

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling, MBA

Untersuchungen zur Funktion des Wachstumsfaktors Midkine und seines putativen Rezeptors Rptp ζ in Osteoblasten

Dissertation

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

vorgelegt von

Vincent Christian Kanbach
aus Hamburg

Hamburg 2011

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 04.11.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. T. Schinke

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. F. Barvencik

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Knochenphysiologie.....	1
1.1.1 Die Osteoporose.....	1
1.1.2 Weitere Erkrankungen des Knochenstoffwechsels.....	2
1.2 Knochenbildung	3
1.2.1 Osteoblasten	3
1.2.2 Osteozyten	5
1.2.3 Regulation der Knochenbildung (Wnt-Signalweg)	6
1.3 Knochenresorption.....	7
1.3.1 Osteoklasten	7
1.3.2 Regulation der Knochenresorption (Rankl-Opg-System).....	9
1.4 Heparin-bindende Wachstumsfaktoren	9
1.4.1 Struktur, Funktion und Bedeutung.....	9
1.4.2 Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren im Knochen.....	10
1.4.3 Putative Mdk-Rezeptoren	10
1.4.4 Molekularer Effekt von Mdk auf Osteoblasten	12
1.5 Potentielle Bedeutung von Mdk und Rptp ζ für die Tumorentstehung	13
1.5.1 Der seltene Knochentumor: Das Osteosarkom	13
1.5.2 Grundzüge der Tumorgenese	14
1.5.3 Einfluss von Mdk und Rptp ζ auf die Tumorgenese.....	14
1.6 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	18
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese aus genomischer DNA.....	22
2.2.4 Isolierung und Differenzierung primärer Osteoblasten aus Calvarien.....	22
2.2.5 cDNA-Synthese und RNA Isolation	23
2.2.6 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	24
2.3 Histologie und Morphologie.....	24
2.3.1 Calceinmarkierung.....	24

2.3.2	Präparation der Skelette	25
2.3.3	Paraffin- und Acrylat-Histologie	25
2.3.4	Von Kossa-/van Gieson-Färbung	26
2.3.5	Toluidinblau-Färbung.....	27
2.3.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
2.3.7	Histomorphometrie	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Charakterisierung eines <i>Akp2/Mdk</i> -defizienten Mausmodells.....	28
3.1.1	Größe und Gewicht <i>Akp2/Mdk</i> -defizienter Mäuse	28
3.1.2	Histomorphometrische Analyse <i>Akp2</i> - und <i>Akp2/Mdk</i> -defizienter Mäuse	29
3.1.3	Quantifizierung von Osteoidanlagerung in Lendenwirbelkörpern <i>Akp2</i> - und <i>Akp2/Mdk</i> -defizienter Mäuse	32
3.2	Untersuchung der potentiellen Interaktion von Mdk und Rptpζ	32
3.2.1	Mdk-Einfluss auf die Genexpression in <i>Ptprz1</i> -defizienten Osteoblasten.	33
3.2.2	Analyse <i>Mdk/Ptprz1</i> -defizienter Mäuse	34
3.2.3	Histomorphometrische Analyse <i>Mdk/Ptprz1</i> -defizienter Mäuse	35
3.3	Charakterisierung <i>Trp53</i> - und <i>Trp53/Ptprz1</i> -defizienter Mäuse	38
3.3.1	Charakterisierung <i>Trp53</i> -defizienter Mäuse	38
3.3.2	Histomorphometrische Wirbelkörperanalyse <i>Trp53</i> -defizienter Mäuse	39
3.3.3	Einfluss von <i>Ptprz1</i> auf die Osteosarkomentstehung	40
3.3.4	Histologische Analyse <i>Trp53/Ptprz1</i> -defizienter Mäuse	41
3.3.5	Analyse von Tumorbefunden.....	43
4.	Diskussion	46
4.1	Auswirkungen einer Doppeldefizienz von <i>Akp2</i> und <i>Mdk</i>	46
4.2	Rptpζ-abhängiger Einfluss von Mdk auf die Genexpression in Osteoblasten	47
4.3	Auswirkungen einer <i>Mdk/Ptprz1</i> -Defizienz auf den Wnt-Signalweg <i>in vivo</i>	48
4.4	Einfluss von <i>Ptprz1</i> und <i>Trp53</i> auf die Osteosarkomentstehung	49
4.5	Ausblick.....	52
5.	Zusammenfassung.....	53
6.	Abkürzungen	54
7.	Literaturverzeichnis	56
8.	Danksagung.....	68
9.	Lebenslauf	69
10.	Eidesstattliche Versicherung	70

1. Einleitung

1.1 Knochenphysiologie

Der Knochen ist entgegen gängiger Vorstellungen ein stoffwechselaktives Gewebe, das nicht nur einmalig produziert wird, sondern einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Er dient dem Körper als Stützgerüst, Mineralienreservoir und ist Ursprung hämatopoetischer Zellen. Die Bildung der 206-208 Knochen des Menschen verläuft auf verschiedene Arten. Eine Möglichkeit ist die Knochenbildung direkt aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym, was unter anderem für Schädeldach und Claviculae gilt (desmale Ossifikation). Die meisten Knochen werden allerdings über eine Vorstufe aus Knorpelzellen gebildet (chondrale Ossifikation). Bis zum Alter von 30 Jahren wird der Knochen ständig umgebaut, wobei die Knochensynthese überwiegt. Nach dem 30. Lebensjahr verliert der Mensch langsam, aber beständig an Knochenmasse, was im Extremfall zu Osteoporose führen kann.

1.1.1 Die Osteoporose

Die Osteoporose ist die häufigste Erkrankung des Knochens. Sie ist durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit der Folge eines erhöhten Frakturrisikos charakterisiert (WHO 1994). Im Laufe des Lebens ist statistisch jede dritte Frau und jeder fünfte Mann betroffen (Seeman 1995). Insgesamt leiden in Deutschland um die 8 Millionen Menschen an Osteoporose, Tendenz steigend. Damit ist sie eine der häufigsten Erkrankungen der Republik und verursacht jährliche Kosten, die 5 Milliarden Euro übersteigen (Oberender and Fritschi 2003).

Die Osteoporose kann in zwei große Gruppen eingeteilt werden: die primäre (idiopathische) und die sekundäre Form. Unter der primären Form werden vor allem die postmenopausale und senile Osteoporose zusammengefasst. Dagegen tritt die sekundäre Form infolge von bestimmten Grunderkrankungen wie Hyperthyreose, Malabsorptionsstörungen oder juveniler idiopathischer Arthritis auf (Bartl 2004).

Die ursächliche Pathologie ist ein Knochenschwund, sei es durch vermehrte Resorption, verminderte Produktion oder beidem zugleich. Der Knochen betroffener Menschen wird porös, instabil und neigt zu Frakturen (Amling et al. 1994; Amling et al. 1996; Amling et al. 1996). Das ist besonders bei alten Menschen ein Problem, da dies mit einer um 10-20% erhöhten Mortalität innerhalb des Jahres nach einer Oberschenkelhalsfraktur einhergeht (Oberender and Fritschi 2003).

Die Therapie der Osteoporose kann von verschiedenen Seiten erfolgen. Als Basis empfiehlt sich richtige Ernährung (Calcium und Vitamin D reich), das Minimieren von Risikofaktoren wie Nikotin, Alkohol und sedierender Medikamente, eine ausgewogene Bewegung, einen BMI > 20 und analgetisch medikamentöse Begleitung (Empfehlung DVO, Dachverband Osteologie). Die spezifische medikamentöse Therapie besteht aktuell aus einer antiresorptiven oder einer osteoanabolen Behandlung. Um den Knochenumsatz zu stoppen, werden Östrogene, Gestagene (Riggs et al. 2002; Rossouw et al. 2002), Calcitonin, Vitamin D Metaboliten (Vondracek 2010) und Bisphosphonate eingesetzt (Baran 2001; Harris 2001; Walsh et al. 2001). Die knochenbauende Behandlung wird durch Strontium- und Fluoridsalze (Meunier et al. 2004), anabole Steroide und Parathormonersatz (Seeman and Delmas 2001; Miyakoshi 2004), Wachstumsfaktoren und Prostaglandine versucht (Murray and Shalet 2000; Vrotsos et al. 2003). Die Effektivität der osteoanabolen Therapie hält sich derzeit jedoch noch in Grenzen. Somit stellt die Haupttherapie immer noch die antiresorptive Variante, vor allem die mit Bisphosphonaten, dar. Die Knochenresorption wird dadurch jedoch nur gebremst. Ein besserer Ansatz wäre eine gezielt kontrollierte Stimulation der Knochensynthese. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass die Zellen unkontrolliert proliferieren (Enders 2009). Für die gezielt osteoanabole Therapie ist es deswegen wichtig, die geeigneten Zielproteine zu identifizieren und Mechanismen ihrer Wirkung genau zu verstehen.

1.1.2 Weitere Erkrankungen des Knochenstoffwechsels

Eine Krankheit, die im Alter häufig mit der Osteoporose einhergeht, ist die Osteomalazie, welche auf einer Hypomineralisation des Knochens basiert. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Der häufigste Grund ist der Vitamin D-Mangel (Wolff et al. 2008). Die sich daraus ergebenden Folgen sind dumpfe Schmerzen und die erhöhte Anfälligkeit für Frakturen. Die zweithäufigste Erkrankung des Knochenstoffwechsels ist die Osteodystrophia deformans (Morbus Paget). Sie ist durch eine lokale Knochenumbau Störung mit anfänglich erhöhter Knochenresorption charakterisiert, welches zu Schmerzen, Knochendeformitäten und Frakturen führt (Roodman and Windle 2005). Eine Komplikation dieser Erkrankung ist das Osteosarkom, welches in 1-2 % der Fälle auftritt (Hansen et al. 1999).

Die Osteopetrose, im Volksmund auch Marmorknochenkrankheit genannt, geht im Gegensatz dazu mit einer Resorptionsstörung einher. Dies führt zu ungerichteten Knochenanhäufungen, die häufig Frakturen nach sich ziehen, oder aber auch komplikationsfrei verlaufen können (Sly et al. 1983; Gerritsen et al. 1994; Cleiren et al. 2001).

Eine Knochenverdichtung wird allgemein als Osteosklerose definiert. Diese kann auf einer Knochenresorptionsstörung, einer Osteoklastendifferenzierungsstörung oder erhöhter Knochenformationsrate basieren (de Vernejoul 2008; de Vernejoul and Kornak 2010).

1.2 Knochenbildung

1.2.1 Osteoblasten

Am Knochenaufbau sind verschiedene Zelltypen beteiligt. Die anabolen Vorgänge werden von Osteoblasten und Osteozyten vermittelt (Abb.1.1), wobei die einfache Knochensynthese von Osteoblasten übernommen wird. Diese entstehen aus dem pluripotenten embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym. Viele andere Zellen wie Adipozyten (Fettzellen), Myoblasten (Muskelzellen), Fibroblasten (Bindegewebszellen) und Chondrozyten (Knorpelzellen) sind gleichen Ursprungs. Durch den Einfluss bestimmter Faktoren kommt es zur spezifischen Differenzierung zu Präosteoblasten. Faktoren, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, stellen RUNX-2 (runt-related transcription factor 2), Osterix, aber auch BMPs (bone morphogenic proteins) und FGFs (fibroblast growth factors) dar (Karsenty 1999; Nakashima and de Crombrughe 2003; Teplyuk et al. 2009). Die endgültige Osteoblastendifferenzierung erfolgt durch weitere Regulatoren, z.B. Vitamin D, Östrogene, PTH (Parathormon) und verschiedene Zytokine (Abb.1.1A). Der wichtigste Signalweg der ausdifferenzierten Osteoblasten ist der Wnt-Signalweg (Gong et al. 2001).

Nach Ausdifferenzierung schließen sich Osteoblasten zu Gruppen bis zu 200 Zellen zusammen (Abb.1.1B). Es kommt zu Einschlüssen, welche die Entwicklung von Osteozyten fördern. Außerdem wird von den Zellverbänden die extrazelluläre Matrix des Knochens, das Osteoid, sezerniert. Diese besteht zu 95% aus TypI-Kollagen. Die restlichen 5% setzen sich aus nicht-kollagenen Bestandteilen zusammen, wobei Osteocalcin, BSP (bone sialoprotein) und Osteopontin die größten Anteile bilden. Ab der zweiten Woche nach Beginn einer Knochenbildung beginnt die Mineralisation dieser extrazellulären Matrix.

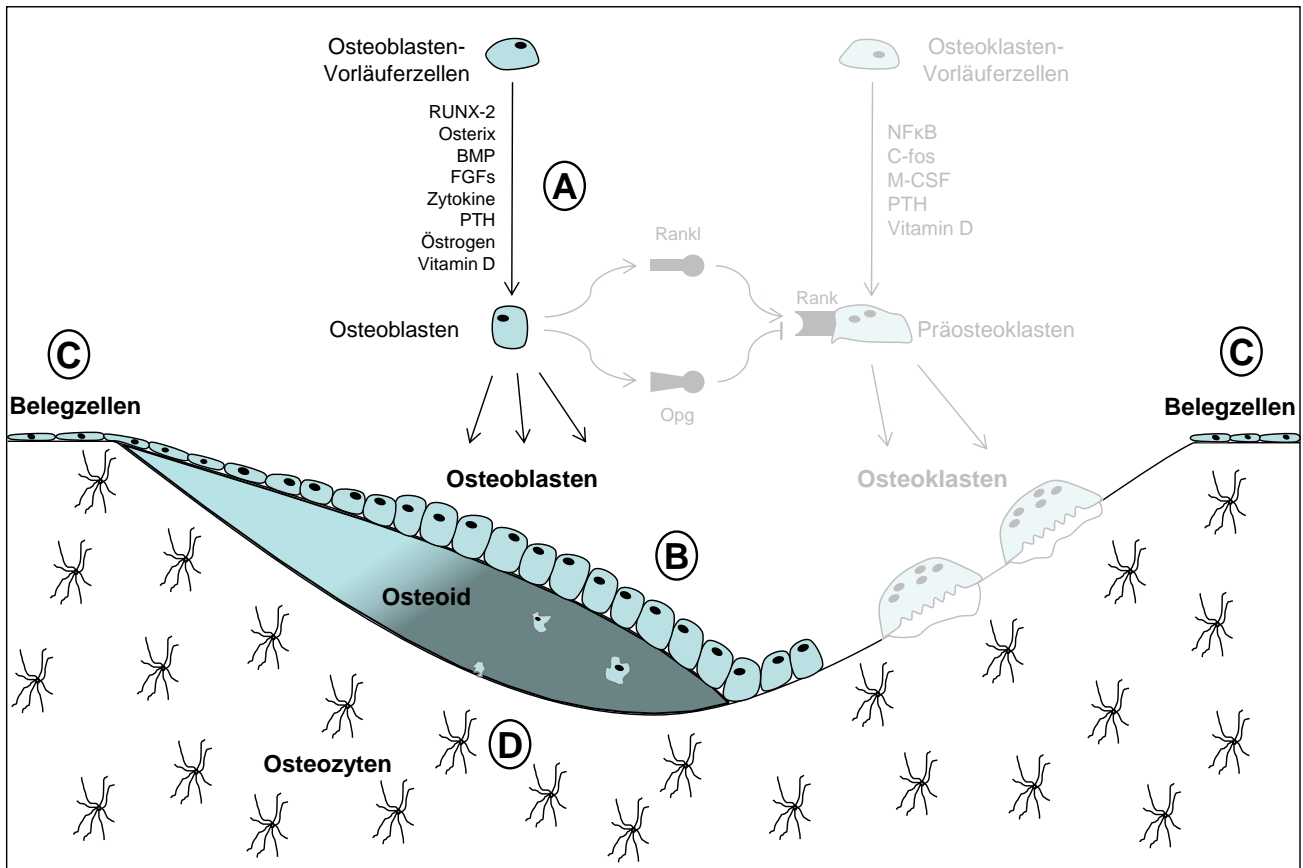


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Knochenbildung. (A) Die Entwicklung von Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen ist auf den Einfluss verschiedener Faktoren angewiesen. (B) Die ausgereiften Osteoblasten lagern sich an Knochen an und sezernieren Osteoid. (C) Dies geschieht mit der Zeit ungerichtet, wodurch die Osteoblasten sich teilweise zu Knochenbelegzellen degradieren. (D) Andere Schicksale des Osteoblasten sind die Ausdifferenzierung zu Osteozyten oder die Apoptose. Abkürzung stehen für: Runt-related Transcription Factor 2 (RUNX-2); Bone Morphogenic Protein (BMP); Fibroblast Growth Factors (FGFs); Parathormon (PTH).

Die verantwortlichen Prozesse sind noch nicht vollständig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer Einlagerung von Hydroxylapatit, einer Verbindung von Calcium und anorganischen Phosphaten, kommt (Karsenty 2003). Diese Einlagerung kann durch Pyrophosphat gehemmt werden und unterliegt einem empfindlichen Gleichgewicht. Die Regulation erfolgt fast ausschließlich durch drei Proteine.

Die Proteine Npp1 (Nucleotid Pyrophosphat Phosphodiesterase1) und Ank (Ankylosis Protein) erhöhen die extrazelluläre Pyrophosphatkonzentration. Npp1 wird durch das Gen *Enpp1* kodiert. Seine Aufgabe besteht darin, von extrazellulären anorganischen Triphosphaten (z.B. Adenosintriphosphat) Pyrophosphat abzuspalten (Abb1.2A). Bei Fehlen dieses Proteins kommt es zu einer Hypermineralisation der Knochenmatrix sowie ektopischer Mineralablagerung (Okawa et al. 1998; Johnson et al. 2000; Hesse et al. 2002; Rutsch et al. 2008). Ank wird durch das Gen *Ank* kodiert. Das Protein ist ein membranständiger Kanal, der Pyrophosphat von intra- nach extrazellulär schleust und auf diese Weise die Konzentration

erhöht (Abb.1.2B). Bei Abwesenheit dieses Proteins kommt es ebenfalls zu einer Hypermineralisation der Knochenmatrix und zu ektopischen Mineralablagerungen (Harmey et al. 2004). Dieses ist unter anderem durch die wegfallende mineralisationshemmende Wirkung des Pyrophosphates zu erklären (Abb.1.2C).

Ein Gegenspieler dieser Proteine ist die für die Mineralisation mitverantwortliche gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (Tnap, tissue-nonspecific alkaline phosphatase). Sie wird durch das Gen *Akp2* kodiert und spaltet Pyrophosphat zu Phosphat (Abb.1.2.D). Dieses steht dadurch zum Einbau ins Hydroxylapatit zur Verfügung (Abb.1.2E). Ein Fehlen der Tnap führt zu Hypophosphatasie und Knochenmineralisationsstörungen (Fedde et al. 1999; Watanabe et al. 2002). Ein direkter Zusammenhang dieses Gleichgewichts konnte anhand von Maus-Defizienzmodellen nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass ein durch *Akp2*-Defizienz ausgelöster Phänotyp sowohl durch eine Doppeldefizienz mit *Ank* als auch mit *Enpp1* korrigiert werden kann (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004).

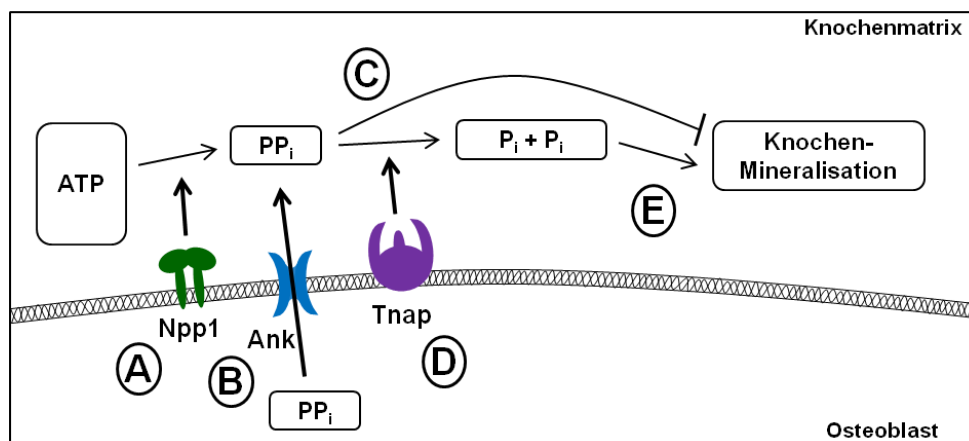


Abb.1.2: Schematische Darstellung essenzieller Mineralisationsproteine und ihre Funktion. (A) Das membrangebundene Protein Npp1 erhöht die extrazelluläre Pyrophosphatkonzentration durch das Spalten von Triphosphaten. **(B)** Eine weitere extrazelluläre Konzentrationserhöhung wird durch den membranständigen Pyrophosphatkanal Ank erreicht. **(C)** Das vorliegende Pyrophosphat wirkt hemmend auf die Mineralisation. **(D)** Die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (Tnap) spaltet das Pyrophosphat zu Phosphaten. **(E)** Diese stehen daraufhin für die Mineralisation bereit. Abkürzungen stehen für: Nucleotid Pyrophosphat Phosphodiesterase1 (Npp1); Ankylosis Protein (Ank); Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (Tnap); Adenosin-Triphosphat (ATP); Pyrophosphat (PPi); Phosphat (Pi).

1.2.2 Osteozyten

Den zweiten anabolen Zelltyp stellen die Osteozyten dar. Sie bilden mit 95% die Mehrheit der Knochenzellen und werden in der Literatur unter anderem mit Metaphern wie „buried alive“ -lebendig begraben- (Franz-Odendaal et al. 2006) oder „Choreography from the tomb“

-Choreografie aus dem Grab- (Manolagas 2006) beschrieben. Dies geschieht aus gutem Grund, denn bis zu einem bestimmten Zeitpunkt sezernieren Osteoblasten Osteoid gezielt und zwar in Richtung Knochenoberfläche. Sie verlieren mit der Zeit jedoch ihre Polarität, wodurch die Sezernierung ungeordnet in alle Richtungen erfolgt. Für das Schicksal des Osteoblasten bedeutet dies, dass entweder der kontrollierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet wird, er zu einem inaktiven Osteoblasten an der Oberfläche degradiert wird, den sogenannten Knochenbelegzellen (Abb.1.1C), oder dass er sich zu einem Osteozyten entwickelt (Abb.1.1D; Rochefort et al. 2010). Letzteres tritt bei ca. 10-20% der Osteoblasten ein (Aubin and Turksen 1996). Diese Entwicklung erfolgt durch das vollkommene Einhüllen mit Osteoid und der Einbettung in Lakunen zwischen den Knochenlammellen. Bestandteil der Entwicklung ist der Auswuchs Neuronen-ähnlicher zytoplasmatischer Auswüchse (Canaliculi), welche die Osteozyten befähigen, untereinander und mit Zellen der Knochenoberfläche zu kommunizieren. Dadurch sind die Osteozyten wesentlicher Bestandteil der Baueinheiten des Röhrenknochens, dem Osteon. Dieses besteht aus einem gefäß- und nerventragenden Zentralkanal, welcher von ringförmig angeordneten Knochenlammellen flankiert wird. Die genauen molekularbiologischen Mechanismen für diese Entwicklung sind bis dato nicht bekannt. Das Dentix-Matrix-Protein-1 (Dmp1) scheint allerdings eine tragende Rolle zu spielen. Es wird stark in Osteozyten exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten. Ein Fehlen des Gens zieht eine Hypophosphatämie sowie veränderte Osteozytenstrukturen nach sich, begleitet von einer Osteomalazie (Rios et al. 2005; Feng et al. 2006; Lorenz-Depiereux et al. 2006).

1.2.3 Regulation der Knochenbildung (Wnt-Signalweg)

Der Knochenumbau und das Knochenwachstum werden über eine Reihe komplexer Signalkaskaden kontrolliert. Diese sind auf verschiedenen Ebenen verschaltet. Es gibt zentrale wie auch periphere Mechanismen. Die dabei wichtigsten Moleküle sind PTH, Vitamin D, Calcitonin und Östrogene.

Eine weitere Regulation läuft über den Wnt-Signalweg. Glykoproteine der Wnt-Familie sind Wachstumsfaktoren, welche aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen zusammengefasst werden und neben der Knochenentwicklung auch für andere Entwicklungs- und homöostatische Prozesse essentiell sind (Gordon and Nusse 2006). Die große Bedeutung dieser Moleküle für den Knochenstoffwechsel konnte erstmalig durch das Fehlen von LRP5/6 (low density protein 5/6), einem wichtigen Ko-Rezeptor von Wnt, bei dem Osteoporose-

Pseudoglioma-Syndrom gezeigt werden, wobei im Kindesalter beginnende Osteoporose und Blindheit auftreten (Gong et al. 2001; Kato et al. 2002; Fujino et al. 2003; Holmen et al. 2004). Verschiedene Forschungsgruppen konnten außerdem nachweisen, dass bei einer Osteosklerose eine vermehrte Expression des Rezeptors LRP5/6 sowie verringerte Nachweisbarkeit eines seiner Antagonisten, dem Sklerostin (kodiert von SOST), vorliegt (Li et al. 2005; Semenov et al. 2005). Im Mausmodell konnte bestätigt werden, dass der Verlust des Genes SOST zu übermäßigem Knochenwachstum, vermehrter Knochendichte sowie Knochenstärke führt (Beighton et al. 1976; Stein et al. 1983; Beighton 1988; Hansen et al. 1999). Im Gegenzug konnte nachgewiesen werden, dass durch Bindung und daraus resultierender Antagonisierung von Sklerostin an LRP5/6 die Osteoblastendifferenzierung negativ beeinflusst wird (Li et al. 2005; Collette et al. 2010).

Die intrazelluläre Signaltransduktion der Wnt-Liganden erfolgt primär über eine Stabilisierung des zytoplasmatischen Proteins β -Catenin. Im inaktiven Zustand wird β -Catenin durch einen Molekül-Komplex dephosphoryliert, degradiert und durch Proteasomen abgebaut (Zeng et al. 1997). Kommt es zur Aktivierung des Wnt-Signalweges, bindet das Wnt-Molekül an seine Rezeptoren Frizzled und LRP5/6. Dies führt zu einer fehlenden Dephosphorylierung von β -Catenin, das im Zytosol akkumuliert und in den Nukleus transloziert. Dort wird die spezifische Genexpression aktiviert (Molenaar et al. 1996).

1.3 Knochenresorption

1.3.1 Osteoklasten

Die Gegenspieler der knochenaufbauenden Zellen sind die multinukleären Osteoklasten. Sie sind die einzigen Zellen des Körpers, die in der Lage sind, Knochen zu resorbieren. Damit sind sie für die katabolen Prozesse am Knochen zuständig. Sie kommen seltener als die Osteoblasten vor und besetzen ca. 1% der Knochenoberfläche. Die Osteoklasten entstehen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie und werden durch Fusion hämatopoetischer Vorläuferzellen gebildet (Abb.1.3A; Boyle et al. 2003). Für ihre Entwicklung sind Faktoren wie der Transkriptionsfaktor NF κ B (Nuclear Factor Kappa β), das Proto-Onkogen c-fos (Retrovirus associated DNA sequence -C), Rankl (Ligand to receptor activator of NF κ B) und Opg (Osteoprotegerin) unabdingbar (Abb.1.3B). Auch Hormone haben Einfluss auf die Osteoklastenentwicklung. Dabei sind vor allem Vitamin D, Parathormon und M-CSF (macrophage-stimulating factor) zu nennen (Cohen 2006).

Um aktiv zu werden, heften sich die Osteoklasten an der Knochenoberfläche an und bilden die so genannte „sealing zone“ (Abb.1.3C). Dadurch entsteht ein extrazelluläres Kompartiment zwischen Knochen und Osteoklast, welches durch Fibronectin/ $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (von Osteoklast) und Osteopontin (von Knochen) versiegelt wird (Blair et al. 1993). Im Anschluss folgt der Transport lysosomaler Enzyme in dieses Kompartiment, das auch als Resorptionslakune bezeichnet wird. Durch die Carboanhydrase II werden intraosteoklastär Protonen gebildet, welche, um das Milieu anzusäuern, zusammen mit Chloridionen und einer V-ATPase in die Resorptionslakune sezerniert werden (Sly et al. 1983). Der entstehende pH-Wert von 4-5 hilft einerseits bei der Auflösung der anorganischen Matrix und führt gleichzeitig zur Aktivierung der lysosomalen Enzyme.

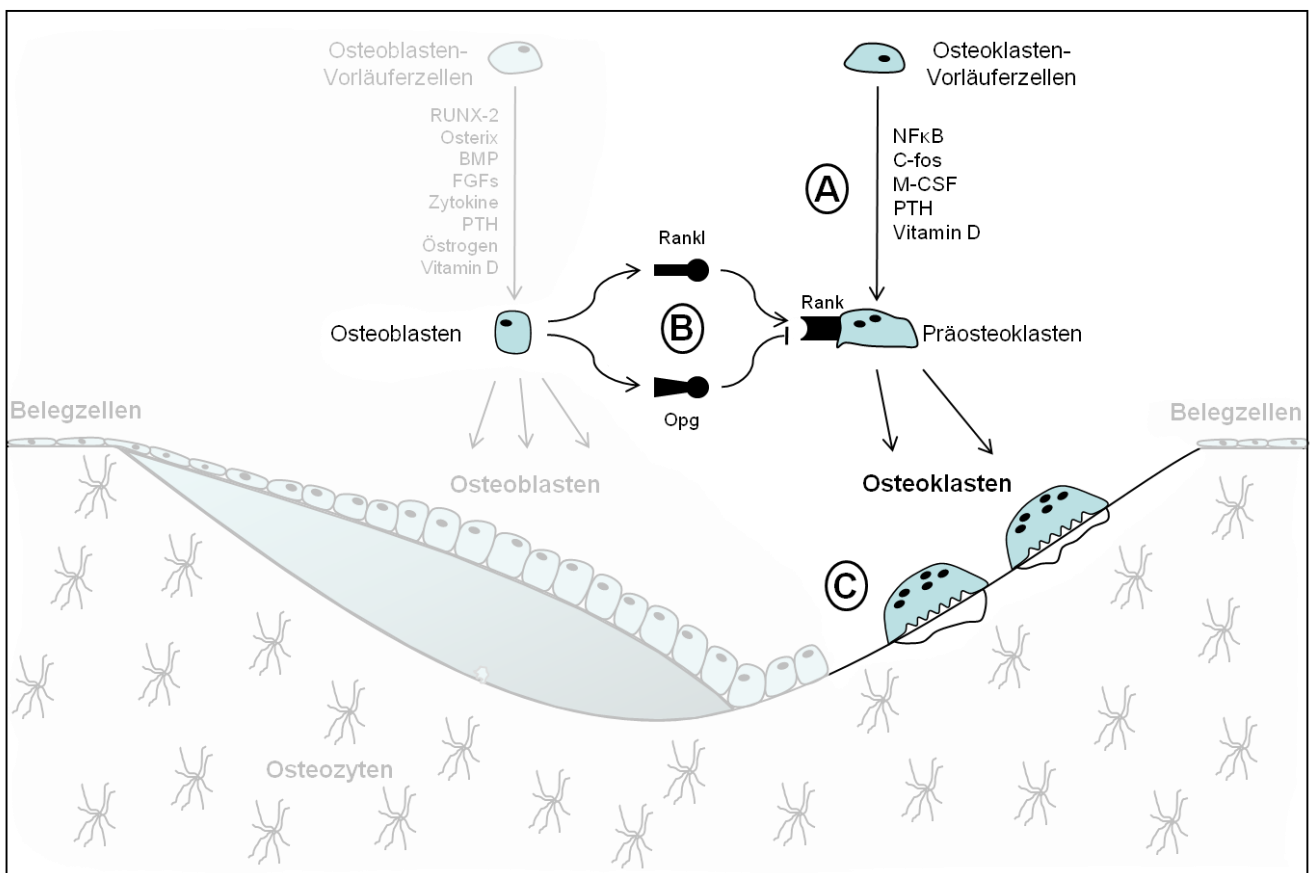


Abb.1.3: Schematische Darstellung der Osteoklastenbildung und des Knochenabbaus. (A) Der Bildung von Osteoklastenvorläuferzellen, den Präosteoklasten, bedarf es verschiedenen Faktoren. **(B)** Die endgültige Differenzierung zu Osteoklasten wird vor allem durch das Rankl-Opg-System kontrolliert. **(C)** Die ausdifferenzierten Osteoklasten werden angelockt und sind in der Lage, Knochen abzubauen. Abkürzungen stehen für: Nuclear Factor Kappa β (NFkB); Retrovirus Associated DNA sequence -C (c-fos); Macrophage-Stimulating Factor (M-CSF); Parathormon (PTH); Ligand to Receptor Activator of NFkB (Rankl); Receptor Activator of NFkB (Rank); Osteoprotegerin (Opg).

1.3.2 Regulation der Knochenresorption (Rankl-Opg-System)

Was der Wnt-Signalweg für die Osteoblasten ist, stellt das Rankl-Opg-System für die Osteoklasten dar (Abb.1.3B). Damit das Gleichgewicht zwischen Resorption und Synthese im Knochenstoffwechsel gehalten werden kann, ist die Osteoblastensekretion des Liganden „Rankl“ (Receptor of Activation of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) wichtig. Dieser induziert durch Binden an den Makrophagenrezeptor „Rank“ (Receptor of Activation of Nuclear Factor Kappa-B) die Differenzierung zu Präosteoklasten (Arai et al. 1999).

Dieses System kann durch Opg (Osteoprotegerin), welches ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird, negativ beeinflusst werden (Burgess et al. 1999). Opg ist ein kompetitiver Antagonist von Rankl und hemmt die Makrophagendifferenzierung zu Präosteoklasten und damit die Knochenresorption (Lacey et al. 1998; Kong et al. 1999). Aktuell ist das neue Medikament Denosumab zugelassen worden, welches genau an diesem System ansetzt. Hierbei handelt es sich um Antikörper gegen Rankl, der genau wie Opg negativ auf die Knochenresorption wirkt (Canalis 2010; Genant et al. 2010; Lewiecki 2010).

1.4 Heparin-bindende Wachstumsfaktoren

1.4.1 Struktur, Funktion und Bedeutung

Midkine (Mdk) und Pleiotrophin (Ptn) bilden eine eigenständige Gruppe Heparin-bindender Wachstumsfaktoren, die eine 45%ige Aminosäuresequenzhomologie besitzen (Muramatsu et al. 1993; Muramatsu 2002; Kadomatsu and Muramatsu 2004).

Aufgrund seiner Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel ist das Protein Mdk von besonderem Interesse. Es wurde 1993 während der Untersuchung maligner embryonaler Keimzelltumoren entdeckt, bei denen durch Retinsäure induzierte Gene identifiziert werden sollten (Kadomatsu et al. 1988; Tomomura et al. 1990). Mdk wird während der Entwicklungsphase am stärksten exprimiert (Rauvala 1989; Muramatsu and Muramatsu 1991), in adulten Mäusen kann es hingegen nur noch in den Nieren und Gonaden nachgewiesen werden (Muramatsu 2002).

Die beiden Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren haben eine Reihe gemeinsamer Funktionen, insbesondere einen Einfluss auf Neuronen. So sind Mdk und Ptn in radialen Gliazellen des Gehirns zu finden (Matsumoto et al. 1994; Sun et al. 1997) und stimulieren Neuritenauswüchse embryonaler Neuronen (Rauvala 1989; Muramatsu and Muramatsu 1991; Muramatsu et al. 1993) sowie deren Migration (Maeda et al. 1999; Qi et al. 2001). Mdk besitzt jedoch eine Reihe von Einflüssen, die nicht durch Ptn vermittelt werden. Dazu zählen

die chemotaktischen Eigenschaften auf inflammatorische Zellen (Takada et al. 1997; Horiba et al. 2000), die Stimulation der Neuronendifferenzierung (Michikawa et al. 1993; Yokota et al. 1998) und die Überlebensverbesserung embryonaler Neuronen (Muramatsu et al. 1993; Satoh et al. 1993; Kaneda et al. 1996).

1.4.2 Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren im Knochen

Die potenzielle Bedeutung der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren für den Knochenstoffwechsel wurde erstmals in transgenen Mäusen gezeigt, die Ptn spezifisch in Knochen überexprimierten. Dies resultierte in erhöhter Knochendichte und gesteigertem trabekulären Volumen (Masuda et al. 1997; Imai et al. 1998; Tare et al. 2002).

Bei der Untersuchung von Femora und Tibiae dieser Mäuse wurde gezeigt, dass Ptn im frühen Stadium der Knochenentwicklung zu gesteigertem Knochenwachstum führt, die Knochen jedoch im Alter brüchig werden. Im gleichen Zusammenhang wurde durch induzierte Frakturen festgestellt, dass die Knochenheilung durch Überexpression von Ptn vermindert ist (Li et al. 2005). Die Ergebnisse waren vielversprechend, jedoch konnte in einem Ptn-defizienten Mausmodell kein Unterschied im Vergleich zu Wildtypen bezüglich Knochenwachstum, Knochendicke und Knochenmineralisation gezeigt werden (Lehmann et al. 2004).

Für Mdk wurde zunächst eine Beteiligung an Rheumatoider Arthritis (RA) festgestellt, da es die Migration von Leukozyten induziert und die Osteoklastendifferenzierung fördert (Maruyama et al. 2004). Nach Fraktur einer Tibia konnte eine erhöhte Mdk- Expression in proliferierenden Chondrozyten und eine verminderte Expression in der inflammatorischen Phase nachgewiesen werden (Ohta et al. 1999). Auch für Mdk wurde ein Defizienzmodell der Maus generiert und knochenphänotypisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die *Mdk*-Defizienz im Alter von 12 und 18 Monaten zu einer erhöhten Knochendichte führt, welche auf erhöhte Knochenformation zurückzuführen ist (Neunaber et al. 2010). Dies spricht für eine physiologische Funktion von Mdk im Knochenumbau, wo es als Inhibitor der Osteoblasten-Aktivität wirkt.

1.4.3 Putative Mdk-Rezeptoren

Für die Signaltransduktion von Mdk und Ptn werden vier verschiedene Rezeptoren diskutiert. Ein Rezeptor kommt aus der Syndecan-Familie (Mitsiadis et al. 1995; Kojima et al. 1996). Die Tyrosinkinase ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) wurde etwas später als Rezeptor für die beiden Wachstumsfaktoren nachgewiesen (Stoica et al. 2002). Der Rezeptor LRP (LDL

receptor related protein) gilt als sehr vielversprechend für Therapieansätze bei Knochenerkrankungen (Muramatsu et al. 2000; Muramatsu 2002; Shibata et al. 2002). Der vierte Rezeptor ist der Proteintyrosin-Phosphatase-Rezeptor, Typ zeta (Maeda et al. 1999; Meng et al. 2000). Dessen Gen, *Ptprz1*, wurde erstmalig in Zellen des zentralen Nervensystems entdeckt. *Ptprz1* ist im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel von besonderem Interesse, da es das Gen ist, das durch Affymetrix-Genchipanalyse in primären Osteoblasten *Mdk*-defizienter Mäuse während der Mineralisation am stärksten induziert wird (Abb.1.4). Aufgrund der Vermutung direkter Zusammenhänge zwischen *Mdk* und Rptp ζ wurde ein Mausmodell mit *Ptprz1*-Defizienz analysiert. In der Tat zeigten diese Mäuse eine Osteopenie auf, bedingt durch verminderte Knochenformation, d.h. es konnte ein gegensätzlicher Knochenphänotyp im Vergleich zu *Mdk*-defizienten Mäusen beobachtet werden (Schinke et al. 2008).

Gene	d5	d25	Log Ratio
<i>Ptprz1</i>	3.3	262.1	6.9
<i>Fcgr2b</i>	2.6	262.4	6.3
<i>Prg1</i>	3.2	81.7	5
<i>Adn</i>	6.7	280	4.9
<i>Bglap</i>	409.6	11568	4.7
<i>Dkk1</i>	3.4	89.3	4.7
<i>ApoE</i>	349.5	7704.4	4.6
<i>Ibsp</i>	107.2	3127	4.4
<i>Dmp1</i>	24.8	166.3	3
<i>Akp2</i>	287.7	1690.7	2.5

Abb.1.4: Affymetrix-Gen-Chip-Hybridisierung von sich differenzierenden Osteoblasten. Es sind die Gene aufgeführt, die an Tag 5 (d5) und Tag 25 (d25) der Differenzierung am stärksten induziert wurden. Dargestellt sind die Expressionswerte an beiden Zeitpunkten sowie das logarrhythmische Signalverhältnis. Abkürzungen stehen für: *Proteintyrosine-Phosphatase-Rezeptor Type z*, *Polypeptide 1 (Ptprz1)*; *Fc-Rezeptor für IgG IIb (Fcgr2b)*; *Proteoglycan 1 (Prg1)*; *Adipsin (Adn)*; *Bone-Gamma-Carboxyglutamate-Protein (Bglap)*; *Dickkopf-Homolog 1 (Dkk1)*; *Apolipoprotein E (ApoE)*; *Integrin-binding-Sialoprotein (Ibsp)*; *Dentin-Matrix-Protein 1 (Dmp1)*; *Alkaline-Phosphatase-2 (Akp2)*.

Um die Zusammenhänge zwischen *Mdk* und *Ptprz1* näher zu untersuchen, wurde zudem ein Transfektionsversuch durchgeführt (Abb.1.5). Dabei wurde der Wnt-Signalweg durch Transfektion von *Wnt3a* plus *Mdk* und/oder *Ptprz1* in Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1-Zellen untersucht. Durch Hilfe eines Wnt-abhängigen Luziferase-Rezeptor-Konstruktes konnte gezeigt werden, dass bei Co-Transfektion von *Mdk* und *Wnt3a* die Signalintensität abnimmt und der Wnt-Signalweg gehemmt wird. Dieser Effekt konnte durch synergistische

Wirkung von *Ptprz1* noch verstärkt werden. Dies ist überraschend, da *Mdk*- und *Ptprz1*-defiziente Mäuse konträre Phänotypen besitzen.

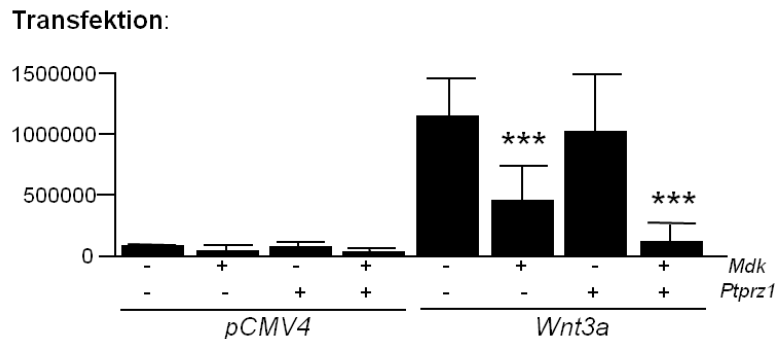


Abb.1.5: Transfektion von *Wnt3a*, *Mdk* und *Ptprz1* in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Transfektionsversuches, in dem durch die Transfektion von *Wnt3a*, *Mdk* und / oder *Ptprz1* der Gene auf den Wnt-Signalweg überprüft werden sollte. pCMV4 diente dabei als Kontrolle.

1.4.4 Molekularer Effekt von *Mdk* auf Osteoblasten

Mdk-defiziente Mäusen zeigen im Alter von 12 und 18 Monaten einen Knochenphänotyp, welcher durch erhöhte Knochendichte charakterisiert ist und auf erhöhter Knochenformationsrate basiert (Neunaber et al. 2010).

Durch eine Affymetrix-Genchiphybridisierung primärer Osteoblasten wurden an Tag 10 der Differenzierung Gene identifiziert, die durch Zugabe von rekombinaten *Mdk* induziert werden (Abb.1.6; Neunaber et al. 2010). Die Ergebnisse zeigten, dass einige Gene direkt mit der Mineralisation in Zusammenhang stehen. Unter diesen war der Natrium-Phosphat-Kotransporter *Slc20a1*, auch *Pit1* genannt, welcher in den Nieren exprimiert wird und am Phosphathaushalt beteiligt ist (Kavanaugh and Kabat 1996; Virkki et al. 2007).

Auch das schon erwähnte Gen *Dmp1* wurde induziert. Es ist für die Phosphathomöostase von Bedeutung und vermittelt seine Wirkung indirekt über FGF23 (Qin et al. 2007).

Außerdem wurden die Gene *Ank* und *Enpp1* durch *Mdk* induziert. Diese sind wesentlich an der Regulation des Pyrophosphathaushalts beteiligt und sind Gegenspieler der *Tnap*, wodurch sie inhibierend auf die Mineralisation wirken.

Gene	-Mdk	+Mdk	Log Ration
<i>Mmp3</i>	32	151	2.1
<i>Dmp1</i>	1056	3008	1.6
<i>Ank</i>	545	1369	1.4
<i>Serpina3g</i>	74	162	1.4
<i>Ccl7</i>	38	102	1.4
<i>Steap4</i>	93	259	1.2
<i>Ccl19</i>	127	254	1.2
<i>Mt2</i>	155	410	1.2
<i>Klhdc8a</i>	106	226	1.2
<i>Mmp10</i>	35	107	1.2
<i>Hp</i>	54	107	1.1
<i>Slc20a1</i>	385	949	1.1
<i>Enpp1</i>	97	315	1.1

Abb.1.6: Auflistung der am stärksten durch Mdk induzierten Gene in primären Osteoblasten. Durch eine Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung wurden Gene identifiziert, die an Tag 10 der Osteoblastendifferenzierung durch Midkine induziert wurden. Rot hervorgehoben sind Gene mit bekannter Funktion bei der Phosphat-Homöostase oder Biomineralisation. Abkürzungen stehen für: *Mmp3*: Matrix Metallopeptidase 3; *Dmp1*: Dentin-Matrix Protein 1; *Ank*: Progressive Ankylosis; *Serpina3g*: serine (oder cysteine) Peptidase Inhibitor; *Ccl7*: Chemokine (C-C motif) Ligand 7; *Steap4*: STEAP family member 4; *Ccl19*: Chemokine (C-C motif) Ligand 19; *Mt2*: Metallothionein 2; *Klhdc8a*: Kelch-Domain containing 8A; *Mmp10*: Matrix-Metallopeptidase 10; *Hp*: Haptoglobin; *Slc20a1*: Solute Carrier Family 20, Member 1; *Enpp1*: Ectonucleotide-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1.

1.5 Potentielle Bedeutung von Mdk und Rptpζ für die Tumorentstehung

1.5.1 Der seltene Knochentumor: Das Osteosarkom

Das Osteosarkom ist zwar ein seltener Tumor (2/1.000.000), dafür aber der am häufigsten auftretende maligne Knochentumor. Er tritt bei Erwachsenen vornehmlich gelenksnah in den langen Röhrenknochen auf, wobei 50% in der Knieregion lokalisiert sind (Bielack et al. 2002). Die Prognose ist sehr schlecht, da in 20% der Fälle bei Diagnose schon Metastasen (primär Lungenmetastasen) vorliegen (Meyers et al. 1993; Kaste et al. 1999). Obwohl die Forschung voranschreitet, ist die Überlebensrate in den letzten 20 Jahren nahezu unverändert geblieben (Federman et al. 2009; O'Day and Gorlick 2009).

Die Behandlung sieht eine radikale Entfernung des Tumors sowie eine zentralisierte aggressive prä- und postoperative Chemotherapie vor (EURAMOS; EUROBOSS). Um Nebenwirkungen zu minimieren, bessere Früherkennung und effektivere Therapien zu ermöglichen, ist es wichtig, neue krankheitsspezifische Zielmoleküle zu identifizieren (Wunder et al. 2005). Bei Brust- und Dickdarntumoren werden solche Entdeckungen schon erfolgreich angewendet (Carey et al. 2006; Walgenbach-Brunagel et al. 2008).

1.5.2 Grundzüge der Tumorgenese

Die schon 1976 in Grundzügen erstellte Mehrschritthypothese zur malignen Transformation von Zellen ist weiterhin von Relevanz. Sie besagt, dass Zellen mehrere Transformationenstufen durchlaufen müssen, bis ein neoplastischer Klon mit autonomen Verhalten vorliegt (Nowell 1976). Die Karzinogenese ist also ein Prozess, in dem mehrere Mutationen in verschiedenen Genen über einen längeren Zeitraum akkumulieren (Vogelstein and Kinzler 1993; Frisch and Francis 1994; Arends 2000). Genetische Veränderungen, wie Deletion, Punktmutation, Insertion oder chromosomale Translokation können zu Überexpression und Aktivierung von Onkogenen bzw. zu Suppression und Deaktivierung von Tumorsuppressoren führen.

Der am häufigsten, in mehr als 50% der Tumore, vorkommende Tumorsuppressor ist das Protein p53 (Hollstein et al. 1991). Dieser Tumorsuppressor wurde 1979 von David P. Lane, Lionel Crawford und Arnold Levine entdeckt (Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979) und bekam aufgrund seiner Funktion den Namen „Wächter des Genoms“ (Lane 1992). Seitdem wurde p53 vielseitig untersucht.

Es hat sich gezeigt, dass Maus-Gendefizienzmodelle sich gut für neue Erkenntnisgewinnung eignen. Die brachte hervor, dass eine homozygote *Trp53*-Gendefizienz (*Transformation related Protein 53*) vornehmlich Lymphome (ca. 75% der Fälle) nach sich zieht. Für die Überlebensrate der Tiere hat das entscheidende Bedeutung. Nach 18 Wochen leben noch 50% bzw. nach 24 nur noch 5% der Tiere. Durch die Deletion nur einen Allels, einer heterozygoten Defizienz, kann die Überlebensrate dahingehend ändern, dass nach 17 Monaten noch 72% der Tiere leben (Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994).

Laut der Mehrschritthypothese müssen immer mehrere Gendefekte vorliegen, damit sich Tumore manifestieren. Durch die Beteiligung von p53-Mutationen an mehr als 50% der bisher identifizierten Tumore und die sich daraus ergebenden begünstigten Tumorprogressionen, eignet sich das Mausmodell ideal zur Identifizierung weiterer Faktoren, die zu einer Tumormanifestation beitragen.

1.5.3 Einfluss von Mdk und Rptpζ auf die Tumorgenese

Die Entdeckung von Mdk im Rahmen der Untersuchung maligner Zellen lässt ein Zusammenhang zur Tumorgenese vermuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Mdk als auch Ptn gewebeunabhängig in diversen Tumorarten (Lungen-, Brust-, Ösophagus-, Pankreas-, Magen-, Leber-) exprimiert werden (Tsutsui et al. 1993; O'Brien et al. 1996). Eine steigende Expression von Mdk, sowie eine sinkende Expression von Ptn in

Tumorgewebe korreliert dabei negativ mit der Prognose (Kadomatsu and Muramatsu 2004; Maehara et al. 2007). Da Mdk ein zu sezernierendes Protein ist und bei positivem Karzinombefund in über 60% der Fälle im Serum nachgewiesen werden kann, könnte es aufgrund guter Verlaufskontrollmöglichkeiten als wichtiger Tumormarker fungieren (Takada et al. 1997; Ikematsu et al. 2000; Kadomatsu and Muramatsu 2004; Maehara et al. 2007). Eine Studie konnte bereits anhand des Osteosarkoms zeigen, dass Mdk der einzige Parameter war, der Aussagen über Prognosen zuließ. Des Weiteren sprachen Tumorzellen auf Mdk-Antikörper an, welche zu Tumorrückgang führten (Maehara et al. 2007).

Die Zellproliferation wird auf verschiedene Art und Weise kontrolliert. Ein Mechanismus ist die Phosphorylierung von Tyrosinresten, der durch Tyrosinkinase vermittelt wird. Die Gegenspieler der Tyrosinkinase, von denen mehr als 100 Mitglieder bekannt sind, sind die Tyrosinphosphatasen. Aufgrund ihrer dephosphorylierenden und damit wachstumshemmenden Eigenschaft wurden sie oft als Tumorsuppressoren diskutiert (Tonks 2005). Wegen ihres direkten Einflusses auf Zellproliferation stellen sie attraktive Zielmoleküle für zukünftige Medikamente dar.

Speziell für Rptpζ wurde in vorangehenden Versuchen proliferationshemmende Eigenschaft nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass Osteoblasten einer *Ptprz1*-defizienter Mäuse wesentlich stärker proliferieren als entsprechende Wildtypenkulturen, selbst unter Entzug des fötalen Kälberserums (Abb.1.7; Schinke et al. 2008). In *Ptprz1*-defizienten Mäusen ist bis zum Alter von 50 Wochen bisher allerdings kein Tumor, mit besonderem Augenmerk auf dem Osteosarkom, beschrieben worden (Schinke et al. 2008).

Es stellt sich die Frage, ob sich eine auf *Ptprz1*-Defizienz beruhende Osteosarkombildung erst durch mehrere Mutationen manifestiert, so wie es die Mehrschritthypothese suggeriert. Um die tumorsupprimierende Eigenschaft von *Ptprz1* zu untersuchen, wäre der Tumorsuppressor p53 aufgrund seiner häufigen Beteiligung an der Tumorgenese und der bestehenden Erfahrung ein geeigneter „Defizienzpartner“.

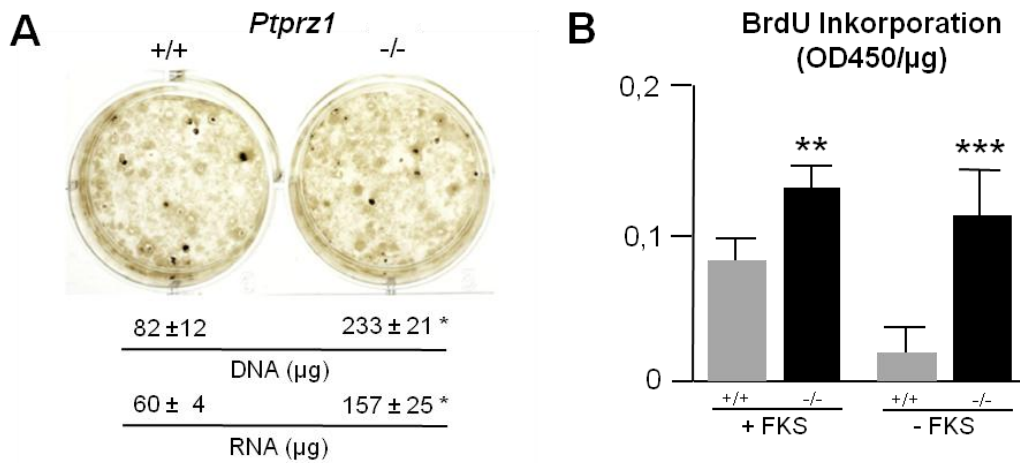


Abb.1.7: Gesteigerte Proliferation *Ptpz1*-defizienter Osteoblasten. (A) Es wurden Osteoblasten aus Calvarien von Wildtyp- (*Ptpz1*^{+/+}) und *Ptpz1*-defizienten neugeborenen Mäusen (*Ptpz1*^{-/-}) isoliert. Die Zellen wurden an Tag 25 der Differenzierung nach von Kossa/van Gieson gefärbt. Durch die DNA- und RNA Menge konnten Rückschlüsse auf Zellzahlen gewonnen werden. (B) In einem BrdU Inkorporationsversuch konnte gezeigt werden, dass die Zellen *Ptpz1*-defizienter Mäuse (^{-/-}) besonders nach Entzug von fötalem Kälberserum (FKS) signifikant stärker proliferieren. (T-Test: ** bedeutet p < 0.01; *** bedeutet p < 0.001).

1.6 Fragestellung

Aufgrund der oben beschriebenen Vorarbeiten ergaben sich im Wesentlichen drei Fragestellungen, die im Verlauf dieser Dissertation durch die Untersuchung von Mausmodellen adressiert werden sollten:

1. Durch Mdk kommt es zu einer Induktion von *Ank* und *Enpp1*. Da diese Gene Gegenspieler der alkalischen Phosphatase (*Akp2*) sind, sollte anhand einer Doppeldefizienz von *Mdk* und *Akp2* am Mausmodell untersucht werden, ob dadurch die Mineralisationsdefekte *Akp2*-defizienter Mäuse korrigiert werden können.
2. Mdk und Rptp ζ haben einen synergistischen Effekt auf die Induktion des Wnt-Signalweges *in vitro*. Durch ein Maus-Doppeldefizienzmodell sollte untersucht werden, ob der Verlust beider Gene in Osteosklerose resultiert.
3. Rptp ζ hat einen hemmenden Einfluss auf Osteoblastenproliferation. Durch die gleichzeitige Deletion von *Ptprz1* und *Trp53* sollte am Mausmodell überprüft werden, ob eine Defizienz von Rptp ζ die Bildung von Osteosarkomen begünstigt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Gibco (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet. Die Enzyme und rekombinanten Proteine wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Eine bis zu einem Zentimeter messende Mausschwanzbiopsie wurde mit 700 µl Mausschwanz-Lysis Puffer und 50 µl Proteinkinase K (10mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am Folgetag wurde unter einem Abzug 750 µl PCA (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Verhältnis 25:24:1) hinzugefügt, kräftig geschüttelt und für 5 Minuten zentrifugiert (13000 rpm). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Tube pipetiert und der letzte Schritt mit 650 µl PCA wiederholt. Die obere Phase wurde zum Waschen in ein neues Eppendorf-Tube mit 550 µl Isopropanol versetzt. Nach leichtem Schwenken kam das Gemisch für 5 Minuten ins Eisfach (-20°). Nach erneutem fünfminütigen Zentrifugieren (13000 rpm), wurde der Überstand abpipetiert und das übrig gebliebene Pellet in 500 µl 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2 Minuten bei 13000 rpm). Nach Abnahme des restlichen Ethanols wurde das Pellet mit 50 µl TE-Puffer für mehrere Stunden bei Raumtemperatur resolubilisiert.

<u>Mausschwanz-Lysis Puffer:</u>	50ml 1M TRIS (Trisma Base, pH8)
	200ml 0,5M EDTA
	100ml 1M NaCl
	50ml 20% SDS
	600ml H ₂ O destilliert
Proteinase K (10mg/ml):	250mg Proteinase K
	25ml H ₂ O destilliert

TE-Puffer: 10mM Tris (pH 7,4)
1mM EDTA

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine DNA Vermehrung *in vitro*, hier zum Zwecke der Genotypisierung. Die originale DNA wurde dabei mit zwei Arten von Primern (vor- und rückwärts-) vermischt, welche für einen bestimmten Abschnitt spezifisch sind. Außerdem wurde eine hitzestabile Polymerase (Dream Taq-Polymerase, Firma Fermentas) sowie passender Puffer, H₂O (destilliert) und Desoxynukleotide hinzugegeben. Die PCR-Reaktion verlief nach einem Protokoll, welches von den Temperaturoptima der Primer abhängig ist. Bei den während der PCR durchlaufenden Zyklen kommt es bei 94°C zur Denaturierung der DNA und es entstehen Einzelstränge. Abhängig von den Primern wird die Temperatur gesenkt und das Annealing der DNA startet. Hierbei kommt es zur Hybridisierung der Primer mit den DNA-Einzelsträngen. Bei der folgenden Elongation wird die Temperatur auf das Optimum der Taq-Polymerase angehoben, welches bei 72°C liegt. Es folgt die DNA-Kettenverlängerung. Der Zyklus der Denaturierung, Annealing und Elongation wird 35 x durchlaufen. Bei den durchgeführten PCRs wurde folgender Reaktionsmix und Primer verwendet:

2,00µl 10x Taq-Polymerase-Puffer inkl. MgCl₂
0,35µl dNTPs (2,5mM)
1,70µl Vorwärtsprimer (200µM)
1,70µl Rückwärtsprimer (200µM) / Common-Primer
13,25µl H₂O destilliert
0,10µl Taq-Polymerase (5U/µl)
1,00µl DNA-Template (1 :10 verdünnt)

Mdk-Wildtyp Primer

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

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

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

Mdk-defiziente Primer:

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

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

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

Cyclerprogramm

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	45	35x
Annealing/Hybridisierung	58	45	
Elongation/Synthese	72	120	
Endgültige Synthese	72	420	
Lagerung	4	∞	

Ptprz1-Wildtyp (Wt)-Primer:

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

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

Erwartete Bandengröße: 400bp bei Wildtyp-Mäusen

Ptprz1-defiziente (Ko) Primer:

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

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

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

Cyclerprogramm

Vorgang	Temperatur(C°)	Zeit (Sek.)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	30	35x
Annealing/Hybridisierung	61 (Wt); 55 (Ko-)	45	
Elongation/Synthese	72	45	
Endgültige Synthese	72	420	
Lagerung	4	∞	

Trp53-Wildtyp Primer:

Vorwärtsprimer: 5'- ACA gCg Tgg Tgg TAC CTT AT -3'

Common-Primer: 5'- CTA TCA ggA CAT AgC gTT gg -3'

Erwartete Bandengröße: 400bp bei Wildtyp-Mäusen

Trp53-defiziente Primer:

Vorwärtsprimer: 5'- TAT ACT CAg AgC Cgg CCT -3'

Common-Primer: 5'- CTA TCA ggA CAT AgC gTT gg -3'

Erwartete Bandengröße: 600bp bei *Trp53*-defizienten Mäusen

Cyclerprogramm

Vorgang	Temperatur (C°)	Zeit (Sek.)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	180	
Denaturierung	94	30	
Annealing/Hybridisierung	66	60	35x
Elongation/Synthese	72	90	
Endgültige Synthese	72	120	
Lagerung	10	∞	

Akp2-Wildtyp-Primer:

Wildtyp-Primer: 5'- CTg gCA CAA AAg AgT Tgg TAA ggC Ag -3'

Common-Primer: 5'- gAT Cgg AAC gTC AAT TAA CgT CAA T -3'

Erwartete Bandengröße: 167 bp bei *Akp2*-Wildtyp Mäusen

Akp2-defiziente Primer:

Mutations-Primer: 5'- g TgC ATC TgC CAg TTT gAg gggA 3'

Common-Primer: 5'- gAT Cgg AAC gTC AAT TAA CgT CAA T -3'

Erwartete Bandengröße: 400bp bei *Akp2*-defizienten Mäusen

Cyclerprogramm

Vorgang	Temperatur (C°)	Zeit (Sek.)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	180	
Denaturierung	94	30	
Annealing/Hybridisierung	65	60	35x
Elongation/Synthese	72	60	
Endgültige Synthese	72	120	
Lagerung	10	∞	

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris-Azetat

50 mM EDTA

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen

Taq-Polymerase-Puffer :

10x PCR reaction puffer

20 mM MgCl₂

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese aus genomischer DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wird verwendet, um DNA ihrer Molekülgröße nach aufzutrennen. Dieses wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes ermöglicht und erlaubt eine Charakterisierung von DNA nach PCR.

Zur Durchführung wurde ein Gel mit 1%igem Agarosegehalt erstellt. Dafür wurden 1g bzw. 3g (je nach Gelgröße) Agarose abgewogen und zusammen mit 100ml bzw. 300ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Das Gemisch wurde mit Ethidiumbromid versetzt, sodass eine Konzentration von 0.1% $\mu\text{g/ml}$ entsteht. Nach dem Bestücken der Gelschlitten mit den gewünschten Kämmen wurde der Mix zum Gelieren hineingegossen. Der ausgehärtete Schlitten wurde inklusive Gel in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer umgelagert. Die mit 3 μl eines 6 x DNA-Gel-Ladepuffers vermischten DNA Proben wurden auf die Geltaschen aufgetragen. Bei 80 – 140 V trennten sich die Proben für 20-45 Min auf. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels UV-Licht in einem Geldokumentationsgerät. Zum Speichern der Bilder wurden mit der Gel Doc Software 2000 (Gel-Dokumentationssystem, Bio-Rad) Aufnahmen gemacht.

<u>6 x DNA-Gel-Ladepuffer:</u>	10mM Tris-HCL (pH 7,6)
	0.03% Bromphenol blau
	0.03% Xylen Cyanol FF
	60% Glycerol
	60 mM EDTA

2.2.4 Isolierung und Differenzierung primärer Osteoblasten aus Calvarien

In den ersten Tagen nach der Geburt ist die Mineralisation der Calvarien (Schädeldächer) bei Mäusen noch nicht abgeschlossen. Um Knochenvorläuferzellen zu gewinnen, können die Schädeldächer einem enzymatischen Verdau unterzogen werden. Dazu wurden drei bis fünf Tage alte Mäuse zum Desinfizieren in 80%igen Ethanol getaucht und mit einer scharfen Schere dekapitiert. Der Kopf wurde an der Nasenwurzel mit einer Pinzette fixiert und mit zwei Schnitten, jeweils von Hinterhauptsloch zum Auge, aufgeschnitten und aufgeklappt. Die Kopfhaut sowie das Gehirn wurden vorsichtig entfernt. Sonstige Gewebereste wurden mit dem Skalpell entfernt und die Calvarien in einem 50ml Falcon in PBS gesammelt. Nach abgeschlossener Präparation wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und 10ml Osteoblasten-Verdaulösung hinzugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt im Schüttler bei 37°C für 20 Minuten. Die Verdaulösung wurde verworfen und durch 20ml neue Osteoblasten-

Verdaulösung ersetzt, worauf erneutes Schütteln für 30 Minuten bei 37°C folgte. Um jedwede Knochenreste zu entfernen, wurde die Suspension durch ein 100µl Sieb gegossen und bei 12000rpm für drei Minuten zentrifugiert. Die Verdaulösung wurde behutsam abgesaugt und das Pellet in 5ml Osteoblasten-Kulturmedium suspendiert. In einer Thomazellkammer wurden die Zellen gezählt. Es folgte das Ausplattieren auf 12er Wells, wobei 50000 Zellen pro Well in 1ml Osteoblasten-Kulturmedium ausplattiert wurden.

Die Zellen wurden immer unter gleichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit) kultiviert, bis sie eine 80-90%ige Konfluenz auf der Platte erreicht hatten. In diesem Stadium wurde Osteoblasten-Differenzierungsmedium hinzugefügt, welches dem Tag 0 der Differenzierung entsprach. Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert. Eine vollständige Mineralisation erfolgt nach 20 Tagen. Die letzte Nacht wurden die Zellen mit serumfreien Medium kultiviert.

Osteoblasten-Verdaulösung: 40ml α-Mem (ohne FKS und Antibiotika)
0,04g Collagenase Typ Ia (Sigma, C-9891)
0.08g Dispase Grade II (Roche, #04 942 078 001)
steril filtrieren

Kulturmedium: α-Mem/Minimum Essential Medium Eagle, Alpha
Modification (Sigma, #M0644-1L)
1000ml H₂O destilliert
10% fetales Kälberserum
1% Penicillin/Streptomycin

Differenzierungsmedium: Kulturmedium (Osteoblasten)
10mM β-Glyzerolphosphat
50µl/ml Ascorbinsäure

2.2.5 cDNA-Synthese und RNA Isolation

Für die cDNA Synthese wurde das Super Script[®] III First-Strand Synthesis System von Invitrogen (#18080-051) verwendet: Die einzelnen Schritte erfolgten laut Angaben des Herstellers. Bei der RNA Isolierung wurden die Zellen mit dem QIAshredder[™] von Qiagen (#79654) lysiert. Die RNA Gewinnung erfolgte durch das RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen (#74104). Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach der Anleitung des Herstellers.

2.2.6 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für diese Methode wurde das StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System der Fa. Applied Biosystems benutzt. Die individuellen Primer wurden direkt bei der Firma Applied Biosystems bestellt. Für die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

10µl	TaqMan® Gen Expression Master Mix (Applied Biosystems, Kalifornien, USA, #4369016)
1µl	TaqMan® Gen Expression Assay Primer (Applied Biosystems, Sequenzen unbekannt)
7µl	RNase-freies Wasser
2µl	1:10 verdünnte cDNA

Der ganze Mix wurde in 96-Well Platten (Applied Biosystems, #4346906) pipettiert. Zur Auswertung wurde die delta-delta-CT Methode gewählt, welche mit Hilfe der Step One Software Version 2.0 angewendet wurde. Als Referenz wurde in jedem Versuch das Haushaltsgen GapDH (Applied Biosystems, #4308313) mit untersucht.

2.3 Histologie und Morphologie

2.3.1 Calceinmarkierung

Den Mäusen wurden zweimal im Abstand von 7 Tagen Calcein (jeweils 100µl Injektionslösung) intraperitoneal injiziert. Dies ist ein flurochromer Farbstoff, der sich an den Knochen anlagert. Diese Eigenschaft wurde sich für die Bestimmung der Knochenzuwachsrate (BFR, bone formation rate) zunutze gemacht. Unter UV-Licht wurden 12µm ungefärbte Acrylatschnitte analysiert, anhand zwei grün-fluoreszierenden Banden, die mit den zweimaligen Injektionen korrelieren, konnte die Zuwachsrate in Tibiae und Wirbelkörpern berechnet werden.

<u>Calcein-Lösung:</u>	0,2g NaCl
	0,5g Natriumbicarbonat
	25ml H2O destilliert
	0,25g Calcein
	steriles Filtrieren, Lagerung bei 4°C

2.3.2 Präparation der Skelette

Die Mäuse wurden mittels einer Inhalationsnarkose getötet und anschließend gewogen. Nach Besprühen des Felles mit 80%igem Ethanol wurde der Bauchraum eröffnet und aus dem Herzen Blut entnommen. Die Organe wurden morphologisch untersucht, bei Auffälligkeiten zur weiteren Analyse aufbewahrt und ansonsten entfernt. Die Mäuse wurden gehäutet und die Skelette zur Analyse auf einer Korkplatte gestreckt und für 24h in frischem 3,7% gepufferten Formaldehyd fixiert. Zur Lagerung wurden die Mäuse in 80%igen Ethanol überführt. Vor der weiteren Präparation wurden die Skelette im Kontaktstrahlröntgenapparat (Faxitron, Xray, Fa. Faxitron Xray Corp., Wheeling Illinois, USA; Filme: Mamory HDR PQ, Fa. Agfa, Mechelen, Belgien) für zwei Sekunden bei 35kV geröntgt.

2.3.3 Paraffin- und Acrylat-Histologie

Für die Analyse waren von den Mäusen jeweils die rechte Tibia und die oberen 4 Lendenwirbelkörper von Bedeutung. Diese wurden unentkalkt in Acrylatblöcke eingegossen und weiter prozessiert. Auffällige Organe wurden erst bei 37°C für 24 bis 72 Stunden in 20% EDTA entkalkt und anschließend in Paraffinblöcke gegossen. Für die Acrylathistologie wurden Tibiae und Lendenwirbel 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 60 min EtOH absolut). Am Folgetag wurden die Proben bei 4°C für 24 Stunden in der Infiltrationslösung I, für weitere 48 Stunden in Infiltrationslösung II infiltriert und anschließend in Glasgefäße mit Gießlösung eingebettet. Über Nacht erfolgte bei 4°C eine Polymerisation. Die polymerisierten Blöcke wurden mit Schleifpapier angeschliffen und am Rotationsmikrotom (Microtec Cut 4060E) 4µm sowie 12µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Gelatine-beschichtete Objektträger gezogen. Zum Strecken der Schnitte wurde unter dem Abzug 80%iges Isopropanol, gemischt mit einem Tropfen Butylether, verwendet. In einer Presse trockneten die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank (60°C) und waren anschließend fertig für die Färbung.

Für die Paraffinhistologie wurden die Organe ebenfalls über Nacht im Autotechnikon entwässert (2 x 60 Minuten 70% Ethanol, 60 Minuten 80% Ethanol, 2 x 60 Minuten 96% Ethanol, 2 x 60 Minuten absoluten Ethanol, 2 x 60 Minuten Xylol, 3 x 60 Minuten Paraffin, 60°C). Am Folgetag kam die Einbettung in 60°C warmes Paraffin, welches auf Eis aushärtete. Mit dem Schlittenmikrotom (Fa. Jung) wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf polysinbeschichtete Objektträger (Fa. Menzel GmbH) aufgezogen. Nach 60 minütigem Fixieren im Wärmeschrank waren die Schnitte bereit für die Färbung.

<u>Infiltrationslösung I und II:</u>	1000ml entstabilisiertes Methylmethacrylat (Merck, #800590) 100ml Nonylphenylpolyglycolaether-Acetat 3.3g Benzoylperoxid (Merck, #801641)
<u>Giesslösung:</u>	1000ml Methylmethacrylat 100ml Nonylphenylpolyglycolaether-Acetat 6,6g Benzoylperoxid
<u>0,1 % Gelatine:</u>	Sigma-Aldrich, #G-1890
<u>Gelatinelösung:</u>	0,5 g Gelatine lösen in 50 ml H ₂ O destilliert (< 60°) 2 ml Chromalaunlösung

2.3.4 Von Kossa-/van Gieson-Färbung

Bei Verwendung dieser Färbung stellen sich mineralisierte Strukturen -z.B. Knochen-schwarz, Kollagen und Bindegewebe rot dar. Das Acrylat wurde durch dreimaliges Einwirken (jeweils 10 Minuten) von 2-(Methoxyethyl)-azetat (Merck, #806061) herausgelöst. Durch eine absteigende Alkoholreihe (100%iges bis 50%iges Ethanol) wurden die Schnitte bewässert und nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser nach folgendem Schema behandelt: Silbernitrat 3%ig für 5 Minuten, destilliertes Wasser für 10 Minuten, Sodaformol für 5 Minuten, Leitungswasser für 10 Minuten, Natriumthiosulfat für 5 Minuten, Leitungswasser für 10 Minuten, van Gieson-Farbe für 20 Minuten. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (50%ig bis 100%ig Ethanol) und anschließend dreimaligem Xylol (jeweils 5 Minuten) wieder entwässert. Die Schnitte wurden daraufhin mit DPX (Sigma-Aldrich, #44581) eingedeckt.

<u>Silbernitrat 3%ig:</u>	3g Silbernitrat (Merck, #1.01512.0100) 100ml H ₂ O destilliert
<u>van Gieson-Lösung:</u>	2,5g Säurefuchsin (Merck, #105231) 900ml gesättigte Pikrinsäure (Sigma, #80456) 100ml Glycerin 5ml konzentrierte Salpetersäure

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung eines *Akp2/Mdk*-defizienten Mausmodells

An einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Gendefizienz von *Mdk* zu einem Knochenphänotyp mit gesteigerter Knochendichte führt. Dies ist auf eine erhöhte Knochenformationsrate zurückzuführen (Neunaber et al. 2010). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *Mdk* im Osteoblasten eine Induktion von *Ank* und *Enpp1* bewirkt. Durch eine Defizienz des Gegenspielers dieser beiden Proteine, der Gewebe-unspezifischen alkalischen Phosphatase, kommt es zu Hypophosphatasie, Mineralisationsstörungen und vermehrter Osteoidanlagerung (Fedde et al. 1999). Dieser Phänotyp kann sowohl durch eine Doppeldefizienz mit *Ank* als auch mit *Enpp1* korrigiert werden (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004). Da *Mdk* *in vitro* in Osteoblasten zu einer Induktion von *Ank* und *Enpp1* führt, sollte im Umkehrschluss analysiert werden, ob eine Doppeldefizienz von *Mdk* und *Akp2* den Phänotyp *Akp2*-defizienter Mäuse korrigieren kann. Versuche anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass Mäuse einer *Akp2*-Defizienz sehr früh aufgrund epileptischer Anfällen und Hypomineralisation versterben (Millan et al. 2008). Dies war in unserer Kolonie ebenso der Fall, weshalb die Tiere bereits im Alter von 3 Wochen analysiert wurden.

3.1.1 Größe und Gewicht *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse

In den Kontaktradiographien *Akp2*-defizienter Mäuse ließen sich vergrößerte Wachstumsfugen der distalen Femora erkennen. Diese Fehlbildung existierte ebenso bei *Akp2/Mdk*-defizienten Mäusen. Außerdem ließ sich auf den Kontaktradiographien erkennen, dass *Akp2*-defiziente Mäuse kleiner im Vergleich zu Wildtypen sind (Abb.3.1A). Das Ausmessen der Kontaktradiographien zeigte, dass der Größenverlust der *Akp2*-defizienten Mäuse unter anderem durch kürzere Lendenwirbelkörper und Tibiae zustande kommt (Abb.3.1B). Bei *Akp2/Mdk*-defizienten Mäusen war hingegen nur eine Verkürzung der Tibiae zu messen. Um von einer Korrektur des *Akp2*-Defizienz-Phänotyps zu sprechen, müsste es signifikante Unterschiede zwischen Einzel- und Doppeldefizienz geben. Diese wurden jedoch weder bei Lendenwirbelkörperlängen, noch bei den Tibiae festgestellt. Die Femora waren bei beiden Mausmodellen im Vergleich zu den Wildtypen nicht verkürzt. Das Gewicht ging mit den gemessenen Größenunterschieden einher. Es war bei beiden Defizienzmodellen verringert. Allerdings kann man auch hier nicht von einer Korrektur sprechen, da sich die Gewichte der Defizienzmodelle untereinander nicht signifikant unterschieden.

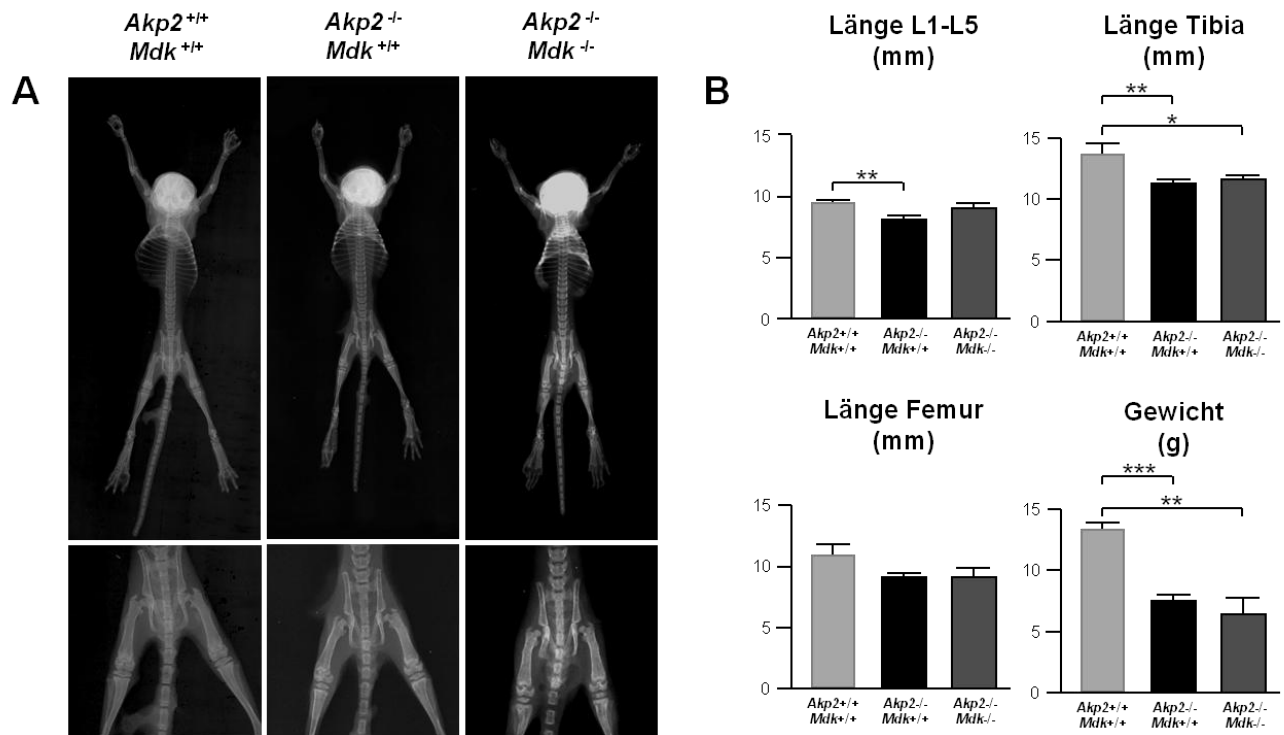


Abb.3.1 Charakterisierung $Akp2$ - und $Akp2/Mdk$ -defizienter Mäuse. (A) In der Darstellung sind Kontaktradiographien 3 Wochen alter Mäuse mit $Akp2$ -Defizienz ($Akp2^{-/-}/Mdk^{+/+}$), $Akp2$ - Mdk -Defizienz ($Akp2^{-/-}/Mdk^{-/-}$) und Wildtypen ($Akp2^{+/+}/Mdk^{+/+}$) verglichen worden. (B) Weitere Analysen lieferten die Werte der Lendenwirbelkörper-, Femora- und Tibialängen, sowie das Gewicht der Mäuse. (n=3 Tiere pro Gruppe; T-Test: * bedeutet $p < 0.05$; ** bedeutet $p < 0.01$; *** bedeutet $p < 0.001$).

3.1.2 Histomorphometrische Analyse $Akp2$ - und $Akp2/Mdk$ -defizienter Mäuse

Der nächste Schritt der Analyse beinhaltete die Anfertigung nicht-dekalzifizierter Lendenwirbelkörperschnitte in der von Kossa-/van Gieson-Färbung. Diese wurden histomorphometrisch vermessen und so strukturelle Knochenparameter gewonnen (Abb.3.2A). Durch die histomorphometrische Messung wurden Werte des Knochenvolumens (BV/TV, bone volume per tissue volume), der Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness), der Trabekelanzahl (TbN, trabecular number) und des Trabekelabstandes (TbSp, trabecular separation) ermittelt (Abb.3.2B). Der Vergleich ergab jedoch zwischen Wildtypen, den $Akp2$ - und den $Akp2/Mdk$ -defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede.

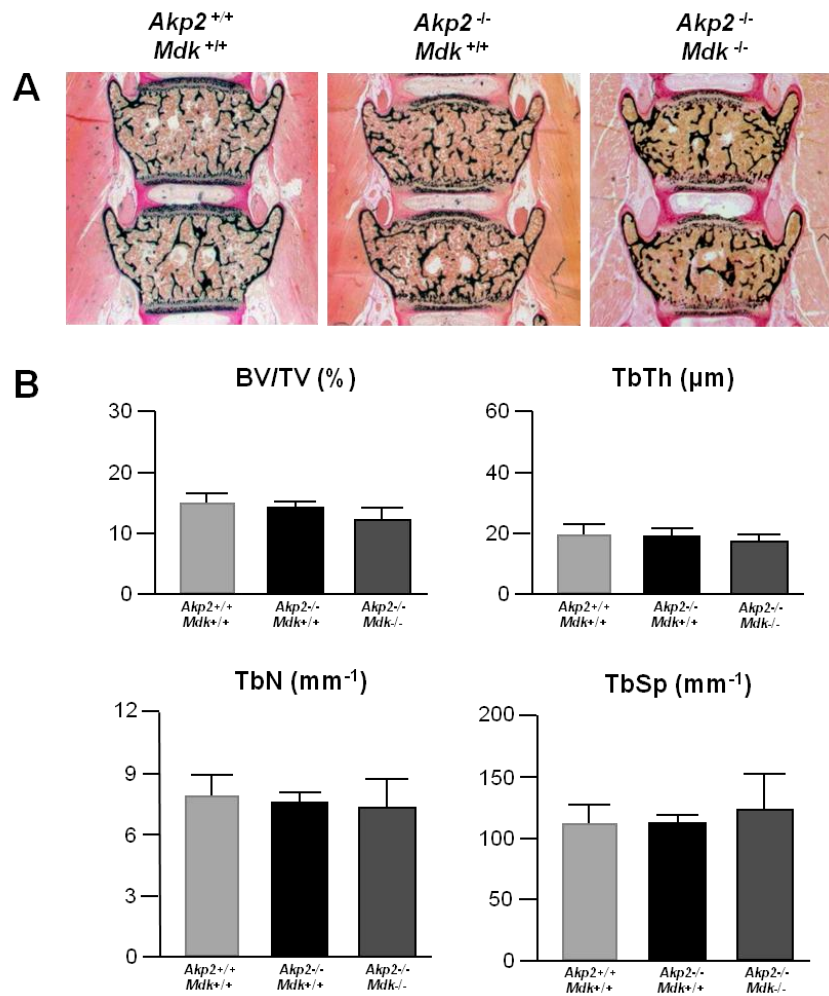


Abb.3.2: Histologische- und histomorphometrische Untersuchung *Akp2*- und *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse. (A) Der Vergleich nicht-dekalzifizierter Wirbelkörperschnitte 3 Wochen alter Wildtyp- (*Akp2*^{+/+}/*Mdk*^{+/+}), *Akp2*- (*Akp2*^{-/-}/*Mdk*^{+/+}) und *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse (*Akp2*^{+/+}/*Mdk*^{-/-}) wurde in der von Kossa/van Gieson-Färbung dargestellt. (B) Durch die histomorphometrische Quantifizierung wurden Knochenvolumen/ BV/TV (bone volume/tissue volume), Trabekeldicke/TbTh (trabecular thickness), Trabekelanzahl/TbN (trabecular number) und Trabekelabstand/TbSp (trabecular spacing) bestimmt.

Um Unterschiede in den Knochenparametern weiter auszuschließen, wurden die entsprechenden Tibiae der Tiere analysiert (Abb.3.3A). Dabei zeigte sich, dass sowohl das Knochenvolumen, als auch die Trabekelanzahl und die Trabekeldicke *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt waren (Abb.3.3B). Der Trabekelabstand stieg in Einklang mit den Parametern signifikant an.

Die Bestimmung der histomorphometrischen Daten *Akp2*-defizienter Tiere ergab wie schon in den Lendenwirbelkörpern auch in den Tibiae keinerlei Veränderung.

Zwischen den beiden Defizienzmodellen war allerdings ein signifikanter Unterschied in der Trabekeldicke zu erkennen. Dabei kann hier jedoch nicht von Korrektur des *Akp2*-defizienten

Phänotyps gesprochen werden, da die Trabekelzahl in den *Akp2/Mdk*-defizienten Tieren signifikant erniedrigt war.

Dies lässt den Schluss zu, dass eine Doppeldefizienz von *Akp2* und *Mdk* im Gegensatz zu einer einfachen *Akp2*-Defizienz einen Einfluss auf die Knochenparameter zu haben scheint, welcher sich allerdings im Alter von 3 Wochen erst in den Tibiae zeigt und welcher nicht für eine Korrektur, sondern sogar für eine Verschlechterung des Phänotyps spricht.

Akp2-defiziente Mäuse präsentierten keinen Phänotyp. Dies war jedoch auch nicht zu erwarten, da sich eine Defizienz vor allem durch reduzierte Mineralisation in Form von Osteoidanlagerungen bemerkbar macht (Fedde et al. 1999).

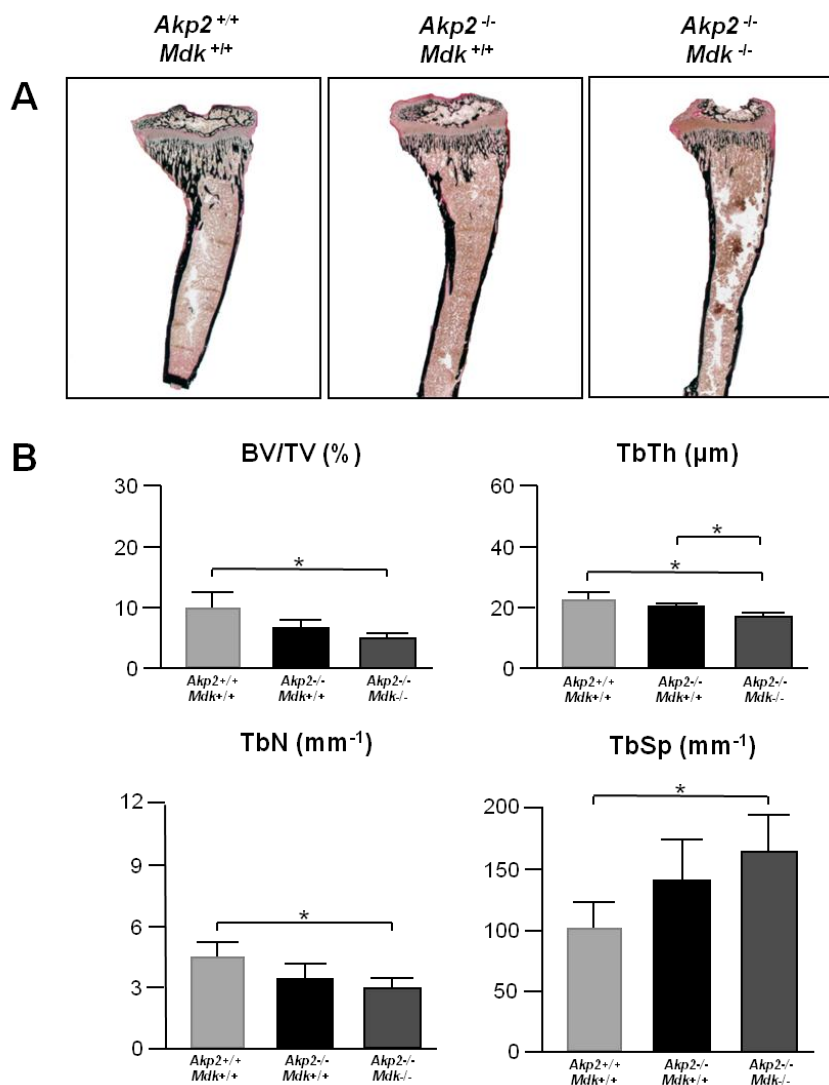


Abb.3.3: Histologische- und histomorphometrische Analyse *Akp2*- und *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse. (A) Die dargestellten Tibiae sind nach von Kossa/van Gieson gefärbt und stammen von 3 Wochen alten Mäusen. (B) Durch Vermessung der Schnitte konnten die knochenspezifischen Parameter ermittelt werden. (n=3 Tiere pro Gruppe; T-Test: * bedeutet p < 0.05).

3.1.3 Quantifizierung von Osteoidanlagerung in Lendenwirbelkörpern *Akp2*- und *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse

Um die beschriebenen Ergebnisse vermehrter Osteoidanlagerung zu analysieren, wurde das Osteoid in den Lendenwirbelkörpern gemessen (Abb.3.4A). Hier wurde erwartet, dass die Doppeldefizienz Einfluss auf die Ausprägung nimmt. Bei den Messungen zeigte sich, dass sowohl durch *Akp2*- als auch durch *Akp2/Mdk*-Defizienz im Alter von 3 Wochen mehr Osteoidoberfläche pro Knochenoberfläche (OS/BS, osteoid surface per bone surface) und insgesamt mehr Osteoidvolumen pro Knochenvolumen (OV/BV, osteoid volume per bone volume) nachweisbar war (Abb.3.4B). Sowohl die Osteoidoberfläche als auch das Osteoidvolumen war allerdings bei den *Akp2/Mdk*-defizienten Mäusen stärker erhöht als in *Akp2*-defizienten Tieren. Dies spricht also nicht für eine Korrektur, sondern für eine Verschlechterung des Phänotyps *Akp2*-defizienter Mäuse.

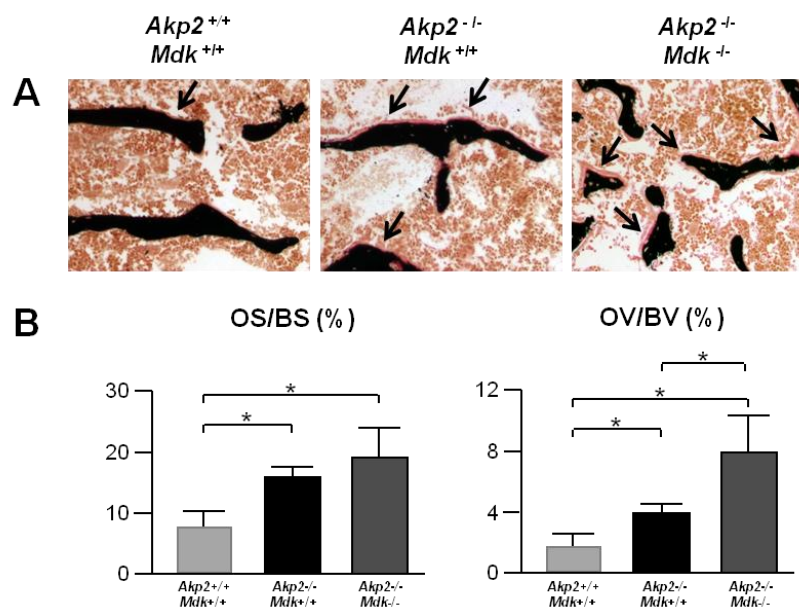


Abb.3.4: Quantifizierung des Osteoidanteils in *Akp2*- und *Akp2/Mdk*-defizienten Mäusen. (A) Die dargestellten Aufnahmen stammen aus den Lendenwirbelkörpern 3 Wochen alter Mäuse (100-fache Vergrößerung). Durch eine von Kossa/van Gieson Färbung konnte das Osteoid visualisiert werden (→). (B) In den Graphen sind die Osteoidoberfläche und das Osteoidvolumen der jeweiligen Genotypen aufgezeigt. Abkürzungen stehen für: OS/BS (osteoid surface per bone surface): Osteoidoberfläche pro Knochenoberfläche; OV/BV (osteoid volume per bone volume): Osteoidvolumen pro Knochenvolumen (n=3 Tiere pro Gruppe; T-Test: * bedeutet p < 0.05).

3.2 Untersuchung der potentiellen Interaktion von *Mdk* und *Rptpζ*

In vorangehenden Versuchen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass die Proteine *Ank* und *Npp1* mitverantwortlich für den Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse sind. Da der Rezeptor *Rptpζ* während der Osteoblastendifferenzierung induziert wird, scheint er im

Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle einzunehmen. In diesem Zusammenhang sollte ermittelt werden, ob die Geninduktion durch rekombinantes humanes Midkine (rh-Mdk) über die Bindung an den Rezeptor Rptp ζ erfolgt. Um die Zusammenhänge des Wachstumsfaktors Mdk und seinem putativen Rezeptor Rptp ζ *in vivo* zu verdeutlichen, wurde eine Mausmodell mit Gendefizienz beider Faktoren generiert.

3.2.1 Mdk-Einfluss auf die Genexpression in *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten

Um die Frage der Geninduktion durch rekombinantes humanes Midkine (rh-Mdk) über die Bindung an den Rezeptor Rptp ζ zu adressieren, wurden primäre Osteoblasten aus Calvarien Wildtyp- und *Ptprz1*-defizienter neugeborener Mäuse isoliert und mit rh-Mdk für 5 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde RNA isoliert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Hierbei lag der Schwerpunkt auf Genen, die für die Mineralisation wichtig sind (*Ank*, *Enpp1* und *Akp2*). Es sollten aber auch Gene untersucht werden, die wichtige Rollen im Phosphathaushalt übernehmen (*Dmp1* und *Slc20a1*).

Bei den Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch rh-Mdk Inkubation sowohl die *Ank*- als auch die *Enpp1*-Expression in Wildtyp-Osteoblasten ansteigt. Dieser Effekt war in *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten nicht mehr nachzuweisen (Abb.3.5A). Die Expression von *Akp2*, dem Gegenspieler dieser beiden Gene, wurde in Wildtyp-Osteoblasten durch rh-Mdk reprimiert, was ebenso in *Ptprz1*-defizienten Zellen nicht nachweisbar war (Abb.3.5A).

Die für den Phosphathaushalt wichtigen Gene *Dmp1* und *Slc20a1* wurden durch rh-Mdk in Wildtyp-Osteoblasten induziert. Auch dieser Effekt war in *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten nicht zu beobachten (Abb.3.5B). Als Negativkontrolle wurde die Expression von *Ibsp* (*Bone Sialoprotein*) bestimmt, was in der Tat weder in Wildtyp- noch in *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten durch rh-Mdk Behandlung beeinflusst war (Abb.3.5B).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die durch rh-Mdk vermittelten Effekte auf die Expression von *Ank*, *Enpp1*, *Akp2*, *Dmp1* und *Slc20a1* zumindest zum Teil auf der Anwesenheit des Rezeptors Rptp ζ beruhen.

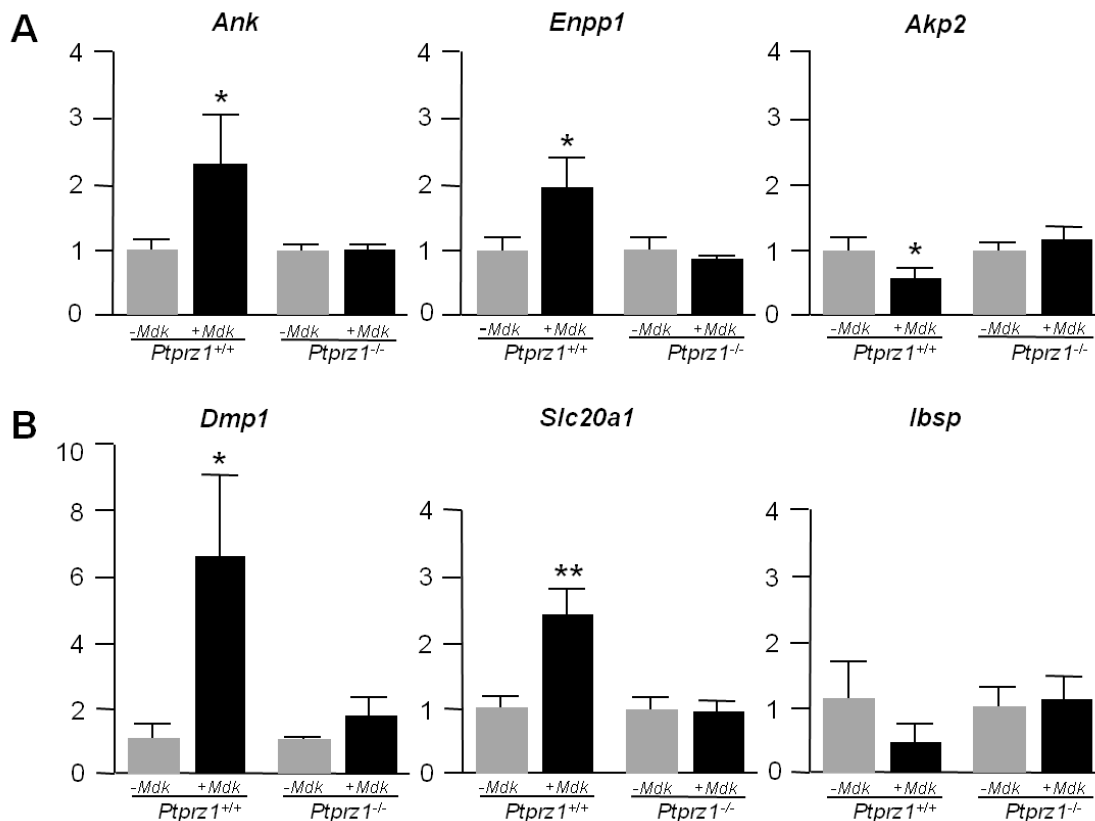


Abb.3.5: Quantifizierung der Genexpression von *Ank*, *Enpp1*, *Akp2*, *Dmp1*, *Slc20a1* und *Ibsp* nach Inkubation von Wildtyp- und *Ptpz1*-defizienten Osteoblasten mit rh-Mdk. Aus 5 Tage alten Wildtyp- (*Ptpz1*^{+/+}) bzw. *Ptpz1*-defizienten-Mäusen (*Ptpz1*^{-/-}) wurden primäre Osteoblasten aus Schädeldächern isoliert und 5 Stunden mit 100ng rekombinanten humanen Mdk (+Mdk) inkubiert. RNA wurde gewonnen, zu cDNA umgeschrieben und die spezifische Genexpression mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen. **(A)** Dargestellt sind die Hauptvertreter zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes der extrazellulären Pyrophosphatkonzentration (*Ank*, *Enpp1*, *Akp2*). **(B)** Weitere Versuche zeigten die Expression der beiden an der Phosphathomöostase beteiligten Gene *Dmp1* und *Slc20a1*. Die Expression von *Ibsp* diente als Negativkontrolle. (T-Test: * bedeutet p < 0.05; ** bedeutet p < 0.01).

3.2.2 Analyse *Mdk/Ptpz1*-defizienter Mäuse

In einem vorangehenden Transfektionsversuch unseres Labors konnte ein Zusammenhang von *Mdk* und *Ptpz1* *in vitro* hergestellt werden. Dabei resultierte bei gleichzeitiger Transfektion von *Mdk* und *Ptpz1* durch synergistische Effekte eine vollkommene Hemmung des Wnt-Signalweges. Das gab Hinweise darauf, dass im Umkehrschluss die Defizienz beider Gene zu einer überschießenden Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion und somit zu Osteosklerose führen könnte. Aus diesem Grund wurde ein entsprechendes Mausdefizienzmodell (*Mdk/Ptpz1*-Defizienz) generiert und im Alter von 26 Wochen analysiert. Im ersten Schritt wurden die Kontaktradiographien analysiert (Abb.3.6A). Die verglichenen Bilder zeigten jedoch keine Unterschiede. Um eventuelle Größenunterschiede festzustellen, wurde die Länge der Lendenwirbelkörper L1-L5 vermessen (Abb.3.6B). Diese

Messungen zeigten weder bei den Männchen noch bei den Weibchen Unterschiede zwischen den *Mdk/Ptprz1*-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Kontrolltieren. Gleiches gilt für das Gewicht der Mäuse.

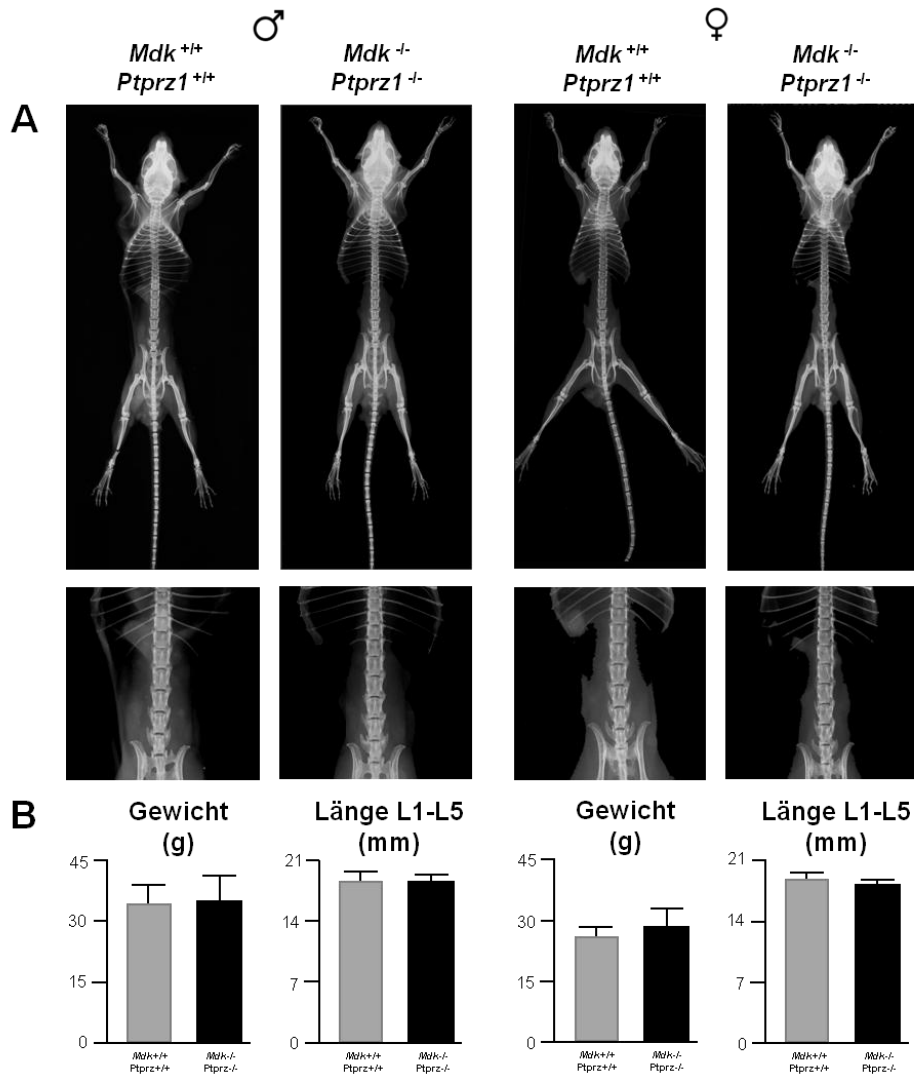


Abb.3.6: Charakterisierung 26 Wochen alter *Mdk/Ptprz1*-defizienter Mäuse. (A) Darstellung von Kontaktradiographien und Vergrößerung der Lendenwirbelkörperregion *Mdk/Ptprz1*-defizienter Mäuse (*Mdk*^{-/-}/*Ptprz1*^{-/-}), verglichen mit Wildtypen (*Mdk*^{+/+}/*Ptprz1*^{+/+}). **(B)** Bei der Bestimmung des Körpergewichtes und der Länge der Lendenwirbelkörper zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3 Histomorphometrische Analyse *Mdk/Ptprz1*-defizienter Mäuse

Um genauere Aussagen über die Knochenbeschaffenheit zu machen, wurden nicht-dekalifizierte Lendenwirbelkörperschnitte angefertigt und nach von Kossa-/van Gieson gefärbt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Mdk/Ptprz1*-defizienten Mäusewirbelkörpern erkannt werden (Abb.3.7A). Durch histomorphometrische Vermessung wurden strukturelle Knochenparameter bestimmt. Die Ergebnisse des Knochenvolumens

(BV/TV), der Trabekeldicke (TbTh), der Trabekelanzahl (TbN) und des Trabekelabstandes (TbSp) zeigten, dass es bei den Männchen und Weibchen keine signifikant messbaren Unterschiede im Vergleich zu Wildtypen gab (Abb.3.7B).

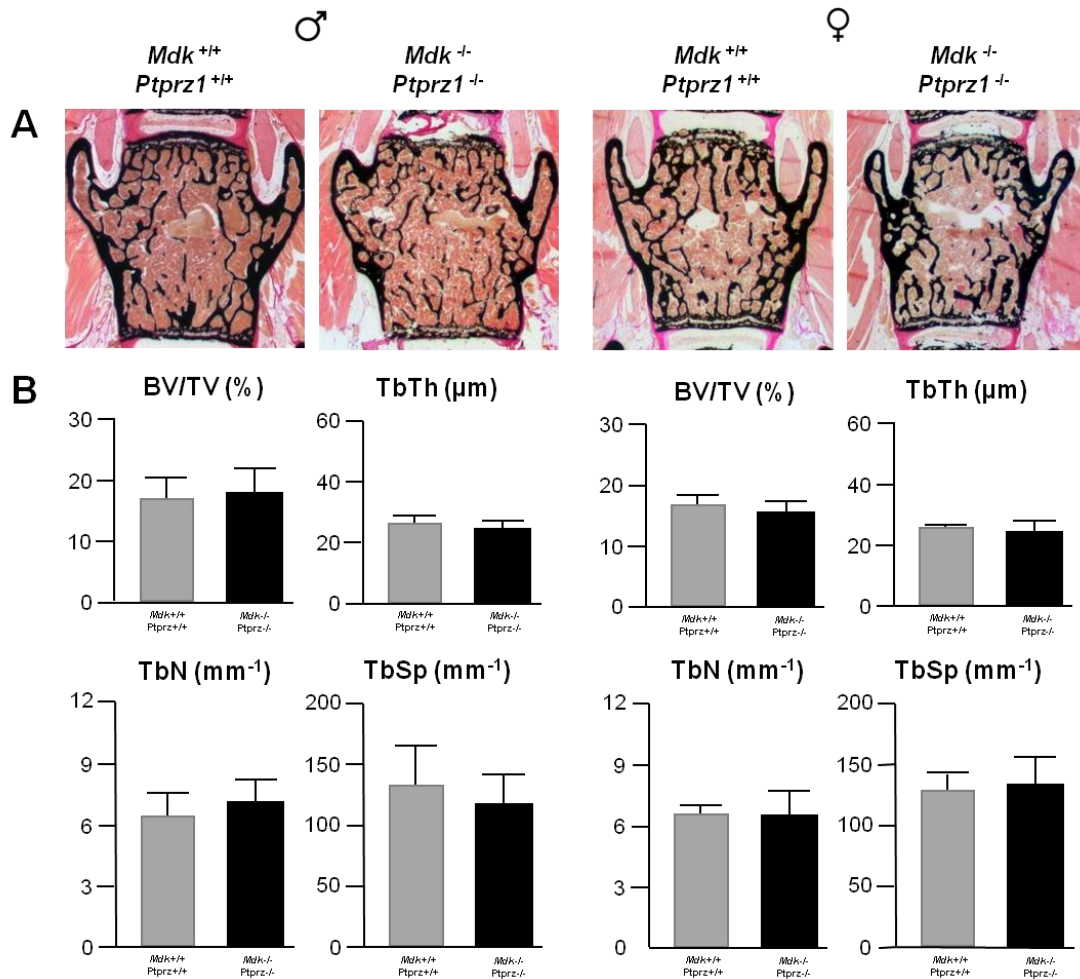


Abb.3.7: Histologische- und histomorphometrische Lendenwirbelkörperaufarbeitung *Mdk/Ptprz1*-defizienter Mäuse. (A) Die nicht-dekalzifizierten Schnitte 26 Woche alter Mäuse sind nach von Kossa-/van Gieson gefärbt. Dadurch wird mineralisiertes Gewebe (z.B. Knochen) schwarz angefärbt. Dabei wurden Mäuse mit *Mdk/Ptprz1*-Defizienz (*Mdk*^{-/-}/*Ptprz1*^{-/-}) den Wildtyp-Tieren (*Mdk*^{+/+}/*Ptprz1*^{+/+}) gegenübergestellt. **(B)** In der weiteren Analyse wurden das Knochenvolumen, die Trabekeldicke, die Trabekelanzahl und der Trabekelabstand bestimmt.

Um histologische Auffälligkeiten im Alter von 26 Wochen weiter auszuschließen, wurden nicht-dekalzifizierte Tibiae der Tiere ebenfalls histologisch aufgearbeitet und in der von Kossa-/van Gieson-Färbung analysiert. Bei der visuellen Betrachtung fielen dabei keine Unterschiede auf (Abb.3.8A). Daraufhin wurden histomorphometrische Messungen erhoben. Die knochenspezifischen Parameter der Mäuse zeigten allerdings ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten oder signifikante Unterschiede (Abb.3.8B).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es bei den Mäusen im Alter von 26 Wochen keine Unterschiede bezüglich der knochenspezifischen Parameter in Lendenwirbelkörpern und Tibiae zwischen Wildtyp- und *Mdk/Ptprz1*-defizienten Mäusen gab. Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch *Mdk/Ptprz1*-Defizienz vollkommene Inhibition des Wnt-Signalweges *in vitro*, *in vivo* im Alter von 26 Wochen nur eine untergeordnete Rolle für den Knochenstoffwechsel zu spielen scheint.

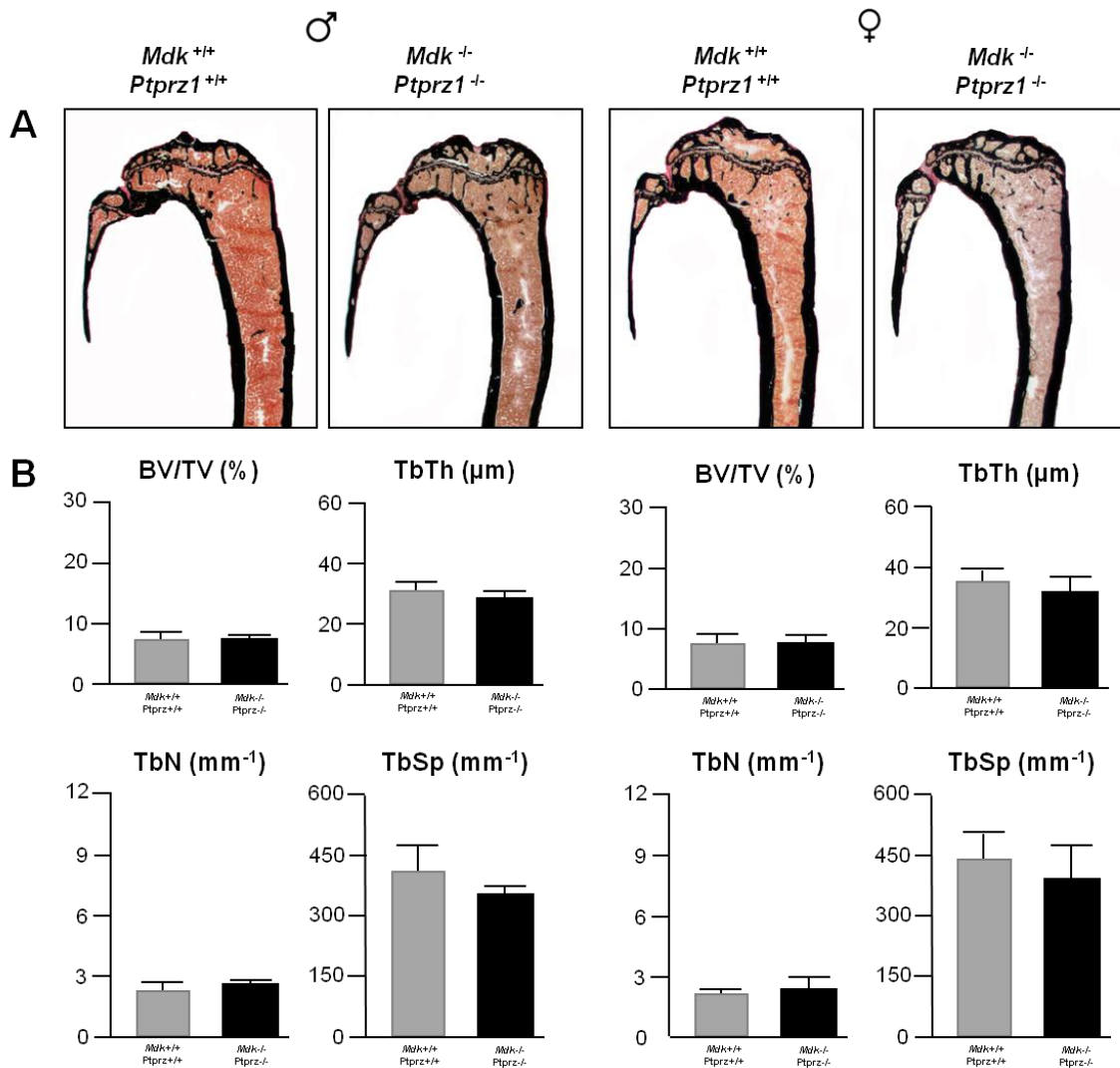


Abb.3.8: Histologische- und histomorphometrische Analyse der Tibia *Mdk/Ptprz1*-defizienter Mäuse. (A) In der Darstellung sind nicht-dekalzifizierte Tibiaschnitte 26 Wochen alter Mäuse gezeigt, welche nach von Kossa/van Gieson gefärbt sind. Dabei wurde zwischen den Wildtypen (*Mdk*^{+/+}/*Ptprz1*^{+/+}) und den *Mdk/Ptprz1*-defizienten Mäusen (*Mdk*^{-/-}/*Ptprz1*^{-/-}) unterschieden. **(B)** Die histomorphometrischen Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

3.3 Charakterisierung *Trp53*- und *Trp53/Ptprz1*-defizienter Mäuse

Für den Proteintyrosin-Phosphataserezeptor, Typ zeta (Rptp ζ) konnte gezeigt werden, dass er hemmend auf die Proliferation von Osteoblasten wirkt. Ob die Abwesenheit dieses Rezeptors die Tumorentstehung triggert, ist bisher jedoch unklar. Auch der Tumorsuppressor p53 ist im Zusammenhang mit der Entstehung von Knochentumoren beschrieben worden. Durch eine Defizienz von *Trp53* und *Ptprz1* sollte deshalb anhand eines Mausmodells herausgefunden werden, wie groß der Einfluss von *Ptprz1* auf die Entstehung von Osteosarkomen *in vivo* ist.

3.3.1 Charakterisierung *Trp53*-defizienter Mäuse

Da bisher nur widersprüchliche Knochen-spezifische histomorphometrische Analysen *Trp53*-defizienter Mäuse beschrieben wurden, sollte zunächst untersucht werden, ob eine einfache Defizienz von *Trp53* den Knochenstoffwechsel beeinflusst. Dies geschah durch Kontaktradiographien, wobei sich keine auffälligen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den *Trp53*-defizienten Mäusen zeigten (Abb.3.9A). Gleiches gilt für die Länge der Wirbelsäulen und das Körpergewicht (Abb.3.9B).

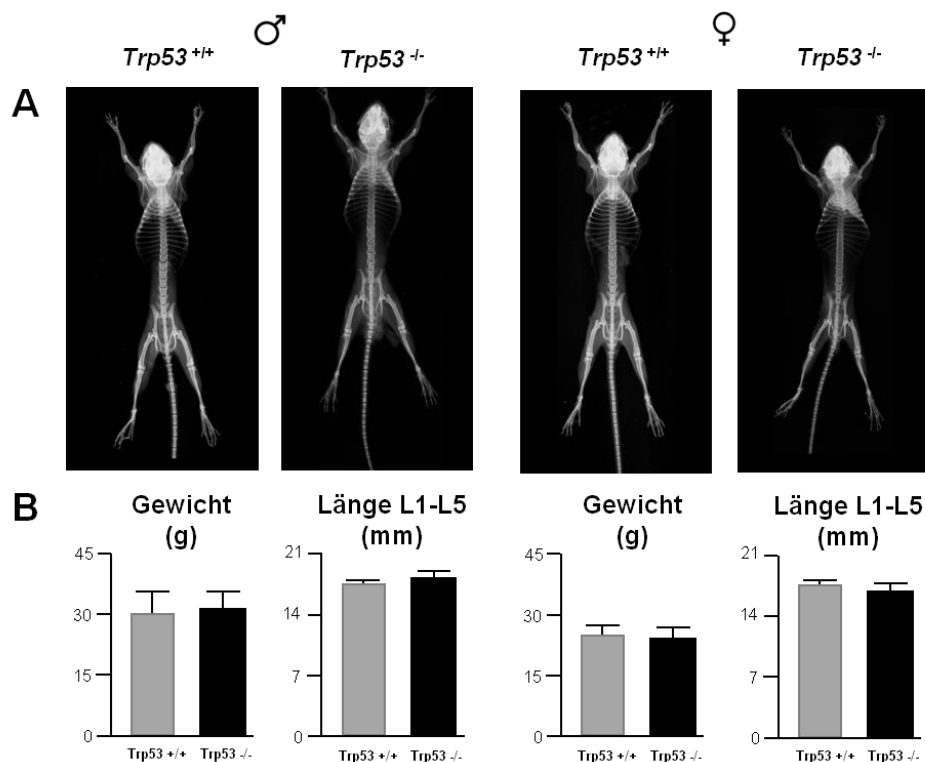


Abb.3.9: Charakterisierung *Trp53*-defizienter Mäuse. (A) In der ersten Darstellung sind Kontaktradiographien 13 Wochen alter *Trp53*-defizienter Mäuse (*Trp53*^{-/-}) mit denen von Wildtypen (*Trp53*^{+/+}) verglichen worden. (B) Im Anschluss daran wurden die Lendenwirbelkörper vermessen und die Tiere gewogen.

3.3.2 Histomorphometrische Wirbelkörperanalyse *Trp53*-defizienter Mäuse

Um einen Einfluss von p53 auf den Knochenstoffwechsel bis zum Alter von 13 Wochen auszuschließen, wurden nicht-dekalzifizierte Schnitte der Lendenwirbel angefertigt und nach von Kossa/van Gieson gefärbt (Abb.3.10A). Die Wirbelkörper zeigten optisch keine großen Unterschiede. Die histomorphometrische Messung ergab, dass sich die Wildtypen von den *Trp53*-defizienten Mäusen im Knochenvolumen, der Trabekeldicke, der Trabekelanzahl und dem Trabekelabstand nicht signifikant unterschieden (Abb.3.10B). Sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen ließ sich trotz leichter Schwankungen kein signifikanter Unterschied messen.

Daraus kann man schließen, dass eine *Trp53*-Defizienz bei Mäusen bis zum Alter von 13 Wochen geschlechtsunabhängig keine signifikanten Veränderungen der knochenspezifischen Parameter nach sich zieht.

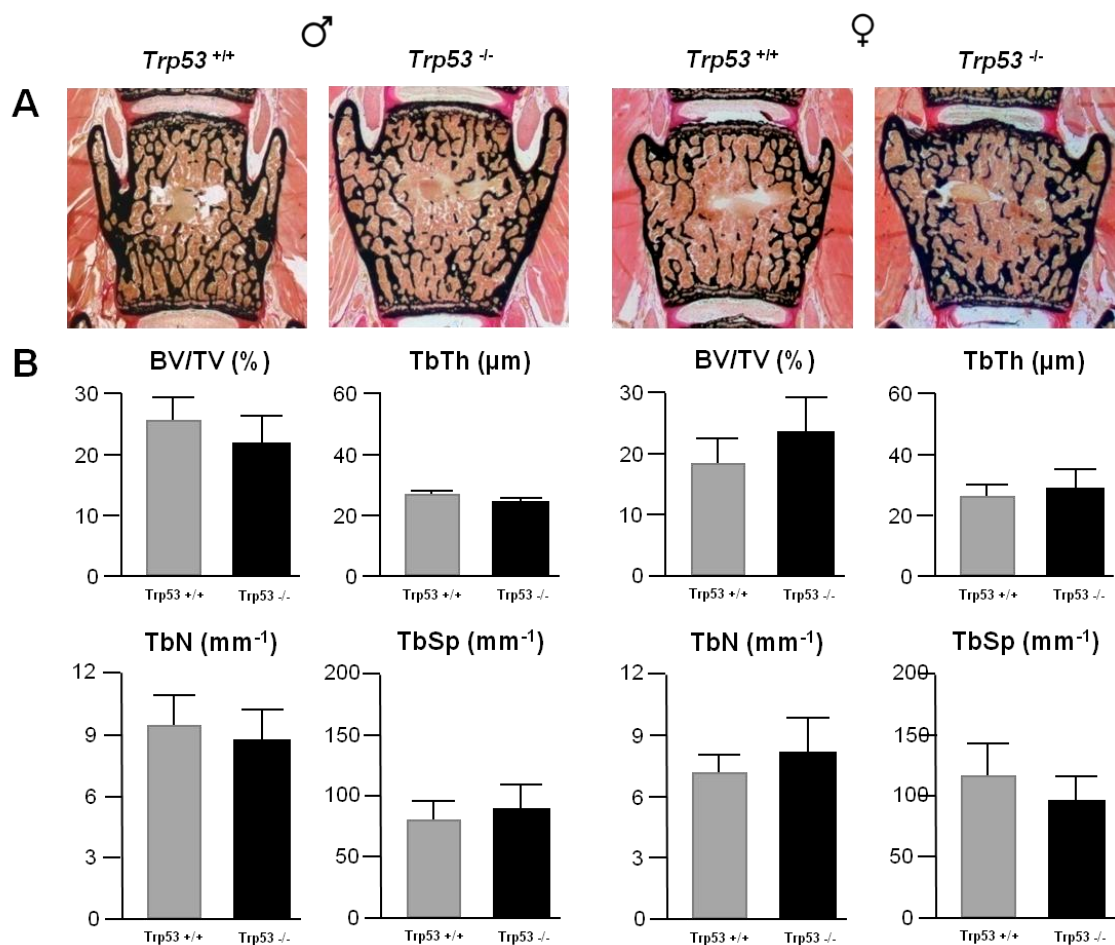


Abb.3.10: Histologische und histomorphometrische Analyse von Lendenwirbeln *Trp53*-defizienter Mäuse. (A) In der Darstellung werden jeweils Wildtyp-Mäuse (*Trp53*^{+/+}) mit *Trp53*-defizienten Mäusen (*Trp53*^{-/-}) verglichen. Die Wirbelkörper wurden nicht-dekalzifiziert aufgearbeitet und nach von Kossa/van Gieson gefärbt. (B) Anschließend wurden die histomorphometrischen Daten erhoben und geschlechtsspezifisch zwischen den Wildtypen und *Trp53*-defizienten Tieren verglichen.

3.3.3 Einfluss von *Ptprz1* auf die Osteosarkomentstehung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die alleinige Defizienz von *Trp53* keinen Einfluss auf die Knochendichte, bzw. die Bildung von Osteosarkomen hat, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob der gleichzeitige Verlust von *Ptprz1* eventuell zur Entstehung von Osteosarkomen führt. Hierzu wurde *Trp53/Ptprz1*-defiziente Mäuse gezüchtet und im Vergleich zu *Trp53*-defizienten Geschwistertieren im Alter von 13 Wochen analysiert. Um ein möglichst detailliertes Screening auf eine Osteosarkomentstehung zu ermöglichen, wurden im ersten Schritt Kontaktradiographien angefertigt. Für erste Hinweise wurden diese auf Auffälligkeiten wie Knochenfehlbildungen und -aufbauten untersucht. Dabei konnte bei den Männchen (Abb.3.11A) und Weibchen (Abb.3.11B) weder in der Einzelbetrachtung, noch im direkten Vergleich eine Anomalität ausgemacht werden, die Hinweise auf eine mögliche Osteosarkomentstehung gibt. Beim Menschen entstehen mehr als 50% der Osteosarkome in den Röhrenknochen, kniegelenksnah. Diesem Bereich galt besondere Aufmerksamkeit. Durch Vergrößerung wurde der Bereich gezielt analysiert, jedoch konnte auch dort keine anormale Veränderung festgestellt werden.

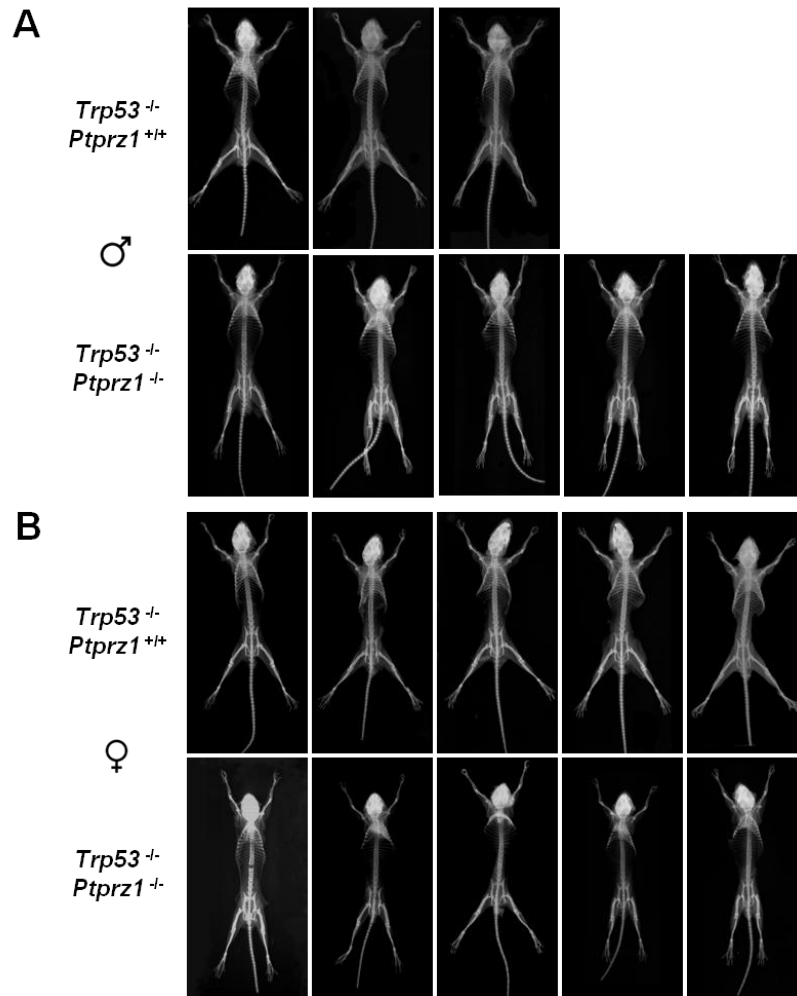


Abb.3.11: Kontaktradiographien *Trp53*- und *Trp53/Ptprz1*-defizienter Mäuse. In den Darstellungen sind 13 Wochen alte (A) Männchen und (B) Weibchen *Trp53*- (*Trp53^{-/-}/Ptprz1^{+/+}*) und *Trp53/Ptprz1*-Defizienz (*Trp53^{-/-}/Ptprz1^{-/-}*) aufgeführt. Das Augenmerk der Analyse lag auf knöchernen Veränderungen, die Hinweise auf eine Osteosarkomentstehung geben könnten.

3.3.4 Histologische Analyse *Trp53/Ptprz1*-defizienter Mäuse

Die Kontaktradiographien waren der erste Schritt der Analyse. Osteosarkome bilden nicht immer knöcherne Aufbauten, sondern können auch proliferieren, ohne, dass es von außen ersichtlich wäre. Wie schon erwähnt, liegt ein Fokus auf den langen Röhrenknochen. Deswegen wurden nicht-dekalzifizierte Schnitte der entsprechenden Tibiae angefertigt und nach von Kossa-/van Gieson gefärbt. Anzeichen für Osteosarkome bzw. der Beginn von Knochentumoren sollte sich durch Trabekelnetze, Einschlüsse oder stark mineralisierte Zonen darstellen. In der Analyse der männlichen Tibiae konnten im Vergleich zwischen *Trp53*- und *Trp53/Ptprz1*-defizienten Mäusen jedoch keine beschriebenen Anzeichen entdeckt werden (Abb.3.12A). Auch bei den Weibchen wurden keine ungewöhnlichen Strukturen identifiziert (Abb.3.12B). Die Kortikalis erscheint teilweise etwas dicker. Dies steht

jedoch nicht mit einer möglichen Osteosarkomentstehung in Verbindung, sondern lässt sich auf leichte Unterschiede bezüglich der Schnittebene zurückführen.

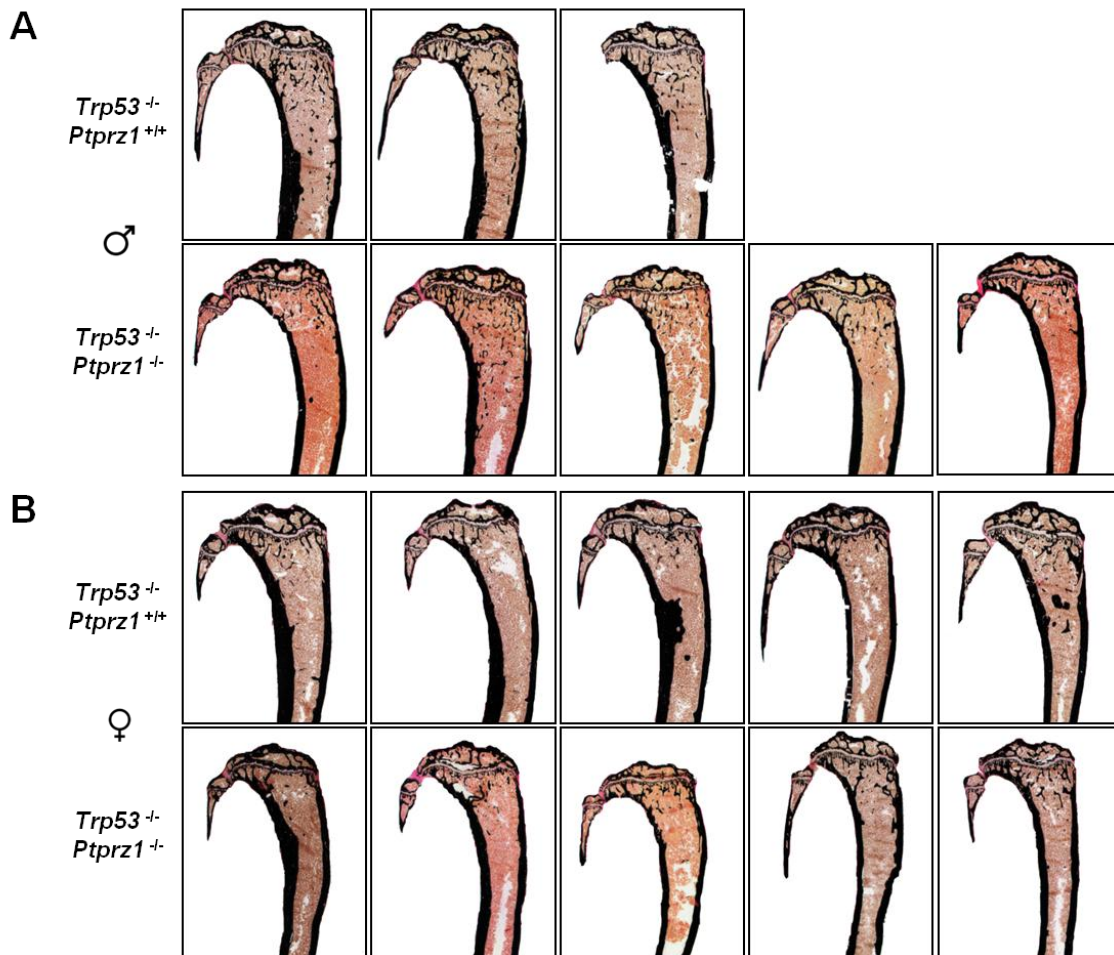


Abb.3.12: Histologische Analyse der Tibia *Trp53*- und *Trp53/Ptprz1*-defizienter Mäuse. Die Darstellung zeigt nicht-dekalzifizierte Tibiaschnitte 13 Wochen alter (A) männlicher und (B) weiblicher Mäuse. Dabei wurden *Trp53*- (*Trp53^{-/-}/Ptprz1^{+/+}*) mit *Trp53/Ptprz1*-defizienten Mäusen (*Trp53^{-/-}/Ptprz1^{-/-}*) verglichen. Die Schnitte wurden nach von Kossa/van Gieson gefärbt, um eine optimale Darstellung einer möglichen Osteosarkomentstehung zu erreichen.

Häufig geht eine Osteosarkombildung auch von den Lendenwirbelkörpern aus. Deswegen wurden diese ebenfalls von den gleichen 13 Wochen alten Mäusen aufgearbeitet und analysiert. Ein Osteosarkom sollte sich auch hier durch veränderte und ungewöhnliche Trabekelstrukturen darstellen. Bei Analyse der männlichen Wirbelkörper gab es einige Hinweise auf veränderte Strukturen (Abb.3.13A). Dabei ließen sich bei 2 von 5 *Trp53/Ptprz1*-defizienten Mäusen auffällige Trabekelstrukturen erkennen, wohingegen bei alleiniger *Trp53*-Defizienz keine Anzeichen zu erkennen waren. Bei den Weibchen bot sich hingegen ein anderes Bild (Abb.3.13B). Die Trabekel stellten sich hier in 1 von 5 *Trp53*-defizienten

Mäusen als verzweigt, vernetzt und mit Einschlüssen dar. Bei den *Trp53/Ptprz1*-defizienten Tieren konnten hingegen keine Hinweise auf Tumorentstehung identifiziert werden.

Diese veränderten Strukturen können noch nicht als Osteosarkome gewertet werden. Es können vielmehr Hinweise für das Frühstadium eines Knochen-Tumors sein. Die Ergebnisse zeigen, dass es sinnvoll ist, weitere Versuche anzuschließen, um die Tumorentstehung und die Zusammenhänge mit *Ptprz1* genau zu verstehen und zu analysieren.

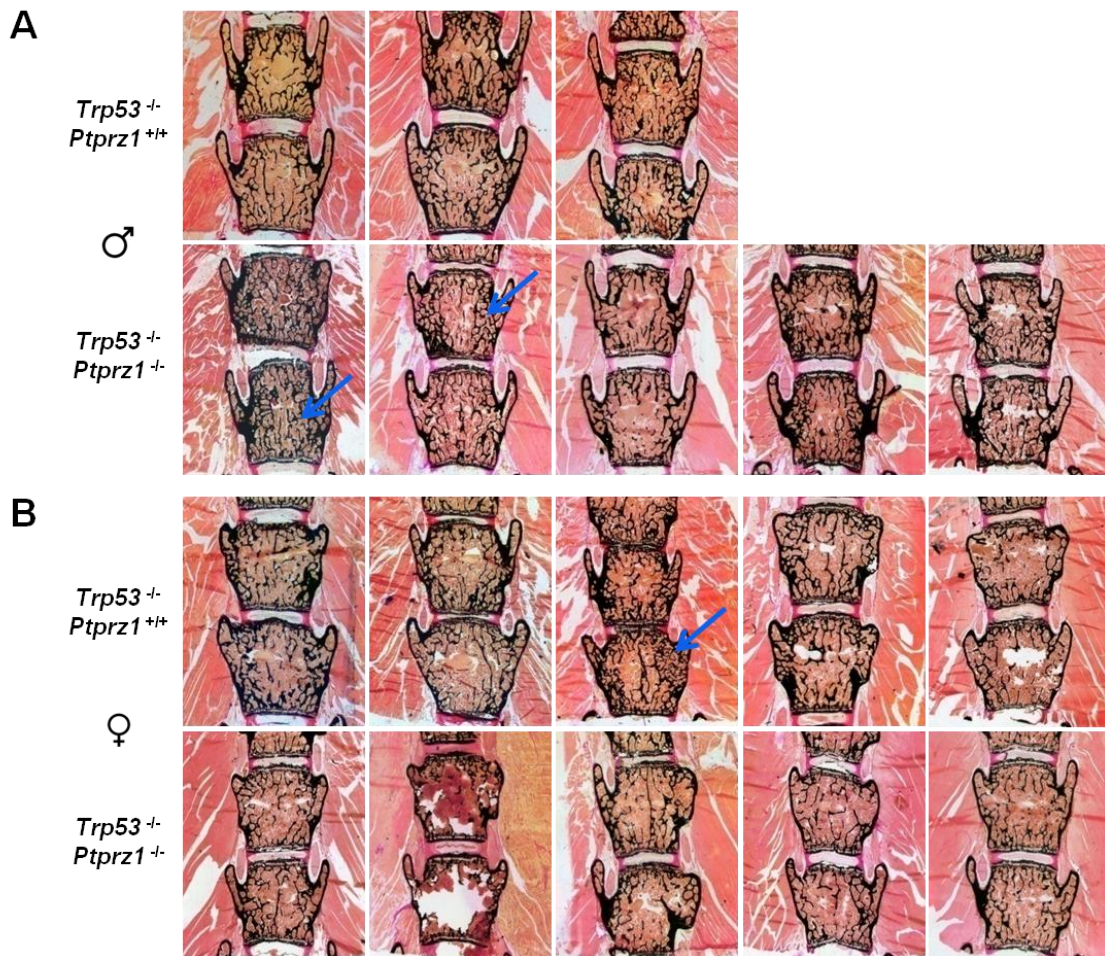


Abb.3.13: Lendenwirbelkörperschnitte *Trp53*- und *Trp53/Ptprz1*-defizienter Mäuse zur Analyse der Osteosarkomentstehung. Die Schnitte der 13 Wochen alten Mäuse wurden nach von Kossa/van Gieson gefärbt und anschließend analysiert. **(A)** Auffällige Strukturen sind sowohl bei den **(A)** Männchen als auch bei den **(B)** Weibchen mit Pfeilen (→) gekennzeichnet.

3.3.5 Analyse von Tumorbefunden

Eine weibliche *Trp53/Ptprz1*-defiziente Maus, die einen Tumor entwickelte, präsentierte sich im Alter von 13 Wochen viel kleiner, abgemagert und sehr bewegungsarm. Während der Präparation stellte sich im Thorax ein Gewebe dar, welches normales Lungengewebe nahezu vollständig verdrängte (Abb.3.15A). Das Gewebe wurde histologisch aufgearbeitet und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. In den verschiedenen Vergrößerungen sah man, dass es

sich um dichtes Gewebe handelte, welches Bindegewebebestandteilen und verschiedene Zellen beinhaltete (Abb.3.15B). Um das Gewebe mit der Lunge zu vergleichen, wurde aus einer 13 Wochen alten Wildtyp-Maus Lungengewebe isoliert, histologisch aufgearbeitet und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (Abb.3.15C). Im Vergleich zeigte sich schon unter 25-facher Vergrößerung, dass sich das Lungengewebe der gesunden Maus vom tumorösen Gewebe unterscheidet. In der 100-fachen Vergrößerung waren im Lungengewebe eindeutige *Sacculi alveolari* und Alveolen zu identifizieren, wohingegen beim tumorösen Gewebe dichtes, einheitliches Gewebe vorherrschte. In der 400-fachen Vergrößerung zeigten sich im Tumor unterschiedliche Zelltypen. In der Literatur sind ähnliche Bilder von Fällen beschrieben, bei denen es sich um maligne lymphozytische Lymphome handelt. Kennzeichnend dafür ist, dass die typischen Lymphknotenstrukturen aufgehoben sind und durch ein diffuses Infiltrat kleiner rundlicher Zellen ersetzt wird. Diese lassen sich schwer von kleinen Lymphozyten unterscheiden. Die Vergrößerungen der gewonnenen Proben zeigen, dass es tatsächlich diffuse Infiltrate gibt (100-fache Vergrößerung) und dass die meisten Zellen tatsächlich relativ uniforme kleine Lymphozyten sind, deren Charakteristik große rundliche basophile Kerne und ein dünner Zytoplasmasaum sind (400-fache Vergrößerung). Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass sich verschiedene Tumoren aufgrund einer *Trp53*-Defizienz in Mäusen ausbilden können, wobei der Hauptteil der Tumore Lymphome sind. Der hier beschriebene Tumor unterstützt diese Beobachtung.

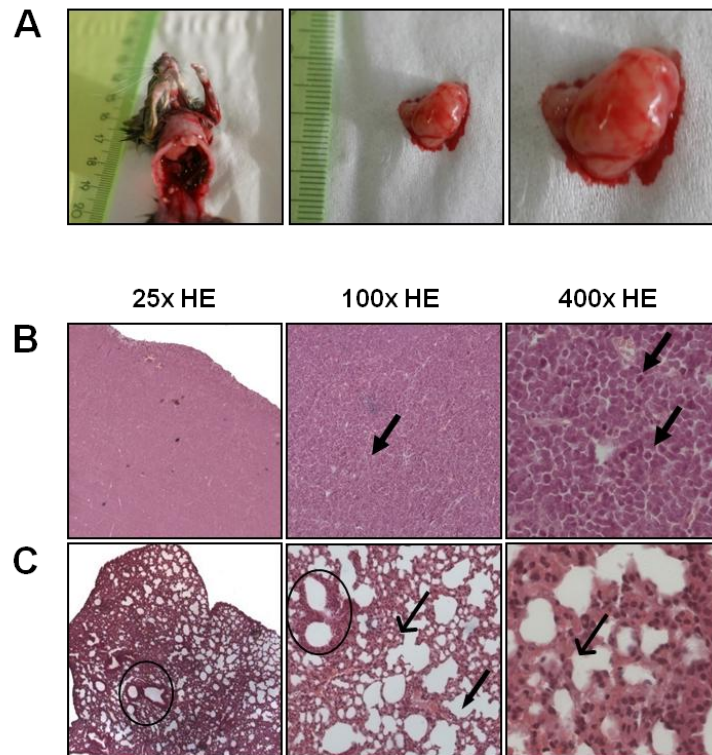


Abb.3.15: Analyse eines Tumors der Lunge einer *Trp53/Ptprz1*-defizienten Maus. (A) Dargestellt ist ein Tumorbefund aus dem Thorax einer 13 Wochen alten *Trp53/Ptprz1*-defizienten weiblichen Maus. **(B)** Nach histologischer Aufarbeitung wurde das Gewebe mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und in verschiedenen Vergrößerungen analysiert. Die 100-fache Vergrößerung zeigt das Vorkommen vieler kleinen Lymphozyten (-▶). In der 400-fachen Vergrößerung lassen sich diese noch deutlicher mit ihren charakteristischen großen rundlichen basophilen Kernen und dünnem Zytoplasmasaum darstellen (-▶). **(C)** Zum Vergleich wurde eine Lungenbiopsie einer Maus ohne Gendefekt analysiert. In dieser lassen sich Sacculi alveolari (->), die sich daran anschließenden Alveolen (→) und Gefäße (○) klar erkennen und unterscheiden.

4. Diskussion

4.1 Auswirkungen einer Doppeldefizienz von *Akp2* und *Mdk*

Der Wachstumsfaktor Midkine (*Mdk*) wurde erstmalig 1993 in Keimzelltumoren beschrieben, in denen durch Retinolsäure induzierte Gene identifiziert werden sollten (Muramatsu 2002). Bei weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass *Mdk* am stärksten während der Entwicklungsphase exprimiert wird, hingegen in adulten Mäusen nur noch in den Nieren und Gonaden nachzuweisen ist (Muramatsu and Muramatsu 1991; Muramatsu 2002). Durch ein Gendefizienzmodell der Maus konnte gezeigt werden, dass eine Abwesenheit von *Mdk* in Gehirn, Herz, Lunge Magen und Nieren zu keinen offensichtlichen Veränderungen führt (Nakamura et al. 1998). Anfänglich wurde dem Wachstumsfaktor nur ein großer Einfluss auf Neuronen nachgesagt (Muramatsu and Muramatsu 1991; Matsumoto et al. 1994). Inzwischen wurde jedoch ein enger Zusammenhang zur Knochenmineralisation nachgewiesen (Neunaber et al. 2010). Dies ergab, dass die Abwesenheit von *Mdk* bei 12 und 18 Monate alten Mäusen zu erhöhter Knochendichte führt, welche auf eine verstärkte Knochenformation zurückzuführen ist.

In diesem Kontext wurde gezeigt, dass die Funktion des Wachstumsfaktors unter anderem auf der Induktion der Gene *Ank* und *Enpp1* beruht. Das Fehlen dieser Gene führt beim Menschen zu Chondrokalzinose, kranio-metaphysärer Dysplasie, Hypermineralisation, Ossifikation der Wirbelsäulenligamente und anderen ektopischen Mineralablagerungen (Okawa et al. 1998; Ho et al. 2000; Pendleton et al. 2002; Gurley et al. 2006; Kirsch et al. 2009). Ein Gegenspieler dieser beiden Gene ist die gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase (Tnap, Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, durch das Gen *Akp2* kodiert). Durch eine *Akp2*-Defizienz kommt es zu Hypophosphatasie und Knochenmineralisationsstörungen (Fedde et al. 1999; Watanabe et al. 2002). Mit der Analyse von *Akp2/Ank*- bzw. *Akp2/Enpp1*-Mausdefizienzmodellen konnte die gegensätzliche Wirkung identifiziert werden, wodurch es in beiden Mausmodellen zu einer Korrektur des *Akp2*-Defizienz-Phänotyps kam (Hessle et al. 2002; Harmey et al. 2004).

Ein weiterer enger Zusammenhang zwischen *Enpp1*, *Ank* und *Akp2* konnte in vorangehenden Versuchen unseres Labors in 20 Tage alten primären Osteoblasten des Knochenmarks *Mdk*-defizienter Mäuse nachgewiesen werden. Dabei wurde eine *Akp2*-Geninduktion gemessen, welche allgemein auch als Parameter für die Osteoblastenzahl verwendet wird. Da sich in *Mdk*-defizienten Tieren tatsächlich mehr Osteoblasten befinden, konnten die anderen Gene auf *Akp2* normiert werden. Dadurch zeigte sich, dass die *Ank*-

und *Enpp1*-Expression in diesen Osteoblasten signifikant erniedrigt ist. Eine sich stellende Frage war, ob eine Doppeldefizienz von *Akp2* und *Mdk*, welches Einfluss auf *Ank* und *Enpp1* nimmt, zu einer Korrektur des *Akp2*-defizienten Phänotyps führt.

Die Analysen von Lendenwirbelkörpern 3 Wochen alter Mäuse zeigten, dass es weder durch *Akp2*- noch durch *Akp2/Mdk*-Defizienz zu veränderten histomorphometrischen Parametern kommt. In den Tibiae waren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren Knochendichte, Trabekelanzahl und Trabekeldicke *Akp2/Mdk*-defizienter Mäuse signifikant vermindert, der Trabekelabstand vergrößert. Die entstehende Frage war jedoch, ob es durch Doppeldefizienz zu einer Korrektur kommt. Davon könnte man sprechen, wenn sich die Werte des Doppeldefizienzmodells signifikant von denen der *Akp2*-Defizienz unterscheiden. Dies war bei der Trabekeldicke der Fall, jedoch waren die Werte hier in eine pathologische Richtung verschoben. Dadurch kann man nicht von einer Korrektur, sondern ganz im Gegenteil, von einer Verschlechterung des Phänotyps durch *Akp2/Mdk*-Defizienz sprechen. Die Hintergründe dafür konnten nicht abschließend geklärt werden und wurden auch nicht weiter verfolgt.

Akp2-Defizienz führt vor allem zu Osteoidanreicherung (Fedde et al. 1999). Die Osteoidquantifizierung der Lendenwirbelkörper bestätigte dies, da Osteoidoberfläche und –volumen in den *Akp2*-defizienten Mäusen erhöht waren. Damit die Erwartungen einer Korrektur erfüllt wären, müsste diese Osteoid-Anreicherung durch eine gleichzeitige Defizienz von *Mdk* reduziert sein. Dies war jedoch nicht so. Die Osteoidoberfläche blieb unverändert erhöht, und das Osteoidvolumen stieg sogar noch weiter an. Eine Erklärung für die fehlende Korrektur wäre, dass *Ank* und *Enpp1* nicht ausschließlich über *Mdk* reguliert werden. Dementsprechend sind sie durch eine *Mdk*-Defizienz auch nicht vollkommen inaktiv, so wie es bei den jeweiligen Defizienzen der Fall wäre. Die Frage, warum der *Akp2*-Defizienz-Phänotyp jedoch durch das gleichzeitige Fehlen von *Mdk* verstärkt wird, bleibt unbeantwortet und bedarf weiterer Untersuchungen. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse jedoch den Schluss zu, dass man durch eine Doppeldefizienz von *Mdk* und *Akp2* keine Korrektur eines *Akp2*-Defizienz-Phänotyps erreichen kann.

4.2 Rptpζ-abhängiger Einfluss von Mdk auf die Genexpression in Osteoblasten

Der Proteintyrosin-Phosphatase-Rezeptor, Typ zeta (Rptpζ) wurde erstmals in neuronalen Zellen beschrieben (Levy et al. 1993). Der Zusammenhang zum Knochenstoffwechsel konnte durch die Induktion seines Genes, *Ptprz1*, in einer Affymetrix-Genchipanalyse sich differenzierender Osteoblasten nachgewiesen werden (Schinke et al. 2008). In einem

daraufhin analysierten Mausdefizienzmodell wurde zudem gezeigt, dass die Abwesenheit von *Ptprz1* in verminderter Knochendichte und reduzierter Knochenformation resultiert.

Rptp ζ wird schon seit längerem als ein möglicher Rezeptor für Mdk diskutiert (Maeda et al. 1999; Meng et al. 2000). Für diesen Wachstumsfaktor wurde ebenfalls ein Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen. Außerdem konnten knochenspezifische Gene wie *Ank*, *Enpp1* und *Akp2* identifiziert werden, über welche der Phänotyp zu erklären ist (Neunaber et al. 2010). Aufgrund dessen wurde untersucht, wie wichtig die Rolle von *Ptprz1* für die Signaltransduktion hinsichtlich durch Mdk-induzierter Gene (*Ank*, *Enpp1*, *Akp2*, *Dmp1*, *Slc20a1*) ist. Die Geninduktionsmessung primärer Osteoblasten zeigte, dass die 5 von uns untersuchten Gene durch 5-stündige Inkubation von rekombinantem humanen Mdk in Wildtyp-Osteoblasten induziert wurden. In Osteoblasten *Ptprz1*-defizienter Mäuse konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

Mit diesen Ergebnissen wurde nochmals gezeigt, dass Mdk seine Wirkung zumindest zum Teil über *Ank*, *Enpp1* und *Akp2* reguliert und auch Phosphathomöostase-spezifische Gene (*Dmp1* und *Slc20a1*) durch Mdk direkt beeinflusst werden. Weiterhin belegen die Ergebnisse, dass für diese Geninduktion die Anwesenheit von *Ptprz1* erforderlich ist, was einmal mehr die enge Verknüpfung von Mdk und Rptp ζ aufzeigt. Dadurch sind diese Ergebnisse ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Funktion des Wachstumsfaktors Mdk und dem Verständnis seiner Signaltransduktion.

4.3 Auswirkungen einer *Mdk/Ptprz1*-Defizienz auf den Wnt-Signalweg *in vivo*

Der Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signaltransduktionswege für die Osteogenese und Knochenhomöostase. Für die Osteoblastenproliferation sowie deren Differenzierung ist dieser Signalweg sogar essenziell (Krishnan et al. 2006; Yavropoulou and Yovos 2007). In Transfektionsversuchen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Transfektion von *Mdk* und *Ptprz1* zu einer vollständigen Inhibition des Wnt-Signalweges führt. Dies veranlasste dazu, ein Maus-Doppeldefizienzmodell dieser Gene zu generieren. Die Erwartung war, dass durch Abwesenheit von *Mdk* und *Ptprz1*, der Wnt-Signalweg übermäßig aktiviert wird und sich schon in jungem Alter eine Osteosklerose mit erhöhter Knochendichte manifestiert. Deswegen wurden von Mäusen im Alter von 26 Wochen Kontaktradiographien, histologische Aufarbeitungen und histomorphometrischen Messungen angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass sich in den *Mdk/Ptprz1*-defizienten Mäusen keine Osteosklerose ausbildet. Es wurden weder bei männlichen noch bei weiblichen Mäusen Unterschiede hinsichtlich der oben genannten Parameter im Vergleich zu Wildtypen

gemessen. Dies steht im Widerspruch zu den *in vitro* Ergebnissen, bei denen der synergistische Effekt von *Mdk* und *Ptprz1* eine eindeutige Inhibition des Wnt-Signalweges bewirkte.

Diese Ergebnisse bestätigen die Erwartungen einer Osteosklerose mit erhöhter Knochendichte eindeutig nicht. Der fehlende Knochenphänotyp gibt dagegen Hinweise darauf, dass die Gene *Mdk* und *Ptprz1* bis zu einem Alter von 26 Wochen keine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel spielen, was dazu passt, dass sowohl *Mdk*- als auch *Ptprz1*-defiziente Mäuse erst im Alter einen Knochenphänotyp entwickeln.

In diesem Zusammenhang gibt es noch ausstehende Fragen zu klären. Die Untersuchung einer *Mdk*-Defizienz zeigte, dass es in 52 und 78 Wochen alten Mäusen zu erhöhter Knochendichte kommt, welches auf gesteigerter Knochenformation beruht (Neunaber et al. 2010). Eine *Ptprz1*-Defizienz resultiert hingegen in 50 Wochen alten Mäusen in einem gegensätzlichen Phänotyp, d.h. in einer Osteopenie durch erniedrigte Knochenformation (Schinke et al. 2008). Um die Frage zu klären, inwieweit *Mdk* und *Rptpζ* verknüpft sind und welchen Einfluss dies auf die Osteogenese nimmt, wurde schon damit begonnen, weitere *Mdk/Ptprz1*-defiziente Mäuse zu generieren, die im Alter von 52 Wochen analysiert werden sollen.

4.4 Einfluss von *Ptprz1* und *Trp53* auf die Osteosarkomentstehung

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass *Rptpζ* durch seine dephosphorylierende Eigenschaft inhibitorische Funktion für die Proliferation primärer Osteoblasten hat (Abb.1.6). Dies ließ den Schluss zu, dass das Fehlen dieses Rezeptors zur Entstehung von Osteosarkomen führen könnte. Um diese Beobachtung *in vivo* zu untersuchen, wurden *Trp53/Ptprz1*-defiziente Mäuse generiert. Aufgrund der immer noch vertretenden Mehrschritthypothese zur Entwicklung von Tumoren, wurde der bereits im Zusammenhang mit der Osteosarkomentstehung beschriebenen Tumorsuppressor p53 als „Trigger“ gewählt (Wunder et al. 2005). Die Analysen wurden bei Mäusen im Alter von 13 Wochen durchgeführt, da für Mäuse einer homozygoten *Trp53*-Mutation ein frühes Versterben beschrieben ist (Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994).

Um Aussagen über den Einfluss von *Ptprz1* auf die Tumorprogression zu machen, wurde ein *Trp53*-Mausdefizienzmodell zum Vergleich gewählt. Für diese Mäuse sind histomorphometrische Daten zwar schon beschrieben worden, widersprechen sich jedoch. Eine Arbeitsgruppe berichtete, dass durch *Trp53*-Defizienz eine erhöhte Knochendichte aufgrund von gesteigerter Knochenformation auftritt (Wang et al. 2006), wohingegen eine

andere Gruppe keine Unterschiede feststellte (Sakai et al. 2002). Um ein eigenes Bild zu bekommen, wurden die *Trp53*-defiziente Mäuse histologisch und histomorphometrisch aufgearbeitet, analysiert und geschlechtsspezifisch mit Wildtypen verglichen. Dabei konnte man weder in den Kontaktradiographien, noch im Gewicht oder Größe signifikante Differenzen erkennen. Auch bei der histomorphometrischen Datenerhebung zeigten sich keine Unterschiede.

Damit schließen sich diese Ergebnisse denen der Arbeitsgruppe um Sakai an. Mögliche Ursachen der Diskrepanz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Wang könnten das Alter der Analyse sein. Während Sakai, Sakata et al. die Tiere im Alter von zwei Monaten betrachteten, in unserem Institut im Alter von drei Monaten, wurden die Mäuse bei Wang, Kua et al. im Alter von vier Monaten analysiert. Um Aufschluss über den genauen Manifestationszeitraum zu bekommen, müssten deswegen weitere Analysen älterer Mäuse erfolgen.

Die eigentliche Fragestellung war jedoch, ob *Rptpζ* an der Entstehung von Osteosarkomen beteiligt ist. Dazu wurden Mäuse im Alter von 13 Wochen mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht. Im ersten Schritt wurden Kontaktradiographien angefertigt. Die Suche nach auffälligen Knochenstrukturen verlief erfolglos. Im zweiten Schritt wurden Tibiae der Tiere aufgearbeitet. Jedoch konnte auch hier kein Hinweis auf Tumorentstehung entdeckt werden. Dieser hätte sich durch stark veränderte Trabekelstrukturen äußern müssen. Solche Charakteristika wurden zum Teil bei der Analyse der Lendenwirbelkörper gefunden. Diese Funde sind nicht eindeutig auf eine der Gruppen beschränkt. So finden sich sowohl in den *Trp53*- als auch in den *Trp53/Ptprz1*-defizienten Mäusen Hinweise beginnender Osteosarkome. Aber es konnte keiner dieser Strukturen eindeutig als Osteosarkom identifiziert werden.

Auf diese widersprüchlichen Ergebnisse folgte eine andere Vorgehensweise. So sollen die Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden, bis zu diesem allerdings auch überleben und nicht einer beschriebenen Lymphomentstehung (in mehr als 70% der Fälle) vorher erliegen (Donehower et al. 1992). Um dies zu ermöglichen, wurde ein Mausmodell generiert, welches auf einer heterozygoten *Trp53*-Defizienz basiert, d.h. in dem *Trp53* nur auf einem der beiden Allele deletiert wurde. Dies erhöht die durchschnittliche Überlebenszeit deutlich (Harvey et al. 1993). Dieser Genotyp wurde abermals mit einer *Ptprz1*-Defizienz kombiniert und soll im Alter von 52 Wochen analysiert werden.

Die ersten Mäuse haben inzwischen das entsprechende Alter erreicht. Dabei zeigte sich, dass sich bereits bei 2 von 5 Mäusen Osteosarkome am Rippenbogen gebildet hatten

(Abb.4.1). Dieses Ergebnis ist sehr vielversprechend. Sollten weitere Mäuse Osteosarkome bilden, wäre dies der erste Beweis dafür, dass *Ptprz1* nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* mit der Proliferation von Osteoblasten, speziell dem Osteosarkom, in engem Zusammenhang steht. Dieses Wissen würde den Weg in weitere Therapieansätze dieses Tumors öffnen. Es wäre der erste Rezeptor, der relativ knochenspezifisch exprimiert wird und eine isoliertere und gezieltere Therapie des bisher schlecht therapierbaren Osteosarkoms ermöglichen könnte.

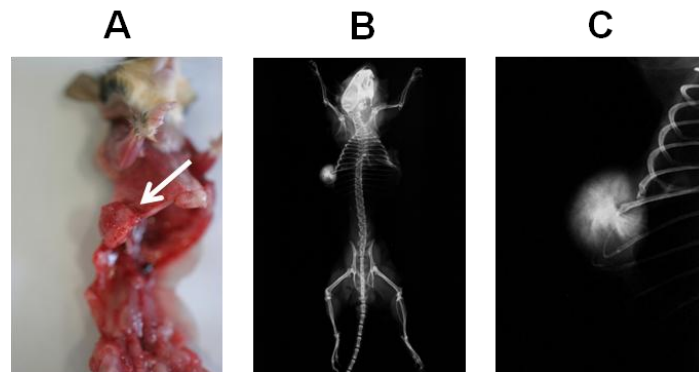


Abb.4.1: Analyse eines Tumorfundes einer *Trp53^{+/+}/Ptprz1^{-/-}*-defizienten Maus. (A) Bei der Präparation einer 52 Wochen alten *Trp53^{+/+}/Ptprz1^{-/-}*-Maus wurde ein Osteosarkom am Rippenbogen entdeckt (→). **(B)** Die Aufnahme der Kontaktradiographie spiegelt die Verschattung deutlich wieder. **(C)** In der Vergrößerung des Tumors lässt sich das stark mineralisierte Zentrum noch besser erkennen.

4.5 Ausblick

Die Frage, ob der Phänotyp einer *Akp2*-Defizienz durch Doppeldefizienz mit *Mdk* korrigiert werden kann, konnte durch die vorangegangenen Analysen klar widerlegt werden. Deswegen werden in diesem Teilabschnitt keine weiteren Versuche folgen.

Durch das Maudoppeldefizienzmodell von *Mdk* und *Ptprz1* konnte beantwortet werden, dass der synergistische Effekt auf die Hemmung des Wnt-Signalweges *in vivo* nicht zu bestätigen ist. Um die weiteren Interaktionen zwischen *Mdk* und Rptp ζ zu verstehen, wurden bereits *Mdk/Ptprz1*-defiziente Mäuse generiert, die im Alter von 52 Wochen histologisch und histomorphometrisch analysiert werden sollen.

Die Ergebnisse der Zusammenhänge von *Ptprz1*, *Trp53* und der Osteosarkomentstehung waren nur bedingt aussagekräftig, sind jedoch Ausgangspunkt für weitere vielversprechende Versuche. So wurde die Vorgehensweise dahingehend geändert, dass *Trp53* nur noch auf einem Allel deletiert wurde und die Mäuse im Alter von 52 Wochen analysiert werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass in 2 von 5 *Trp53^{+/-}/Ptprz1^{-/-}*-defizienten Mäusen ein Osteosarkom nachweisbar war. Hier ist die Analyse weiterer Mäuse sowie der entsprechenden *Trp53^{+/-}*-Kontrolltiere von entscheidender Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Midkine und Pleiotrophin bilden eine eigenständige Gruppe von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren. Für Mdk konnte gezeigt werden, dass ein Genverlust im Alter durch erhöhte Knochenformation in vermehrter Knochenmasse resultiert. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Mdk die Gene *Ank* und *Enpp1* induziert. Dies sind Gegenspieler der Gewebe-unspezifischen alkalischen Phosphatase. Diese Arbeit zeigt, dass der Phänotyp einer *Akp2*-Defizienz in 3 Wochen alten Mäusen nicht durch eine gleichzeitige Defizienz von *Akp2* und *Mdk* korrigiert werden kann.

Die Signaltransduktion von Mdk ist noch nicht vollständig verstanden. Um den putativen Rezeptor Rptp ζ zu bestätigen, wurde die durch rekombinantes humanes Midkine induzierte Genexpression in Wildtyp- und *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Gene *Ank*, *Enpp1* und *Akp2* sowie die für den Phosphathaushalt wichtigen Gene *Dmp1* und *Slc20a1* zumindest auf die Anwesenheit von *Ptprz1* angewiesen sind, da ohne diesen Rezeptor keine Induktion durch Mdk messbar war.

Im Rahmen der Untersuchung von Midkine wurde ebenfalls der Zusammenhang mit *Ptprz1* und dem Wnt-Signalweg in Osteoblasten *in vitro* untersucht. Ergebnisse zeigten, dass ein synergistischer Effekt von *Mdk* und *Ptprz1* zu einer vollkommenen Hemmung des Wnt-Signalweges führt. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Doppeldefizienz *in vivo* am Mausmodell im Alter von 26 Wochen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der *in vitro* beobachtete Effekt *in vivo* nicht zu bestätigen ist. Durch weitere Mäuse soll der Knochenphänotyp im Alter von 52 Wochen analysiert werden.

Rptp ζ hat durch seine dephosphorylierende Eigenschaft regulierenden Einfluss auf die Zellproliferation. Durch BrdU-Inkorporationsversuche konnte gezeigt werden, dass dieser Einfluss auch für Osteoblasten gilt. In dieser Arbeit sollte *in vivo* durch ein Mausdefizienzmodell untersucht werden, ob dieser Einfluss die Bildung von Osteosarkomen beeinflusst. Hierzu wurden *Trp53/Ptprz1*-defiziente Mäuse generiert und histologisch analysiert. Dies ergab bei Mäusen im Alter von 13 Wochen keine Unterschiede im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren.

Erste Untersuchungen 52 Wochen alter *Trp53^{+/-}/Ptprz1^{-/-}*-defizienter Mäuse zeigten hingegen, dass sich in 40% dieser Tiere Osteosarkome entwickelten. Dies soll nun durch Erhöhung der Fallzahlen bestätigt werden.

6. Abkürzungen

<u>Adn:</u>	<i>Adipsin</i>	<u>Dkk1:</u>	<i>Dickkopf-Homolog 1</i>
<u>Akp2:</u>	<i>Alkaline Phosphatase2,</i> kodierendes Gen für Tnap	<u>Dmp1:</u>	<i>Dentin-Matrix-Protein 1</i>
<u>Akp2^{+/+}:</u>	Wildtyp	<u>dNTPs:</u>	Desoxynukleotidtriphosphat
<u>Akp2^{-/-}:</u>	<i>Akp2</i> -Defizienz	<u>Dsh:</u>	Dishevelled's
<u>ALK:</u>	Anaplastic Lymphoma Kinase	<u>DVO:</u>	Dachverband Osteologie
<u>Alpl:</u>	unspezifische Alkalische Phosphatase	<u>EDTA:</u>	Ethylendiaminetetraacetic acid (Ethylendiaminetetra- essigsäure)
<u>α-Mem:</u>	Minimum-Essential-Medium- Eagle, Alpha Modification	<u>Enpp1:</u>	kodierendes Gen für <i>Npp1</i>
<u>ANK:</u>	ankylosis protein	<u>EtOH:</u>	Ethanol
<u>Ank:</u>	kodierendes Gen für ANK	<u>EUROBOSS:</u>	European Bone over 40 Osteosarcoma Study
<u>APC:</u>	Adenomatöse-Polyposis- Coli	<u>EURAMOS:</u>	European and American Osteosarcoma Study
<u>ApoE:</u>	<i>Apolipoprotein E</i>	<u>Fcgr2b:</u>	<i>Fc-Rezeptor für IgG IIb</i>
<u>ATP:</u>	Adenosintriphosphat	<u>FGF23:</u>	fibroblast growth factor 23
<u>Bglap:</u>	<i>Bone-Gamma-Carboxyl-</i> <i>glutamate-Protein</i>	<u>GSK-3:</u>	Glykogen-Synthase- Kinase β3
<u>BMP:</u>	Bone Morphogenic Protein	<u>H₂O:</u>	Wasser
<u>BV/TV:</u>	bone volume per tissue volume (Knochenvolumen pro Gewebevolumen)	<u>HCL:</u>	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
<u>Ccl7:</u>	<i>Chemokine (C-C motif)</i> <i>Ligand 7</i>	<u>Hp:</u>	<i>Haptoglobin</i>
<u>Ccl19:</u>	<i>Chemokine (C-C motif)</i> <i>Ligand 19</i>	<u>lbsp:</u>	<i>Integrin-Binding-Sialoprotein</i>
<u>cDNA:</u>	complementary DNA (komplementär DNA)	<u>Klhdc8a:</u>	<i>Kelch-Domain containing 8A</i>
<u>c-fos:</u>	Retrovirus Associated DNA sequence –C	<u>LEF:</u>	lymphoid enhancer-binding factor 1
		<u>LRP5/6:</u>	low density protein 5/6
		<u>M-CSF:</u>	Macrophage-Stimulating Factor
		<u>MDK:</u>	humanes Midkine
		<u>Mdk:</u>	murines Midkine
		<u>Mdk:</u>	kodierendes Gen für Mdk
		<u>Mdk^{+/+}:</u>	Wildtyp
		<u>Mdk^{-/-}:</u>	<i>Mdk</i> -Defizienz
		<u>MgCl₂:</u>	Magnesiumchlorid

<u>Mmp3:</u>	<i>Matrix-Metallopeptidase 3</i>	<u>RNase:</u>	Ribunuklease
<u>Mmp10:</u>	<i>Matrix-Metallopeptidase 10</i>	<u>RUNX-2:</u>	Runt-related Transcription Factor 2
<u>Mt2:</u>	<i>Metallothionein 2</i>	<u>SDS:</u>	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
<u>NaCl:</u>	Natrium-Chlorid	<u>Serpina 3g:</u>	<i>Serine-(Cysteine) Peptidase- Inhibitor</i>
<u>NaOH:</u>	Natriumhydroxid	<u>Slc20a1:</u>	<i>Solute Carrier Family 20, Member</i>
<u>NFκB:</u>	Nuclear Factor Kappa β	<u>Steap4:</u>	<i>STEAP family member 4</i>
<u>Npp1:</u>	nucleotid pyrophosphate phosphodiesterase1	<u>TCF:</u>	T cell-specific transcription factor
<u>Opg:</u>	Osteoprotegerin	<u>TNAP:</u>	tissue-nonspecific alkaline phosphatase
<u>PCR:</u>	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)	<u>TRIS:</u>	Trisma Base
<u>P_i:</u>	Phosphat	<u>Trp53:</u>	<i>Transformation related protein 53</i>
<u>PP_i:</u>	Pyrophosphat	<u>Trp53^{+/+}:</u>	Wildtyp
<u>Prg1:</u>	<i>Proteoglycan 1</i>	<u>Trp53^{-/-}:</u>	<i>Trp53-Defizienz</i>
<u>PTH:</u>	Parathormon		
<u>Ptn:</u>	Pleiotrophin		
<u>Ptprζ:</u>	Proteintyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ zeta		
<u>Ptprz1:</u>	kodierendes Gen für Ptprζ		
<u>RA:</u>	Rheumatoide Arthritis		
<u>Rank:</u>	Receptor Activator of NFκB		
<u>Rankl:</u>	Ligand of Receptor Activator of NFκB		

7. Literaturverzeichnis

- Amling, M., H. J. Grote, M. Posl, M. Hahn and G. Delling (1994). "Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and three-dimensional morphology." *Bone Miner* 27(3): 193-208.
- Amling, M., S. Herden, M. Posl, M. Hahn, H. Ritzel and G. Delling (1996). "Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus." *J Bone Miner Res* 11(1): 36-45.
- Amling, M., M. Werner, M. Posl, H. Ritzel, H. Welkerling, J. V. Wening, R. Maas, K. Winkler, U. Heise and G. Delling (1996). "[Solitary bone cysts. Morphologic variation, site, incidence and differential diagnosis]." *Pathologe* 17(1): 63-7.
- Arai, F., T. Miyamoto, O. Ohneda, T. Inada, T. Sudo, K. Brasel, T. Miyata, D. M. Anderson and T. Suda (1999). "Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors." *J Exp Med* 190(12): 1741-54.
- Arends, J. W. (2000). "Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma." *J Pathol* 190(4): 412-6.
- Aubin, J. E. and K. Turksen (1996). "Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage." *Microsc Res Tech* 33(2): 128-40.
- Baran, D. (2001). "Osteoporosis. Efficacy and safety of a bisphosphonate dosed once weekly." *Geriatrics* 56(3): 28-32.
- Bartl, R. (2004). "[Update 2004. Osteoporosis--management--current status]." *Krankenpfl J* 42(7-10): 232.
- Beighton, P. (1988). "Sclerosteosis." *J Med Genet* 25(3): 200-3.
- Beighton, P., L. Durr and H. Hamersma (1976). "The clinical features of sclerosteosis. A review of the manifestations in twenty-five affected individuals." *Ann Intern Med* 84(4): 393-7.
- Bielack, S. S., B. Kempf-Bielack, G. Delling, G. U. Exner, S. Flege, K. Helmke, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik, M. Werner, W. Winkelmann, A. Zoubek, H. Jurgens and K. Winkler (2002). "Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols." *J Clin Oncol* 20(3): 776-90.
- Blair, H. C., P. H. Schlesinger, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (1993). "Recent advances toward understanding osteoclast physiology." *Clin Orthop Relat Res*(294): 7-22.

- Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* 423(6937): 337-42.
- Burgess, T. L., Y. Qian, S. Kaufman, B. D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W. J. Boyle, C. R. Dunstan, S. Hu and D. L. Lacey (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts." *J Cell Biol* 145(3): 527-38.
- Canalis, E. (2010). "New Treatment Modalities in Osteoporosis." *Endocr Pract*: 1-23.
- Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp and R. C. Millikan (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." *JAMA* 295(21): 2492-502.
- Cleiren, E., O. Benichou, E. Van Hul, J. Gram, J. Bollerslev, F. R. Singer, K. Beaverson, A. Aledo, M. P. Whyte, T. Yoneyama, M. C. deVernejoul and W. Van Hul (2001). "Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CICN7 chloride channel gene." *Hum Mol Genet* 10(25): 2861-7.
- Cohen, M. M., Jr. (2006). "The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates." *Am J Med Genet A* 140(23): 2646-706.
- Collette, N. M., D. C. Genetos, D. Muruges, R. M. Harland and G. G. Loots (2010). "Genetic evidence that SOST inhibits WNT signaling in the limb." *Dev Biol* 342(2): 169-79.
- de Vernejoul, M. C. (2008). "Sclerosing bone disorders." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(1): 71-83.
- de Vernejoul, M. C. and U. Kornak (2010). "Heritable sclerosing bone disorders: presentation and new molecular mechanisms." *Ann N Y Acad Sci* 1192(1): 269-77.
- Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel and A. Bradley (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* 356(6366): 215-21.
- Enders, G. H. (2009). "Wnt therapy for bone loss: golden goose or Trojan horse?" *J Clin Invest* 119(4): 758-60.
- Fedde, K. N., L. Blair, J. Silverstein, S. P. Coburn, L. M. Ryan, R. S. Weinstein, K. Waymire, S. Narisawa, J. L. Millan, G. R. MacGregor and M. P. Whyte (1999). "Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia." *J Bone Miner Res* 14(12): 2015-26.
- Federman, N., N. Bernthal, F. C. Eilber and W. D. Tap (2009). "The multidisciplinary management of osteosarcoma." *Curr Treat Options Oncol* 10(1-2): 82-93.

- Feng, J. Q., L. M. Ward, S. Liu, Y. Lu, Y. Xie, B. Yuan, X. Yu, F. Rauch, S. I. Davis, S. Zhang, H. Rios, M. K. Drezner, L. D. Quarles, L. F. Bonewald and K. E. White (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." *Nat Genet* 38(11): 1310-5.
- Franz-Odendaal, T. A., B. K. Hall and P. E. Witten (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." *Dev Dyn* 235(1): 176-90.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." *J Cell Biol* 124(4): 619-26.
- Fujino, T., H. Asaba, M. J. Kang, Y. Ikeda, H. Sone, S. Takada, D. H. Kim, R. X. Ioka, M. Ono, H. Tomoyori, M. Okubo, T. Murase, A. Kamataki, J. Yamamoto, K. Magoori, S. Takahashi, Y. Miyamoto, H. Oishi, M. Nose, M. Okazaki, S. Usui, K. Imaizumi, M. Yanagisawa, J. Sakai and T. T. Yamamoto (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 229-34.
- Genant, H. K., K. Engelke, D. A. Hanley, J. P. Brown, M. Omizo, H. G. Bone, A. J. Kivitz, T. Fuerst, H. Wang, M. Austin and C. Libanati (2010). "Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density." *Bone* 47(1): 131-9.
- Gerritsen, E. J., J. M. Vossen, I. H. van Loo, J. Hermans, M. H. Helfrich, C. Griscelli and A. Fischer (1994). "Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course." *Pediatrics* 93(2): 247-53.
- Gong, Y., R. B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A. M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F. H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W. N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J. A. Batch, P. Beighton, G. C. Black, R. G. Boles, L. M. Boon, C. Borrone, H. G. Brunner, G. F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M. L. Halfhide, B. Hall, R. C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Juppner, C. A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T. Letteboer, L. Peltonen, R. S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M. J. van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B. R. Olsen and M. L. Warman (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." *Cell* 107(4): 513-23.
- Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* 281(32): 22429-33.
- Gurley, K. A., H. Chen, C. Guenther, E. T. Nguyen, R. B. Rountree, M. Schoor and D. M. Kingsley (2006). "Mineral formation in joints caused by complete or joint-specific loss of ANK function." *J Bone Miner Res* 21(8): 1238-47.

- Hansen, M. F., M. J. Nellisery and P. Bhatia (1999). "Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease." *J Bone Miner Res* 14 Suppl 2: 39-44.
- Harmey, D., L. Hessle, S. Narisawa, K. A. Johnson, R. Terkeltaub and J. L. Millan (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." *Am J Pathol* 164(4): 1199-209.
- Harris, S. T. (2001). "Bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis: clinical studies of etidronate and alendronate." *Osteoporos Int* 12 Suppl 3: S11-6.
- Harvey, M., M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel, A. Bradley and L. A. Donehower (1993). "Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice." *Nat Genet* 5(3): 225-9.
- Hessle, L., K. A. Johnson, H. C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. W. Goding, R. Terkeltaub and J. L. Millan (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9445-9.
- Ho, A. M., M. D. Johnson and D. M. Kingsley (2000). "Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis." *Science* 289(5477): 265-70.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* 253(5015): 49-53.
- Holmen, S. L., T. A. Giambernardi, C. R. Zylstra, B. D. Buckner-Berghuis, J. H. Resau, J. F. Hess, V. Glatt, M. L. Bouxsein, M. Ai, M. L. Warman and B. O. Williams (2004). "Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both *Lrp5* and *Lrp6*." *J Bone Miner Res* 19(12): 2033-40.
- Horiba, M., K. Kadomatsu, E. Nakamura, H. Muramatsu, S. Ikematsu, S. Sakuma, K. Hayashi, Y. Yuzawa, S. Matsuo, M. Kuzuya, T. Kaname, M. Hirai, H. Saito and T. Muramatsu (2000). "Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice." *J Clin Invest* 105(4): 489-95.
- Ikematsu, S., A. Yano, K. Aridome, M. Kikuchi, H. Kumai, H. Nagano, K. Okamoto, M. Oda, S. Sakuma, T. Aikou, H. Muramatsu, K. Kadomatsu and T. Muramatsu (2000). "Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas." *Br J Cancer* 83(6): 701-6.
- Imai, S., M. Kaksonen, E. Raulo, T. Kinnunen, C. Fages, X. Meng, M. Lakso and H. Rauvala (1998). "Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)." *J Cell Biol* 143(4): 1113-28.

- Jacks, T., L. Remington, B. O. Williams, E. M. Schmitt, S. Halachmi, R. T. Bronson and R. A. Weinberg (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* 4(1): 1-7.
- Johnson, K. A., L. Hessle, S. Vaingankar, C. Wennberg, S. Mauro, S. Narisawa, J. W. Goding, K. Sano, J. L. Millan and R. Terkeltaub (2000). "Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(4): R1365-77.
- Kadomatsu, K. and T. Muramatsu (2004). "Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer." *Cancer Lett* 204(2): 127-43.
- Kadomatsu, K., M. Tomomura and T. Muramatsu (1988). "cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 151(3): 1312-8.
- Kaneda, N., A. H. Talukder, M. Ishihara, S. Hara, K. Yoshida and T. Muramatsu (1996). "Structural characteristics of heparin-line domain required for interaction of midkine with embryonic neurons." *Biochem Biophys Res Commun* 220(1): 108-12.
- Karsenty, G. (1999). "The genetic transformation of bone biology." *Genes Dev* 13(23): 3037-51.
- Karsenty, G. (2003). "The complexities of skeletal biology." *Nature* 423(6937): 316-8.
- Kaste, S. C., C. B. Pratt, A. M. Cain, D. J. Jones-Wallace and B. N. Rao (1999). "Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features." *Cancer* 86(8): 1602-8.
- Kato, M., M. S. Patel, R. Levasseur, I. Lobov, B. H. Chang, D. A. Glass, 2nd, C. Hartmann, L. Li, T. H. Hwang, C. F. Brayton, R. A. Lang, G. Karsenty and L. Chan (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." *J Cell Biol* 157(2): 303-14.
- Kavanaugh, M. P. and D. Kabat (1996). "Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family." *Kidney Int* 49(4): 959-63.
- Kirsch, T., H. J. Kim and J. A. Winkles (2009). "Progressive ankylosis gene (ank) regulates osteoblast differentiation." *Cells Tissues Organs* 189(1-4): 158-62.
- Kojima, T., A. Katsumi, T. Yamazaki, T. Muramatsu, T. Nagasaka, K. Ohsumi and H. Saito (1996). "Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor." *J Biol Chem* 271(10): 5914-20.
- Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L.

- Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle and J. M. Penninger (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." *Nature* 397(6717): 315-23.
- Krishnan, V., H. U. Bryant and O. A. Macdougald (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *J Clin Invest* 116(5): 1202-9.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* 93(2): 165-76.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." *Nature* 358(6381): 15-6.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* 278(5701): 261-3.
- Lehmann, W., T. Schinke, A. F. Schilling, P. Catala-Lehnen, M. Gebauer, P. Pogoda, L. C. Gerstenfeld, J. M. Rueger, T. A. Einhorn and M. Amling (2004). "Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo." *Bone* 35(6): 1247-55.
- Levy, J. B., P. D. Canoll, O. Silvennoinen, G. Barnea, B. Morse, A. M. Honegger, J. T. Huang, L. A. Cannizzaro, S. H. Park, T. Druck and et al. (1993). "The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system." *J Biol Chem* 268(14): 10573-81.
- Lewiecki, E. M. (2010). "Denosumab--an emerging treatment for postmenopausal osteoporosis." *Expert Opin Biol Ther* 10(3): 467-76.
- Li, G., J. R. Bunn, M. T. Mushipe, Q. He and X. Chen (2005). "Effects of pleiotrophin (PTN) over-expression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair." *Calcif Tissue Int* 76(4): 299-306.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris and D. Wu (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." *J Biol Chem* 280(20): 19883-7.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* 17(1): 43-52.
- Lorenz-Depiereux, B., M. Bastepe, A. Benet-Pages, M. Amyere, J. Wagenstaller, U. Muller-Barth, K. Badenhop, S. M. Kaiser, R. S. Rittmaster, A. H. Shlossberg, J. L. Olivares, C. Loris, F. J. Ramos, F. Glorieux, M. Vikkula, H. Juppner and T. M. Strom (2006). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nat Genet* 38(11): 1248-50.

- Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, T. Kimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu and M. Noda (1999). "A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta." *J Biol Chem* 274(18): 12474-9.
- Maehara, H., T. Kaname, K. Yanagi, H. Hanzawa, I. Owan, T. Kinjou, K. Kadomatsu, S. Ikematsu, T. Iwamasa, F. Kanaya and K. Naritomi (2007). "Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma." *Biochem Biophys Res Commun* 358(3): 757-62.
- Manolagas, S. C. (2006). "Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling." *BoneKEy-Osteovision* 3: 5-14.
- Maruyama, K., H. Muramatsu, N. Ishiguro and T. Muramatsu (2004). "Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 50(5): 1420-9.
- Masuda, H., A. Tsujimura, M. Yoshioka, Y. Arai, Y. Kuboki, T. Mukai, T. Nakamura, H. Tsuji, M. Nakagawa and T. Hashimoto-Gotoh (1997). "Bone mass loss due to estrogen deficiency is compensated in transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1." *Biochem Biophys Res Commun* 238(2): 528-33.
- Matsumoto, K., A. Wanaka, T. Mori, A. Taguchi, N. Ishii, H. Muramatsu, T. Muramatsu and M. Tohyama (1994). "Localization of pleiotrophin and midkine in the postnatal developing cerebellum." *Neurosci Lett* 178(2): 216-20.
- Meng, K., A. Rodriguez-Pena, T. Dimitrov, W. Chen, M. Yamin, M. Noda and T. F. Deuel (2000). "Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2603-8.
- Meunier, P. J., C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J. E. Badurski, T. D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E. M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H. K. Genant and J. Y. Reginster (2004). "The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis." *N Engl J Med* 350(5): 459-68.
- Meyers, P. A., G. Heller, J. H. Healey, A. Huvos, A. Applewhite, M. Sun and M. LaQuaglia (1993). "Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation." *J Clin Oncol* 11(3): 449-53.
- Michikawa, M., R. Y. Xu, H. Muramatsu, T. Muramatsu and S. U. Kim (1993). "Midkine is a mediator of retinoic acid induced neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 192(3): 1312-8.
- Millan, J. L., S. Narisawa, I. Lemire, T. P. Loisel, G. Boileau, P. Leonard, S. Gramatikova, R. Terkeltaub, N. P. Camacho, M. D. McKee, P. Crine and M. P. Whyte (2008). "Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia." *J Bone Miner Res* 23(6): 777-87.

- Mitsiadis, T. A., M. Salmivirta, T. Muramatsu, H. Muramatsu, H. Rauvala, E. Lehtonen, M. Jalkanen and I. Thesleff (1995). "Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis." *Development* 121(1): 37-51.
- Miyakoshi, N. (2004). "Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis." *Curr Pharm Des* 10(21): 2615-27.
- Molenaar, M., M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree and H. Clevers (1996). "XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos." *Cell* 86(3): 391-9.
- Muramatsu, H. and T. Muramatsu (1991). "Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors." *Biochem Biophys Res Commun* 177(2): 652-8.
- Muramatsu, H., H. Shirahama, S. Yonezawa, H. Maruta and T. Muramatsu (1993). "Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution." *Dev Biol* 159(2): 392-402.
- Muramatsu, H., K. Zou, N. Sakaguchi, S. Ikematsu, S. Sakuma and T. Muramatsu (2000). "LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 936-41.
- Muramatsu, T. (2002). "Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis." *J Biochem* 132(3): 359-71.
- Murray, R. D. and S. M. Shalet (2000). "Growth hormone: current and future therapeutic applications." *Expert Opin Pharmacother* 1(5): 975-90.
- Nakamura, E., K. Kadomatsu, S. Yuasa, H. Muramatsu, T. Mamiya, T. Nabeshima, Q. W. Fan, K. Ishiguro, T. Igakura, S. Matsubara, T. Kaname, M. Horiba, H. Saito and T. Muramatsu (1998). "Disruption of the midkine gene (*Mdk*) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour." *Genes Cells* 3(12): 811-22.
- Nakashima, K. and B. de Crombrughe (2003). "Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation." *Trends Genet* 19(8): 458-66.
- Neunaber, C., P. Catala-Lehnen, F. T. Beil, R. P. Marshall, V. Kanbach, A. Baranowsky, W. Lehmann, T. Streichert, A. Ignatius, T. Muramatsu, T. Schinke and M. Amling (2010). "Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine." *J Bone Miner Res* 25(8): 1724-35.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* 194(4260): 23-8.

- O'Brien, T., D. Cranston, S. Fuggle, R. Bicknell and A. L. Harris (1996). "The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers." *Cancer Res* 56(11): 2515-8.
- O'Day, K. and R. Gorlick (2009). "Novel therapeutic agents for osteosarcoma." *Expert Rev Anticancer Ther* 9(4): 511-23.
- Oberender, P. O. and D. A. Fritschi (2003). "Versorgungsmängel bei einer relevanten Frauenkrankheit." *Dtsch Arztebl* 100 A 1728–1731 [Heft 25].
- Ohta, S., H. Muramatsu, T. Senda, K. Zou, H. Iwata and T. Muramatsu (1999). "Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis." *J Bone Miner Res* 14(7): 1132-44.
- Okawa, A., I. Nakamura, S. Goto, H. Moriya, Y. Nakamura and S. Ikegawa (1998). "Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine." *Nat Genet* 19(3): 271-3.
- Pendleton, A., M. D. Johnson, A. Hughes, K. A. Gurley, A. M. Ho, M. Doherty, J. Dixey, P. Gillet, D. Loeuille, R. McGrath, A. Reginato, R. Shiang, G. Wright, P. Netter, C. Williams and D. M. Kingsley (2002). "Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis." *Am J Hum Genet* 71(4): 933-40.
- Qi, M., S. Ikematsu, N. Maeda, K. Ichihara-Tanaka, S. Sakuma, M. Noda, T. Muramatsu and K. Kadomatsu (2001). "Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* 276(19): 15868-75.
- Qin, C., R. D'Souza and J. Q. Feng (2007). "Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis." *J Dent Res* 86(12): 1134-41.
- Rauvala, H. (1989). "An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors." *EMBO J* 8(10): 2933-41.
- Riggs, B. L., S. Khosla and L. J. Melton, 3rd (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." *Endocr Rev* 23(3): 279-302.
- Rios, H. F., L. Ye, V. Dusevich, D. Eick, L. F. Bonewald and J. Q. Feng (2005). "DMP1 is essential for osteocyte formation and function." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5(4): 325-7.
- Rocheffort, G. Y., S. Pallu and C. L. Benhamou (2010). "Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue." *Osteoporos Int* 21(9): 1457-69.
- Roodman, G. D. and J. J. Windle (2005). "Paget disease of bone." *J Clin Invest* 115(2): 200-8.

- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg, M. L. Stefanick, R. D. Jackson, S. A. Beresford, B. V. Howard, K. C. Johnson, J. M. Kotchen and J. Ockene (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* 288(3): 321-33.
- Rutsch, F., P. Boyer, Y. Nitschke, N. Ruf, B. Lorenz-Depierieux, T. Wittkamp, G. Weissen-Plenz, R. J. Fischer, Z. Mughal, J. W. Gregory, J. H. Davies, C. Loirat, T. M. Strom, D. Schnabel, P. Nurnberg and R. Terkeltaub (2008). "Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy." *Circ Cardiovasc Genet* 1(2): 133-40.
- Sakai, A., T. Sakata, S. Tanaka, R. Okazaki, N. Kunugita, T. Norimura and T. Nakamura (2002). "Disruption of the p53 gene results in preserved trabecular bone mass and bone formation after mechanical unloading." *J Bone Miner Res* 17(1): 119-27.
- Satoh, J., H. Muramatsu, G. Moretto, T. Muramatsu, H. J. Chang, S. T. Kim, J. M. Cho and S. U. Kim (1993). "Midkine that promotes survival of fetal human neurons is produced by fetal human astrocytes in culture." *Brain Res Dev Brain Res* 75(2): 201-5.
- Schinke, T., M. Gebauer, A. F. Schilling, S. Lamprianou, M. Priemel, C. Mueledner, C. Neunaber, T. Streichert, A. Ignatius, S. Harroch and M. Amling (2008). "The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice." *Bone* 42(3): 524-34.
- Seeman, E. (1995). "The dilemma of osteoporosis in men." *Am J Med* 98(2A): 76S-88S.
- Seeman, E. and P. D. Delmas (2001). "Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone." *Trends Endocrinol Metab* 12(7): 281-3.
- Semenov, M., K. Tamai and X. He (2005). "SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor." *J Biol Chem* 280(29): 26770-5.
- Shibata, Y., T. Muramatsu, M. Hirai, T. Inui, T. Kimura, H. Saito, L. M. McCormick, G. Bu and K. Kadomatsu (2002). "Nuclear targeting by the growth factor midkine." *Mol Cell Biol* 22(19): 6788-96.
- Sly, W. S., D. Hewett-Emmett, M. P. Whyte, Y. S. Yu and R. E. Tashian (1983). "Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(9): 2752-6.
- Stein, S. A., C. Witkop, S. Hill, M. D. Fallon, L. Viernstein, G. Gucer, P. McKeever, D. Long, J. Altman, N. R. Miller, S. L. Teitelbaum and S. Schlesinger (1983). "Sclerosteosis: neurogenetic and pathophysiologic analysis of an American kinship." *Neurology* 33(3): 267-77.

- Stoica, G. E., A. Kuo, C. Powers, E. T. Bowden, E. B. Sale, A. T. Riegel and A. Wellstein (2002). "Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types." *J Biol Chem* 277(39): 35990-8.
- Sun, X. Z., M. Inouye, Y. Fukui, S. Hisano, K. Sawada, H. Muramatsu and T. Muramatsu (1997). "An immunohistochemical study of radial glial cells in the mouse brain prenatally exposed to gamma-irradiation." *J Neuropathol Exp Neurol* 56(12): 1339-48.
- Takada, T., K. Toriyama, H. Muramatsu, X. J. Song, S. Torii and T. Muramatsu (1997). "Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis." *J Biochem* 122(2): 453-8.
- Tare, R. S., R. O. Oreffo, K. Sato, H. Rauvala, N. M. Clarke and H. I. Roach (2002). "Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development." *Biochem Biophys Res Commun* 298(3): 324-32.
- Teplyuk, N. M., L. M. Haupt, L. Ling, C. Dombrowski, F. K. Mun, S. S. Nathan, J. B. Lian, J. L. Stein, G. S. Stein, S. M. Cool and A. J. van Wijnen (2009). "The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts." *J Cell Biochem* 107(1): 144-54.
- Tomomura, M., K. Kadomatsu, S. Matsubara and T. Muramatsu (1990). "A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product." *J Biol Chem* 265(18): 10765-70.
- Tonks, N. K. (2005). "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling." *Cell* 121(5): 667-70.
- Tsutsui, J., K. Kadomatsu, S. Matsubara, A. Nakagawara, M. Hamanoue, S. Takao, H. Shimazu, Y. Ohi and T. Muramatsu (1993). "A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas." *Cancer Res* 53(6): 1281-5.
- Virkki, L. V., J. Biber, H. Murer and I. C. Forster (2007). "Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families." *Am J Physiol Renal Physiol* 293(3): F643-54.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* 9(4): 138-41.
- Vondracek, S. F. (2010). "Managing osteoporosis in postmenopausal women." *Am J Health Syst Pharm* 67(7 Suppl 3): S9-19.
- Vrotsos, Y., S. C. Miller and S. C. Marks, Jr. (2003). "Prostaglandin E--a powerful anabolic agent for generalized or site-specific bone formation." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13(2-4): 255-63.

- Walgenbach-Brunagel, G., B. Burger, E. S. Leman, K. J. Walgenbach, R. Tolba, L. Heukamp, A. Hirner and R. H. Getzenberg (2008). "The use of a colon cancer associated nuclear antigen CCSA-2 for the blood based detection of colon cancer." *J Cell Biochem* 104(1): 286-94.
- Walsh, S., G. R. Jordan, C. Jefferiss, K. Stewart and J. N. Beresford (2001). "High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis." *Rheumatology (Oxford)* 40(1): 74-83.
- Wang, X., H. Y. Kua, Y. Hu, K. Guo, Q. Zeng, Q. Wu, H. H. Ng, G. Karsenty, B. de Crombrughe, J. Yeh and B. Li (2006). "p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling." *J Cell Biol* 172(1): 115-25.
- Watanabe, H., M. Goseki-Sone, H. Orimo, R. Hamatani, H. Takinami and I. Ishikawa (2002). "Function of mutant (G1144A) tissue-nonspecific ALP gene from hypophosphatasia." *J Bone Miner Res* 17(11): 1945-8.
- WHO, s. g. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843. Geneva: WHO.
- Wolff, A. E., A. N. Jones and K. E. Hansen (2008). "Vitamin D and musculoskeletal health." *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(11): 580-8.
- Wunder, J. S., N. Gokgoz, R. Parkes, S. B. Bull, S. Eskandarian, A. M. Davis, C. P. Beauchamp, E. U. Conrad, R. J. Grimer, J. H. Healey, D. Malkin, D. C. Mangham, M. J. Rock, R. S. Bell and I. L. Andrulis (2005). "TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study." *J Clin Oncol* 23(7): 1483-90.
- Yavropoulou, M. P. and J. G. Yovos (2007). "The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation." *Hormones (Athens)* 6(4): 279-94.
- Yokota, C., S. Takahashi, A. Eisaki, M. Asashima, S. Akhter, T. Muramatsu and K. Kadomatsu (1998). "Midkine counteracts the activin signal in mesoderm induction and promotes neural formation." *J Biochem* 123(2): 339-46.
- Zeng, L., F. Fagotto, T. Zhang, W. Hsu, T. J. Vasicek, W. L. Perry, 3rd, J. J. Lee, S. M. Tilghman, B. M. Gumbiner and F. Costantini (1997). "The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." *Cell* 90(1): 181-92.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit anzufertigen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling für die Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise zu dieser Arbeit an dem Institut für Osteologie und Biomechanik im Universitätskrankenhaus Eppendorf.

Für die hilfreiche Beratung und alltägliche Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. rer. nat. Thorsten Schinke.

Einen herzlichen Dank an Frau Dr. Claudia Neunaber für den kompetenten Beistand bei meinem Start in die Laborarbeit, ebenso an Frau Dietzmann und Frau Winter für ihre Hilfe. Mein Dank gilt auch Susanne, die sich stets um das Wohl der Tiere in der Tierhaltung gekümmert hat.

Ein großer Dank gilt auch meiner Freundin, die mich nicht nur psychisch, sondern auch durch ihre exzellenten Word-Kenntnisse unterstützt hat.

Ebenso danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

9. Lebenslauf

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:

