur Bestimmung von  $1,24,25(OH)_3$  Vitamin D<sub>3</sub> routinemäßig zur Verfügung stehen und eine im Knochengewebe lokal erhöhte Konzentration dieser Substanz nur schwerlich nachweisbar ist.

#### Svs7

Als weiteres Zielgen von CT in Osteoklasten konnte *Svs*7 identifiziert werden, dessen biologische Funktion noch nicht bekannt ist. Svs7 scheint eine Rolle im Kalziumtransport zu spielen, indem es an verschiedene Phospholipide bindet (Luo et al., 2001). Auffallend ist, dass Svs7 hochspezifisch in Osteoklasten produziert wird und eine starke Expression im

Prostatagewebe aufweist, welches bei maligner Entartung häufig osteoblastische Metastasen verursacht. Da dieses Peptid zudem wasserlösliche Eigenschaften aufweist und in den Extrazellulärraum sekretiert wird, stellt *Svs7* ein interessantes Zielgen von Calcitonin in Osteoklasten dar, welches weitere Untersuchungen rechtfertigt. Hierzu wurde *Svs7* aus Osteoklasten cDNA geklont und an den ApoE-Promotor gekoppelt. Dies führt dazu, dass in der Leber *Svs7* überexprimiert wird und somit ein erhöhter Serumspiegel des Proteins vorliegt. Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnten leider noch keine Nachkommen identifiziert werden, bei denen es zur Inkorporation des *Svs7*-Konstrukts in die genomische DNA gekommen ist.

Zusammengefasst stellen *Spns2*, *Cyp24A1* und *Svs7* allesamt potentielle Mediatoren des hemmenden Effekts von CT auf die Funktion von Osteoblasten dar (Abb. 33). Obwohl klar gezeigt werden konnte, dass CT *in vivo* und *in vitro* durch seinen ausgeprägten Effekt auf Osteoklasten die Knochenformation reguliert, kann zu diesem Zeitpunkt noch keine definitive Aussage über den verantwortlichen Mechanismus getroffen werden. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die in dieser Arbeit erhobenen Hypothesen zu überprüfen.

Neben potentiellen Kopplungsfaktoren konnte eine Vielzahl von weiteren Genen identifiziert werden, deren Expression durch CT reguliert wird. Obwohl der Effekt von CT auf knochenresorbierende Osteoklasten intensiv untersucht worden ist, sind bis dato die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen verhältnismäßig unklar. Dies zeigt sich beispielsweise anhand der Tatsache, dass mit Calcr und Crem bislang nur zwei Zielgene von CT in Osteoklasten identifiziert werden konnten. Der inhibitorische Einfluss von CT auf die Expression von Calcr lässt auf einen präzisen Regelkreis schließen, der es CTRexprimierenden Zellen ermöglicht, auf wechselnde Serumkonzentrationen von CT reagieren zu können. Dies erklärt die Beobachtung, dass supraphysiologische Mengen an CT schnell ihre Wirksamkeit verlieren und somit der klinische Nutzen von CT in der Osteoporosetherapie eingeschränkt ist. Inwiefern andere, durch CT regulierte Gene, Einfluss auf die Osteoklastenfunktion nehmen, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur vermuten. Pscdbp und Tspan13 beispielsweise sind beide an der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt (Iwai et al., 2007; Watford et al., 2006). Für Ramp3 und CD14 konnte eine wichtige Funktion als Co-Rezeptoren gezeigt werden (Kirkland & Viriyakosol, 1998; Pondel, 2000). Pip5k1b und Myo1b spielen möglicherweise eine Rolle in der Regulation des Zytoskeletts von Osteoklasten (Coppolino et al., 2002; Dumont et al., 2002), während Inppl1 die Sensitivität von Makrophagen zu M-CSF reguliert und somit Einfluss auf die Osteoklastogenese nehmen kann (Wang et al., 2004).

71

#### 5.5 Die endokrine Funktion des Calcitoninrezeptors.

Aufgrund seiner Osteoklasten-hemmenden und hypokalzämischen Wirkung wurde CT seit seiner Entdeckung als Gegenspieler von PTH gehandelt, welches durch eine Steigerung der Knochenresorption mit nachfolgender Hyperkalzämie genau den gegenteiligen Effekt bewirkt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CTR zwar die Osteoklastenfunktion inhibiert, unter normalen Bedingungen aber keinen Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel oder die Ausschüttung von PTH ausübt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Analyse der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die ebenfalls normale Kalzium- und PTH-Konzentrationen aufwiesen (Hoff et al., 2002). Allerdings kann eine mögliche Funktion des CTR in der Regulation des Kalziumstoffwechsels zu Zeiten hormonellen Stresses wie beispielsweise während der Laktation oder bei Hyperkalzämie nicht ausgeschlossen werden (Woodrow et al., 2006; Davey et al., 2008).

Überraschenderweise reguliert der CTR nicht nur die Funktion von Knochenzellen, sondern übt auch einen nachhaltigen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel aus. Von wesentlicher Bedeutung für die westliche Welt ist das metabolische Syndrom, ein Symptomkomplex, der unter anderem durch Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und erhöhte Serumspiegel von Triglyzeriden und Glukose gekennzeichnet ist. Beachtet man einige dieser Parameter in weiblichen Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen, so scheint die Abwesenheit des CTR den Charakteristika dieses Krankheitsbildes entgegenzuwirken. Nachdem der wichtigste Regulator des Energiehaushaltes das Hormon Insulin ist, überrascht es nicht, dass die erniedrigten Glukose- und Triglyzeridspiegel mit tendenziell erhöhten Insulinspiegeln einhergehen. Die nächstliegende Erklärung für diese Beobachtungen sind die erhöhten Serumwerte von Osteocalcin und Adiponektin. Osteocalcin wird von aktiven Osteoblasten produziert und stimuliert direkt die Insulinfreisetzung aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Darüberhinaus regt es Fettzellen zur Freisetzung von Adiponektin an, welches die Wirkung von Insulin verbessert. Esp<sup>-/-</sup>-Mäuse, die einen erhöhten Osteocalcinspiegel im Serum aufweisen, sind resistent gegenüber Fettleibigkeit und Diabetes und imponieren mit erniedrigten Glukose- und Triglyzeridspiegeln bei gleichzeitig erhöhten Insulinwerten (Lee et al., 2007). Ein fast identisches Stoffwechselprofil findet sich in weiblichen Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen, die aufgrund einer gesteigerten Knochenformation ebenfalls erhöhte Osteocalcinspiegel aufweisen.

Im Ganzen weisen diese Daten darauf hin, dass der veränderte Glukosemetabolismus in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen sekundär durch eine gesteigerte Knochenformation hervorgerufen wird. Wieso dieses Phänomen nur in weiblichen *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu beobachten ist, ist derzeit noch unklar.
#### 5.6 Amylin in Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Zahlreiche *in vitro* Studien an transfizierten Zelllinien haben den CTR als essentiellen Bestandteil des Amylinrezeptors postuliert. In dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal gezeigt, dass Amy auf Osteoklasten ohne funktionellen CTR immer noch einen deutlichen Effekt ausüben kann. Obwohl Amy keinen Effekt auf die Dentinresorption von *Calcr<sup>-/-</sup>*Osteoklasten ausübte, konnte eine deutliche Inhibition der Osteoklastenformation trotz abwesendem CTR beobachtet werden. Diese Beobachtungen liefern weitere Hinweise auf einen bislang unbekannten Rezeptor für Amy und unterstützen die von Daquin et al. postulierte Hypothese, dass Amy nicht über den CTR seine Wirkung auf den Knochenmetabolismus vermittelt. Aufgrund des intrazellulären Anstiegs von cAMP nach Stimulation mit Amy in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten scheint dieser neuartige Rezeptor an der Zelloberfläche lokalisiert zu sein und zumindest teilweise seine Effekte über die Aktivierung der Proteinkinase A zu vermitteln.

Amy wird von pankreatischen β-Zellen mit Insulin ko-sekretiert, sodass im Serum ein konstantes Verhältnis von 1:100 von Amy gegenüber Insulin vorliegt. Ausgehend von den tendenziell erhöhten Insulinwerten in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen ist deshalb auch eine gesteigerte Produktion von Amy denkbar. Da Amy die Formation von *Calcr<sup>-/-</sup>*-Osteoklasten inhibiert, könnten erhöhte Amy-Spiegel eine weitere Erklärung sein, wieso *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse im Vergleich zu *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine weniger stark gesteigerte Knochenresorption aufweisen.

Amy spielt nicht nur eine Rolle in der Kontrolle der Knochenresorption, sondern reguliert auch den Glukosestoffwechsel. Durch Behandlung mit Amy kommt es beispielsweise zu erniedrigten Glukosespiegeln, verbesserter Insulinwirkung, verlangsamter Magenentleerung und Gewichtsabnahme (Roth et al., 2008). Da diese Mechanismen einen positiven Effekt auf Patienten mit Typ1 und Typ2 Diabetes haben, wurde das synthetische Amy-Analogon Pramlintide entwickelt, welches sich derzeit in der klinischen Erprobung befindet (Elkind-Hirsch et al., 2008; Smith et al., 2008; Riddle et al., 2009). Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus von Pramlintide oder Amy auf den Stoffwechsel noch nicht genau bekannt. Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass die Bedeutung von Calcr als Rezeptor für Amy kontrovers diskutiert wird und Unklarheit über den wirklichen Amylinrezeptor herrscht. In Geweben wie der Bauchspeicheldrüse, der Leber, den Muskeln und dem Fett, die wichtige Funktionen in der Glukosekontrolle spielen, ist keine signifikante Expression von Calcr bekannt. Möglich ist deshalb, dass der gleiche Rezeptor, der die Effekte von Amy in Calcr<sup>-/-</sup>-Osteoklasten vermittelt, in anderen Geweben von entscheidender Bedeutung für den Glukosestoffwechsel ist. Eine nähere Charakterisierung dieses Rezeptors würde die Generierung hochpotenter Agonisten erheblich erleichtern und könnte möglicherweise wesentlich zum Verständnis und zur Therapie von Diabetes mellitus beitragen.

#### 5.7 Calcitonin im Menschen und im Nagetier - ein Vergleich.

Obwohl CT vor mehr als 40 Jahren entdeckt wurde und seitdem Gegenstand intensiver Untersuchungen ist, konnte bislang noch immer kein Konsensus bezüglich der physiologischen Bedeutung dieses Hormons gefunden werden. Da pathologisch veränderte CT-Spiegel im Menschen, wie sie beim medullären Schilddrüsenkarzinom oder nach Thyreoidektomie zu finden sind, die Knochenmasse nicht maßgeblich zu beeinflussen scheinen, wird von keiner wesentlichen Relevanz des Hormons für den Knochenstoffwechsel ausgegangen (Hurley et al., 1987; Recker & Shapiro, 1989; Schneider et al., 1991; Gonzalez et al., 1991; Sugino et al., 1992; Mirzaei et al., 1999).

Mehrere Versuche wurden unternommen, diese klinischen Zustände im Mausmodell nachzuempfinden. Wie im Menschen ist auch in Mäusen, die aufgrund einer Mutation im ret-Onkogen ein medulläres Schilddrüsenkarzinom entwickeln, trotz mehrfach erhöhter CT-Konzentrationen kein sonderlich auffälliger Knochenphänotyp zu beobachten (Abb. 4). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens liefert die komplexe Regulation des CTR, der schon nach kurzer Stimulation mit Internalisation und verminderter Expression auf erhöhte Serumkonzentrationen von CT reagiert und dadurch das Ausmaß des hervorgerufenen biologischen Effekts modulieren kann. Dieser Effekt wird dafür verantwortlich gemacht, dass Calcitonin bei der Behandlung der Osteoporose seine Wirkung verliert und könnte erklären, wieso erhöhte CT-Spiegel keinen maßgeblichen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausüben. Komplexer gestaltet sich allerdings die Frage, wieso die Abwesenheit von CT zu widersprüchlichen Beobachtungen führt. Wird in der Maus CT oder der CTR gentechnisch entfernt, so findet sich ein signifikant gesteigerter Knochenumbau mit einer Gesamterhöhung der Knochenmasse, während beim Menschen die Entfernung der Schilddrüse mit nachfolgendem Abfall von CT in keinen Osteopathologien resultiert. Dies könnte schlichtweg dadurch bedingt sein, dass CT, im Gegensatz zum Menschen, nur in Nagetieren von physiologischer Bedeutung für den Knochenstoffwechsel ist. Wie erklärt man aber, dass die Entfernung der Schilddrüse auch in Ratten zu keinen gravierenden Veränderungen der Knochenmasse führt (Hirsch & Hagaman, 1986)? Diese Differenzen sind schwierig zu interpretieren und stellen eine Herausforderung für zukünftige Untersuchungen dar. Die einfachste Erklärung wäre die Existenz eines bis dato nicht bekannten Regelmechanismus, der für eine lokale Produktion von CT im Knochen sorgt und von höherer Bedeutung für die Funktion von Knochenzellen als das von der Schilddrüse ausgeschüttete CT ist. Einen Hinweis auf die Synthese von CT im Knochenmilieu fand sich in einer Microarray-Analyse von primären Osteoblasten, die mit PTH stimuliert worden waren (Daten nicht gezeigt). Neben einigen bekannten Zielgenen von PTH wie beispielsweise Tnfsf11 (Rankl) oder VDR (Vitamin D Rezeptor), wurde die Expression von Calca in Osteoblasten mehr als 4-fach

gesteigert. Eine subsequente RT-PCR Analyse mit spezifischen Primern zeigte, dass es sich um eine erhöhte Expression von CT handelte. Eine über dem Serumspiegel liegende Konzentration von CT im Knochen selbst könnte erklären, wieso das von den C-Zellen der Schilddrüse produzierte Hormon verhältnismäßig wenig Einfluss auf den Knochenmetabolismus ausübt und nur Tiermodelle, in denen alle Zellen die Fähigkeit zur Synthese von CT verloren haben (z.B. *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäuse), die tatsächliche Funktion von Calcitonin erkennen lassen.



**Abb. 31. Mögliche Regulationsmechanismen des Knochemumbaus durch CT und PTH.** Von der Schilddrüse sezerniertes CT bindet an den Calcitoninrezeptor und ruft verschiedene biologische Effekte hervor. In der Niere wird durch die Aktivierung des CTR die Expression von *Cyp27B1* gehemmt, wohingegen in Osteoklasten die Expression von *Cyp24A1* und *Spns2* reduziert wird. Dadurch wird die Freisetzung von knochenanabolen Substanzen (rot) aus Osteoklasten inhibiert, sodass die extrazelluläre Konzentration von S1P bzw. 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D, zwei potentiell osteoanabolen Substanzen, sinkt. Darüberhinaus könnte CT einen direkt hemmenden Effekt auf die Produktion des löslichen und potentiell osteoanabolen Svs7 ausüben, dessen Funktion im Knochengewebe noch unklar ist. An welchen Rezeptor und ob überhaupt Svs7 und 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vit D<sub>3</sub> an Osteoblasten bindet, ist bislang noch unklar. PTH, der Gegenspieler von CT, wird in den Nebenschilddrüsen produziert und stimuliert in Osteoblasten die Expression verschiedener Proteine, darunter Rankl und möglicherweise auch CT. Während Rankl die Knochenresorption stimuliert, könnte die Produktion von CT in Osteoblasten Hinweise auf einen bis dato nicht erkannten Regelkreis liefern und verschiedene widersprüchliche Beobachtungen erklären (siehe 5.7).

In Übereinstimmung damit lässt sich der ausgeprägte Knochenphänotyp von *Calca<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht durch erhöhte Serumspiegel von CT normalisieren, wenn diese mit transgenen Mäusen verpaart werden, die mCT oder sCT unter dem Leber-spezifischen Promotor ApoE überexprimieren (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wäre nur durch eine Osteoblasten-spezifische Überexpression von mCT eine Korrektur des *Calca<sup>-/-</sup>*-Phänotyps realisierbar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Relevanz dieser Beobachtung in der Maus und im Mensch näher zu charakterisieren. Eine Funktion von CT im Menschen ist also keinesfalls ausgeschlossen und es stellt sich die Frage, inwiefern Studien an thyreoidektomierten Patienten ein realistisches Abbild der physiologischen Bedeutung von CT darstellen können. Ähnlich wie PTH, das ursprünglich als osteokataboles Hormon beschrieben wurde und paradoxerweise heutzutage in der Therapie der Osteoporose klinische Anwendung findet, muss anhand der erhobenen Daten auch die Funktion von CT neu evaluiert werden.

### 6. Ausblick

Obgleich in dieser Arbeit zumindest einige der Fragen zur Funktion von CT beantwortet werden konnten, werfen die Ergebnisse eine Vielzahl von neuen Fragen auf, die weiterführende Experimente nötig machen. Von höchster Priorität ist die Identifizierung von geeigneten Substanzen, die therapeutisch zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden können. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass von Osteoklasten freigesetzte Substanzen von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von Osteoblasten sind, bieten die Ergebnisse der Micorarray-Analyse eine wertvolle Basis zur näheren Charakterisierung solcher Substanzen. Hierzu gehört die Analyse von Svs7<sup>ApoE</sup>-Mäusen, die Svs7 unter Kontrolle des Leber-spezifischen Promotor ApoE überexprimieren und Aufschluss über eine mögliche Funktion von Svs7 im Knochenstoffwechsel geben könnten. Gleichermaßen ist geplant, die Rolle von S1P und S1pr3 in der Vermittlung des hemmenden Effekts von CT auf die Knochenformation näher zu untersuchen. Dazu werden momentan Calcr<sup>-/-</sup>- mit S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäusen verpaart. Sollte CT auch in vivo die Sekretion von S1P aus Osteoklasten regulieren, und sollte S1P die Osteoblastenaktivität über S1pr3 stimulieren, so müssten die Calcr<sup>-/-</sup>/S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäuse eine gleich niedrige Knochenformationsrate aufweisen wie sie in S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäusen zu beobachten ist.

Erinnert man sich an die postulierte Funktion von CT als Gegenspieler von PTH, so tritt hier eine interessante Gemeinsamkeit auf. Beide Hormone benutzen offenbar den Osteoklasten als Zwischenglied eines indirekten Effekts auf die knochenbildenden Osteoblasten. Während CT die Knochenformation hemmt, wird diese durch PTH stimuliert. Der stimulierende Effekt von PTH auf die Neuformation von Knochen wird eliminiert, wenn beide Hormone simultan verabreicht werden (Gooi et al., 2010). Demnach ist es möglich, dass CT und PTH über die Modulation eines gemeinsamen Mechanismus in Osteoklasten einen entgegengesetzten Effekt auf Osteoblasten ausüben. Dies könnte beispielsweise die Produktion und Ausschleusung von S1P sein. Sollte der Osteoblasten-stimulierende Effekt von PTH, wie vermutlich der Osteoblasten-hemmende von CT, auf veränderter Syntheseleistung oder Ausschleusung von S1P basieren, so wäre in mit PTH behandelten *S1pr3*<sup>-/-</sup>-Mäusen möglicherweise keine gesteigerte Knochenformation mehr zu beobachten. Deshalb ist geplant, *S1pr3*<sup>-/-</sup>-Mäuse einer intermittierenden PTH-Therapie auszusetzten und einer vollständigen histomorphometrischen Analyse zu unterziehen. Unabhängig vom Ausgang dieser Experimente wurde mit dieser Arbeit schon jetzt gezeigt, dass der Verlust von S1pr3 mit einer erniedrigten Knochenmasse aufgrund reduzierter Knochenformation einhergeht. Denkbar wäre also eine klinische Verwendung von S1P-Analoga, die eine stimulierende Wirkung spezifisch an S1pr3 aufweisen und somit knochenbildende Osteoblasten stimulieren könnten.

Nachdem die Deletion von *Calcr* zu einer gesteigerten Knochenmasse aufgrund erhöhter Knochenformation führt, ist prinzipiell auch die Möglichkeit der pharmakologischen Blockade des CTR als Osteoporosetherapie zu überlegen. Während der anabole Effekt von PTH von einer intermittierenden Applikation in Form einer täglichen subkutanen Injektion abhängt, ist die erhöhte Knochenformation in *Calcr*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch eine dauerhafte Abwesenheit des CTR bedingt. Aufgrund seiner Lokalisation an der Zelloberfläche stellt der CTR einen idealen Angriffspunkt für Medikamente dar, der beispielsweise mit dem CTR-Antagonisten sCT(8-32) spezifisch und effektiv antagonisiert werden kann. Ein subkutanes Depot dieser Substanz würde für eine langanhaltende Rezeptorblockade sorgen und könnte sich für Patienten mit Osteoporose als sinnvolle Alternative zur täglichen PTH-Injektion erweisen. Um diese Möglichkeit näher zu überprüfen, sollen Mäuse mit einem subkutanen Pellet von sCT(8-32) versehen werden und eine potentiell positive Wirkung auf die Knochenqualität anhand von Knochenhistomorphometrie und Biomechanik näher analysiert werden.

Neben einem veränderten Knochenstoffwechsel konnten in dieser Arbeit auch veränderte Parameter des Glukosemetabolismus in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen beobachtet werden. Obwohl über die zugrunde liegenden Mechanismen an dieser Stelle nur gemutmaßt werden kann, resultiert die globale Deletion des CTR in einer erniedrigten Serumkonzentration von Glukose und Triglyzeriden. Dieser Effekt ist besonders für Patienten mit Diabetes mellitus von entscheidender Bedeutung für den Krankheitsverlauf, sodass weiterführende Untersuchungen der bisherigen Beobachtungen zur Entwicklung von neuen Therapieformen beitragen könnten. Zum einen sollen dafür *Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*- und *Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse den gleichen Serumanalysen wie *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen unterzogen werden, um Rückschlüsse auf den

zellulären Mechanismus des beobachteten Phänomens ziehen zu können. Gleichermaßen sollen *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse einer hochkalorischen Diät ausgesetzt werden, sodass ein möglicher protektiver Effekt eines abwesenden CTR in Hinblick auf Fettleibigkeit und Diabetes mellitus evaluiert werden kann. Zum anderen ist geplant, *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäuse verschiedenen Stimulationstests zu unterziehen, um Aufschluss über etwaige Anomalitäten bezüglich Glukose- und Insulintoleranz zu erhalten. Gleichermaßen wäre es sinnvoll, den Effekt von Amylin bzw. Pramlintide in Mäusen ohne CTR näher zu charakterisieren. Die Identifizierung des biologisch relevanten Rezeptors für Amylin würde einen wichtigen Schritt in der Diabetesforschung bedeuten. Beispielsweise könnte dieser Rezeptor in Zelllinien stabil transfiziert und anhand pharmakologischer Studien potente und nebenwirkungsarme Agonisten entwickelt werden.

Während die Funktion des CTR in Hypothalamus und Osteoklasten in dieser Arbeit näher charakterisiert werden konnte, ist trotz etlicher *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen die physiologische Bedeutung der Expression von *Calcr* in Nierengewebe noch verhältnismäßig unklar. Da die Funktion der Nieren in *Calcr<sup>-/-</sup>*-Mäusen möglicherweise durch einige der beobachteten endokrinologischen Anomalitäten beeinflusst wird, lässt sich die Rolle des CTR in Nierengewebe am besten mit einem zellspezifischen Defizienzmodell untersuchen. Hierzu werden momentan *Calcr<sup>f//f</sup>*-Mäuse mit transgenen Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des nierenspezifischen *Sgt/2*-Promotors überexprimieren.

## 7. Zusammenfassung

Obwohl die Entdeckung von CT mehr als 45 Jahre zurückliegt, bestand lange Zeit Unstimmigkeit über die physiologische Relevanz dieses Hormons, welche erst durch die Analyse von CT-defizienten Mäusen (*Calca*<sup>-/-</sup>) näher charakterisiert werden konnte. Um eine genauere Vorstellung der Funktion von CT im Knochengewebe zu erlangen, wurden in dieser Arbeit Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse (*Calcr*<sup>-/-</sup>) untersucht.

Zuerst wurde gezeigt, dass die Deletion von Exon 6 und 7 des Calcr zu vollständigem Verlust eines funktionellen Calcitoninrezeptors (CTR) führt. Nachkommen von Calcr<sup>+/-</sup>-Mäusen werden nach der erwarteten Mendelschen Ratio geboren, und die homozygote Defizienz von Calcr führt zu keinen offensichtlichen Fehlbildungen, sodass der CTR nicht essentiell für die Embryogenese ist. Ähnlich wie Calca<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen Calcr<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhöhte Knochenmasse auf und in höherem Alter finden sich Anzeichen einer gesteigerten Knochenresorption, die durch das Auftreten von hyperostotischen Läsionen in der Knochenkortikalis gekennzeichnet ist. Gleichermaßen und von primärer Bedeutung führt auch der Verlust des CTR zu einer erhöhten Knochenformationsrate, welche die gesteigerte Knochenmasse in Calcr<sup>-/-</sup>-Mäusen erklärt. Um denjenigen Zelltyp zu identifizieren, über den CT seinen hemmenden Effekt auf die Osteoblastenaktivität ausübt, wurde der CTR mittels der "Cre/LoxP"-Strategie in hypothalamischen Neuronen und in Osteoklasten deletiert, wobei die transgene Expression von Cre unter dem Camk2a- und dem LysM-Promotor zu einer spezifischen Deletion von Calcr in den entsprechenden Zielgeweben führte. Während Cre<sup>Camk2a</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse keine Auffälligkeiten aufwiesen, rekapitulierten Cre<sup>LysM</sup>/Calcr<sup>fl/fl</sup>-Mäuse in allen untersuchten Aspekten den Knochenphänotyp von Calcr<sup>-/-</sup>- und von Calca<sup>-/-</sup>-Mäusen. Demnach regulieren Osteoklasten die Knochenformation über spezielle Substanzen, deren Produktion oder Freisetzung durch CT gehemmt wird. Übereinstimmend damit weist das Medium von Osteoklasten einen osteoanabolen Effekt auf, der verschwindet, СТ wenn Osteoklasten unter Zugabe von kultiviert werden. Anhand von Genexpressionsstudien konnten mit Spns2, Cyp24A1 und Svs7 drei verschiedene Proteine identifiziert werden, deren Expression durch CT in Osteoklasten reprimiert wird und welche die Kopplung von Knochenformation an Knochenresorption erklären könnten. Der vielversprechendste Kandidat bislang ist Spns2, welches über die Ausschleusung von S1P die extrazelluläre Konzentration einer osteoanabolen Substanz reguliert. Als möglicher Rezeptor, der den Effekt von S1P im Knochengewebe vermittelt, konnte S1pr3 identifiziert werden. S1pr3<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen eine Osteopenie aufgrund verminderter Knochenformation auf. und S1pr3-defiziente Osteoblasten lassen sich durch konditioniertes Osteoklastenmedium nicht mehr stimulieren.

Neben potentiellen Kopplungsfaktoren konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren Expression in Osteoklasten durch CT reguliert wird und die Hinweise auf mögliche Mechanimsen liefern, durch die CT eine Hemmung der Knochenresorption bewirkt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Amylin (Amy), welches nach klassischer Sichtweise den CTR als Rezeptor benutzt, einige seiner Effekte im Knochen über einen neuartigen Rezeptor ausübt, der vermutlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist und seine Effekte über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bzw. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in das Zellinnere vermittelt.

# 8. Abkürzungsverzeichnis

Amy: Amylin ATP: Adenosintriphosphat BFR: bone formation rate (Knochenformationsrate) BMU: bone multicellular units **BSA:** bovines Serumalbumin cDNA: complementary DNA cAMP: cylic adenosine monophosphate CGRP: calcitonin gene-related peptide CRLR: calcitonin receptor like receptor CT: Calcitonin CTR: Calcitoninrezeptor Cyp24A1: Cytochrome P450, Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1  $(24\alpha$ -Hydroxylase) Cyp27B1: Cytochrome P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1  $(1\alpha$ -Hydroxylase) **DEPC:** Diethylpyrokarbonat DMSO: Dimethylsulfoxid DMF: Dimethylformamid DNA: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) dNTPs: Desoxynukleotidtriphosphat Dpd: Deoxypyridinolin EDTA: Ethylendiamintetraazetat ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) FCS: fetal calf serum (fetales Kälberserum) Frt-site: Flp(e)-recombinase targets (Erkennungssequenz für die Flp(e)-Rekombinase) *lacZ*: β-Galaktosidase Gen KO: Knockout

LoxP-site: locus of crossingover of P1 phage (Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase) mCT: mouse (Maus) Calcitonin min: Minute mRNA: messenger (Boten-) RNA NOb/Bpm: number of osteoblasts per bone perimeter (Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche) NOc/Bpm: number of osteoclasts per bone perimeter (Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche) NTPs: Nukleotidtriphosphate PBS: phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung) PCR: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) PFA: Paraformaldehyd PKA: Protein Kinase A PTH: Parathormon rCT: rat (Ratten) Calcitonin RNA: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) RT-PCR: Reverse Transkriptase-PCR sCT: salmon (Lachs) Calcitonin SDS: sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat), Detergens Spns2: spinster homologue 2 Svs7: seminal vesical secretory protein 7 TAE: Tris-Azetat-EDTA-Puffer TbN: trabecular number (Anzahl der Trabekel) TbSp: trabecular spacing (Abstand der Trabekel) TbTh: trabecular thickness (Trabekeldicke) TE: Tris-EDTA

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Puffersubstanz WT: Wildtyp

## 9. Literaturverzeichnis

Bar-Shavit Z (2007). The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem.*, 102(5), 1130-1139.

Black DM. Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ (2003). The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.*, 349(13), 1207-1215.

Boyce BF, Xing L (2006). Osteoclasts, no longer osteoblast slaves. *Nat Med.*,12(12), 1356-1358.

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

Chakraborty M, Chatterjee D, Kellokumpu S, Rasmussen H, Baron R. (1991). Cell cycle dependent coupling of the calcitonin receptor to different G proteins. *Science*, 251(4997), 1078-1082. *Science*, 251(4997):1078-82.

Chen Y, Shyu JF, Santhanagopal A, Inoue D, David JP, Dixon SJ, Horne WC, Baron R (1998). The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. Involvement of Gi, protein kinase C, and calcium. *J Biol Chem*, 273(31), 19809-19816.

Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8(4), 265-277.

Copp DH, Cameron EC (1961). Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science*, 134, 2038.

Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S (2002). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase lalphaimpairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem*, 277(46), 43849-43857.

Dacquin R, Davey RA, Laplace C, Levasseur R, Morris HA, Goldring SR, Gebre-Medhin S, Galson DL, Zajac JD, Karsenty G (2004). Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol*, 164(4), 509-514.

Davey RA, Turner AG, McManus JF, Chiu WS, Tjahyono F, Moore AJ, Atkins GJ, Anderson PH, Ma C, Glatt V, MacLean HE, Vincent C, Bouxsein M, Morris HA, Findlay DM, Zajac JD (2008). Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice. *J Bone Miner Res*, 23(8), 1182-1193.

Del Fattore A, Cappariello A, Teti, A (2008). Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*, 42(1), 19-29.

Delmas PD, Vergnaud P, Arlot ME, Pastoureau P, Meunier PJ, Nilssen MH (1995). The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate—is activated resorption a prerequisite for the in vivo effect of PTH on formation in a remodeling system? *Bone*, 16(6), 603-610.

van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Roelse M, Weyts F, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP (2006). Evidence that both 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 24hydroxylated D3 enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J Cell Biol*, 99(3), 922-935.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100(2), 197-207.

Dumont RA, Zhao YD, Holt JR, Bähler M, Gillespie PG (2002). Myosin-I isozymes in neonatal rodent auditory and vestibular epithelia. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3(4), 375-389.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, 434(7032), 514-520.

Elkind-Hirsch K, Butler WJ, Bhushan M, Hirsch D, Bhushan R (2008). Clinical experience with the addition of pramlintide in patients with insulin-requiring type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31(1), 39-40.

Erben RG, Bante U, Birner H, Stangassinger M (1997). Prophylactic effects of 1,24,25trihydroxyvitamin D3 on ovariectomy-induced cancellous bone loss in the rat. *Calcif Tissue Int*, 60(5), 434-440.

Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM (2003). The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med*, 349(13), 1216-1226.

Foster GV, Baghdiantz A, Kumar MA, Slack E, Soliman HA, Macintyre I (1964). Thyroid Origin of Calcitonin. *Nature*, 202, 1303-1305.

Goldring SR, Gorn AH, Yamin M, Krane SM, Wang JT (1993). Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm Metab Res*, 25(9), 477-480.

Gooi JH, Pompolo S, Karsdal MA, Kulkarni NH, Kalajzic I, McAhren SH, Han B, Onyia JE, Ho PW, Gillespie MT, Walsh NC, Chia LY, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA (2010). Calcitonin impairs the anabolic effect of PTH in young rats and stimulates expression of sclerostin by osteocytes. *Bone*. [Epub ahead of print]

Gorn AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, Manning CA, Lodish HF, Krane SM, Goldring SR (1992). Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *J Clin Invest*, 90(5), 1726-1735.

Gorn AH, Rudolph SM, Flannery MR, Morton CC, Weremowicz S, Wang TZ, Krane SM, Goldring SR (1995). Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone. The first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction. *J Clin Invest*, 95(6), 2680-2691.

Granholm S, Lundberg P, Lerner UH (2007). Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoetic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF-{kappa}B and c-Fms. *J Endocrino*, 195(3), 415-427.

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265(5168), 103-106.

Hirsch PF, Hagaman JR (1986). Reduced bone mass in calcitonin-deficient rats whether lactating or not. *J Bone Miner Res*, 1(2), 199-206.

Hock JM, Gera I (1992). Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, 7(1), 65-72.

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

Huang CL, Sun L, Moonga BS, Zaidi M (2006). Molecular physiology and pharmacology of calcitonin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52(3), 33-43.

Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P, Perkovic S, Streichert T, Emeson RB, Amling M, Schinke T (2008). The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), 210-217.

Huebner AK, Schinke T, Priemel M, Schilling S, Schilling AF, Emeson RB, Rueger JM, Amling M (2006). Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res*, 21(12), 1924-1934.

Inoue D, Shih C, Galson DL, Goldring SR, Horne WC, Baron R (1999). Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology*, 140(3), 1060-1068.

Iwai K, Ishii M, Ohshima S, Miyatake K, Saeki Y (2007). Expression and function of transmembrane-4 superfamily (tetraspanin) proteins in osteoclasts: reciprocal roles of Tspan-5 and NET-6 during osteoclastogenesis. *Allergol Int,* 56(4), 457-463.

Karsdal MA, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K (2008). Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 366(2), 483-488.

Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science*, 323(5913), 524-527.

Khosla S (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142(12), 5050-5055.

Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1791(7), 692-696.

Kirkland TN, Viriyakosol S (1998). Structure-function analysis of soluble and membranebound CD14. *Prog Clin Biol Res*, 397, 79-87.

Koh AJ, Demiralp B, Neiva KG, Hooten J, Nohutcu RM, Shim H, Datta NS, Taichman RS, McCauley LK (2005). Cells of the osteoclast lineage as mediators of the anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Endocrinology*, 146(11), 4584-4596.

Kuestner RE, Elrod RD, Grant FJ, Hagen FS, Kuijper JL, Matthewes SL, O'Hara PJ, Sheppard PO, Stroop SD, Thompson DL (1994). Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. *Mol Pharmacol*, 46(2), 246-255.

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3), 456-469.

Lee SK, Goldring SR, Lorenzo JA (1995). Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology*, 136(10), 4572-4581.

Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF Jr, Lodish HF, Goldring SR (1991). Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 254(5034), 1022-1024.

Luo CW, Lin HJ, Chen YH (2001). A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J Biol Chem*, 276(10), 6913- 6921.

Martin TJ, Seeman E (2008). Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 22(5), 701-722.

Martin TJ, Sims NA (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 11(2), 76-81.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683), 333-339.

Moonga BS, Alam AS, Bevis PJ, Avaldi F, Soncini R, Huang CL, Zaidi M (1992). Regulation of cytosolic free calcium in isolated rat osteoclasts by calcitonin. *J Endocrinol*, 132(2), 241-249.

Morfis M, Tilakaratne N, Furness SG, Christopoulos G, Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM (2008). Receptor activity-modifying proteins differentially modulate the G protein-coupling efficiency of amylin receptors. *Endocrinology*, 149(11), 5423-5431.

Muff R, Bühlmann N, Fischer JA, Born W (1999). An amylin receptor is revealed following cotransfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*, 140(6), 2924-2927.

Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, Kato S (1999). Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology*, 140(5), 2224-2231.

Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ (1986). Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest*, 78(2), 355-360.

Nishikawa T, Ishikawa H, Yamamoto S, Koshihara Y (1999). A novel calcitonin receptor gene in human osteoclasts from normal bone marrow. *FEBS Lett.*, 458(3), 409-414.

Otto F, Lübbert M, Stock M (2003). Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Biol Chem*, 89(1), 9-18.

Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), 20764-20769.

Pondel, M (2000). Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*, 81(6), 405-422.

Raisz LG (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, 115(12), 3318-3325.

Reidelberger, RD, Kelsey L Heimann D (2002). Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(5), R1395-1404.

Riddle M, Pencek R, Charenkavanich S, Lutz K, Wilhelm K, Porter L (2009). Randomized comparison of pramlintide or mealtime insulin added to basal insulin treatment for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(9), 1577-1582.

Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, Koda JE, Anderson CM, Parkes DG, Baron AD (2008). Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(20), 7257-7262.

Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH (2006). Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J*, 25(24), 5840-5851.

Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, Inouye K (2005). Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci*, 10, 119-134.

Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Blicharski D, Rueger JM, Gagel RF, Emeson RB, Amling M (2004). Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alphacalcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res.*, 19(12), 2049-2056.

Seeman E (2003). Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 3, S2-8.

Seo EG, Einhorn TA, Norman AW (1997). 24R,25-dihydroxyvitamin D3: an essential vitamin D3 metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology*, 138(9), 3864-3872.

Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T (1999). Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25- hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 8253-8258.

Smith SR, Aronne LJ, Burns CM, Kesty NC, Halseth AE, Weyer C (2008). Sustained weight loss following 12-month pramlintide treatment as an adjunct to lifestyle intervention in obesity. *Diabetes Care*, 31(9), 1816-1823.

Staunton H (2006). Sudeck atrophy. Ir Med J, 99(10), 313-315.

Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J*, 9(9), 745-754.

Suominen H (2006). Muscle training for bone strength. Aging Clin Exp Res, 18(2), 85-93.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111(3), 305-317.

Teitelbaum SL (2000). Bone resorption by osteoclasts. Science, 289(5484), 1504-1508.

Tilakaratne N, Christopoulos G, Zumpe ET, Foord SM, Sexton PM (2000). Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1), 61-72.

Vico L, Lafage-Proust MH, Alexandre C (1998). Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo. *Bone*, 95S-100S.

Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA (2008). Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Mineral Res*, 23(12), 2025-2032.

Wang Y, Keogh RJ, Hunter MG, Mitchell CA, Frey RS, Javaid K, Malik AB, Schurmans S, Tridandapani S, Marsh CB (2004). SHIP2 is recruited to the cell membrane upon macrophage colonystimulating factor (M-CSF) stimulation and regulates M-CSF-induced signaling. *J Immunol*, 173(11), 6820-6830.

Watford WT, Li D, Agnello D, Durant L, Yamaoka K, Yao ZJ, Ahn HJ, Cheng TP, Hofmann SR, Cogliati T, Chen A, Hissong BD, Husa MR, Schwartzberg P, O'Shea JJ, Gadina M (2006). Cytohesin binder and regulator (cybr) is not essential for T- and dendritic-cell activation and differentiation. *Mol Cell Biol*, 26(17), 6623-6632.

Whyte MP (2006). Clinical practice. Paget's disease of bone. N Engl J Med, 355(6), 593-600.

Wolff AE, Jones AN, Hansen KE (2008). Vitamin D and musculoskeletal health. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4(11), 580-588.

Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS (2006). Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology*, 147(9), 4010-4021.

Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, 135(5), 825-837.

Yamin M, Gorn AH, Flannery MR, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Tapp DR, Krane SM, Goldring SR (1994). Cloning and characterization of a mouse brain calcitonin receptor complementary deoxyribonucleic acid and mapping of the calcitonin receptor gene. *Endocrinology*, 135(6), 2635-2643.

Yang M, Kream BE (2008). Calcitonin induces expression of the inducible cAMP early repressor in osteoclasts. *Endocrine*, 33(3), 245-253.

Zaidi M, Moonga BS, Bevis PJ, Bascal ZA, Breimer LH (1990). The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 28(2), 109-174.

Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL (2003). Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res*, 18(4), 599-609.

Zaidi M, Moonga BS, Abe E (2002). Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest*, 110(12), 1769-1771.

Zhong Y, Armbrecht HJ, Christakos S (2009). Calcitonin, a regulator of the 25hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene. *J Biol Chem*, 284(17), 11059-11069.

# 10. Anhang

## 10.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

*Michael Amling:* Vielen Dank für Deine grenzenlose Unterstützung, Deine Menschlichkeit und so manche spektakuläre Konversation.

*Thorsten Schinke:* Herzlichen Dank für die vielen interessanten und ergiebigen Diskussionen, Deine tollen Anregungen und die exzellente Betreuung.

*Jochen, Joachim und Till:* Es war mir ein königlicher Genuss, mit Euch den Arbeitsplatz zu teilen und mit Witz und Gaunerei so manch bittere Stunde zu überstehen. Vielen Dank für Eure hochgeschätzen Anregungen, Eure Unterstützung und das Privileg Eurer Freundschaft.

*Antje Huebner:* Das von Dir geschaffene Mausmodell ist wirklich gut, und ohne Deine Arbeit wäre diese Dissertation wohl ganz anders geworden.

*Anke Baranowsky, Claudia Neunaber:* Ohne Euch wäre dieses Projekt wohl an grundlegenden Dingen gescheitert.

Sandra Perkovic: Danke für Deine Mühen bei der Einarbeitung und für Dein Mitwirken an diesem Projekt.

*Olga Winter:* Vielen herzlichen Dank für die Anfertigung der vielen, vielen Knochenhistologien.

*Tierpflegerinnen und –pfleger:* Danke für die exzellente Betreuung und Pflege der verwendeten Mauskolonien.

Ein uneingeschränktes und ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, meine Schwester Christina, meine Tante Gea und ihren Sohn Christoph, meine Großeltern und an Margarethe Broemel für ihre nie endende Unterstützung und ihr Vertrauen.

## 10.2 Lebenslauf

Name:	Johannes Hermann Keller
Geburtstag:	24.07.1983
Geburtsort:	Illertissen, Bayern
Eltern:	Gisela Keller, geb. Schott, Oberstudienrätin
	Hans-Joachim Keller, Studiendirektor
1994-2000	Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium, Weißenhorn
2000-2001	Gladbrook-Reinbeck High School, Reinbeck, IA, USA
2001-2003	Abitur am Hans-und Sophie Scholl Gymnasium, Ulm
2003-2004	Zivildienst bei Zusammenleben e.V., Hamburg
2004-2006	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität, Budapest, HU
2006-2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2007-2010	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Osteologie und Biomechanik,
	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

#### 2009-2010 Praktisches Jahr:

- Onkologie and Hematologie, King's College, London, UK
- Endokrinologie, Bart's and the London School of Medicine and Dentistry, London, UK
- Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
- Traumatologie, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA
- Herzchirurgie, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA
- Orthopädie, Albertinen Krankenhaus, Hamburg

### Herbst 2010

- Staatsexamen im Fach Humanmedizin und Approbation als Arzt
- PhD Programm am Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
- Aufbaustudiengang Molekularbiologie am Zentrum f
  ür Molekulare Neurobiologie, Universit
  ätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

#### Präsentationen

 Keller J, Huebner AK, Catala-Lehnen P, Schinke T, Amling M (2008). High Bone Mass Due to Increased Bone Formation in Mice Lacking the Calcitonin Receptor. 30<sup>th</sup> ASBMR Annual Meeting, Montreal, Canada.

#### Publikationen

- Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P, Perkovic S, Streichert T, Emeson RB, Amling M, Schinke T (2008). The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch Biochem Biophys*, 15;473(2):210-7.
- Schulze J, Albers J, Baranowsky A, Keller J, Spiro A, Streichert T, Zustin J, Amling M, Schinke T (2010). Osteolytic prostate cancer cells induce the expression of specific cytokines in bone-forming osteoblasts through a Stat3/5-dependent mechanism. *Bone*, 46(2):524-33
- Schulze J, Bickert T, Beil FT, Albers J, Zaiss MM, Streichert T, Klaetschke K, Keller J, Hissnauer T, Spiro A, Gessner A, Schett G, Amling M, McKenzie A, Horst A, Schinke T (2010). Interleukin-33 is Expressed in Differentiated Osteoblasts and Blocks Osteoclast Formation From Bone Marrow Precursor Cells. *J Bone Miner Res*, [Epub ahead of print].
- Albers J, Schulze J, Gebauer M, Baranowsky A, Keller J, Beil FT, Marshall RP, Wintges K, Friedrich F, Priemel M, Schilling AF, Rueger JM, Cornils K, Fehse B, Streichert T, Sauter G, Jakob F, Insogna K, Pober B, Knobeloch KP, Francke U, Amling M, Schinke T. Control of bone formation by the Serpentine Receptor Frizzled . JCB, *accepted*.
- Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Lueth A, Marshall RP, Albers J, Schulze J,
   Schilling S, Haberland M, Perkovic S, Hermans-Borgmeyer I, Rueger JM, Streichert T,
   Levkau B, Sauter G, Kleuser B, Chun J, Schinke T, and Amling M. Control of bone
   formation by the calcitonin receptor in osteoclasts. *In preparation*.

# 11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: .....