

Aus dem
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Osteologie und Biomechanik
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

Lipide und Knochen

Untersuchungen zur Funktion der Hepatischen Lipase und Lrp1 (LDL-Receptor-related protein-1) im Knochenstoffwechsel

Dissertation

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

Tayfun Yilmaz
aus Hamburg

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 07.03.2012

Veröffentlicht mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss Vorsitzender: Prof. Dr. M. Amling

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

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. T. Beil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Skelett	1
1.2	Knochenzellen	1
1.3	Zusammenhänge zwischen dem Knochen- und Fettstoffwechsel.....	3
1.4	Lipoproteine im Osteoblasten	4
1.5	Die Lrp-Genfamilie und der Einfluss auf den Knochenstoffwechsel	6
1.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	7
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Material	9
2.1.1	Geräte und Laborbedarf	9
2.1.2	Chemikalien und Enzyme.....	9
2.1.3	Puffer und Lösungen	10
2.1.4	Primer	12
2.1.5	Tiere	12
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1.1	Isolierung von RNA	12
2.2.1.2	RT-PCR (cDNA-Synthese).....	13
2.2.2	Zellkulturen primärer Osteoblasten	14
2.2.2.1	Isolation primärer Osteoblasten	14
2.2.2.2	Proliferation und Differenzierung primärer Osteoblasten	14
2.2.2.3	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität und der Protein-Konzentration in primären Osteoblasten.....	14
2.2.2.4	Von Kossa-Färbung primärer Osteoblasten.....	15
2.2.3	Serum- und Urinanalysen.....	15
2.2.3.1	Serum- und Uringewinnung	15
2.2.3.2	Bestimmung von Osteocalcin im Serum	15
2.2.3.3	Bestimmung von Kreatinin und DPD im Urin	16
2.2.4	Histologie und Morphologie	16
2.2.4.1	Skelett-Präparation	16
2.2.4.2	Kontaktradiographie	17
2.2.4.3	Acrylat-Histologie	17
2.2.4.4	von Kossa/van Gieson-Färbung.....	17
2.2.4.5	Toluidinblau-Färbung	18
2.2.4.6	Calceinmarkierung	18
2.2.4.7	TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)-Färbung	18
2.2.4.8	Histomorphometrie.....	18
3	Ergebnisse.....	20
3.1	Expression der Hepatischen Lipase im Osteoblasten	20
3.2	Die Deletion des <i>Lip</i> c-Gens führt zu erhöhter Knochenmasse	21
3.3	Verstärkte Mineralisierung der <i>Lip</i> c-defizienten Osteoblasten in Zellkultur	25
3.4	Deletion des <i>Lrp</i> 1-Gens unter dem <i>Runx</i> 2-Promotor führt zu Osteopenie	26
3.5	Die Osteoblasten-spezifische Lrp1-Inaktivierung führt zum Tumorwachstum an der Tibia.....	31

4	Diskussion	34
4.1	Die Hepatische Lipase wird auch im Osteoblasten gebildet und inhibiert die Knochenformation	34
4.2	LDL-receptor-related-protein 1 ist ein Inhibitor der Knochenresorption.....	36
4.3	Lrp1 als zentrales Gen bei der Entstehung von Osteochondromen	38
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	43
7	Danksagung	50
8	Curriculum Vitae	51

1 Einleitung

1.1 Das Skelett

Der Knochen ist ein spezialisiertes Gewebe, das durch Kalziumphosphateinlagerung in Form von Hydroxylapatit gehärtet ist. Mit seiner Robustheit nimmt er eine Schutzfunktion sensibler Organe, wie die des Rückenmarks oder auch des Gehirns ein. Das Skelett mit seinen Gelenken bildet die Grundvoraussetzung für die Beweglichkeit. Schließlich ist der Knochen das robuste Gewebe, welches nach dem Tod Jahrhunderte überstehen kann. Umso erstaunlicher ist es zu sehen, dass der makroskopisch statisch wirkende Knochen auf zellulärer Ebene sehr dynamisch ist. So wird in 10 Jahren soviel Knochenmasse umgesetzt, dass es dem Volumen des gesamten Skeletts entspricht ^(Cohen Jr., 2006). Die ständige Knochenresorption und Knochenformation, auch „Remodelling“ genannt, erlaubt dem Knochen nach Frakturen wieder zu heilen oder sich den ständig ändernden Belastungen anzupassen. Im Kindesalter überwiegt dabei die Knochenformation, im jungen Erwachsenenalter ist die Knochenresorption und Knochenformation in der Regel ausgeglichen. Im hohen Alter verschiebt sich das Gleichgewicht meist zugunsten der Resorption ^(Datta et al., 2008).

Neben der Stütz- und Schutzfunktion hat das Skelett eine wichtige Aufgabe als größter Kalziumspeicher des Menschen. Hier kann bei einem erhöhten Bedarf, wie im Falle einer Schwangerschaft, zusätzliches Kalzium freigesetzt werden. Zusätzlich beinhaltet das Skelett aber auch das lebenswichtige Knochenmark. Dieses ist postnatal der primäre Ort der Blutbildung. Hier werden aber auch Abwehrzellen gebildet und die Stammzellen gespeichert.

1.2 Knochenzellen

Der Knochen besteht grundsätzlich aus vier verschiedenen Zelltypen. Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Knochenbelegzellen (Abbildung 1).

Osteoblasten entstehen unter dem Einfluss verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aus mesenchymalen Stammzellen. Sie kommen ausschließlich im Knochen vor. Zwei Signalwege sind essentiell, damit aus den

Vorläuferzellen die Osteoblasten entstehen können. Das Sox9 führt dazu, dass aus den mesenchymalen Stammzellen die Osteochondroprogenitorzellen entstehen. Damit aus diesen Zellen der Prä-Osteoblast entstehen kann muss der Runx2 Promotor aktiviert werden. Runx2 aktiviert den Transkriptionsfaktor Osterix, welcher nun bewirkt, dass aus dem Prä-Osteoblasten der reife Osteoblast entsteht ^(Karsenty, 2003). Osteoblasten kommen als Zellverband auf der Knochenoberfläche vor. Sie sezernieren eine extrazelluläre Matrix, die zu 95% aus Typ-1-Kollagen besteht. Weitere Bestandteile sind das knocheneigene Osteocalcin (Bgp, bone gla protein), Bsp (bone sialoprotein) und das Osteopontin. Die frisch sezernierte Knochenmatrix, das Osteoid, ist primär nicht mineralisiert. Erst nach einer Zeit von etwa zwei Wochen lagert sich Kalziumphosphat als Hydroxylapatit ein.

Ist der Osteoblast von Knochenmatrix umschlossen, so entwickelt sich aus ihm der Osteozyt. Osteozyten stehen über Zellausläufer in Kontakt, ähnlich wie Neuronen. Es handelt sich um terminal differenzierte Osteoblasten, über die noch wenig bekannt ist, obwohl sie mehr als 90% der Knochenzellen ausmachen. Es wird vermutet, dass sie mechanische Reize, denen der Knochen ausgesetzt ist, aufnehmen und somit die Knochenformation und die Knochenresorption beeinflussen ^(Knothe Tate et al., 2004).

Osteoklasten sind die einzigen Zellen des Körpers die Knochen resorbieren können ^(Teitelbaum, 2000). Sie sind 50-100 µm große multinukleäre Zellen. Osteoklasten haben 2-10 Zellkerne und entstehen durch die Fusion mehrerer mononukleärer Vorläuferzellen der Granulozyten-Makrophagen-Linie. Der Osteoklast hat einen polaren Aufbau, mit einem apikalen (knochennahen) und einem baso-lateralen (markraumnahen) Pol. Peripher am apikalen Pol befindet sich die Verdichtungs-Zone („sealing-zone“), in welcher ein enger Kontakt zwischen Knochenmatrix und Osteoklast von nur 0,2 bis 0,5 nm besteht. Diese Zone grenzt die Howship-Resorptionslakune, in der ein saurer pH herrscht, von dem restlichen extrazellulären Raum ab. Der saure pH-Wert ist wichtig für die Aktivität einiger Enzyme die vom Osteoklasten sezerniert werden und eine Grundvoraussetzung, damit der Knochen resorbiert werden kann ^(Amling und Delling 1998). Die Knochenabbauprodukte, wie das Kalzium, werden anschließend durch den Osteoklasten hindurch in den Extrazellulärraum transportiert.

Über die Knochenbelegzellen ist wenig bekannt. Sie besiedeln den Anteil der

Knochenoberfläche, auf der keine Osteoblasten oder Osteoklasten sind. Sie sind metabolisch wenig aktiv und bilden eine Art Schutzhülle des Knochens.

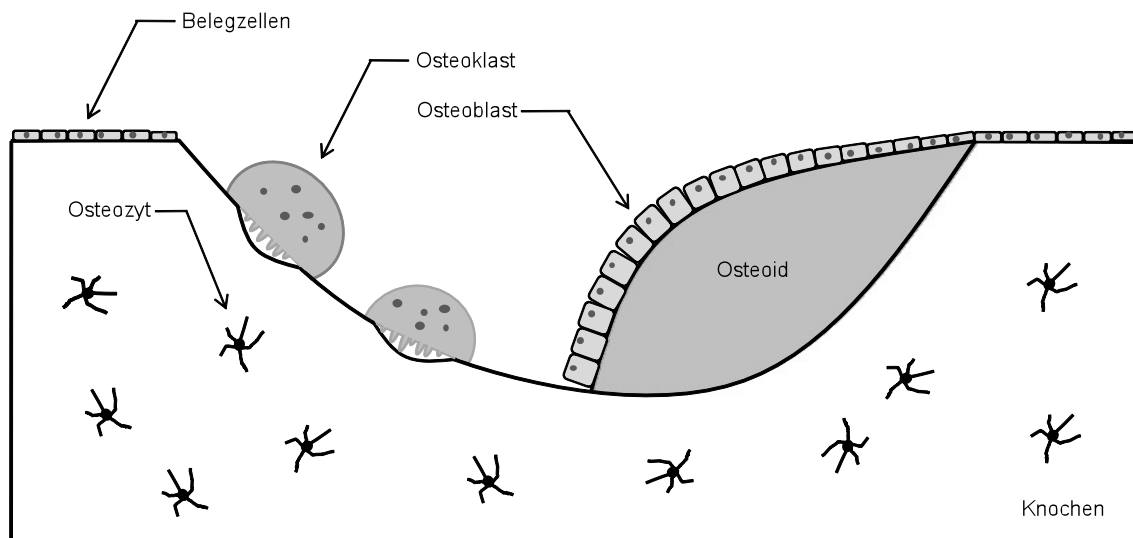


Abbildung 1 Schema des Knochenumbaus am Trabekel

Die Trabekeloberfläche, welche nicht vom Umbau betroffen ist, wird von den Belegzellen des Knochens bedeckt. Die mehrkernigen Osteoklasten schaffen durch ihre Resorptionsaktivität eine Resorptionslakune. Die Osteoblasten füllen den Knochen anschließend wieder auf, indem sie unmineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) sezernieren. Von Osteoid eingeschlossene Osteoblasten werden zu Osteozyten.

1.3 Zusammenhänge zwischen dem Knochen- und Fettstoffwechsel

Zahlreiche Studien zeigen schon seit längerer Zeit auf, dass es eine Verbindung zwischen dem Fett- und dem Knochenstoffwechsel gibt. So haben Menschen mit einem erhöhten body-mass-index (BMI) in der Regel auch eine erhöhte Knochendichte. Zudem vermindert die Adipositas das Risiko für osteoporotische Frakturen (Duque, 2008).

Leptin ist ein Proteohormon und spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Fettstoffwechsels. Dieses vor allem in Adipozyten gebildete Hormon beeinflusst nicht nur den Fettstoffwechsel, sondern hat auch einen Einfluss auf den Knochenaufbau. Leptin inhibiert über den Hypothalamus die Knochenformation. Daher könnte die Resistenz übergewichtiger Menschen gegenüber Leptin auch ein Grund für das verminderte Osteoporose-Risiko sein (Ducy und Amling et al., 2000). Zum anderen beeinflusst der Knochen auch das Fettgewebe und den Energiestoffwechsel. So kann das in den Osteoblasten

sezernierte Hormon Osteocalcin die Langerhans-Inseln zur Proliferation anregen und führt somit zu einer vermehrten Insulinsekretion. Insulin regt die Zellen an mehr Zucker und damit mehr Energie aufzunehmen. So können Osteoblasten auch die Adiponectin-Ausschüttung in den Adipozyten, welche zur Steigerung der Insulinsensitivität in diesen Zellen führt, steigern ^(Lee et al., 2007). Folglich ist der Knochen als Organsystem auch in den Fettstoffwechsel mit eingebunden.

1.4 Lipoproteine im Osteoblasten

Lipide erfüllen wichtige Aufgaben im Körper. So sind sie essentieller Bestandteil der Zellmembran, beispielsweise in Form von Phospholipiden. Zudem besitzt das Lipid eine sehr gute isolierende Eigenschaft, sei es thermisch, als Unterhautfettgewebe, oder auch mechanisch, als schützendes Fettpolster der Organe. In der Nahrung sind sie ein wichtiger Energieträger und helfen zudem bei der Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen (Vitamin A, D, E und K).

Mit der Nahrung aufgenommen, werden die Lipide im Darm resorbiert und unter anderem in Form von Chylomikronen über die Lymphe ins Blut transportiert. Durch die Übertragung von Apolipoprotein E (ApoE) und C (ApoC) durch HDL (high density lipoprotein) auf die Chylomikronen wird dessen Abbau aktiviert. Lipoproteinlipasen hydrolysieren einen Großteil der Triglyceride, welche dann vom jeweiligen Organ aufgenommen werden (Abbildung 2). Während des Abbaus entstehen aus den Chylomikronen allmählich die Chylomikronen-Reste (CR). Diese werden dann schließlich in der Leber aufgenommen und abgebaut. Wichtige Bestandteile die zur Aufnahme der CR benötigt werden, sind das Lrp1 (Low density lipoprotein related lipoprotein 1), der LDL-Rezeptor (low density lipoprotein receptor), die Hepatische Lipase, aber auch das in den Chylomikronen enthaltene ApoE ^(Lillis, et al. 2008).

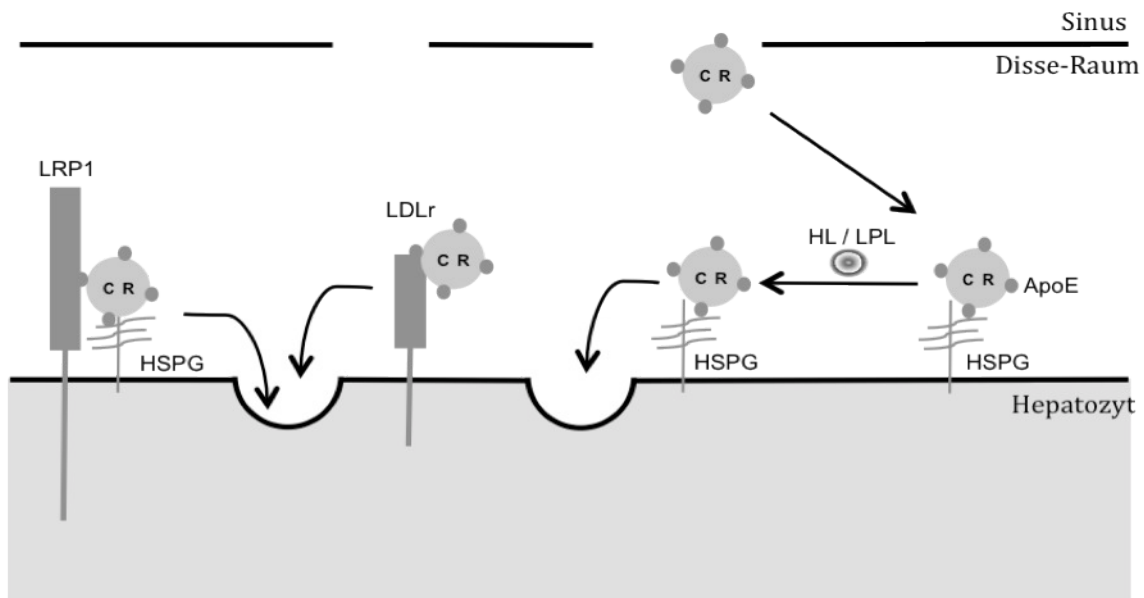


Abbildung 2 Modell zur Aufnahme der Chylomikronen-Reste in der Leber

Chylomikronen-Reste (CR) werden im Disse-Raum, dem Zwischenraum zwischen Hepatozyt und Gefäßlumen, aufgenommen. Dieses kann über verschiedene Wege erfolgen. Zum einen binden sich CR ApoE-vermittelt an Heparinsulfat-Proteoglycane (HSPG), werden dann durch die Hepatische und Lipoprotein Lipase prozessiert und anschließend durch Endozytose aufgenommen. Zum anderen besteht die Möglichkeit das CR auch Rezeptor vermittelt aufgenommen werden. Dieses kann entweder durch den Ldl-Rezeptor oder den Lrp1-Rezeptor in Kombination mit HSPG vermittelt werden. (Lillis, et al. 2008)

In vergleichenden Expressionsanalysen von Osteoblasten an Tag 5 und 25 der Differenzierung zeigte sich, dass auch Gene aus dem Fettstoffwechsel im Osteoblasten während der Mineralisierung stark induziert werden. So befindet sich das ApoE, neben dem knochenspezifischen Osteocalcin, unter den zehn am stärksten induzierten Genen (Abbildung 3), wobei über 10.000 Gene untersucht wurden. Nachfolgende Untersuchungen an Mäusen zeigten zudem, dass das ApoE eine hemmende Wirkung auf die Knochenformation hat, da ApoE-defiziente Mäuse eine erhöhte Knochenmasse aufweisen (Schilling und Schinke et al. 2005).

Die Hepatische Lipase, welche ebenfalls an der CR Aufnahme beteiligt ist, befand sich ebenfalls unter den zehn am stärksten induzierten Genen während der Mineralisierung der Osteoblasten, weshalb die Rolle dieses Gens in dieser Dissertation näher untersucht werden sollte.

Rang	Acc.No	Gen	d5	d25	log ratio
1	AI84930	Ptprz1	3,3	262,1	6,9
2	M31312	Fcgr2b	2,6	262,4	6,3
3	M34603	Prg1	3,2	81,7	5
4	X04673	Adn	6,7	280	4,9
5	L24431	Bglap	410	11568	4,7
6	AF030433	Dkk1	3,4	89,3	4,7
7	D00466	Apoe	350	7704,4	4,6
8	X58426	Lipc	3,6	86,2	4,5
9	AI837100	Cd83	1,2	63,8	4,5
10	L20232	Ibsp	107	3127	4,4

Abbildung 3 Expressionsanalyse primärer Osteoblasten an Tag 5 und 25

Aus kultivierten Osteoblasten wurde an Tag 5 und 25 der Differenzierung RNA isoliert. Diese wurde mit dem Affimetrix™ Genchip analysiert. Neben den als knochenspezifisch geltenden Genen Osteocalcin (Bglap, bone gla protein) und Bone sialoprotein (Ibsp) zeigen sich hier auch zwei Gene aus dem Fettstoffwechsel. Zum einen ist es das Apolipoprotein E (Apoe), dessen Effekt auf den Knochen bereits gezeigt wurde. Zum anderen ist es die Hepatische Lipase (Lipc).

1.5 Die Lrp-Genfamilie und der Einfluss auf den Knochenstoffwechsel

Aus der Familie der LDL-Rezeptoren spielen Lrp5 (*LDL-receptor related protein* 5) eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel. Dabei sind sie Co-Rezeptoren der *frizzled* Familie. An diesen Rezeptorkomplex können sich verschiedene Wnt-Moleküle binden ^(He et al., 2004). Über einen kanonischen, also das β -catenin beeinflussenden Signalweg kann somit die Genexpression der Osteoblasten gesteuert werden. Dabei verhindert die Aktivierung des Rezeptors die Phosphorylierung des β -catenins durch den GSK3-Axin-APC Komplex und somit dessen Abbau ^(Lindvall et al., 2007). Proteine der Dickkopf (Dkk) Familie können die Bindung des Wnt an Lrp5 verhindern und führen damit zu einer Senkung der β -catenin Konzentration im Zellkern ^(Niehrs, 2006). Lrp5 können jedoch auch über einen nicht kanonischen, β -catenin unabhängigen Signalweg die Genexpression beeinflussen ^(Williams und Insogna 2009). Somit können Lrp5 sowohl über den kanonischen, als auch den nicht-kanonischen Signalweg die Genexpression des Osteoblasten steuern und je nach Signalweg osteoanabol

oder –katabol wirken.

Humane Mutationen des LRP5-Gens können verschiedene Auswirkungen haben. So führt eine Mutation mit Funktionsverlust des *Lrp5* zum Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom, welches eine geminderte Knochenmasse aufzeigt (Gong et al., 2001). Hierbei ist eine Mutationen welche zu einem verfrühten Stop-Codon führt, häufig die Ursache für den Funktionsverlust (Semenov und He, 2006). Andere Mutationen können zu einer Aktivierung von *Lrp5* führen. Diese Menschen zeigen eine erhöhte Knochenmasse auf (Little et al., 2002) (Boyden et al., 2002) (Wesenbeeck et al., 2003).

Neben diesen beiden *Lrp*-Molekülen wird auch das *Lrp1* im Osteoblasten exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass dem *Lrp1* eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Chylomikronen-Resten (CR) zukommt. Dabei nehmen Osteoblasten mit dem *Lrp1* ApoE-vermittelt mehr CR auf als Zellen ohne *Lrp1* (Niemeier et al., 2005).

Das *Lrp1* hat eine vielseitige Bindungsstelle, an die unter anderem auch das ApoE bindet. Zudem hat dieser Rezeptor wichtige Aufgaben im menschlichen Organismus. Er hat eine protektive Wirkung gegen die Arteriosklerose, zudem spielt dieser auch bei der Regulierung der Blut-Hirn-Schranke und bei der Invasivität von Brustkrebszellen eine Rolle. Die Funktion des *Lrp1* in den Neuronen ist noch nicht ganz geklärt. Es wird vermutet, dass dieser Rezeptor eine Rolle in der Progression der Alzheimer-Krankheit spielen könnte. Die zahlreichen Liganden und die Fähigkeit, sowohl eine Endozytose des Liganden, als auch ein intrazelluläres Signal zu vermitteln, macht die Funktion des *Lrp1* so vielseitig (Lillis et al., 2008).

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Erkrankungen des Knochens, wie die Osteoporose treten immer häufiger in den Vordergrund. Umso wichtiger ist es den Knochenstoffwechsel zu verstehen, um eine adäquate Therapie dieser Erkrankungen durchführen zu können.

Wie in der Einleitung beschrieben scheinen auch vermehrt Proteine, denen wichtige Aufgaben im Fettstoffwechsel zukommen, eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel einzunehmen. Für das Apolipoprotein E konnte bereits ein hemmender Effekt auf den Knochenaufbau gezeigt werden.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit sollte untersucht werden, welchen Effekt die

Hepatische Lipase auf den Knochenstoffwechsel hat.

Als weiteres Protein, welches im Fokus dieser Arbeit stand, ist das Lrp1 zu nennen, welches auch im Osteoblasten exprimiert wird. Hier galt es zu klären, ob eine Osteoblasten-spezifische Deletion von Lrp1 den Knochenstoffwechsel beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Brutschrank	Hereaus BBD 6220	
ELISA-Reader	Molecular Devices VERSAmax	tuneable microplate reader
Gefrierschrank	Liebherr Comfort	
Kontakt Röntgenapparat	Faxitron X-Ray Corp. Cabinet X-Ray System	
Kühlschranke	Liebherr Profiline	
Mikroskope	Zeiss Axiovert 25	
	Zeiss Axioskop mit AxioCam	
PCR-Cycler	iCycler, Biorad (München)	
Photometer	Ultraspec2100pro	UV/visible Spectrophotometer
Röntgenfilme	AGFA	
Rotationsmikrotom	CUT 4060/E Microtec (München)	
Schüttler	IKA KS 260 basic	
Sterilbank	BDK	
Thermocycler	BioRAD iCycler	
Turrax	IKA-Werke Ultra-TURRAX T25 Basic	
Wasserbad	GFL	
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 D	
	Kendro Megafuge 1.0R	

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit es nicht anders aufgeführt wird, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Gibco (Karlsruhe), BioRad (München) und Carl-Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Enzyme stammen von der Firma Roche (Mannheim).

2.1.3 Puffer und Lösungen

10x DNA-Gel-Ladepuffer	50% Glycerin 0,1% Xylencyanol 0,1% Bromphenolblau in TE
Calcein-Lösung	0,15M NaCl 2% NaHCO ₃ 1% Calcein [w/v]
Differenzierungsmedium	Alpha-MEM FBS 50 µg/ml L-Ascorbat 10mM β-Glycerophosphat steril filtriert
Gelatinelösung	0,5 g Gelatine in 50 ml dest. Wasser (< 60°C) lösen, 2 ml Chromalaunlösung zugeben
Infiltrationslösung I	1000 ml Methylmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet
Infiltrationslösung II	1000 ml Methylmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet 100 ml LPG (Nonyl-Phenol, SIGMA-ALDRICH #74430)
ProteinaseK	10 mg/ml, -20°C

TRAP Lösung	5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 µl N,N Dimethylformamid lösen und mit 50 ml TRAP-Puffer mischen; 30 mg Fast Red Violet LB Salt darin lösen und sofort für die Färbung verwenden
TRAP Puffer	40 mM Azetat 10 mM Natriumtartrat, pH 5,0, bei 4°C aufbewahren
Toluidinlösung	1 g Toluidinblau O 100 ml dest. Wasser pH 4,5
Van Gieson	2,5 g Säurefuchsin (MERCK #105231) 900 ml gesättigte Pikrinsäure (SIGMA- A. #80456) 100 ml Glycerin 5 ml konz. Salpetersäure
Von Kossa	3 g Silbernitrat (MERCK #1.01512.0100) auf 100 ml dest. Wasser
Zellkulturmedium	Alpha-MEM FBS 1%ig Penecillin/Streptomycin
Verdaulösung (steril filtriert)	100 mg Kollagenase Typ Ia (SIGMA #C-984) 200 mg Dispase (grade II) (B-M)

100 ml alpha-MEM + Pen/Strep 1%

2.1.4 Primer

Die in der RT-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MEG GmbH bezogen.

Lipc-Hin-Primer: 5'-GAA GCC TTG GAG CTA AAG C-3'

Lipc-Rück-Primer: 5'-CCA GTT TTC TAG CAA GCC ATC C-3'

2.1.5 Tiere

Die C57BL/6J *Lipc*^{-/-} Mäuse wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Alle Tiere wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf unter einem normalen Tag-Nacht-Zyklus gehalten und mit Standard-Futter und Wasser *ad libitum* ernährt. Die Organentnahme war in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz beim Tierschutzbeauftragten des UKE angemeldet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von RNA

Zur RNA-Isolierung wurden frisch präparierte Gewebe von 50-100 mg in Trizol (INVITROGEN #15596-018) überführt und mit dem Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE, Staufen) homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 200 µl Chloroform vermischt und erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 500 µl Isopropanol vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und mit 7.500 x g für 5 Minuten

bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.1.2 RT-PCR (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System von Invitrogen (#11904-018, Karlsruhe) verwendet und es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Für die anschließende PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl	cDNA
5 µl	10x PCR-Puffer
1 µl	dNTP-Mix 10mM
8 µl	Primer hin
8 µl	Primer rück
0,5 µl	Taq-Polymerase
26,5 µl	H ₂ O

Ein typisches Temperaturprogramm für den Cycler war:

Reaktion	Zeit	Temperatur	Schleife
Primärdenaturierung	2 Min.	94°C	} 32x
Denaturierung	30 s	94°C	
Hybridisierung	45 s	58°C	
Synthese	30 s	72°C	

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

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

2.2.2 Zellkulturen primärer Osteoblasten

2.2.2.1 Isolation primärer Osteoblasten

Aus 3-5 Tage alten Mäusen wurden die Schädeldächer heraus präpariert. Diese wurden anschließend in 10ml Verdauungslösung überführt und für 10 Minuten bei 37°C in den Schüttler gestellt. Anschließend wurde die flüssige Phase abgesaugt und verworfen. Die Schritte wurden viermal wiederholt, wobei die flüssige Phase der letzten drei Durchgänge gesammelt wurde. Die gesammelten Überstände wurden dann durch einen Zellfilter mit einer Porengröße von 100 µm (BD FALCON, Bedford USA, #352360) filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wurde nun für 3 Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet mit 5ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde 10µl der Zellsuspension auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und die Zellzahl pro Milliliter anhand der ausgezählten Zellen errechnet.

2.2.2.2 Proliferation und Differenzierung primärer Osteoblasten

Die durch Präparation gewonnen Zellen wurden in einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml auf six-well Platten ausgesät, wobei 2ml der Suspension pro Well verwendet wurde. Am Folgetag wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten (Dauer 2-4 Tage) wurde das Differenzierungsmedium hinzugegeben. Das Differenzierungsmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach 20 Tagen war die Mineralisierung abgeschlossen.

2.2.2.3 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität und der Protein-Konzentration in primären Osteoblasten

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend wurde 1ml PBS mit ProteinaseK-Hemmer hinzugegeben. Alle folgenden Schritte wurden dann auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden vom Boden der six-well Platten abgekratzt, in 4ml Rundbodenröhrchen gegeben und für 15 Sekunden im Turrax zerkleinert.

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurde zu 200µl Zellextrakt 500µl AP-Substrat-Lösung hinzugegeben und für 3 Minuten

inkubiert. Anschließend wurden 200ml 2,5M NaCl Lösung zugeführt und die Absorption bei 405nm im Photometer gemessen.

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde zu 100µl Zellextrakt 700µl destilliertes Wasser und 200µl Protein Assay (BioRad) hinzugegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 595nm im Photometer gemessen.

Anhand von Standardkurven wurden die absoluten Konzentrationen errechnet und die Werte der Alkalischen Phosphatase in Relation zu den Protein Konzentrationen gesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Resultate zu erlangen.

2.2.2.4 Von Kossa-Färbung primärer Osteoblasten

Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit kaltem Methanol für 10 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Leitungswasser wurde den Zellen 5%ige Silbernitratlösung hinzugegeben und für 30 Minuten unter Licht inkubiert. Nachfolgend wurde erneut dreimal mit Leitungswasser gewaschen und für 5 Minuten 10%iges Natriumthiosulfat hinzugefügt. In Leitungswasser gelagert wurden die gefärbten Zellen abschließend fotografiert.

2.2.3 Serum- und Urinanalysen

2.2.3.1 Serum- und Uringewinnung

Vor dem Entfernen aller Thorax-, Bauch- und Beckenorgane bei der Skelettpräparation, wurde den Mäusen Blut entnommen. Dazu wurde die Maus thorakal ausbluten gelassen und dieses Blut sofort entnommen. Nachdem es bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es für 8 Minuten bei 4.000rpm zentrifugiert und das Serum bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Für die Urinuntersuchungen wurde entweder Spontanurin der Mäuse oder Urin durch Blasenpunktion bei der Skelettpräparation verwendet.

2.2.3.2 Bestimmung von Osteocalcin im Serum

Zur Bestimmung des Osteocalcin (Bgp = bone gla protein) i.S., welches den Aktivitätsgrad der Osteoblasten widerspiegelt wurde das Osteocalcin IRMA-Kit (IMMUTOPICS, INC., California, USA, #50-1300) verwendet. Die Proben wurden wie vom Hersteller beschrieben analysiert.

2.2.3.3 Bestimmung von Kreatinin und DPD im Urin

Bei der Knochenresorption entstehen Abbauprodukte, die ins Blut abgegeben werden. Einige werden auch im Urin ausgeschieden, so auch das Deoxypyridinol (DPD). DPD ist ein Crosslink des Typ-I Kollagens, aus dem der organische Knochenanteil zu annähernd 90% besteht. Um eine Vergleichbarkeit unabhängig von der Urinausscheidungsmenge zu erlangen, wurde zusätzlich zum DPD das ausgeschiedene Kreatinin im Urin bestimmt.

Die DPD-Konzentration wurde auf die Kreatinin-Konzentration bezogen. Um die DPD-Konzentration zu bestimmen wurde das Metra DPD EIA Kit (REF8006, Quidel San Diego/USA) verwendet. In jede der Anti-DPD beschichteten 96er Wells wurde jeweils die 1:10 verdünnten Urinproben, Kontrollen oder Standards gegeben. Anschließend wurde in jedes Well je 100µl Enzymkonjugat gegeben und bei 2-8°C für 2 Stunden im dunklen inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit einfach konzentriertem Waschpuffer, wurde in jedes Well je 150µl auf 20-28°C erwärmte Substratlösung gegeben und bei 20-28°C für 60 Minuten inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde je 100µl Stopplösung hinzu gegeben. Die Absorption wurde bei 405nm im ELISA-Reader gemessen. Die DPD Konzentrationen der Urinproben wurden anhand der in ein halblogarithmisches Koordinatensystem übertragenen Standardwerte ermittelt.

Die Kreatinin-Konzentration im Urin wurde mit dem Metra Creatinine Assay (REF8009, Quidel San Diego/USA) ermittelt. Die 1:40 verdünnten Urinproben, Kontrollen und Standards wurden zu je 50µl in die Wells gegeben. Je 150µl Working-Solution wurden hinzugefügt und bei 18-28°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Die Absorptionen der Standards wurden in ein lineares Koordinatensystem übertragen und anhand dieser Grade wurden die Kreatinin Konzentrationen der Proben ermittelt.

2.2.4 Histologie und Morphologie

2.2.4.1 Skelett-Präparation

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und getötet. Dann wurden sie enthäutet und es wurden alle Thorax-, Bauch- und Beckenorgane entfernt. Anschließend wurden die Skelette auf Korkplatten gestreckt, für einen Tag in 3,7 %

gepuffertem Formaldehyd fixiert und dann in 80 % Ethanol überführt. Von allen Mäusen wurden jeweils die oberen vier Lendenwirbel und die rechte Tibia histologisch untersucht.

2.2.4.2 Kontaktradiographie

Ein Kontaktröntgen wurde von allen fixierten Skeletten angefertigt. Dazu wurden diese auf einem Röntgenfilm für 2 Sekunden bei 35kV im Kontakt-Röntgenapparat geröntgt.

2.2.4.3 Acrylat-Histologie

Die Tibia und Wirbelkörper wurden im Autotechnikon über Nacht entwässert. Dazu durchliefen die Präparate 2 x 60min 70% Ethanol, 3 x 60min 80% Ethanol, 3 x 60min 96% Ethanol und 4 x 60min Ethanol absolut. Anschließend wurden die Präparate für je einen Tag in der Infiltrationslösung I und II infiltriert und dann in der Gießlösung in Glasgefäßen eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 4°C im Wasserbad über Nacht. Am Rotationsmikrotom wurden dann 3 und 12µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger, welche mit Gelatinelösung beschichtet wurden, aufgezogen und mit der Strecklösung gestreckt.

2.2.4.4 von Kossa/van Gieson-Färbung

Zur Vorbereitung auf die eigentliche Färbung wurde das Acrylat mit 2-(Methoxyethyl)-acetat (MERCK #806061) aus den Schnitten gelöst (3 x 10min). Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert. Für die Färbung wurden die Schnitte für 5 min in 3 %ige Silbernitratlösung, 10min in endionisiertes Wasser, 5min Sodaformollösung, 10min in fließendes Leitungswasser, 5 min in 5%ige Natriumthiosulfatlösung, erneut 10min in fließendes Leitungswasser und zum Schluss in die van Gieson-Lösung getaucht. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol überführt (3 x 5 min) und mit DPX (SIGMA-ALDRICH #44581) und einem Deckglas eingedeckt.

2.2.4.5 Toluidinblau-Färbung

Die Vor- und Nachbehandlung der Schnitte verlief wie bei der von Kossa-/ van Gieson-Färbung (2.2.4.4). Für die Färbung selbst wurde die Schnitte für 30min in die Toluidinblau-Lösung getaucht.

2.2.4.6 Calceinmarkierung

Calcein ist ein sich an die mineralisierte Knochenmatrix anlagernder flurochromer Farbstoff. Die Mäuse wurden zweimal im Abstand von 7 Tagen mit je 100µl Calcein markiert (letzte Injektion 2 Tage vor Präparation). Anhand der sich ergebenden grün fluoreszierenden Calcein-Banden in den histologischen Schnitten konnte die Knochenwachstumsrate (BFR) bestimmt werden.

2.2.4.7 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)-Färbung

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

2.2.4.8 Histomorphometrie

Die Quantifizierung von Knochenvolumen (BV/TV, bone volume per tissue volume), Anzahl der Trabekel (TbN, trabecular number), Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness) und Abstand der Trabekel zueinander (TbSp, trabecular separation) wurden nach standardisierten Protokollen mit dem BIOQUANT Histomorphometrie System an 4µm dicken von Kossa-/ van Gieson gefärbten Schnitten durchgeführt.

Mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie System wurde an 12µm dicken, ungefärbten, Calcein markierten Schnitten (2.2.4.6) die Knochenformationsrate (BFR, bone formation rate) und an 4µm dicken Toluidin gefärbten Schnitten die Osteoblasten- und Osteoklastenanzahl (NOb bzw. NOc/BPm, number of

osteoblasts bzw. number of osteoclasts per bone parameter) anhand standardisierter Protokollen gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Hepatischen Lipase im Osteoblasten

Dass die Hepatische Lipase auch im Osteoblasten exprimiert wird, zeigte bereits die Expressionsanalyse primärer Osteoblasten an Tag 5 und 25 der Differenzierung (Abbildung 3). Hierbei zeigte sich, dass die Hepatische Lipase während der Mineralisierung zu den zehn am stärksten induzierten Genen im Osteoblasten gehört.

Um zu analysieren, ob die im Osteoblasten gebildete Hepatische Lipase mRNA der ungekürzten Form in der Leber entspricht, wurden Primer hergestellt, welche das Exon2 detektieren. Es wurde anschließend eine Analyse verschiedener Organe durchgeführt. Untersucht wurde, ob das Exon2 und damit die ungekürzte mRNA zu detektieren ist. Um Schwankungen im cDNA-Gehalt der Proben zu erkennen und den cDNA-Gehalt in allen Proben anzugleichen, wurde jeweils die Expression von *Gapdh*, einem Haushaltsgen welches in allen Zellen exprimiert wird, überprüft.

Es zeigte sich, dass das Exon 2 der *Lipc*-mRNA, neben der Leber, spezifisch auch im Osteoblasten gebildet wird (Abbildung 4). Auch die Induktion der *Lipc*-Expression von Tag 10 auf Tag 25 konnte in dieser RT-PCR Analyse sehr gut dargestellt werden. Zum Vergleich wurde ein weiterer Vertreter aus der Familie der Lipasen, die Lipoproteinlipase (*Lpl*) analysiert. Die *Lpl* wies keine Organspezifität auf. Sie wird in vielen Organen exprimiert.

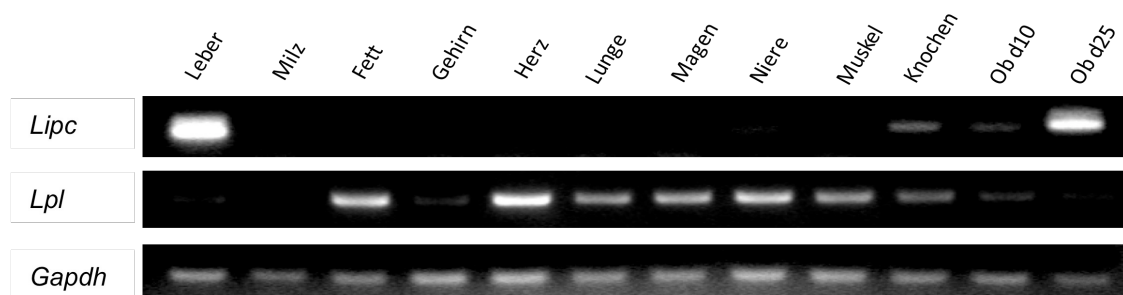


Abbildung 4. Expression von *Lipc* und *Lpl* in verschiedenen Geweben

RNA wurde aus diversen Geweben adulter Mäuse isoliert. Anschließend wurde eine reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Die sich anschließende Gelelektrophorese ist hier abgebildet. Die Expression von *Gapdh* diente als Positivkontrolle.

3.2 Die Deletion des *Lip*c-Gens führt zu erhöhter

Knochenmasse

Der Befund, dass die mRNA der Hepatischen Lipase neben der Leber auch im Osteoblasten gebildet wird, wirft die Frage auf, welche Funktion die Hepatische Lipase im Osteoblasten und damit auch im Knochen hat. Um einen möglichen Effekt der Hepatischen Lipase auf den Knochen zu zeigen, wurde ein *Lip*c-defizientes Mausmodell untersucht. Im Alter von 3 und 6 Monaten wurden jeweils die Lendenwirbelkörper der Mäuse histologisch aufgearbeitet. Hierzu wurden Schnitte angefertigt, welche dann nach von Kossa/ van Gieson gefärbt wurden. Anschließend erfolgte die standardisierte Auswertung.

Im Alter von 3 Monaten zeigten sich anhand dieser histologischen Schnitte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und *Lip*c^{-/-}-Mäusen, weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren.

Weibliche Mäuse im Alter von 6 Monaten wiesen dagegen eine erhöhte Knochenmasse (BV/TV) auf, wenn das *Lip*c-Gen auf beiden Allelen deletiert wurde. Dieser Knochenmassezuwachs im Vergleich zu den Wildtypen beruht auf einer signifikanten Zunahme der Trabekelanzahl (TbN). Die Trabekeldicke (TbTh) zeigte sich dabei unverändert (Abbildung 5). Bei den männlichen Tieren konnte auch in dieser Altersgruppe kein Unterschied zwischen den *Lip*c-defizienten und Wildtyp Mäusen festgestellt werden (Abbildung 6).

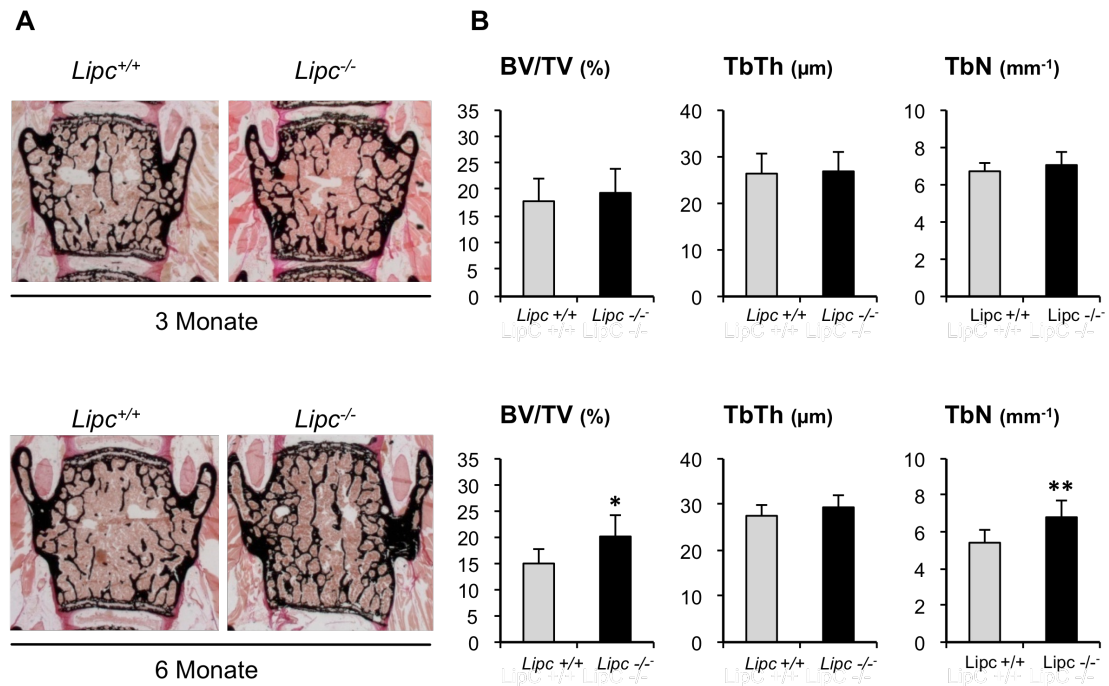


Abbildung 5. Histologische Analyse *Lip*-defizienter weiblicher Mäuse im Alter von 3 und 6 Monaten

A Abgebildet sind die histologischen Schnitte der Wirbelkörper in der von Kossa/ van Gieson Färbung. Der mineralisierte Knochen zeigt sich schwarz. Es zeigt sich mehr mineralisierter Knochen bei den 6 Monate alten *Lip*-defizienten Weibchen, als bei den Wildtypen. **B** Die Ergebnisse der quantitativen Histomorphometrie objektivieren diesen Befund. So sind die trabekuläre Knochendichte (BV/TV, bone volume per tissue volume) und die trabekuläre Anzahl (TbN, trabecular number) in den *Lip*^{-/-}-Mäusen erhöht, die trabekuläre Dicke (TbTh, trabecular thickness) ist jedoch nicht verändert.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

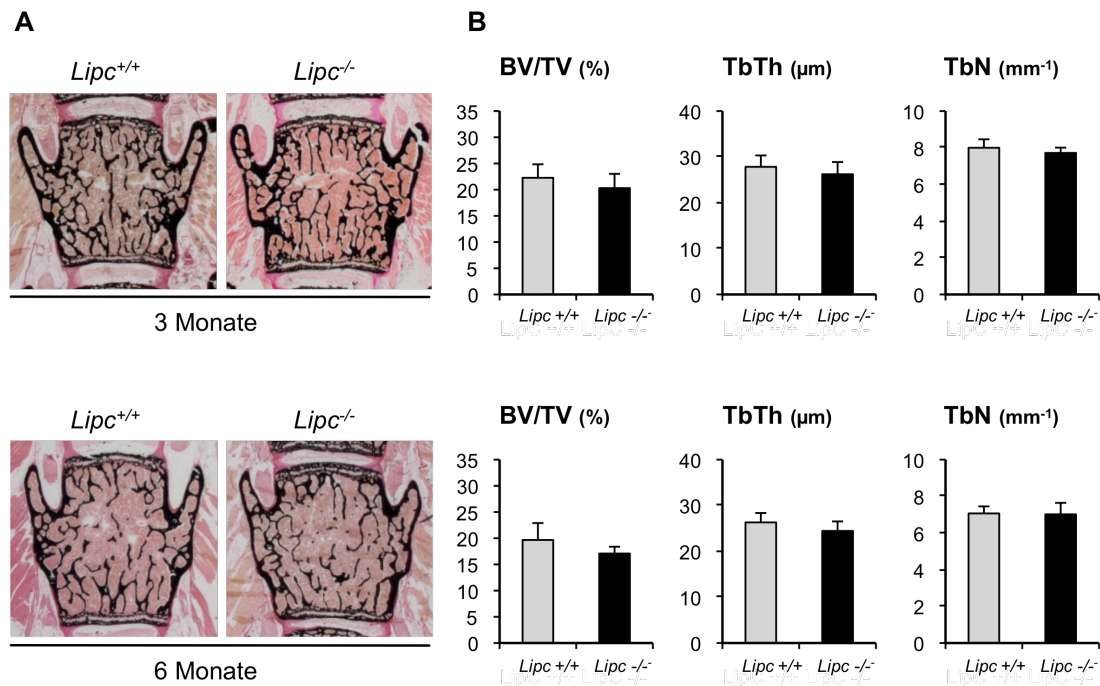


Abbildung 6. Histologische Analyse *Lip*-defizienter männlicher Mäuse im Alter von 3 und 6 Monaten

A Abgebildet sind die histologischen Schnitte der Wirbelkörper in der von Kossa/ van Gieson Färbung. Der mineralisierte Knochen zeigt sich schwarz. Es zeigen sich in beiden Altersgruppen keine Unterschiede.

B Die strukturellen Knochenparameter objektivieren diesen Befund. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Knochenmasse (BV/TV), Trabekeldicke (TbTh) oder Trabekelanzahl (TbN).

Der beobachtete Phänotyp bei den weiblichen Tieren könnte durch eine erhöhte Osteoblastenaktivität hervorgerufen werden. Aber auch eine geminderte Osteoklastenaktivität kann zu diesen Beobachtungen führen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass beide Faktoren die erhöhte Knochenmasse verantworten.

Um diese Frage zu klären, wurde an Toluidinblau-gefärbten histologischen Schnitten der Wirbelkörper die Zahl der Osteoblasten bestimmt. Anhand Calcein-markierter Präparate konnte die Knochenformationsrate, d.h. die Aktivität der Osteoblasten, vermessen werden.

Es zeigte sich, dass *Lip*^{-/-}-Mäuse weniger Osteoblastenoberfläche (ObS/BS), bei gleicher Osteoblastenzahl (Nob/BS) im Vergleich zu den Wildtypen aufweisen (Abbildung 7).

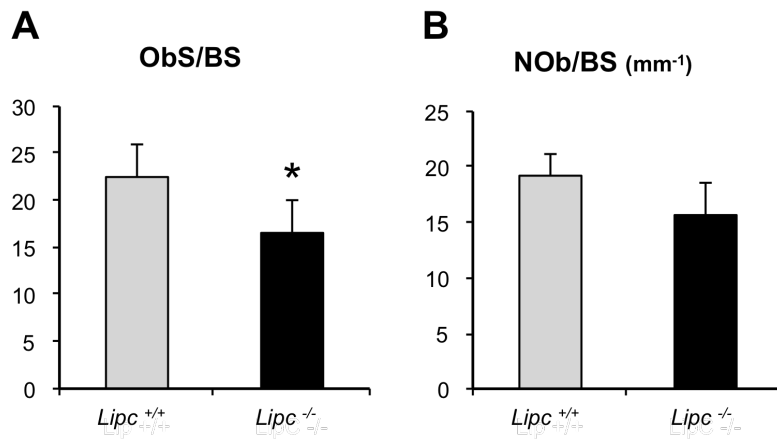


Abbildung 7. Histomorphometrische Analyse der Osteoblasten in *Lipc*-defizienten Mäusen

Die Parameter wurden an Toluidinblau-gefärbten histologischen Schnitten der Lendenwirbelkörper von *Lipc*-defizienten und Wildtyp-Mäusen erhoben. **A** Die Oberfläche der Osteoblasten (ObS/BS) ist im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erniedrigt. **B** Die Anzahl der Osteoblasten (Nob/BS) bleibt jedoch unverändert. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Wichtig dabei ist, dass die Osteoblasten der *Lipc*^{-/-}-Mäuse trotz der kleineren Oberfläche aktiver sind als die der Wildtypen. Man erkennt dies an der gesteigerten Knochenformationsrate (BFR, bone formation rate) (Abbildung 8).

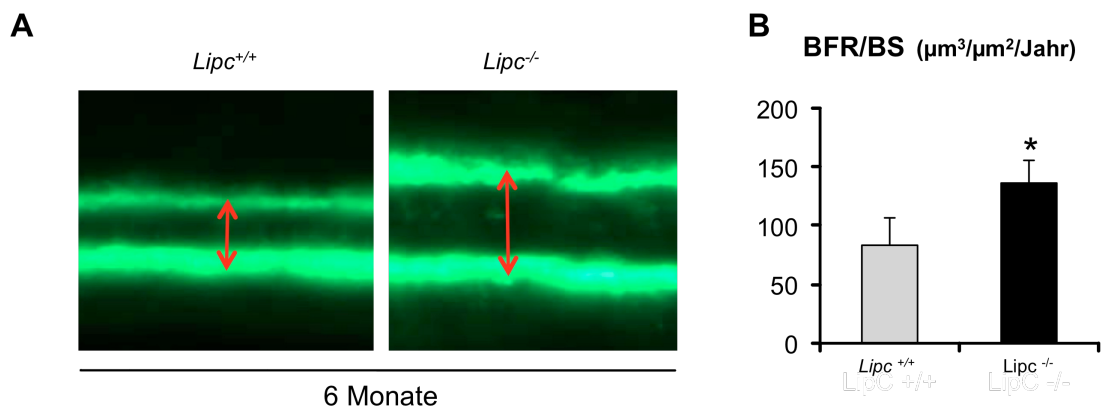


Abbildung 8. Analyse der Knochenneubildung in den *Lipc*-defizienten Mäusen

A Anhand der Calcein markierten histologischen Schnitte der Knochen, hier ein repräsentativer Ausschnitt, zeigt sich in den *Lipc*-defizienten Mäusen ein größerer Abstand zwischen den Banden und somit ein vermehrter Knochenzuwachs. **B** Die standardisierte Messung an markierten Wirbelkörpern kann dieses objektivieren. Es zeigt sich eine signifikant gesteigerte Knochenformationsrate (BFR/BS, bone formation rate per bone surface) im Vergleich zu den Wildtypen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Auch wurde die Anzahl der Osteoklasten anhand Toluidinblau-gefärbter histologischer Schnitte bestimmt. Dabei wiesen diese weder in der Zellzahl,

noch in der Aktivität einen Unterschied zwischen den Wildtypen und den *Lip*^{-/-}-Mäusen auf. Die Osteoklastenaktivität wurde durch die Bestimmung des DPD, einem Kollagenabbauprodukt, welches beim Abbau des Knochens durch Osteoklasten entsteht, im Urin gemessen (Abbildung 9).

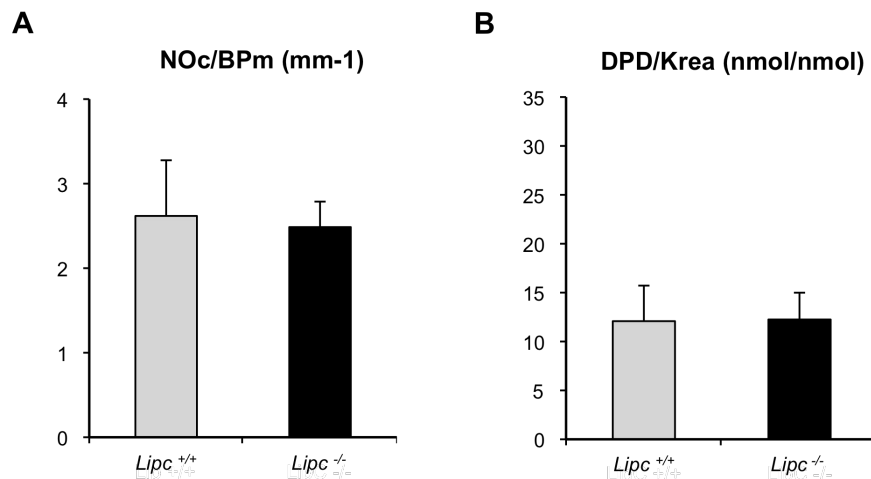


Abbildung 9. Osteoklastenzahl und -aktivität in *Lip*c-defizienten Mäusen

A An Toluidinblau-gefärbten histologischen Schnitten wurde als histomorphometrischer Parameter die Osteoklastenzahl (NOc/BPm) bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Knockout- und Wildtypmäusen. **B** Auch die Osteoklastenaktivität, gemessen an der DPD-Ausscheidung, in Bezug auf das Kreatinin im Urin, weist keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf.

3.3 Verstärkte Mineralisierung der *Lip*c-defizienten

Osteoblasten in Zellkultur

Im Mausmodell zeigt sich eine erhöhte Knochenmasse durch eine gesteigerte Osteoblastenaktivität in den *Lip*^{-/-}-Mäusen. Fraglich ist, ob dieser Effekt auch zellautonom auftritt. Denn bei einem nicht-zellspezifischen Knockout in der Maus, kann es durchaus sein, dass der beobachtete Effekt durch andere Mechanismen, wie z.B. die hormonelle Zusammensetzung im Blut oder im Falle der Hepatischen Lipase ein verändertes Lipidprofil hervorgerufen wird.

Daher wurden primäre Osteoblasten aus den Calvarien 2-5 Tage alter Mäuse isoliert und in Kultur gebracht. An Tag 20 der Differenzierung wurden die Zellkulturen anschließend analysiert. Es zeigte sich an den von Kossa gefärbten Kulturen, dass die *Lip*c-defizienten Osteoblasten stärker mineralisieren, als die der Wildtypen. Als Marker für die Aktivität der Osteoblasten wurde der Gehalt an Alkalischer Phosphatase (AP) in den Zellen

bestimmt und ins Verhältnis zu dem gesamten Zellprotein gesetzt. Hierbei zeigte sich ein signifikant erhöhter AP-Wert in den *Lipc*^{-/-}-Osteoblasten (Abbildung 10). Anhand dieser beiden Beobachtungen lässt sich ein zellautonomer Effekt der hepatischen Lipase in Osteoblasten *in vitro* bestätigen.

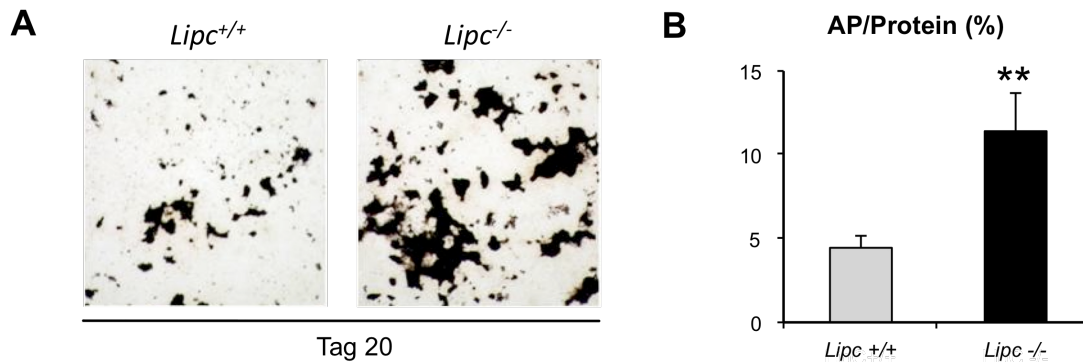


Abbildung 10. Mineralisation und Aktivität *Lipc*-defizienter Osteoblasten *in vitro*

A Zu sehen sind Osteoblastenkulturen in der von Kossa Färbung an Tag 20 der Differenzierung. Mineralisiertes Gewebe zeigt sich schwarz. Man sieht eine deutliche vermehrte Mineralisierung der defizienten Osteoblasten. **B** Auch die Aktivität der Osteoblasten, gemessen an der Alkalischen Phosphatase (AP/Protein), zeigt sich im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erhöht.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.4 Deletion des *Lrp1*-Gens unter dem *Runx2*-Promotor führt zu Osteopenie

Osteoblasten exprimieren *Lrp1*, einen Rezeptor der Ldl-Rezeptor-Familie. *Lrp1* spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Lipiden und damit auch eine wichtige Rolle in der Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen, was auch in primären Osteoblasten bestätigt werden konnte (Niemeier et al., 2008). Ob das *Lrp1* einen Effekt in der Maus zeigt wurde in dieser Arbeit anhand eines *Lrp1*-defizienten Mausmodells untersucht. In diesem war das *Lrp1* nur in *Runx2*-positiven Zellen, d.h. in Osteoblasten ausgeschaltet.

Schon makroskopisch lässt sich erkennen, dass die Mäuse mit der Osteoblasten-spezifischen *Lrp1*-Inaktivierung (*Lrp1* Δ Obl-Mäuse) kleiner sind als die Wildtypen. Um diesen Befund zu objektivieren, wurden Kontaktradiographien der Mäuse angefertigt. An diesen wurde die Länge der Lendenwirbelkörper L1-L4 und die Femurlänge vermessen. Es zeigte sich, dass

die $Lrp1^{\Delta Obl}$ -Mäuse kleinere Wirbelkörper, aber auch signifikant kleinere Femora haben (Abbildung 11).

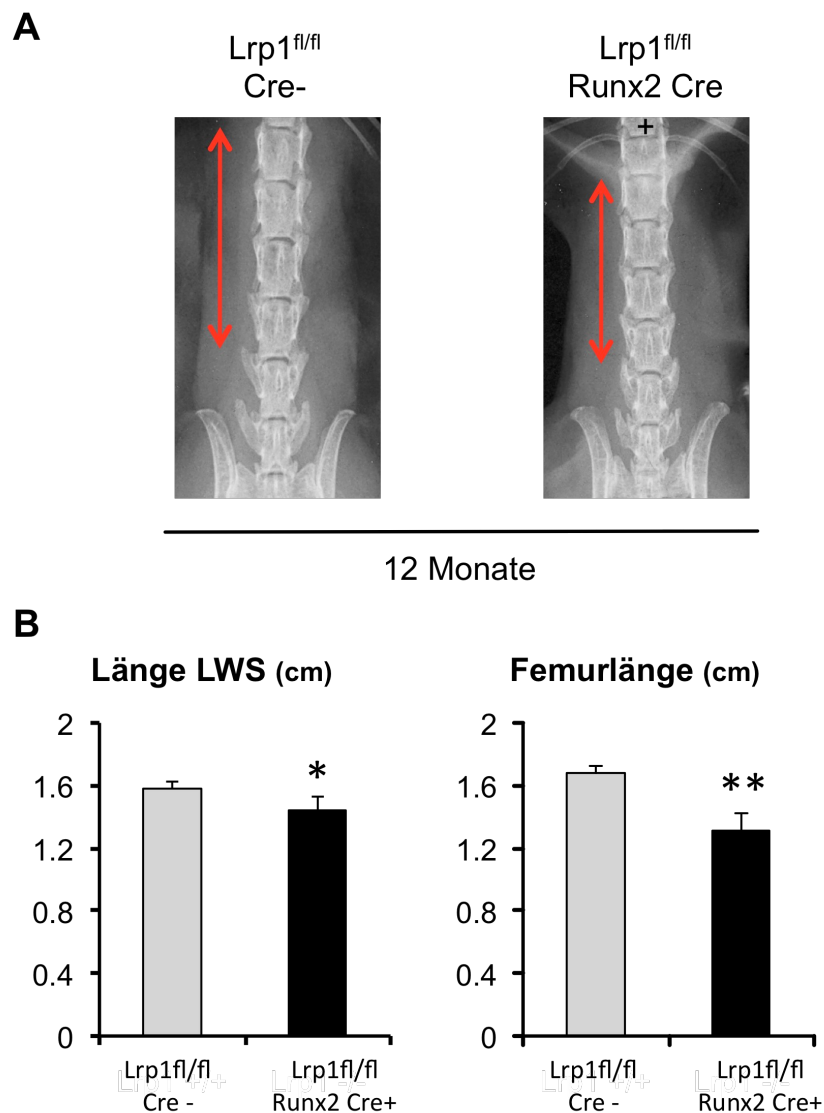


Abbildung 11 Verkürzung der Knochen in $Lrp1^{\Delta Obl}$ -Mäusen.

A Kontaktradiographie der Lendenwirbelsäule von $Lrp1^{\Delta Obl}$ -Mäusen ($Lrp1^{fl/fl}/Runx2-Cre$) und den Cre-negativen Kontrolltieren $Lrp1^{fl/fl}/Cre-$. Der mineralisierte Knochen stellt sich weiß dar. Man sieht deutlich kleinere Wirbelkörper in Mäusen mit $Lrp1$ -defizienten Osteoblasten. **B** Der Längenunterschied wurde durch Messungen anhand dieser Kontaktradiographien objektiviert. Misst man die Länge der Lendenwirbelkörper 1 bis 4, zeigt sich eine signifikant verkürzte Lendenwirbelsäule bei Mäusen mit $Lrp1$ defizienten Osteoblasten. Auch sind die Femora signifikant verkürzt.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Weiterhin wurde untersucht, ob es signifikante Veränderungen in der Knochenmasse der $Lrp1^{\Delta Obl}$ -Mäuse gibt. Dazu wurden die Lendenwirbelkörper aus 3, 6 und 12 Monate alten Mäusen histologisch untersucht, indem von

Kossa/ van Gieson gefärbte Schnitte angefertigt und die strukturellen Knochenparameter bestimmt hat. Es zeigte sich in allen Altersgruppen eine signifikant erniedrigte Knochenmasse in den Mäusen mit dem zellspezifischen Lrp1 Knockout (Abbildung 12).

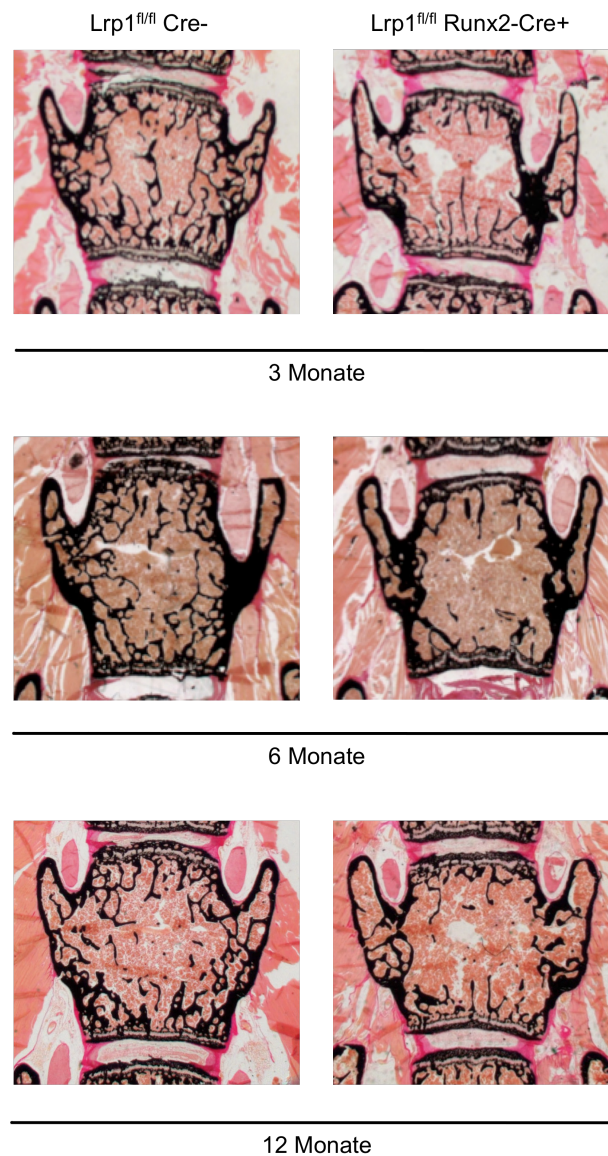


Abbildung 12. Osteopenie in Lrp1 Δ Obl-Mäusen

Abgebildet sind Lendenwirbelkörper in der von Kossa/ van Gieson Färbung. Mineralisierter Knochen zeigt sich schwarz. Man sieht eine deutlich reduzierte Knochenmasse in den Mäusen mit osteoblastenspezifischer Deletion des Lrp1.

Dieser Effekt beruht vor allem auf einer signifikant reduzierten Trabekelanzahl (TbN) (Abbildung 13).

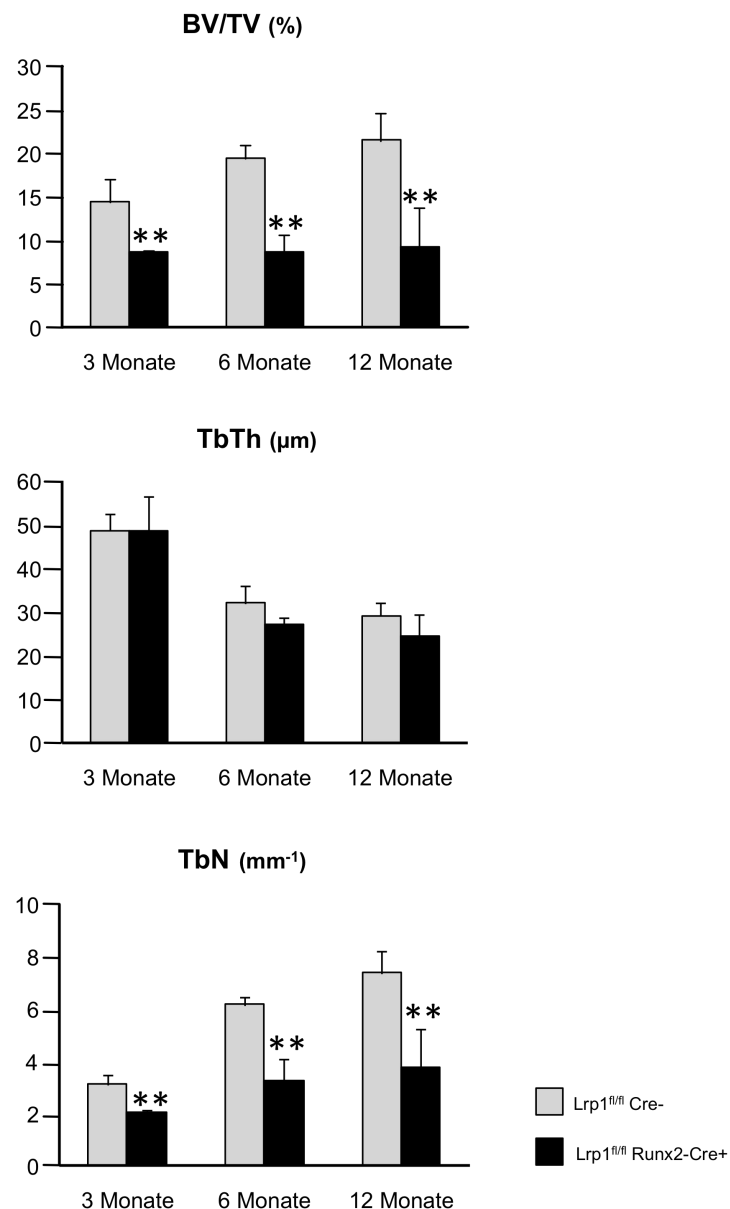


Abbildung 13. Histomorphometrische Analyse von Histologien aus Mäusen mit osteoblastenspezifischer Deletion des Lrp1

Anhand der in Abbildung 12 gezeigten Histologien wurden die strukturellen Knochenparameter mit standardisierten Protokollen gemessen. Es zeigt sich in allen Altersgruppen eine signifikant geminderte Knochenmasse (BV/TV) in Mäusen mit osteoblastenspezifischer Deletion des Lrp1. Dies beruht auf einer signifikant reduzierten Trabekelanzahl (TbN). Die Trabekeldicke (TbTh) zeigt sich unverändert.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Um zu analysieren welcher Zelltyp für diesen Effekt verantwortlich ist, wurden histomorphometrische Untersuchungen an Toluidinblau-gefärbten Schnitten 6

Monate alter Mäuse durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Lrp1 Δ Obl-Mäuse keinen Unterschied in der Osteoblastenanzahl (ObN/BPm) oder auch der Osteoblastenaktivität, gemessen anhand der Knochenformationsrate, (BFR) zeigten (Abbildung 14).

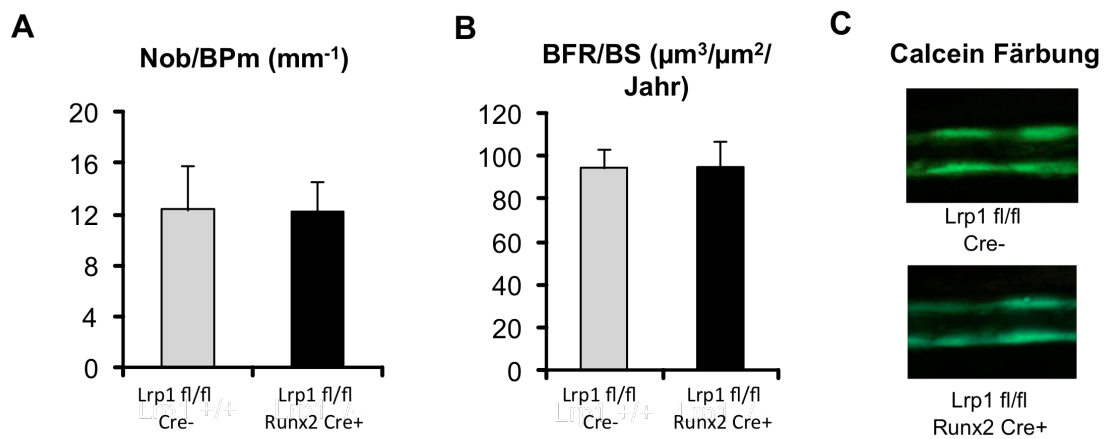


Abbildung 14. Normale Knochenbildung in Lrp1 Δ Obl-Mäusen

A Die relative Anzahl der Osteoblasten, bezogen auf den Knochen (Nob/BPm) zeigt keinen Unterschied in beiden Gruppen. **B** Auch die Knochenformationsrate ist zwischen den beiden Gruppen gleich. **C** Dies ist hier an zwei repräsentativen Calceinbanden dargestellt. Die Zeit zwischen den beiden Calcein-Markierungen betrug 7 Tage.

Anhand TRAP-gefärbter histologischer Schnitte konnte gezeigt werden, dass die Lrp1 Δ Obl-Mäuse signifikant mehr Osteoklasten besitzen. Auch der Aktivitätsmarker der Osteoklasten, das DPD im Urin der Mäuse, ist signifikant erhöht. Eine Veränderung der Knochenformationsrate zeigte sich nicht (Abbildung 15).

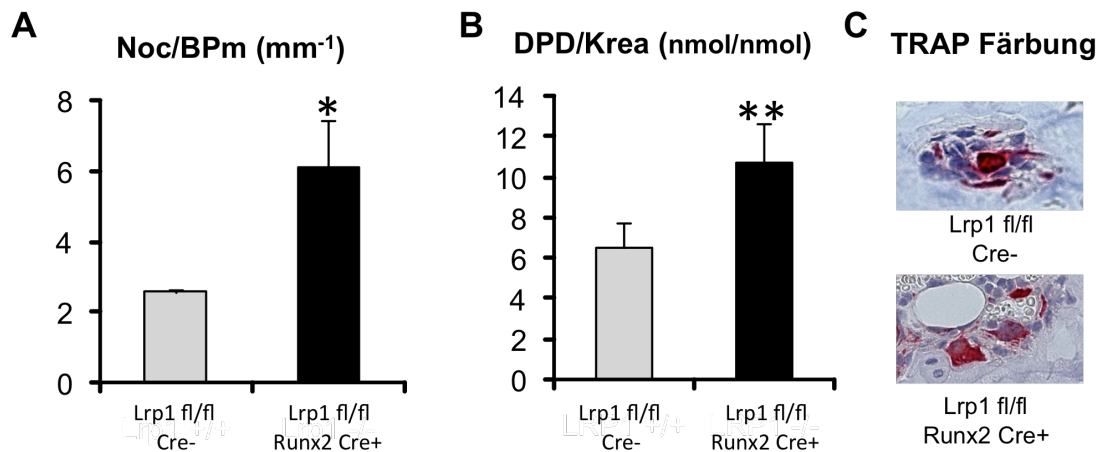


Abbildung 15. Gesteigerte Knochenresorption in Lrp1 Δ Obl-Mäusen (die Sternchen müssen ein wenig höher)

A Die an Toluidinblau gefärbten histologischen Schnitten bestimmte Anzahl an Osteoklasten (Noc/BPm), zeigt eine signifikante Zunahme der Anzahl, wenn in den Osteoblasten das Lrp1 deletiert ist. **B** Die im Urin messbaren Bestandteile des Knochenabbaus, die DPD-Krosslinks, zeigen eine starke Zunahme in Mäusen mit osteoblastenspezifischer Deletion des Lrp1. Dabei wurden die DPD-Werte jeweils auf die ausgeschiedene Menge an Kreatinin bezogen. **C** Anhand der TRAP Färbung können aktive Osteoklasten rot angefärbt werden. Die Mäuse mit der spezifischen Lrp1-Deletion weisen mehr Osteoklasten auf.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.5 Die Osteoblasten-spezifische Lrp1-Inaktivierung führt zum Tumorwachstum an der Tibia

Der Minderwuchs der Lrp1 Δ Obl-Mäuse war jedoch nicht der einzige Befund, der sich aus den Röntgenbildern ableiten ließ. Lrp1 Δ Obl-Mäuse entwickelten Tumore an der distalen Tibia (Abbildung 16). Die Penetranz der Tumorentstehung ist dabei in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich, wobei die Häufigkeit mit 12 Monaten am höchsten ist (Abbildung 17). Die Tumore sind stets am Übergang vom mittleren zum distalen Drittel der Tibia gelegen (Abbildung 16).

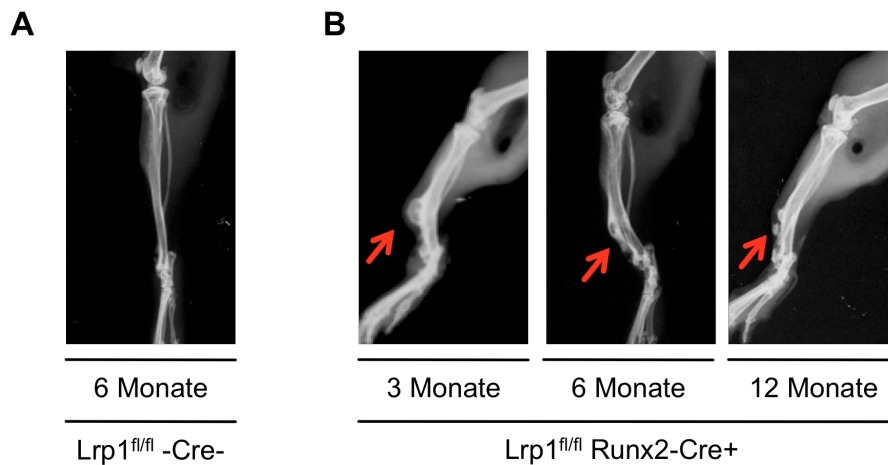


Abbildung 16. Tumorbildung an der Tibia von Lrp1 Δ Obl-Mäusen.

A Kontaktradiographie einer Tibia aus einer Maus ohne Deletion des Lrp1. Der mineralisierte Knochen zeigt sich weiß. **B** Kontaktradiographien der Tibiae von Mäusen mit Deletion des Lrp1 in Zellen mit Runx2 Expression. Man erkennt deutlich die kalkreiche Struktur an der distalen Tibia. Bildmorphologisch ähnelt der Befund einer cartilaginären Exostose.

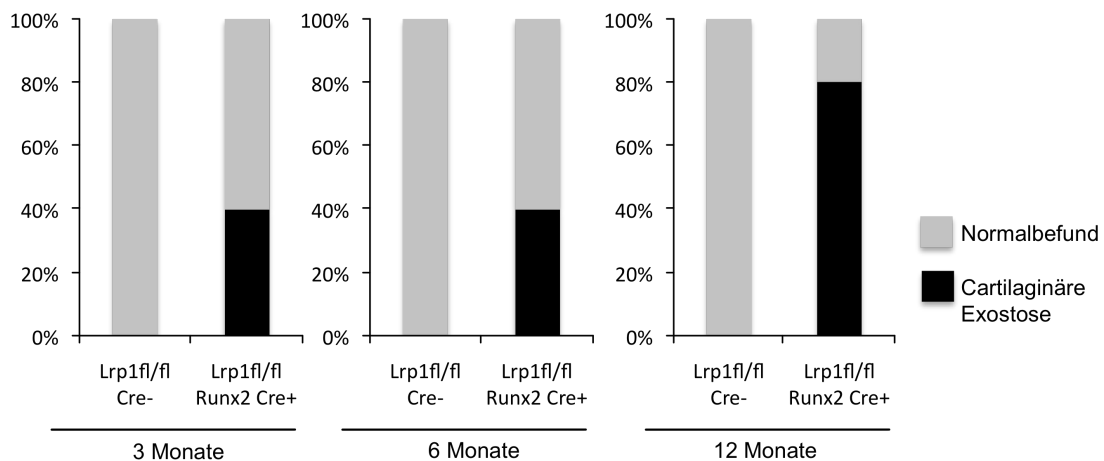


Abbildung 17. Anteil der tumorösen Veränderungen an der Tibia bei Lrp1 Δ Obl-Mäusen und Cre-negativen Kontrolltieren.

Der Anteil von tumorösen Veränderungen an der Tibia wurde anhand der Kontaktradiographien ermittelt. Bei den Mäusen ohne Deletion findet man kein tumoröses Wachstum im Sinne einer cartilaginären Exostose. Bei den Mäusen mit Runx2 spezifischer Deletion des Lrp1 sieht man je nach Altersgruppe einen unterschiedlichen Penetranz der cartilaginären Exostosen.

Morphologische Untersuchungen des entstandenen Tumors zeigten, dass es sich dabei am ehesten um cartilaginäre Exostosen handelt. Dieser besteht aus einer teils verknöcherten Knorpelkappe. Der Tumor weist keine erhöhte Anzahl an Mitosen auf (Abbildung 18). Das kann als Zeichen für einen

benignen Tumor gewertet werden und unterstützt somit die Diagnose einer cartilaginären Exostose.

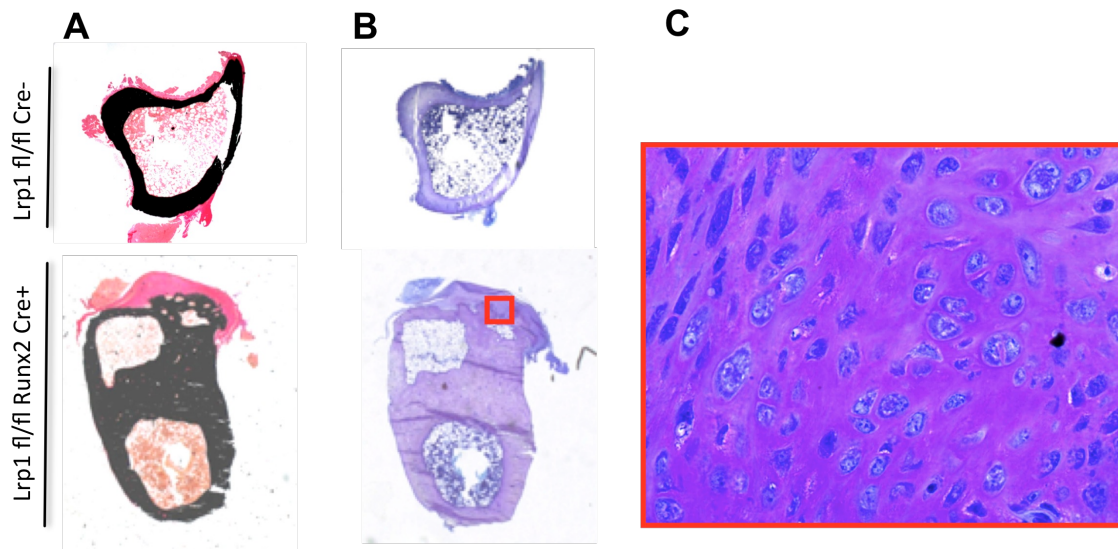


Abbildung 18 Histologische Aufarbeitung des cartilaginären Tumors an der distalen Tibia

A Im Querschnitt der Tibia in der von Kossa/ van Giesson Färbung sieht man in Lrp1 Δ Obl-Mäusen neben den schwarzgefärbten knöchernen Veränderungen auch die rötlich gefärbte Knorpelkappe. **B** Hier ist die selbe Veränderung in der Toluidinfärbung dargestellt. **C** Man erkennt in der vergrößerten Darstellung der Knorpelkappe keine vermehrten Mitosen, welches ein Zeichen für ein benignes Geschehen ist.

4 Diskussion

4.1 Die Hepatische Lipase wird auch im Osteoblasten gebildet und inhibiert die Knochenformation

Die Hepatische Lipase ist ein wichtiges Enzym zur Aufnahme von triglyceridreichen Lipoproteinen in der Leber, wie zum Beispiel den Chylomikronen-Resten (CR). Sie gehört zur Gruppe der Esterasen, wobei in diesem Zusammenhang aufgrund der Liganden die Bezeichnung Lipase verwendet wird. Verschiedene Polymorphismen in der Promoterregion des *LIPC*-Gens führen in einigen Individuen zu einer erniedrigten Aktivität der hepatischen Lipase. Daraus resultieren hohe HDL-Cholesterinwerte und große HDL-Partikel, sowie große und weniger dichte LDL-Partikel.

Die Hepatische Lipase wird vor allem in der Leber synthetisiert. Ihre Aktivität wurde aber auch in der Nebenniere ^(Cordie et al., 1983) und in den Ovarien ^(Hixenbaugh et al., 1989), sowie in Makrophagen ^(Nong et al., 2003) entdeckt. Sensitive RT-PCR Analysen haben jedoch gezeigt, dass die mRNA in den Ovarien und Nebennieren die ersten beiden Exone fehlen. Hier wird lediglich ein 45 kDa großes, katalytisch inaktives Hepatische Lipase-ähnliches Protein synthetisiert, welches intrazellulär verbleibt ^(Verhoeven et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig auf, dass die Hepatische Lipase, einschließlich des zweiten Exons, auch im Osteoblasten synthetisiert wird.

Diese spezifische Expression der Hepatischen Lipase warf die Frage auf, ob diese Lipase einen physiologischen Effekt im Knochenstoffwechsel hat. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hepatische Lipase einen hemmenden Effekt auf die Knochenformation hat. Da bei den untersuchten Tieren durch das Fehlen der Hepatischen Lipase der hemmende Effekt wegfiel, zeigten sie eine erhöhte Knochenmasse. Zu erklären ist das durch eine erhöhte Knochenformation. Der beobachtete Effekt der erhöhten Osteoblastenaktivität ist zellautonom, denn auch in primären Osteoblastenkulturen zeigt sich eine erhöhte Osteoblastenaktivität. Somit konnte mit dieser Arbeit eine physiologische Funktion der Hepatischen Lipase im Osteoblasten und damit im Knochenstoffwechsel aufgezeigt werden.

Die Hepatische Lipase spielt in der Leber eine zentrale Rolle bei der CR-Aufnahme. Daher wurde in der Arbeitsgruppe um Niemeier und Heeren, am

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die CR-Aufnahme in den Osteoblasten anhand primärer Osteoblasten untersucht (Daten nicht publiziert). Es zeigte sich bei *Lipc*-defizienten Osteoblasten eine vermehrte CR-Aufnahme. Dieses ist ein gegenteiliger Effekt im Vergleich zur Leber. Dort würde man beim Fehlen der Hepatischen Lipase eine verminderte Aufnahme der CR erwarten. Ein wichtiger Bestandteil der CR-Aufnahme in der Leber ist das Apolipoprotein E (ApoE). Das Fehlen des Apolipoprotein E in der Maus führt zu einer verminderten Aufnahme von CR (Schilling et al., 2005). Dieses führt über die damit verbundene reduzierten Aufnahme von Vitamin K1 und der daraus resultierenden geringere Osteocalcin-Carboxylierung zur erhöhten Knochenmasse (Schilling et al., 2005; Niemeier et al., 2005).

Sowohl die *ApoE*- als auch die *Lipc*-defizienten Mäuse weisen eine erhöhte Knochenmasse auf. Beide Mausmodelle haben jedoch ein unterschiedliches CR-Aufnahmeverhalten. Daher muss man davon ausgehen, dass hier im Gegensatz zu den *ApoE*-defizienten Mäusen die Osteocalcin-Carboxylierung nicht für den Phänotyp verantwortlich ist und ein anderer Mechanismus zum tragen kommt.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob der in der Maus beobachtete Effekt auf den Menschen übertragbar ist. Erste Hinweise dafür, dass dies möglich ist, zeigt die Studie der Arbeitsgruppe um Yamada. Hier wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Knochenmasse (BMD, bone mineral density) und dem *LIPC*-Polymorphismus, welcher eine erniedrigte Hepatische Lipase Aktivität hervorruft besteht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhter BMD und verminderter Hepatische Lipase Aktivität besteht. Diesen Effekt sah man im Frauen-, jedoch nicht im Männerkollektiv (Yamada et al., 2007). Auch die Resultate dieser Arbeit zeigen auf, dass die männlichen Mäuse nicht signifikant von dem Effekt der Hepatischen Lipase betroffen sind. Zudem zeigen die weiblichen Mäuse, genau wie die Frauen in der Studie eine Knochenmasseerhöhung bei fehlender, bzw. verminderter Hepatische Lipase Aktivität auf. Somit ist eine gewisse Übertragbarkeit der Resultate dieser experimentellen Arbeit auf den Menschen gegeben.

4.2 LDL-receptor-related-protein 1 ist ein Inhibitor der Knochenresorption

Das zur LDL-Rezeptorfamilie gehörige LDL receptor related protein 1 (Lrp1) wird unter anderem im Osteoblasten exprimiert ^(Niemeier et al., 2005). Es spielt eine wichtige Rolle bei der CR-Aufnahme durch die Leber ^(Rohlmann et al., 1998), aber auch in anderen Geweben. Der Knochen resorbiert dabei soviel Chylomikronen Reste, dass er sich neben der Leber als weiterer wichtiger Ort für die Aufnahme darstellt ^(Niemeier et al., 2008). Mit den CR werden auch die sich darin befindlichen fettlöslichen Vitamine, unter anderem das Vitamin K, aufgenommen. Vitamin K ist für verschiedene Carboxylierungsvorgänge von großer Bedeutung, im Osteoblasten vor allem für die Carboxylierung von Osteocalcin. Beobachtungen an *ApoE*-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass eine verminderte CR-Aufnahme durch den Osteoblasten zu einer geringeren Carboxylierung des Osteocalcins führt. Bei dieser Maus resultierte dies in einer erhöhten Knochenmasse ^(Schilling et al., 2005). Es stellte sich nun die Frage, welche Auswirkungen die Deletion des *Lrp1*-Gens im Osteoblasten *in vivo* hat. Zusätzlich war es wichtig zu untersuchen, ob sich der Phänotyp durch die Beobachtungen am *ApoE*-defizienten Mausmodell erklären lässt.

Lrp1^{-/-}-Mäuse versterben schon in der Embryonalphase, da das *Lrp1* vor allem bis zum 13,5 Tag *post conceptionem* für die Entwicklung wichtig ist ^(Herz et al., 1992). Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell mit einer zellspezifischen Deletion des *Lrp1* untersucht, welche nicht embryonal letal sind.

Die zellspezifische *Lrp1*-Inaktivierung in Runx2-positiven Zellen, also Osteoblasten ^(Ducy et al., 1997) und hypertrophen Chondrozyten ^(Takeda et al., 2001), führt in der Maus zu einer verminderten Knochenmasse. Verfolgt man nun die Überlegungen, welche als Mechanismus für den Phänotyp in der *ApoE*-defizienten Maus in Frage kommen, stellt man fest, dass hier ein anderer Mechanismus ursächlich ist. Zum einen müssten die *Lrp1*-defizienten Osteoblasten weniger CR aufnehmen, was über die geringere Menge an Vitamin K und der daraus resultierenden geringeren Carboxylierung des Osteocalcin zu einer erhöhten Knochenmasse führen würde. Wir sehen jedoch eine verminderte Knochenmasse. Zum anderen kann der beobachtete Phänotyp in den *Lrp1*ΔObl-Mäusen durch die erhöhte Osteoklastenzahl

erklärt werden, während die Knochenbildung nicht beeinträchtigt ist.

Schließlich ist aber das Lrp1 kein Rezeptor, welcher ausschließlich der Endozytose verschiedener Liganden, z.B. CR dient. Er kann zusätzlich intrazellulär Signalwege beeinflussen und interagiert zudem noch mit anderen Rezeptoren ^(May et al., 2005). Der Phänotyp der Lrp1 Δ Obl-Mäuse ließe sich also auch durch einen veränderten intrazellulären Signalweg erklären. Dies ist zum Beispiel bei einem weiteren Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie, dem Lrp5, der Fall. Lrp5 beeinflusst in Verbindung mit Wnt-Molekülen den Frizzled-Rezeptor und weitere Proteine. Das führt dazu, dass an die intrazelluläre Glycogen-synthase-kinase-3 (GSK) kein Axin bindet. Dadurch wird beta-Catenin nicht phosphoryliert und somit auch nicht im Proteosom abgebaut. Wandert schließlich das nicht phosphorylierte beta-Catenin in den Nucleus des Osteoblasten, führt es dort unter anderem zur Transkription von Osteoprotegrin (Opg). Durch die Hemmung der Osteoklasten resultiert dann eine erhöhte Knochenmasse, wenn beta-Catenin Osteoblasten-spezifisch aktiviert wird ^(Glass et al., 2005; Williams und Insogna 2009). Andererseits zeigen Mäuse, bei denen Osteoblasten-spezifisch das beta-Catenin inaktiviert wird, einen osteopenen Phänotyp, da hier die Osteoklasten durch die geringere Opg Produktion weniger gehemmt werden ^(Kramer et al., 2010; Holmen et al., 2005).

Grund für die Annahme, dass auch das Lrp1 ähnliche Signalwege im Osteoblasten beeinflusst, geben die Beobachtungen zur Funktion des Lrp1 in Adipozyten. Hier führt ein Wegfallen des Lrp1 zu einer Erniedrigung des beta-Catenins im Zellkern. Dieser Effekt scheint durch Wnt5a vermittelt zu sein. Ein Anstieg des beta-catenins verursacht im Adipozyten einen Anstieg des intrazellulären Cholesterins ^(Terrand et al., 2008).

Fügt man die Ergebnisse beider Beobachtungen zusammen, kommt man zu der Hypothese, dass wohl auch im Osteoblasten das Lrp1 über einen Wnt-Signalweg den von uns festgestellten Effekt verursacht.

Auffällig und vor allem auf den ersten Blick unverständlich ist die Tatsache, dass, obwohl das Lrp1 nur in Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten nicht exprimiert wird, die Osteopenie vor allem durch die erhöhte Osteoklastenanzahl verursacht wird. Dieses lässt sich jedoch erklären indem man die oben geschilderte Hypothese weiterverfolgt. So bilden beta-Catenin-defiziente Osteoblasten weniger Osteoprotegrin (Opg) ^(Glass II et al., 2005). Opg ist

ein Antagonist des RANK-Liganden (Rankl). Rankl wird vom Osteoklasten zur Differenzierung benötigt. Wenn nun weniger Opg gebildet wird, fehlt die Hemmung auf die Osteoklasten-Differenzierung. Das führt zu einer erhöhten Osteoklastenanzahl, wie es auch in den Lrp1 Δ Obl-Mäusen der Fall ist. Es lässt sich festhalten, dass der oben beschriebene Mechanismus ein möglicher Weg ist, der die Osteoklastenproliferation Lrp1-vermittelt hemmt.

Die Osteopenie ist jedoch nicht die einzige Veränderung, die Lrp1 Δ Obl-Mäuse aufweisen. Unter anderem sind diese Mäuse auch kleiner als die Wildtypen. Während des Knochenwachstums entwickeln sich ständig hypertrophe Chondrozyten in den Wachstumsfugen des Knochens. Für diese Hypertrophie ist die Aktivierung des Runx2-Promotors notwendig. Somit haben neben den Osteoblasten auch die hypertrophen Chondrozyten kein Lrp1 im Runx2-spezifischen Knockout-Mausmodell. Bleibt man bei der Hypothese, dass Lrp1 den Wnt5a-Signalweg beeinflusst, ist dies eine mögliche Erklärung weshalb diese Mäuse kleiner sind, da Wnt5a-defiziente Mäuse ebenso einen Minderwuchs aufweisen (Yamaguchi et al., 1999).

Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob der Phänotyp der Lrp1 Δ Obl-Mäuse tatsächlich durch eine Veränderung des Wnt-Signalweges zustande kommt, und dass Lrp1 somit neben dem Lrp5 ein weiterer wichtiger Regulator des Knochenstoffwechsels ist.

Somit könnten die Ergebnisse diese Arbeit eine wichtige Grundlage für das weitere Verständnis der Rolle des Lrp1 im Knochen sein.

4.3 Lrp1 als zentrales Gen bei der Entstehung von Osteochondromen

Osteochondrome (syn: cartilaginäre Exostosen) sind pathologische knöcherne Strukturen, die mit einer Knorpelkappe bedeckt sind und an der äußeren Seite des Knochens wachsen. Meistens sind die langen Röhrenknochen der Extremitäten betroffen. Multiple Osteochondrome treten bei 1 von 50.000 Personen aus der Gesamtbevölkerung auf (Schmale et al., 1994). Männer scheinen häufiger betroffen zu sein als Frauen. Zudem treten die multiplen Osteochondrome im Durchschnitt sechsmal seltener auf als solitary

Osteochondrome. Bei 62% aller multiplen Osteochondrome ist zu beobachten, dass eine familiäre Häufung besteht ^(Legeai-Mallet et al., 1997).

Osteochondrome haben ihren stärksten Größenzuwachs in der ersten Dekade. Anschließend wachsen sie noch bis zum Schluss der Epiphysenfugen. Danach findet fast kein weiteres Wachstum mehr statt. Patienten mit cartilaginären Exostosen geben oft nur wenig Schmerzen an. Jedoch bestehen sehr häufig starke Deformitäten der Knochen, welche auch zu kosmetischen Entstellungen führen. So können Patienten mit multiplen Osteochondromen unter anderem verbogene Unterarmknochen haben. Aber auch eine disproportionierte Struktur mit verkürzten Extremitäten kann auftreten. Die Wucherungen können aber auch benachbarte Strukturen, wie Sehnen, Gefäße und Nerven, sogar das Rückenmark einengen. Auch können Knochen instabil werden. In beiden Fällen wäre eine Operation indiziert.

Eine große Gefahr bei den eigentlich benignen Osteochondromen ist die maligne Transformation. Diese tritt in etwa 1-5% der Fälle auf ^(Hameetman et al., 2004). Auffällig kann der Übergang in ein malignes Geschehen durch eine Größenzunahme nach Epiphysenschluss oder auch durch Schmerzzunahme werden. Typisch für so eine Transformation wäre auch eine Knorpelkappendicke von über einem Zentimeter.

Die multiplen Osteochondrome werden autosomal-dominant vererbt. Somit haben die Nachkommen eines Betroffenen eine 50%ige Wahrscheinlichkeit zu erkranken, denn diese Tumore zeigen eine fast 100%ige Penetranz ^(Bovée, 2008).

Bei 44-66% der Familien mit Multiplen Osteochondromen spielen Mutationen des Exostosin-1 (EXT1)-Gens eine Rolle bei der Entstehung der Osteochondrome. Mutationen des EXT2 Gen ist nur in 27% der Fälle beteiligt. Beides sind Tumorsuppressorgene aus der EXT-Familie. Alle Mitglieder dieser Genfamilie kodieren für eine Glycosyltransferase welche für die Bindung, aber auch Polymerisation von Heparinsulfat an Heparinsulfatproteoglycanen (HSPG) wichtig ist ^(Esko und Selleck, 2002). Bei Osteochondromzellen verbleiben die HSPG im Zytoplasma, anstatt unter dem Einfluss des EXT an die Zelloberfläche transportiert zu werden ^(Hameetman et al., 2007).

HSPG scheinen eine Rolle bei der Aufnahme des Proteins Indian hedgehog (*Ihh*) zu spielen, welches unter anderem die Chondrozyten-Differenzierung und -Proliferation reguliert ^(Bellaiche et al., 1998; Lai und Mitchell, 2005). Auch das *Lrp1*

interagiert mit HSPGs. In Neuronen beispielsweise wird Amyloid-beta *Lrp1* und HSPG vermittelt aufgenommen (Kanekiyo et al., 2011).

In wie weit die Interaktion zwischen *Lrp1* und HSPG wichtig für die Entstehung von Osteochondromen ist, müssen nun weitere Untersuchungen zeigen.

5 Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Hinweise für eine Interaktion zwischen Fett- und Knochenstoffwechsel. So haben adipöse Menschen an geringeres Osteoporose-Risiko. Zudem konnte für das LDL-Rezeptor-verwandte Protein Lrp5 eine wichtige Funktion im Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden. In vergleichenden Expressionsanalysen von Osteoblasten an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung fiel zudem auf, dass die Expression der Gene *ApoE* und *Lipc*, die für die aus dem Lipoprotein-Stoffwechsel bekannten Proteine Apolipoprotein(E) und Hepatische Lipase kodieren, stark induziert wird. Nachdem in *ApoE*-defizienten Mäusen zuvor eine erhöhte Knochendichte beschrieben wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle der hepatischen Lipase im Knochenstoffwechsel untersucht werden. Zudem wurde ein Mausmodell untersucht, in dem spezifisch in Osteoblasten der Lipoprotein-Rezeptor Lrp1 ausgeschaltet wurde.

Nachdem in dieser Arbeit zunächst gezeigt werden konnte, dass *Lipc* nicht nur in der Leber, sondern auch in Osteoblasten exprimiert wird, wurde im Anschluss der Knochenphänotyp eines *Lipc*-defizienten Mausmodells untersucht. Hier zeigte sich in 6 Monate alten weiblichen Mäusen eine erhöhte Knochendichte im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren, was auf eine Zell-autonome Steigerung der Knochenbildung zurückgeführt werden konnte. Der daraus abgeleitete inhibitorische Einfluss der hepatischen Lipase auf die Knochenbildung ist im Einklang mit klinischen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Frauen mit verringerter Aktivität der hepatischen Lipase eine höhere Knochendichte aufweisen.

Die Osteoblasten-spezifische Inaktivierung von Lrp1 führte hingegen zu einer erniedrigten Knochendichte, die durch eine erhöhte Knochen-Resorption erklärt werden konnte. Zudem konnte in diesen Mäusen eine Verminderung des Längenwachstums sowie die Ausbildung von Osteochondromen nachgewiesen werden, was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, dass die gewählte Strategie auch zur Lrp1-Inaktivierung in hypertrophen Chondrozyten geführt hat.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Prozessierung und Aufnahme von Lipoproteinen für die Regulation des

Knochenstoffwechsels von zentraler Bedeutung ist, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch weiterführend untersucht werden müssen.

6 Literaturverzeichnis

Amling M und Delling G „Osteoklastenbiologie: Bedeutung im Rahmen von Knochenmetastasen.“ *Der Orthopäde* 27 (1998): 214-223.

Bellaiche Y, The I, Perrimon T „Tou-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion.“ *Nature* 394 (1998): 85-88.

Bovée JV. „Multiple osteochondromas.“ *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3 (2008).

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. „High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor–Related Protein 5.“ *The New England Journal of Medicine* 346 (2002): 1513-1521.

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

Cordie, SR, Yeaman SJ, und Clegg RA „Salt-resistant (hepatic) lipase. Evidence for its presence in bovine liver and adrenal cortex.“ *Biochim Biophys Acta*. 753 (1983): 213-219.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, und Varanasi SS. „The cell biology of bone metabolism.“ *Journal of Clinical Pathology* 61 (2008): 577-587.

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

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

Duque G. „Bone and fat connection in aging bone.“ *Current Opinion in Rheumatology* 20 (2008): 429-434.

Esko JD und Selleck SB. „Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate.“ *Annu Rev Biochem* 71 (2002): 435–471.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA und Karsenty G.. „Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation.“ *Developmental Cell* 8 (2005): 751-764.

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

Hameetman L, Szuhai K, Yavas A, Knijnenburg J, van Duin M, van Dekken H, Taminiau AH, Cleton-Jansen AM, Bovée JV, Hogendoorn PC. „The Role of EXT1 in Nonhereditary Osteochondroma: Identification of Homozygous Deletions.“ *Journal of the National Cancer Institute* 99 (2007): 396-406.

Hameetman L, Bovée JV, Taminiau AH, Kroon HM, Hogendoorn PC. „Multiple Osteochondromas: Clinicopathological and Genetic Spectrum and Suggestions for Clinical Management.“ *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2004; 2(4) pp. 161-173 2 (2004): 161-173.

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. „LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way.“ *Development* 131 (2004): 1663-1677.

Herz, J, DE Clouthier, und RE Hammer. „LDL Receptor-Related Protein Internalizes and Degrades uPA-PAI-I Complexes and Is Essential for Embryo Implantation.“ *Cell* 71 (1992): 411-421. (Correction: *Cell* 73 (1993) 428)

Hixenbaugh EA, Sullivan TR Jr, Strauss JF 3rd, Laposata EA, Komaromy M, Paavola LG. „Hepatic lipase in the rat ovary. Ovaries cannot synthesize hepatic lipase but accumulate it from the circulation.“ *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1989): 4222-4230.

Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. „Essential Role of beta-Catenin in Postnatal Bone Acquisition.“ *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005): 21162–21168.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. „Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation.“ *Developmental Cell* 8 (2005): 751-764.

Kanekiyo T, Zhang J, Liu Q, Liu CC, Zhang L, Bu G. „Heparan Sulphate Proteoglycan and the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Constitute Major Pathways for Neuronal Amyloid-beta Uptake.“ *The Journal of Neuroscience* 31 (2011): 1644 –1651.

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

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. „The osteocyte.“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004) 1–8 36 (2004): 1-8.

Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. „Osteocyte Wnt/beta-Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis.“ *Molecular and Cellular Biology* 30 (2010): 3071–3085.

Lai LP, Mitchell J. „Indian Hedgehog: Its Roles and Regulation in Endochondral Bone Development.“ *J Cell Biochem* 96 (2005): 1163-1173.

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

Legeai-Mallet L, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M. „Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses.“ *Clin Genet.* 52 (1997): 12-16.

Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. „LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies.“ *Physiol Rev* 88 (2008): 887–918.

Lindvall C, Bu W, Williams BO, Li Y. „Wnt Signaling, Stem Cells, and the Cellular Origin of Breast Cancer.“ *Stem Cell Rev* 3 (2007): 157–168.

Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. „A Mutation in the LDL Receptor-Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High–Bone-Mass Trait.“ *American Journal of Human Genetics* 70 (2002): 11-19.

May P, Herz J, Bock HH. „Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling.“ *Cell. Mol. Life Sci.* , Nr. 62 (2005): 2325-2338.

Niehrs, C. „Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators Dickkopf review.“ *Oncogene* 25 (2006): 7469-7481.

Niemeier A, Kassem M, Toedter K, Wendt D, Ruether W, Beisiegel U, Heeren J. „Expression of LRP1 by Human Osteoblasts: A Mechanism for the Delivery of Lipoproteins and Vitamin K1 to Bone.“ *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2005): 283-293.

Niemeier A, Niedzielska D, Secer R, Schilling A, Merkel M, Enrich C, Rensen PC, Heeren J. „Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: Impact on osteoblast function.“ *Bone* 43 (2008): 230-237.

Nong Z, Gonzalez-Navarro H, Amar M, Freeman L, Knapper C, Neufeld EB, Paigen BJ, Hoyt RF, Fruchart-Najib J, Santamarina-Fojo S. „Hepatic lipase expression in macrophages contributes to atherosclerosis in apoE-deficient and LCAT-transgenic mice.“ *J. Clin. Invest.* 112 (2003): 367-378.

Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. „Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants.“ *J. Clin. Invest.* 101 (1998): 689–695.

Schilling AF, Schinke T, Münch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M. „Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E.“ *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2005): 274-282.

Schmale GA, Conrad EU 3rd, Raskind WH. „The natural history of hereditary multiple exostoses.“ *J Bone Joint Surg Am* 76 (1994): 986-992.

Semenov MV, He X. „LRP5 Mutations Linked to High Bone Mass Diseases Cause Reduced LRP5 Binding and Inhibition by SOST.“ *The Journal of Biological Chemistry* 281, Nr. 50 (2006): 38276-38284.

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. „Continuous expression of Cbfa1 in non-hypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocytes differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice.“ *Genes & Development* 15 (2001): 467-481.

Teitelbaum SL. „Bone Resorption by Osteoclasts.“ *Science* 289 (2000): 1504-1508.

Terrand J, Bruban V, Zhou L, Gong W, El Asmar Z, May P, Zurhove K, Haffner P, Philippe C, Woldt E, Matz RL, Gracia C, Metzger D, Auwerx J, Herz J, Boucher P. „LRP1 Controls Intracellular Cholesterol Storage and Fatty Acid Synthesis through Modulation of Wnt Signaling.“ *Journal of Biological Chemistry* 284 (2008): 381-388.

Verhoeven AJ, Carling D, Jansen H. „Hepatic lipase gene is transcribed in rat adrenals into a truncated mRNA.“ *Journal of Lipid Research* 35 (1994): 966-975.

Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Bénichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. „Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density.“ *American Journal of Human Genetics* 72 (2003): 763-771.

Williams BO, Insogna KL. „Where Wnts Went: The Exploding Field of Lrp5 and Lrp6 Signaling in Bone.“ *JBMR* 24 (2009): 171–178.

Yamada Y, Ando F, Shimokata H. „Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men.“ *International Journal of Molecular Medicine* 19 (2007): 791-801.

Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. „A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo.“ *Development* 126 (1999): 1211-1223.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Amling möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit danken.

Bei Herrn PD Dr. Thorsten Schinke und Herrn Prof. Dr. Arndt Schilling bedanke ich mich für die exzellente Betreuung und die vielen guten Anregungen, sowie die hervorragende Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit. Arndt verstand es einen trotz teils frustrierender Experimente durch seine neuen Ideen einen stets zu motivieren. Thorsten hat ungeachtet zahlreicher anderer Projekte auch bei meinem Projekt nie den Überblick verloren und hat durch konstruktive Vorschläge zum Gelingen dieser Arbeit sehr viel beigetragen.

Ein sehr großer Dank geht an meine Eltern Leyla und Yasar Yilmaz, die durch ihre grenzenlose Liebe mich stets unterstützt haben.

Auch meinem Bruder Timur Yilmaz möchte ich von ganzem Herzen danken, da er stets neben der Architektur, meiner Nichte Jasmin und meinem Neffen Tijan noch genügend Zeit gefunden hat für konstruktive Diskussionen und moralischen Rückhalt.

Vanessa möchte ich für die hervorragende Unterstützung, die sie mir gegen Ende dieser Arbeit zeigte vom ganzen Herzen danken.

Auch gilt mein herzlicher Dank der gesamten Arbeitsgruppe. Insbesondere Marcus, Jochen, Joachim, Johannes, Tim, Timo, Phillip, Sebastian, Percy und Michael für die tolle Zusammenarbeit und die fröhliche Seite der Forschung.

Vielen lieben Dank!

8 Curriculum Vitae

Vor-und Nachname:	Tayfun Yilmaz
Geburtstag:	30. September 1983
Geburtsort:	Hamburg
1989-1993	Grundschule Arnkielstraße, Hamburg
1993-2002	Gymnasium Allee, Hamburg
2002-2008	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2008	Erteilung der Approbation als Arzt
Seit Mai 2009	Assistenzarzt am Department Orthopädie und Traumatologie Universitätsklinikum Freiburg (Direktor: Prof. Dr. med. N. Südkamp)
Seit 2006	Dissertation „ Lipide und Knochen - Untersuchungen zur Funktion der Hepatischen Lipase und Lrp1 (LDL-Receptor- related protein-1) im Knochenstoffwechsel“ Institut für Osteologie und Biomechanik Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

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.