

Aus dem Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie
und der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Apolipoprotein E im Knochengewebe: Bedeutung für den Knochen- und Energiestoffwechsel

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Chemie

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Brigitte Margit Müller

aus Hammelburg

Hamburg 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Rentmeister

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Niemeier

Datum der Disputation: 21. November 2014

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Knochenstoffwechsel	1
1.1.1 Knochenaufbau und -struktur.....	1
1.1.2 Knochenspezifische Zelltypen.....	2
1.1.2.1 Osteoblasten.....	2
1.1.2.2 Osteozyten.....	4
1.1.2.3 Osteoklasten.....	5
1.1.3 Knochen-Remodeling-Prozesse	6
1.1.3.1 Knochenabbau im Rahmen des Knochen-Remodelings	6
1.1.3.2 Knochenbildung im Rahmen des Knochen-Remodelings.....	8
1.1.3.3 Regulation von Knochen-Remodeling-Prozessen.....	9
1.1.4 Knochenerkrankungen.....	11
1.2 Lipoproteinstoffwechsel.....	13
1.2.1 Aufbau und Funktion von Lipoproteinen.....	13
1.2.2 Bedeutung von Apolipoprotein E im Lipidstoffwechsel.....	13
1.2.3 Der Weg der Lipide durch den Körper	14
1.3 Interaktion des Knochen- und Energiestoffwechsels.....	17
1.3.1 Wechselwirkungen über Hormone und Zytokine.....	17
1.3.2 Einfluss von Apolipoprotein E auf den Knochenstoffwechsel.....	19
1.4 Ziele der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Arbeitsgeräte.....	23
2.1.2 Software.....	24
2.1.3 Gebrauchsmaterial	24
2.1.4 Chemikalien, Kits und Reagenzien.....	25
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Haltung und Zucht verschiedener Mausmodelle	29

2.2.2	Genotypisierung der Mauslinien.....	30
2.2.2.1	<i>ApoE</i> -Knockout-PCR.....	31
2.2.2.2	<i>ApoE_{flox}</i> -PCR.....	32
2.2.2.3	<i>Runx2-Cre</i> -PCR.....	32
2.2.2.4	<i>OC-Cre</i> -PCR.....	33
2.2.2.5	<i>LysM-Cre</i> -PCR.....	35
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.3.1	Differenzierung von primären Osteoblasten aus Calvaria.....	36
2.2.3.2	Differenzierung von primären Osteoblasten aus Knochenmark.....	37
2.2.3.3	Isolierung von primären Chondrozyten.....	37
2.2.3.4	Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmark.....	38
2.2.3.5	Isolierung von primären Hepatozyten.....	38
2.2.3.6	Immunfluoreszenz-Färbung.....	38
2.2.4	RNA-Isolierung und quantitative Real-Time-PCR.....	39
2.2.5	Metabolische Untersuchungen an der Maus.....	40
2.2.5.1	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT).....	40
2.2.5.2	Oraler Fett-Toleranz-Test (OFTT).....	40
2.2.6	Knochenstrukturanalysen.....	41
2.2.6.1	Immunhistochemie.....	41
2.2.6.2	Histomorphometrie.....	42
2.2.6.2.1	Von Kossa-/van Gieson-Färbung.....	42
2.2.6.2.2	Toluidinblau-Färbung.....	43
2.2.6.3	μ -Computer-Tomographie-Analysen.....	43
2.2.7	Analysen von Blut, Urin und Zellkulturüberständen.....	44
2.2.7.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	44
2.2.7.2	Kolorimetrische Messungen.....	44
2.2.7.3	Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität.....	45
2.2.8	Statistik.....	45
3.	Ergebnisse.....	47
3.1	Voruntersuchungen im <i>ApoE</i> ^{-/-} -Mausmodell.....	48
3.1.1	Expression von ApoE im Knochen.....	48
3.1.2	Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären Osteoblasten.....	50

3.2	Charakterisierung des <i>ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre</i> -Mausmodells	54
3.2.1	Osteoblastenspezifische Reduktion von ApoE.....	55
3.2.2	Untersuchung des Energiestoffwechsels.....	56
3.2.3	Analyse der Knochenstruktur	59
3.2.3.1	Histomorphometrische Analyse der Lendenwirbelkörper.....	59
3.2.3.2	µ-Computer-Tomographie-Analyse der Femora.....	61
3.2.4	Bestimmung von Knochenbauparametern im Serum und Urin	63
3.2.5	Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von primären <i>ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre</i> -Osteoblasten.....	66
3.3	Charakterisierung des <i>ApoE^{fllox/fllox}-OC-Cre</i> -Mausmodells	69
3.3.1	Osteoblastenspezifische Reduktion von ApoE.....	69
3.3.2	Untersuchung des Energiestoffwechsels.....	71
3.3.3	Analyse der Knochenstruktur	73
3.3.4	Bestimmung von Knochenbauparametern im Serum und Urin	76
3.3.5	Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von primären <i>ApoE^{fllox/fllox}-OC-Cre</i> -Osteoblasten	77
3.4	Charakterisierung des <i>ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre</i> -Mausmodells.....	80
3.4.1	Osteoklastenspezifische Reduktion von ApoE.....	80
3.4.2	Analyse der Knochenstruktur	81
3.4.2.1	Histomorphometrische Analyse der Lendenwirbelkörper.....	82
3.4.2.2	µ-Computer-Tomographie-Analyse der Femora.....	83
3.4.3	Bestimmung von Knochenbauparametern im Serum und Urin	85
4.	Diskussion.....	87
4.1	Expression von ApoE im Knochen.....	88
4.2	Einfluss von ApoE auf die Osteoblastendifferenzierung in vitro.....	88
4.3	Bedeutung von Osteoblasten-ApoE in vivo	89
4.3.1	Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf den Energiestoffwechsel.....	91
4.3.2	Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf den Knochenstoffwechsel.....	91
4.4	Bedeutung von Osteoklasten- und Makrophagen-ApoE in vivo.....	95
5.	Zusammenfassung.....	99
6.	Summary	101

Literaturverzeichnis	103
Abbildungsverzeichnis.....	119
Tabellenverzeichnis	123
Abkürzungsverzeichnis.....	125
Verwendete Gefahrstoffe.....	129
Danksagung.....	135
Eidesstattliche Versicherung.....	137
Lebenslauf.....	139

1. Einleitung

1.1 Knochenstoffwechsel

Der Knochen (lat.: Os) stellt ein besonderes Bindegewebe dar, das sich durch seine mineralisierte extrazelluläre Matrix auszeichnet und neben der Aufgabe als strukturelle innere Stütze des Körpers eine Vielzahl weiterer Aufgaben hat. So ermöglicht es gemeinsam mit der Muskulatur die Bewegung des Körpers, unterstützt und schützt lebensnotwendige Organe wie das Herz, die Lunge und das Gehirn und bietet im Knochenmark ein spezialisiertes Mikromilieu für das blutbildende System (Calvi et al., 2003). Außerdem fungiert der Knochen als Mineralienreservoir und ist dadurch zentral an der Regulation der Calcium- und Phosphat-Homöostase beteiligt. Jüngere Forschungsarbeiten an Mäusen zeigen darüber hinaus die bis dato unbekannt Funktion des Knochens als endokrines Organ im Energiemetabolismus (Ferron et al., 2010; Lee et al., 2007) und in der Regulation der männlichen Fertilität (Oury et al., 2011).

1.1.1 Knochenaufbau und -struktur

Knochen besteht aus einer organischen Matrix, die zu 85-90 % aus Kollagenfasern gebildet wird, und einem darin eingelagerten anorganischen Anteil der etwa 60-70 % des Trockengewichts ausmacht. Dieser besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), die sich vor allem durch ihre äußerst kleine Kristallgröße sowie ihre kristalline und chemische Unvollkommenheit auszeichnen und somit ein reaktives Material bilden, das skelettale Umbauprozesse erst ermöglicht. Durch die Kombination aus Mineral- und Proteinfraction wird schließlich die benötigte biomechanische Festigkeit und Flexibilität erreicht (Posner, 1985). Zudem besteht das Knochengewebe aus zwei architektonisch differenzierten Kompartimenten, dem kortikalen und dem trabekulären Knochen. Die äußere kompakte Hülle wird durch den kortikalen Knochen gebildet und ist von besonderer mechanischer Stabilität gekennzeichnet. Vor allem das axiale Skelett sowie die Meta- und Epiphysen der Röhrenknochen werden im Inneren durch die schwammartige Struktur des trabekulären Knochens (Spongiosa) unterstützt, der durch sein verzweigtes Netzwerk aus Trabekeln eine sehr große Oberfläche besitzt und metabolisch hoch aktiv ist (Zaidi, 2007).

1.1.2 Knochenspezifische Zelltypen

Im Knochengewebe findet man drei spezifische Zelltypen: knochenbildende Osteoblasten, knochenabbauende Osteoklasten und in die mineralisierte Knochenmatrix eingebettete Osteozyten (Abbildung 1). Alle drei Zelltypen spielen eine essentielle und hoch spezialisierte Rolle für die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase und die Erfüllung der vielfältigen Aufgaben des Knochens.

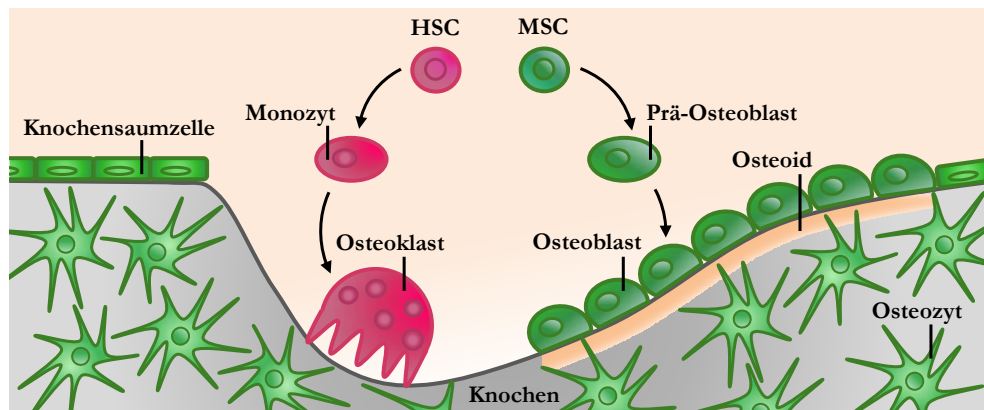


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen knochenspezifischen Zelltypen.

Die Knochenhomöostase wird durch Osteoklasten, die für die Knochenresorption verantwortlich sind, und Osteoblasten, die für die Knochenbildung zuständig sind, erreicht. Osteoblasten bilden sich über Prä-Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Eine Untergruppe der Osteoblasten kann sich schließlich zu Osteozyten entwickeln, indem sie in die Knochenmatrix eingebettet werden. Die restlichen Osteoblasten gehen in Apoptose oder werden zu inaktiven Knochensaumzellen. Osteoklasten sind multinukleare resorptive Zellen, die von Monozyten abstammen, welche wiederum aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) hervorgehen (Grafik in Anlehnung an Long (2012)).

1.1.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind quaderförmige Zellen mit einem zentralen Nukleus, die wie eine Perlenkette auf der Knochenoberfläche sitzen. Die Zellen der Osteoblastenlinie gehen wie Myozyten, Adipozyten und Chondrozyten aus mesenchymalen Stammzellen hervor (Abbildung 2). Die chondrogene und osteoblastäre Zelllinie stammen von gemeinsamen Sex Determining Region Y (SRY)-box (Sox) 9-exprimierenden Vorläuferzellen ab, bevor sich die beiden Linien trennen (Akiyama et al., 2005). Der Beginn und Verlauf der Osteoblastendifferenzierung wird durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert. Der Hedgehog-Signalweg scheint vor allem in der enchondralen Ossifikation die Osteoblastendifferenzierung zu aktivieren (St-Jacques et al., 1999). Diesem nachgelagert treibt der kanonische WNT-Signalweg die Osteoblastendifferenzierung weiter voran. So führt eine Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein (LRP) 5- oder WNT10b-Defizienz zu einer verminderten Knochenmasse (Bennett et al., 2005; Kato et al., 2002), und die Deletion von β -

Catenin in embryonalen mesenchymalen Vorläuferzellen verhindert die Bildung von reifen Osteoblasten (Hu et al., 2005). Der Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Signalweg stimuliert ebenfalls die osteoblastäre Differenzierung und Funktion, wirkt sich aber auch hemmend auf den kanonischen WNT-Signalweg aus (Bandyopadhyay et al., 2006; Kamiya et al., 2008). Zudem wird die Proliferation von Prä-Osteoblasten, die Osteoblastendifferenzierung und die Aktivität von reifen Osteoblasten durch den Fibroblast Growth Factor (FGF)-Signalweg reguliert (Montero et al., 2000; Yu et al., 2003). Diese Aufzählung macht deutlich, dass eine Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege am Prozess der Osteoblastendifferenzierung beteiligt ist und während der Differenzierung in einem komplexen Zusammenspiel integriert wird.

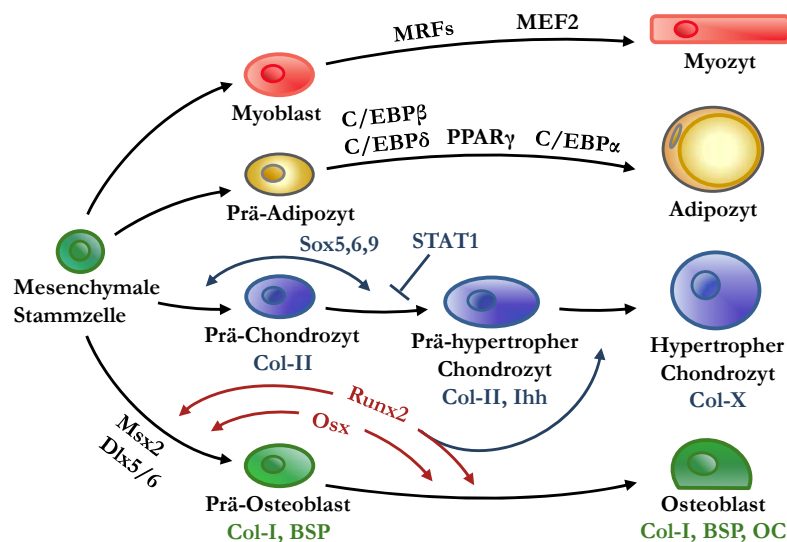


Abbildung 2: Transkriptionelle Kontrolle der osteoblastären, chondrozytären, adipozytären und myozytären Differenzierung.

Osteoblasten differenzieren aus den gleichen mesenchymalen Progenitorzellen, aus denen auch Myozyten, unter der Kontrolle von Myogenic Regulatory Factors (MRFs) und Myocyte-enhancer Factor 2 (MEF2), Adipozyten unter der Kontrolle von CCAAT-Enhancer-binding Protein (C/EBP) α , β und δ und Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) sowie Chondrozyten unter der Kontrolle von Sex Determining Region Y (SRY)-box (Sox) 5, 6 und 9 und Signal Transducers and Activators of Transcription-1 (STAT1) hervorgehen. Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2) ist für die Differenzierung von Osteoblasten erforderlich, ist aber auch im Rahmen der enchondralen Ossifikation am Übergang zu prä-hypertrophen Chondrozyten beteiligt. Osterix (Osx) wirkt nachgelagert von Runx2 und induziert reife Osteoblasten, die Osteoblastenmarker einschließlich Osteocalcin (OC) exprimieren. Abkürzungen: Col-I/II/X, Kollagen Typ I/II/X; Ihh, Indian Hedgehog; BSP, Bone Sialoprotein (Grafik in Anlehnung an Harada und Rodan (2003)).

Der Transkriptionsfaktor Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2) gilt als erster spezifischer und unverzichtbarer Marker der Osteoblastenlinie (Ducy et al., 1997), wird aber auch in prä-hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Enomoto et al., 2000). Runx2-Defizienz führt zu einem vollständigen Stillstand der Osteoblastendifferenzierung und so besitzen *Runx2*-Knockout-Mäuse ein knorpeliges Skelett ohne Osteoblasten und ohne

Knochenmatrix (Komori et al., 1997). Runx2 wird jedoch nicht nur während der Osteoblastogenese benötigt, sondern ist auch in reifen Osteoblasten für die Knochenbildung notwendig (Ducy et al., 1999). Weitere frühe Marker der Osteoblastendifferenzierung sind die Transkriptionsfaktoren Msh Homeobox Homologue 2 (Msx2) und Distal-less Homeobox 5 (Dlx5) (Ichida et al., 2004; Lee et al., 2003). Osterix (Osx) ist der zweite essentielle Transkriptionsfaktor der Osteoblastenlinie und scheint seine Funktion nachgelagert von Runx2 auszuüben, da mesenchymale Zellen in *Osx*-Knockout-Mäusen auch bei normaler Runx2-Expression nicht zu Osteoblasten differenzieren und keine Knochenmatrix ablagern (Nakashima et al., 2002). Activating Transcription Factor 4 (ATF4) stellt schließlich einen wichtigen Transkriptionsfaktor reifer Osteoblasten dar. *Atf4*-Knockout-Mäuse weisen eine reduzierte und verzögerte Knochenmineralisierung auf und haben eine verminderte Knochenmasse (Yang et al., 2004). Zudem moduliert ATF4 die Expression der späten Osteoblastenmarker Bone Sialoprotein und Osteocalcin und des Osteoklasten stimulierenden Faktors Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) (Eleftheriou et al., 2005; Xiao et al., 2005).

Da Osteoblasten für die Produktion der organischen Knochenmatrix zuständig sind, sezernieren sie große Mengen an Proteinen wie alkalische Phosphatase, Bone Sialoprotein, Osteocalcin und vor allem Kollagen Typ I (Nagata et al., 1991). Zudem ermöglichen und kontrollieren sie die anschließende Matrixmineralisierung und sind an der Regulierung der Osteoklastenaktivität beteiligt (Takahashi et al., 1999). Während der Knochenbildung wird ein Teil der Osteoblasten in die neu entstehende Knochenmatrix eingebettet und differenziert zu Osteozyten. Ein weiterer Teil verbleibt am Ende der Knochenbildungsphase auf der Oberfläche des neu gebildeten Knochens, flacht ab und wird zu ruhenden, inaktiven Knochensaumzellen. Die restlichen Osteoblasten verschwinden schließlich, indem sie in Apoptose gehen (Jilka et al., 1998).

1.1.2.2 Osteozyten

Osteozyten machen über 95 % der Knochenzellen im erwachsenen Skelett aus. Beim Übergang vom reifen Osteoblast zum Osteozyt reduziert die Zelle die Produktion von Knochenmatrixproteinen und wird von den umliegenden Osteoblasten mehr und mehr in die Matrix eingebaut bis sie sich in einem Hohlraum umgeben von mineralisierter Knochenmatrix befindet. Bei diesem Prozess verändert sich die Gestalt der Zelle dramatisch. Die Zelle wird sternförmig und bildet zahlreiche dendritische Fortsätze, die sich in kleinen

Kanälen hauptsächlich in Richtung der Mineralisierungsfront ausdehnen. Über diese Dendriten stehen Osteozyten sowohl in Kontakt miteinander als auch mit Zellen an der Knochenoberfläche und im Knochenmark sowie mit Blutgefäßen. Dieses Netzwerk aus kleinen Kanälen ermöglicht die Nährstoffversorgung und Kommunikation der Osteozyten (Dallas et al., 2013). Der Übergang zum osteozytischen Phänotyp wird zudem durch Veränderungen der Genexpression begleitet. Dabei wird die Expression von Genen wie Kollagen Typ I und alkalische Phosphatase herunterreguliert, während die Expression von Dentin Matrix Protein 1 (DMP1), Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) und Phosphate-regulating Gene with Homologies to Endopeptidases on the X Chromosome (PHEX) ansteigt (Nampei et al., 2004; Toyosawa et al., 2001; Ubaidus et al., 2009). Die Induktion von Sclerostin (SOST) kennzeichnet schließlich den reifen Osteozyten-Phänotyp (Winkler et al., 2003).

Osteozyten spielen eine entscheidende Rolle für die Knochenhomöostase im erwachsenen Skelett, da sie hormonelle und mechanische Signale wahrnehmen und verarbeiten können und daraufhin Knochenumbauprozesse durch Regulation der Osteoblasten- und Osteoklastenfunktion in Gang setzen (Tan et al., 2007; Tatsumi et al., 2007; Vezeridis et al., 2006). Zudem können Osteozyten als endokrine Zellen die Phosphat-Homöostase regulieren, indem sie über einen DMP1- und PHEX-vermittelten Prozess die Expression von FGF23 steuern, welcher sich schließlich auf die renale Phosphat-Reabsorption auswirkt (Martin et al., 2011; Zhang et al., 2011). Außerdem sind Osteozyten direkt an der Knochenmineralisierung und deren Regulation beteiligt (Addison et al., 2008; Atkins et al., 2011; Barragan-Adjemian et al., 2006; Sitara et al., 2008).

1.1.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind riesige Zellen mit mehreren Zellkernen, die aus der Fusion mononukleärer Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie hervorgehen, welche sich wiederum aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln (Takahashi et al., 1988; Walker, 1975). Zu Beginn der Osteoklastogenese ist der Transkriptionsfaktor PU.1 unbedingt erforderlich, da gezeigt wurde, dass PU.1-defiziente Mäuse durch die Abwesenheit von Osteoklasten und Makrophagen charakterisiert sind (Tondravi et al., 1997). PU.1 treibt zusammen mit MITF die Expression des Macrophage Colony-stimulating Factor (M-CSF)-Rezeptors voran (DeKoter et al., 1998). Daraufhin induziert M-CSF die Expression von Receptor Activator of NF- κ B (RANK) an der Zelloberfläche von Osteoklasten, was die Grundlage für alle

weiteren Differenzierungsschritte darstellt (Kwon et al., 2005). Außerdem fördert M-CSF die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen und liefert wichtige Überlebenssignale (Woo et al., 2002). Die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK führt neben der Stimulation des Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- und Nuclear Factor (NF)- κ B-Signalwegs auch zur Transkription und Aktivierung des essentiellen Transkriptionsfaktors Nuclear Factor of Activated T Cells c1 (NFATc1) (Asagiri et al., 2005). Zudem werden die Activator Protein-1 (AP-1)-Bestandteile c-Fos und c-Jun, die ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Osteoklastogenese spielen, induziert und aktiviert (Grigoriadis et al., 1994; Ikeda et al., 2004). Daraufhin ermöglichen die aktivierten Transkriptionsfaktoren die Expression etlicher Proteine, wie Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRAP, *Acp5*), Cathepsin K (*Ctsk*), Calcitonin-Rezeptor (*Calcr*) und Dendritic Cell-specific Transmembrane Protein (DC-STAMP) und treiben damit die Differenzierung voran, was bei weiterer M-CSF- und RANKL-Stimulation zur Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen und schließlich zur vollständigen Aktivierung der Osteoklasten führt (Takayanagi et al., 2002; Yagi et al., 2007). Da Osteoklasten darauf spezialisiert sind die Knochenmatrix abzubauen, enthalten sie eine große Anzahl an Mitochondrien und säurehaltigen Vakuolen, in denen saure Phosphatasen, Kollagenasen und andere lysosomale Enzyme gespeichert sind. Bei Aktivierung polarisieren die Zellen und bilden eine abgedichtete Resorptionslakune mit der Knochenoberfläche, in die sie Säuren und proteolytische Enzyme sezernieren, die dann den Knochen lokal abbauen (Boyce et al., 2012).

1.1.3 Knochen-Remodeling-Prozesse

Das Knochengewebe muss Zeit seines Lebens für seine Integrität und Stabilität sorgen und deshalb in der Lage sein, sich an mechanische Belastungen anzupassen, Schäden zu beseitigen und für die Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase zu sorgen. Um den vielfältigen Funktionen gerecht werden zu können, unterliegt das Knochengewebe daher kontinuierlichen Umbauprozessen, bei denen alter oder beschädigter Knochen abgebaut und durch neuen an gleicher oder anderer Stelle ersetzt wird.

1.1.3.1 Knochenabbau im Rahmen des Knochen-Remodelings

Zu Beginn eines Knochenumbauprozesses werden Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Blut und Knochenmark durch Chemokine und Zytokine, wie M-CSF und RANKL, zur

Knochenoberfläche rekrutiert und differenzieren dort zu Osteoklasten (Kodama et al., 1993). Diese wandern dabei in Knochenbereiche ein, von denen sich die Knochensaumzellen zuvor gelöst haben und sich wie ein Dach über der Knochenoberfläche erstrecken (Hauge et al., 2001). Daraufhin erkennt das Zelloberflächenprotein $\alpha_v\beta_3$ -Integrin die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) auf Knochenmatrixproteinen (Oldberg et al., 1986) und es kommt zu einer grundlegenden Reorganisation des Zytoskeletts, die unter Bildung eines Aktin-Rings zu einer festen Bindung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche führt (Faccio et al., 2003). Bei diesem Prozess entsteht ein abgedichteter Hohlraum zwischen dem Osteoklasten und der Knochenoberfläche, die Resorptionslakune (Abbildung 3). Durch Veränderungen im vesikulären Transport bilden die Osteoklasten im Bereich der Resorptionslakune eine stark gefaltete Membranstruktur (sog. „Ruffled Border“) aus und erschaffen ein extrazelluläres resorptives Kompartiment, indem sie lysosomale Proteasen, wie Cathepsin K und TRAP in die Resorptionslakune sezernieren. H^+ -ATPasen akkumulieren in der „Ruffled Border“-Membran und pumpen die durch Carboanhydrasen gebildeten Protonen auf die Knochenoberfläche (Baron et al., 1985; Blair et al., 1989), während Cl^- -Ionen über den Chlorid-Kanal $ClC-7$ in die Resorptionslakune gelangen (Kornak et al., 2001). Die sich dort bildende Salzsäure demineralisiert den Knochen und legt die organische Matrix frei, was schließlich den Abbau von Kollagen Typ I, dem Hauptbestandteil der organischen Matrix, durch Kollagenasen wie Cathepsin K ermöglicht (Saftig et al., 1998). Die Abbauprodukte der Knochenmatrixproteine werden dann von den Osteoklasten durch Endozytose aufgenommen, durch das Zytoplasma transportiert und durch Exozytose in den extrazellulären Raum freigesetzt, von wo aus sie in den Blutkreislauf gelangen (Salo et al., 1997). Daher ist es möglich, durch Messung der Kollagenabbauprodukte im Serum oder Urin indirekt die Knochenresorptionsrate zu bestimmen. Haben Osteoklasten ihre Arbeit getan, gehen sie in Apoptose, welche zumindest teilweise durch einen lokalen Anstieg der extrazellulären Calcium-Konzentration während der Knochendemineralisierung induziert wird (Lorget et al., 2000).

Durch die Resorption der Knochenmatrix kommt es zudem zur Freisetzung von in der Matrix gespeicherten Proteinen, welche die Knochenbildung stimulieren, wie zum Beispiel Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), BMPs und Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Diese Wachstumsfaktoren rekrutieren Osteoblastenvorläuferzellen und fördern ihre Differenzierung zu reifen aktiven Osteoblasten (Fuller et al., 2008; Nakasaki et al., 2008; Tang et al., 2009).

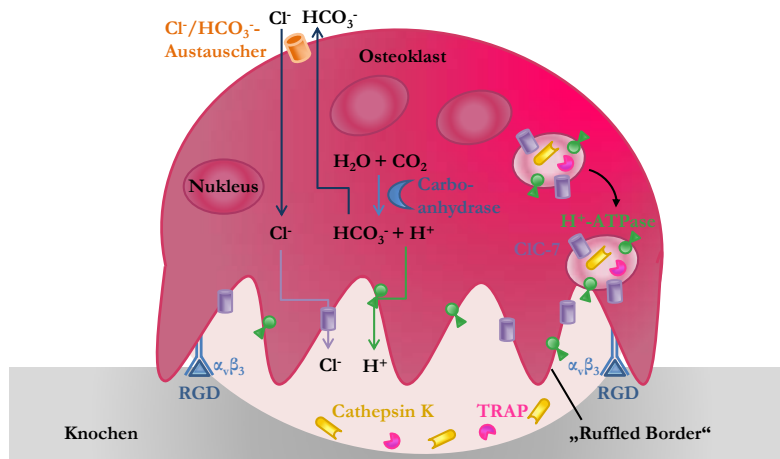


Abbildung 3: Mechanismus der Knochenresorption durch aktivierte Osteoklasten.

Durch die $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Anlagerung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche kommt es zur Bildung eines extrazellulären resorptiven Kompartiments, der Resorptionslakune. Dabei entsteht durch den Transport von Vesikeln an die dem Knochen zugewandte Zelloberfläche die sog. „Ruffled Border“-Membran. Die Azidifizierung der Resorptionslakune wird durch die Carboanhydrase eingeleitet, indem diese H^+ - und HCO_3^- -Ionen bildet. Die H^+ -Ionen werden dann über eine Protonenpumpe (H^+ -ATPase), die sich nur in der „Ruffled Border“-Membran befindet, aus der Zelle in die Resorptionslakune transportiert. Über einen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher, der sich an der nicht-resorptiven Zelloberfläche befindet, und den Chlorid-Kanal CIC-7 in der „Ruffled Border“-Membran werden Cl^- -Ionen in die Resorptionslakune transportiert. Nach der Degradation des anorganischen Minerals infolge des niedrigen pH-Werts wird die organische Knochenmatrix durch Cathepsin K abgebaut (Grafik in Anlehnung an Novack und Teitelbaum (2008)).

1.1.3.2 Knochenbildung im Rahmen des Knochen-Remodelings

Nachdem Osteoblastenvorläuferzellen durch Wachstumsfaktoren und Chemokine zur Resorptionslakune rekrutiert wurden, reifen sie zu Osteoblasten, lagern sich an die erodierte Knochenoberfläche an und beginnen organische Komponenten der Knochenmatrix, das sogenannte Osteoid, zu sezernieren, welches zu 85-90 % aus Kollagen Typ I besteht und zusätzlich diverse nicht-kollagene Proteine wie alkalische Phosphatase, Bone Sialoprotein, Osteopontin und Osteocalcin sowie Wachstumsfaktoren enthält (Hauschka et al., 1989; Nagata et al., 1991; Nakasaki et al., 2008). Während dieses Prozesses werden einzelne Osteoblasten in der sich bildenden Osteoidmatrix lebend begraben, wo sie letztendlich zu Osteozyten differenzieren. Etwas zeitversetzt zum Beginn der Osteoidablagerung beginnt die Mineralisierung gleichzeitig an mehreren Stellen der extrazellulären Matrix, wobei die Entstehung von Kristallisationskeimen durch aktiv von Osteoblasten gebildete Matrixvesikel und Kollagen in Verbindung mit anionischen Matrixproteinen initiiert und kontrolliert wird. Die calcium- und phosphathaltigen Matrixvesikel werden von reifen Osteoblasten und Osteoid-Osteozyten abgeschnürt, bilden Hydroxylapatitkristalle und binden an umliegende Kollagenfasern, was schließlich zur Ablagerung und Ausbreitung der Kristalle zwischen den Kollagenfasern führt (Barragan-Adjemian et al., 2006). Kollagenmoleküle haben

aber auch selbst die Fähigkeit durch ihre molekulare Struktur (geladene Seitenketten) und Anordnung (Bildung von Kanälen) die Bindung von Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen und die Entstehung von Kristallisationskeimen zu begünstigen (Landis und Silver, 2009). Nach der initialen Keimbildung verläuft das Wachstum und die Entwicklung der Hydroxylapatitkristalle spontan durch Anlagerung von Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen aus der übersättigten extrazellulären Flüssigkeit, wobei nicht-kollagene Proteine der extrazellulären Matrix diese Schritte über die Interaktion mit Mineralien kontrollieren (Hunter et al., 1996). Außerdem ist die alkalische Phosphatase von großer Bedeutung für das Kristallwachstum, da dieses Enzym Pyrophosphat, welches die Bildung von Hydroxylapatit hemmt, hydrolysiert und damit zusätzlich PO_4^{3-} -Ionen für die Mineralisierung bereitstellt (Anderson et al., 2004).

Nach Beendigung der Knochenbildungsphase gehen die übrigen Osteoblasten in Apoptose oder werden zu inaktiven Knochensaumzellen, die die Knochenoberfläche bedecken. Knochensaumzellen sind dann für die Kontrolle des Ein- und Ausstroms von Mineralien zuständig, bewahren sich aber auch die Fähigkeit unter Einfluss verschiedener Reize, wie Hormone oder mechanische Belastungen wieder in sezernierende Osteoblasten zu differenzieren (Chow et al., 1998; Dobnig und Turner, 1995).

1.1.3.3 Regulation von Knochen-Remodeling-Prozessen

Die stetig im ganzen Körper stattfindenden Knochenumbauprozesse, also die Abfolge von Knochenabbau und -aufbau, werden durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert, da ein Ungleichgewicht zu pathologischen Veränderungen der Knochenmasse führt (Abbildung 4). Die Regulation von Knochen-Remodeling-Prozessen erfolgt sowohl durch äußere Einflüsse wie mechanische Belastungen oder Stoffwechselveränderungen als auch lokal über direkte Wechselwirkungen von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. So wird die Proliferation, Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten hauptsächlich über M-CSF und RANKL reguliert, die im Knochen vornehmlich von Zellen der Osteoblasten- und Osteozytenlinie exprimiert werden (Takahashi et al., 1999). RANKL kommt primär als membrangebundenes Molekül vor, kann aber durch Metalloproteinasen als lösliches RANKL freigesetzt werden. Jedoch findet die RANKL/RANK-Signalübertragung am effektivsten durch direkte Zell-Zell-Kontakte statt (Hikita et al., 2006). Osteoblasten exprimieren zudem noch einen weiteren löslichen Faktor, Osteoprotegerin (OPG) genannt. OPG wirkt osteoprotektiv, da es RANKL binden kann und damit als „Köder“-Rezeptor dessen Interaktion mit RANK verhindert und folglich die Osteoklastogenese hemmt. So-

mit ist das OPG/RANKL-Verhältnis entscheidend für das Ausmaß der Stimulation der Osteoklastenaktivität. Neben RANKL können aber auch inflammatorische Zytokine wie Tumor Necrosis Factor α (TNF α), IL-6 und TGF- β die Osteoklastenbildung direkt aus Osteoklastenvorläuferzellen induzieren (Fuller et al., 2002). Osteoklasten hingegen können die Knochenbildung über drei Wege an den Knochenabbau koppeln. So regulieren sie die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen entweder durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix oder über die Sekretion sogenannter Klastokine wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P), BMP6 und Mitglieder der WNT-Familie oder durch Zellkontakt vermittelte Mechanismen wie bidirektionale Ephrin-Ephrin-Rezeptor-Signale (Pederson et al., 2008; Zhao et al., 2006). Als Mechanosensoren nehmen Osteozyten Veränderungen der mechanischen Belastung wahr und reagieren auf diese, indem sie die Informationen in biochemische Signale (wie intrazelluläres Calcium, Stickstoffmonoxid, ATP und Prostaglandine) umwandeln, die schließlich Einfluss auf die Genexpression haben (Forwood, 1996; Wang et al., 2013; Watanuki et al., 2002). So wird die anabole Wirkung von mechanischen Reizen zum Beispiel durch eine verminderte Expression von Sclerostin vermittelt, einem WNT-Antagonisten und negativen Regulator der Knochenbildung (Robling et al., 2008; Tu et al., 2012).

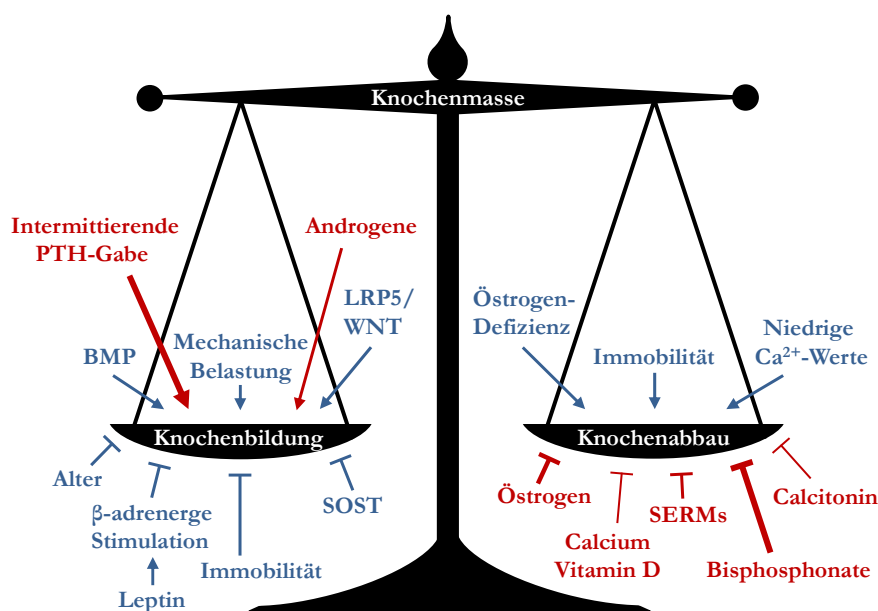


Abbildung 4: Regulation der Skeletthomöostase und der Knochenmasse.

Die schematische Darstellung der Regulation der Knochenmasse zeigt physiologische (schwarz) und pharmakologische (rot) Stimulatoren und Inhibitoren der Knochenbildung und -resorption. Der relative Einfluss wird durch die Dicke der Pfeile dargestellt. Abkürzungen: BMP, Bone Morphogenetic Protein; SOST, Sclerostin; LRP5, Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 5; PTH, Parathormon; SERMs, Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (Grafik in Anlehnung an Harada und Rodan (2003)).

Die zelluläre Kommunikation unterliegt jedoch auch der systemischen Regulation durch Hormone wie Parathormon (PTH) und Östrogen. Zur Regulation der Knochenresorption verändern diese Moleküle meist die Produktion von RANKL und/oder OPG und beeinflussen so auch indirekt die Knochenbildung. Manche Hormone können jedoch auch direkt die Knochenbildung kontrollieren.

PTH ist zuständig für die systemische Regulation der Calcium-Homöostase. Niedrige Calcium-Konzentrationen im Serum führen zur Freisetzung von PTH aus der Nebenschilddrüse. PTH bewirkt über verschiedene Mechanismen in Knochen, Niere und Darm eine Erhöhung der Serum-Calcium-Konzentration. Um Calcium aus dem Knochen freisetzen zu können, stimuliert PTH $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}_3$ vermittelt den Knochenabbau durch die Steigerung von RANKL auf der Osteoblastenmembran und Hemmung der OPG-Sekretion (Lee und Lorenzo, 1999). Während eine kontinuierliche PTH-Gabe über den oben genannten Mechanismus zu einer erhöhten Knochenresorption führt, stimuliert hingegen eine intermittierende PTH-Gabe die Knochenbildung, indem PTH die Sclerostin-Expression hemmt (Bellido et al., 2005; Tam et al., 1982).

Östrogen schützt vor einer Abnahme der Knochenmasse, indem es oxidativen Stress im Knochengewebe reduziert und Knochenumbauprozesse durch eine verminderte Bildung von Osteoblasten und Osteoklasten verlangsamt (Almeida et al., 2010). Außerdem wirkt sich Östrogen gleichzeitig antiapoptotisch auf Osteoblasten und Osteozyten aus, während es über TGF- β und eine erhöhte Fas-Ligand-Expression die Apoptose von Osteoklasten vorantreibt (Chen et al., 2005; Hughes et al., 1996; Kameda et al., 1997). Östrogen fördert zudem indirekt über die Hemmung der Sclerostin-Expression die Knochenbildung und vermindert durch Verschiebung des OPG/RANKL-Verhältnisses die Aktivierung von Osteoklasten (Galea et al., 2013; Hofbauer et al., 1999).

1.1.4 Knochenerkrankungen

Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des Knochens, die durch eine niedrige Knochenmasse, verminderte Knochenmineraldichte, Verschlechterungen der Mikroarchitektur und daraus resultierenden Frakturen charakterisiert ist. Risikofaktoren der Osteoporose sind unter anderem Rauchen, Untergewicht, Immobilität und Diabetes mellitus Typ 2 (DVO Leitlinie Osteoporose 2014). Bei der Entstehung von Osteoporose spielen zudem alterungsbedingte Faktoren und Sexualhormone eine entscheidende Rolle (Khosla et al.,

2011). Nach Erreichen der maximalen Knochenmasse im jungen Erwachsenenalter kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der trabekulären Knochenmasse, während die kortikale Knochenmasse bis ins mittlere Alter relativ stabil bleibt, dann aber bei Frauen mit Beginn der Menopause und bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter ebenfalls deutlich abnimmt (Riggs et al., 2008). Auf Grund der Tatsache, dass in jungen Erwachsenen noch kein Östrogenmangel vorliegt, scheint die Abnahme der trabekulären Knochenmasse zumindest teilweise östrogenunabhängig zu sein und durch alterungsbedingte Faktoren wie oxidativen Stress verursacht zu werden. Da Östrogen aber auch die Fähigkeit hat oxidativem Stress entgegenzuwirken, ist es wahrscheinlich, dass ein Verlust an Sexualhormonen den Alterungsprozess im Knochen noch beschleunigt (Almeida et al., 2007). Zudem führt der abrupte Mangel an Östrogen in den ersten Jahren nach der Menopause zusätzlich zu einer Steigerung von Knochenumbauprozessen, wobei jedoch die Knochenresorption häufig überhandnimmt und nicht mehr durch eine gleichwertige Knochenbildung ausgeglichen werden kann, was somit zu einem stetigen Verlust an Knochenmasse führt und sich schließlich in osteoporotischen Frakturen manifestiert (Recker et al., 2004).

Eine andere Erkrankung des erwachsenen Skeletts stellt die Osteomalazie dar. Diese Krankheit entsteht durch eine Störung des Knochenumbauprozesses, wobei es zu einer Beeinträchtigung der Mineralisierung kommt und das Knochengewebe infolgedessen zunehmend durch unmineralisiertes Osteoid ersetzt wird. Für die Entwicklung einer Osteomalazie gibt es hauptsächlich drei Gründe. Die häufigste Ursache stellt ein Vitamin-D-Mangel dar, der entweder aus einer zu geringen körpereigenen Biosynthese oder einer zu niedrigen Aufnahme über die Nahrung resultiert und durch eine niedrige Konzentration an 25-Hydroxylvitamin D, erhöhte PTH-Werte (sekundärer Hyperparathyroidismus), Hypophosphatämie und eine gesteigerte alkalische Phosphatase-Aktivität im Serum charakterisiert ist. Des Weiteren kann Osteomalazie durch eine renale Fehlfunktion ausgelöst werden, die zu einer Hypophosphatämie führt und häufig mit einer gestörten Aktivierung von Vitamin D einhergeht. Seltener sind auch genetische Defekte in Chondrozyten oder Osteoblasten verantwortlich, die unter anderem zu einer Hypophosphatasie führen können (Whyte und Thakker, 2013).

Neben der Osteoporose und Osteomalazie gibt es noch eine Vielzahl anderer Knochenerkrankungen, auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird.

1.2 Lipoproteinstoffwechsel

Um die einzelnen Organe des Körpers einschließlich des Knochens jeder Zeit mit ausreichend Energie und lebensnotwendigen Nahrungsbestandteilen wie Vitaminen und essentiellen Fettsäuren zu versorgen, benötigt der Organismus ein ausgeklügeltes Transport- und Speichersystem für Nährstoffe. Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems stellt der Lipoproteinstoffwechsel dar.

1.2.1 Aufbau und Funktion von Lipoproteinen

Lipide sind wasserunlöslich und werden für den Transport im Blut in wasserlösliche Lipoproteine verpackt. Diese besitzen eine amphiphile äußere Hülle, die hauptsächlich aus Phospholipiden und freiem Cholesterin besteht, während der innere hydrophobe Kern von Triglyceriden, Cholesterinestern und lipophilen Vitaminen gebildet wird. Wie der Name ausdrückt, bestehen Lipoproteine nicht nur aus Lipiden, sondern besitzen auch Proteinbestandteile, die sogenannten Apolipoproteine (Apo). Bei diesen unterscheidet man zwischen den strukturgebenden Proteinen, wie ApoB, die feste Bestandteile der Lipoproteine darstellen, sowie den funktionsgebenden wie ApoE, die zwischen den verschiedenen Lipoproteinen ausgetauscht werden können. Lipoproteine unterscheiden sich durch ihre Herkunft, Funktion sowie Lipid- und Proteinzusammensetzung und werden in verschiedene Lipoproteinklassen eingeteilt: zu den großen triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL) von geringer Dichte gehören die Chylomikronen, die Nahrungslipide vom Darm in die Peripherie des Körpers transportieren, und die Very Low Density Lipoproteine (VLDL), die von der Leber sezerniert werden und endogene Lipide transportieren. Diesen stehen die kleinen cholesterinreichen Lipoproteine gegenüber, die Low Density Lipoproteine (LDL) und High Density Lipoproteine (HDL). Die LDL liefern hauptsächlich Cholesterin in die Peripherie des Körpers, wohingegen die HDL dieses über den reversen Cholesterintransport zurück zur Leber bringen (Haas et al., 2013).

1.2.2 Bedeutung von Apolipoprotein E im Lipidstoffwechsel

Das Apolipoprotein E, dessen Funktion im Knochen in dieser Arbeit genauer untersucht werden soll, ist Bestandteil aller Lipoproteinklassen außer der atherogenen LDL. Es ist ein Glykoprotein bestehend aus 299 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von ~ 34 kDa und wird hauptsächlich von Hepatozyten produziert (Newman et al., 1985). Als Ligand von

Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) und Mitgliedern der LDL-Rezeptor-Familie, wie dem LDL-Rezeptor und LRP1, ist ApoE an der Bindung, Prozessierung und Endozytose von Lipoproteinen beteiligt und beeinflusst auch die Regulation der VLDL-Produktion (Beisiegel et al., 1989; Kuipers et al., 1997). Die wichtige Funktion von ApoE im Lipoproteinstoffwechsel zeigt sich zudem daran, dass ApoE-Defizienz in Mäusen zu 500 % höheren Plasma-Cholesterin-Werten, niedrigen HDL-Spiegeln und zur spontanen Entstehung von Atherosklerose führt (Zhang et al., 1992).

Beim Menschen kommt ApoE im Gegensatz zu Mäusen in drei Isoformen vor, die sich durch zwei Aminosäuren unterscheiden: ApoE2 (Cys112; Cys158), ApoE3 (Cys112; Arg158) und ApoE4 (Arg112; Arg158) (Rall et al., 1982). *APOE ε3* ist das am meisten verbreitete Allel mit einer Häufigkeit von 0,77 in der kaukasischen Bevölkerung, wohingegen *APOE ε4* mit einer Häufigkeit von 0,15 und *APOE ε2* mit einer Häufigkeit von 0,08 vorkommt (Davignon et al., 1988). Der Austausch der zwei Aminosäuren hat starke Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des ApoE-Moleküls. So besitzt ApoE2 eine stark reduzierte Bindungsaffinität für den LDL-Rezeptor ($\leq 2\%$) im Vergleich zu ApoE3 und ApoE4. Zudem ist *APOE ε2* bei Homozygotie mit der Entwicklung der Typ III Hyperlipoproteinämie assoziiert (Schneider et al., 1981). *APOE ε4* korreliert hingegen mit hohen LDL-Cholesterin-Werten im Blut und ist mit der Entstehung von Atherosklerose und der späten Form der Alzheimer-Krankheit assoziiert (Corder et al., 1993; Stengard et al., 1995; Utermann et al., 1984).

1.2.3 Der Weg der Lipide durch den Körper

Der Lipoproteinstoffwechsel wird in drei Transportwege eingeteilt, den exogenen und endogenen Lipidtransport und den reversen Cholesterintransport. Beim exogenen Weg werden die Lipide nach der Nahrungsaufnahme im Darm durch Lipasen zu freien Fettsäuren, Monoacylglyceriden und freiem Cholesterin hydrolysiert und anschließend von Enterozyten aufgenommen (Young und Hui, 1999). Dort werden sie wieder verestert und die Cholesterylester, Phospholipide und Triglyceride zusammen mit ApoB-48 im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe des Microsomal Triglyceride Transferproteins (MTP) zu Chylomikronen verpackt (Abbildung 5)(Gordon et al., 1995). Diese Partikel werden dann über den Golgi-Apparat, wo ein zweiter Lipidierungsschritt erfolgt, aus der Zelle transportiert und in die Lymphe sezerniert, von wo aus sie über den Ductus thoracicus schließlich

in den Blutkreislauf gelangen (Sabesin und Frase, 1977). Im Blut angekommen, reifen die Chylomikronen, indem sie ApoCII, ApoAV und ApoE von HDL-Partikeln aufnehmen, und werden dann unter Mithilfe von ApoAV an das vaskuläre Endothel peripherer Organe, vor allem des Muskel- und Fettgewebes, geleitet, an das die Lipoprotein Lipase (LPL) über HSPG und Glycosylphosphatidylinositol-anchored High-density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1) gebunden ist (Beigneux et al., 2007; Merkel et al., 2005).

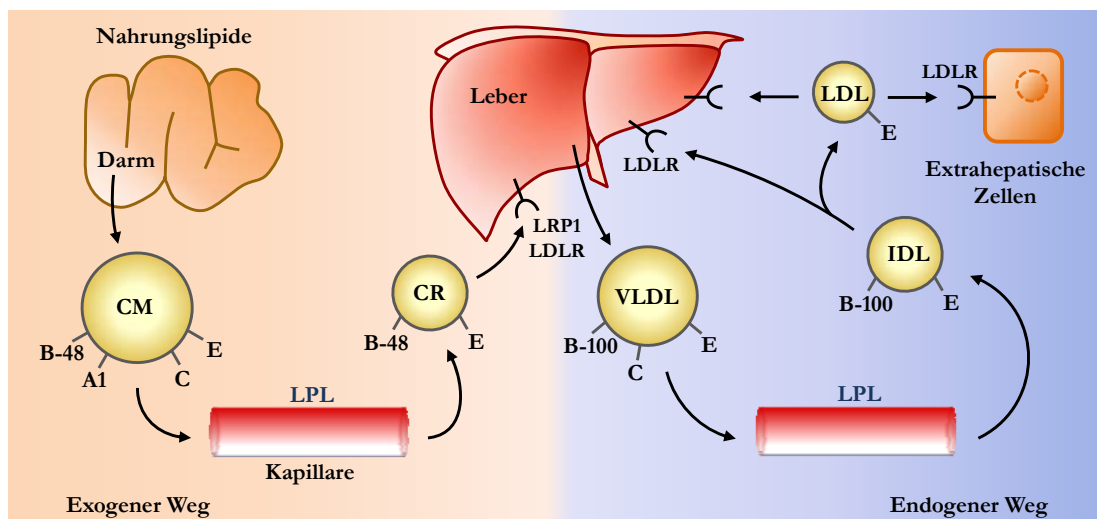


Abbildung 5: Exogener und endogener Lipoproteintransport.

Im Darm werden Nahrungslipide in Chylomikronen verpackt, die dann über die Lymphe in den Blutkreislauf gelangen. Dort werden die Chylomikronen (CM) prozessiert, indem die Lipoprotein Lipase (LPL) die Hydrolyse von Triglyceriden katalysiert und es somit zur Freisetzung von Fettsäuren aus den Chylomikronen kommt. Anschließend werden die Chylomikronen-Restpartikel (CR) von der Leber über den LDL-Rezeptor (LDLR) und LDL-Rezeptor-related Protein 1 (LRP1) aufgenommen. Zum Transport von endogenen Lipiden sezerniert die Leber Very Low Density Lipoproteine (VLDL) in den Blutkreislauf, woraufhin diese ebenfalls durch die LPL prozessiert werden. Die dabei entstehenden Intermediate Density Lipoproteine (IDL) werden entweder wieder von der Leber aufgenommen oder durch weitere Lipolyse zu Low Density Lipoproteinen (LDL) prozessiert. Die LDL-Partikel werden dann entweder zur Deckung des Cholesterinbedarfs von extrahepatischen Zellen aufgenommen oder von der Leber aus dem Blutkreislauf entfernt (Grafik in Anlehnung an Daniels et al. (2009)).

Dort kommt es zu einer ApoCII vermittelten Aktivierung der LPL, die die Hydrolyse der Triglyceride in den Chylomikronen katalysiert (Wang et al., 1992). Die bei diesem Prozess freigesetzten nicht-veresterten Fettsäuren werden über CD36 durch das Endothel transportiert, von den darunterliegenden Zellen aufgenommen und entweder direkt als Energiequelle verwendet oder gespeichert (Goldberg et al., 2009). Gegen Ende des Lipolyseprozesses übertragen die Chylomikronen nicht mehr benötigte Phospholipide und Apolipoproteine mit Hilfe des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) auf HDL-Partikel, wobei ApoE- und LPL-Moleküle auf ihrer Oberfläche angereichert werden bzw. verbleiben (Redgrave und Small, 1979; Setala et al., 2007). Die übrigbleibenden triglyceridarmen cholesterinreichen Chylomikronen-Restpartikel (CR) werden schließlich wieder in den Blutstrom freigelassen

und dann rasch von der Leber aus der Zirkulation entfernt, können aber zu einem geringeren Anteil auch von anderen Geweben wie dem Knochen und dem braunen Fettgewebe aufgenommen werden (Bartelt et al., 2011a; Niemeier et al., 2008). Die Aufnahme der Chylomikronen-Restpartikel durch die Leber erfolgt dabei über die Bindung von ApoE und LPL an HSPG auf der Zelloberfläche, gefolgt von einer Rezeptor vermittelten Endozytose über den LDL-Rezeptor und LRP1 (Heeren et al., 2002; Herz et al., 1995; Laatsch et al., 2009; Rohlmann et al., 1998).

Im gefasteten Zustand überwiegt der endogene Weg, in dem die Leber aus endogenen Lipiden VLDL bildet und diese in den Blutstrom entlässt, um periphere Gewebe zu versorgen. Die Bildung von VLDL in Hepatozyten erfolgt ähnlich wie der Zusammenbau von Chylomikronen in Enterozyten. So findet die Lipidierung von ApoB-100, der strukturellen Proteinkomponente der VLDL, ebenfalls cotranslational im ER-Lumen unter der Kontrolle von MTP statt. Bei diesem Vorgang werden die für die Synthese der VLDL benötigten Lipide jedoch aus den zytosolischen Lipidtropfen der Hepatozyten mobilisiert (Gibbons et al., 2000). Nach der Reifung der VLDL werden diese von der Leber in den Blutkreislauf sezerniert, wo sie ebenfalls mit ApoCII und ApoE angereichert werden und LPL vermittelt freie Fettsäuren an das Muskel- und Fettgewebe abgeben. In Folge des Lipolyse-Prozesses verlieren die VLDL-Partikel sowohl Triglyceride als auch ApoCII und werden zu Intermediate Density Lipoproteinen (IDL). Diese werden entweder direkt von der Leber über LDL-Rezeptoren aufgenommen oder entwickeln sich infolge weiterer Lipolyse-Prozesse unter dem Verlust von ApoE zu cholesterinreichen atherogenen LDL-Partikeln (Ishibashi et al., 1993; Surgi et al., 1978). Die LDL werden dann über den LDL-Rezeptor entweder von peripheren Organen zur Deckung ihres Cholesterinbedarfs aufgenommen oder durch die Leber aus der Zirkulation entfernt.

Da die Leber das einzige Organ ist, das in der Lage ist, Cholesterin über die Galle aus dem Körper auszuscheiden, wird überschüssiges Cholesterin aus der Peripherie des Körpers über den reversen Cholesterintransport wieder zurück zur Leber transportiert. Das in der Leber und im Darm exprimierte ApoAI bildet die Ausgangsstruktur von diskoidalem HDL, auf das Cholesterin und Phospholipide von cholesterinreichen Zellen in peripheren Geweben durch die katalytische Wirkung von ATP Binding Cassette A1 (ABCA1) übertragen werden können (Wang et al., 2000). Das bei diesem Prozess entstehende pre- β -HDL wird dann durch das Enzym Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT), das Cholesterin

in Cholesterylester umwandelt, in HDL3 überführt. Daraufhin kommt es unter der Katalyse von PLTP zur Fusion von zwei HDL3-Partikeln, wobei sich ein größeres HDL2 und ein lipidarmer pre- β -HDL-Vorläufer bildet (Tu et al., 1993). Zurück in der Leber können die reifen HDL-Partikel nun über den Scavenger Receptor BI (SR-BI) Cholesterin an Hepatozyten abgeben ohne dabei jedoch selbst internalisiert zu werden („Selective Cholesterol Uptake“) (Acton et al., 1996). Dieser Prozess ermöglicht daher ein schnelles Recycling der reifen HDL-Partikel zu lipidarmem pre- β -HDL, das sofort wieder für den reversen Cholesterintransport zur Verfügung steht.

1.3 Interaktion des Knochen- und Energiestoffwechsels

Um seine Integrität und Funktion aufrechterhalten zu können, unterliegt das Knochengewebe fortwährend Umbau- und Reparaturprozessen, die jedoch mit einem hohen Energieaufwand verbunden sind. Daher sind gegenseitige Regulationen und Wechselwirkungen zwischen dem Knochen- und Energiestoffwechsel zu erwarten (Lee und Karsenty, 2008).

1.3.1 Wechselwirkungen über Hormone und Zytokine

In der Tat wurde gezeigt, dass das weiße Fettgewebe der Maus Knochenumbauprozesse über Hormone/Zytokine reguliert. So beeinflusst das „Sättigungshormon“ Leptin den Knochenstoffwechsel sowohl über zentrale als auch periphere Signalwege. Im Hypothalamus übt Leptin über das sympathische Nervensystem eine inhibierende Wirkung auf die trabekuläre Knochenmasse aus (Ducy et al., 2000; Takeda et al., 2002), während peripheres Leptin vor allem die kortikale Knochenmasse erhöht und die Knochenbrüchigkeit reduziert (Steppan et al., 2000; Williams et al., 2011). Zudem führt die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor auf Knochenmark-Stromazellen zu einer verstärkten osteoblastären Differenzierung, während die adipozytäre Differenzierung gehemmt wird (Thomas et al., 1999).

Dem Adipokin Adiponektin, das eng mit der Insulinsensitivität und invers mit der Körperfettmasse korreliert (Arita et al., 1999; Yamauchi et al., 2001), werden ebenfalls zentrale als auch periphere Wirkmechanismen und teilweise widersprüchliche Funktionen in der Regulation des Knochenstoffwechsels zugeschrieben. So wirkt Adiponektin einerseits direkt über Adiponektin-Rezeptoren auf Osteoblasten und Osteoklasten ein, indem es *in vitro* die osteoblastäre Differenzierung und Mineralisierung fördert und die Osteoklastenaktivität hemmt (Lee et al., 2009; Oshima et al., 2005). Andererseits hat Adiponektin auch eine

hemmende Wirkung auf die Osteoblastenproliferation und fördert die Osteoklastenaktivität über eine gesteigerte RANKL-Expression (Kajimura et al., 2013; Luo et al., 2006). Zudem führt eine Adiponektin-Defizienz in jungen Mäusen zu einer erhöhten Knochenmasse, welche dann jedoch mit zunehmendem Alter in Folge eines erhöhten sympathischen Tonus stark abnimmt (Kajimura et al., 2013; Shinoda et al., 2006; Williams et al., 2009). Ob ein ähnlicher Regulationsmechanismus auch beim Menschen zu finden ist, wurde bisher nicht untersucht. Jedoch zeigen klinische Studien meist eine negative Assoziation von Serum-Adiponektin mit der Knochenmineraldichte (Napoli et al., 2010; Peng et al., 2008).

Ogleich die Regulation des Knochenstoffwechsels durch das Fettgewebe bisher nur ansatzweise erforscht ist, wurde dennoch eindeutig gezeigt, dass unterschiedlichste Regulationsmechanismen und -ebenen zwischen dem Fett- und Knochengewebe existieren. Dies führt daher zu der Frage, ob und wie das Knochengewebe wiederum den Energiemetabolismus beeinflusst. Lee et al. (2007) haben gezeigt, dass das Protein Osteocalcin in seiner untercarboxylierten Form als Hormon auf den Energiestoffwechsel der Maus einwirkt, indem es zum einen die β -Zellproliferation und Insulinsekretion stimuliert und zum anderen über die Induktion der Adiponektin-Expression die Insulinsensitivität verbessert (Ferron et al., 2008). Osteocalcin wird spezifisch von Osteoblasten exprimiert und vor seiner Sekretion in seine hormonell inaktive Form überführt. Dazu wird es posttranslational über einen Vitamin-K-abhängigen Prozess an drei Glutaminsäureresten γ -carboxyliert, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität für die extrazelluläre Knochenmatrix führt (Hauschka et al., 1989). Neben der Knochenmatrix kommt Osteocalcin jedoch auch zu einem geringen Anteil im Blutkreislauf vor, wo es seine Funktion als Hormon ausüben kann. Einer Hypothese zufolge erfolgt die Freisetzung des hormonell aktiven untercarboxylierten Osteocalcins insulinabhängig über eine Osteoblasten vermittelte Aktivierung von Osteoklasten, die das in der Knochenmatrix gespeicherte Osteocalcin in Folge des Knochenresorptionsprozesses decarboxylieren und in die Zirkulation freisetzen (Ferron et al., 2010; Fulzele et al., 2010). Möglicherweise beeinflussen Osteoblasten auch über das Hormon Osteocalcin hinaus den Energiemetabolismus, da Yoshikawa et al. (2011) gezeigt haben, dass eine Verarmung an Osteoblasten zusätzliche osteocalcinunabhängige Effekte auf den Energiestoffwechsel hat.

1.3.2 Einfluss von Apolipoprotein E auf den Knochenstoffwechsel

Einen weiteren Verknüpfungspunkt des Energie- und Knochenstoffwechsels stellt das Apolipoprotein E dar. Jedoch ist im Gegensatz zu der bereits gut untersuchten Rolle von ApoE im Lipoproteinmetabolismus die Funktion von ApoE im Knochenstoffwechsel kaum verstanden. Erste Hinweise darauf, dass ApoE eine Rolle im Knochen spielen könnte, gaben die Beobachtungen, dass ApoE in mesenchymalen Zellen BMP2-abhängig reguliert, als einziges Apolipoprotein in murinen Calvaria-Osteoblasten exprimiert und im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung stark induziert wird (Bachner et al., 1999; Schilling et al., 2005). Da der globale *ApoE*-Knockout in Mäusen zu einer erhöhten trabekulären und kortikalen Knochenmasse führt, die durch eine gesteigerte Knochenbildungsrate bei unveränderter Knochenresorption verursacht wird, wurde von Schilling et al. (2005) eindeutig gezeigt, dass ApoE einen Regulator des Knochenstoffwechsels darstellt. Außerdem wurde beobachtet, dass Osteocalcin im Blut von ApoE-defizienten Mäusen in einer höheren Konzentration vorkommt und der Anteil des untercarboxylierten Osteocalcins gesteigert ist. Da ApoE zudem eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Vitamin-K-haltigen TRL-Remnant-Partikeln durch Osteoblasten spielt und damit die Menge an Vitamin K beeinflusst, die für die γ -Carboxylierung von Osteocalcin in Osteoblasten zur Verfügung steht (Newman et al., 2002; Niemeier et al., 2005; Niemeier et al., 2008), kontrolliert ApoE den γ -Carboxylierungsgrad von Osteocalcin. Obgleich *ApoE*^{-/-}-Mäuse keinen Osteoklastenphänotyp aufweisen, scheint ApoE dennoch zumindest in vitro einen Einfluss auf die Differenzierung von Osteoklasten zu haben. So wird ApoE in Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert und im Verlauf der RANKL-induzierten Osteoklastogenese herunterreguliert. Zudem übt ApoE eine inhibierende Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung in vitro aus (Kim et al., 2013).

Da eine ApoE-Defizienz im Menschen sehr selten ist, das humane ApoE aber in drei unterschiedlichen Isoformen vorkommt, fokussiert sich die humane Knochenforschung auf den Einfluss des ApoE-Polymorphismus. Vor allem das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel ist mit verschiedenen degenerativen Krankheiten wie Alzheimer und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, die wiederum häufig mit Osteoporose einhergehen (Tremollieres und Ribot, 2010; Tysiewicz-Dudek et al., 2008). Daher steht auch *APOE* $\epsilon 4$ im Fokus der meisten klinischen Studien, jedoch sind die Ergebnisse bezüglich einer Korrelation des *APOE*-Genotyps mit der Knochenmineraldichte und dem Frakturrisiko widersprüchlich. So fanden einige Stu-

dien eine niedrigere Knochenmineraldichte und/oder ein erhöhtes Frakturrisiko in *APOE* $\epsilon 4$ -Trägern verglichen mit Probanden ohne *APOE* $\epsilon 4$ -Allel, während andere diese Assoziation nicht bestätigen konnten. Das sehr unterschiedliche Studiendesign bezüglich Alter, Geschlecht, Ethnizität und andere teilweise unbekannte Störvariablen wie der Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in nicht-kodierenden Bereichen führen wahrscheinlich zu den widersprüchlichen Ergebnissen und machen es schwierig die einzelnen Studien miteinander zu vergleichen. Daher kann bisher keine definitive Aussage darüber getroffen werden, ob das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel einen Einfluss auf die Knochengesundheit hat (Niemeier et al., 2012; Peter et al., 2011). In der Arbeit von Dieckmann et al. (2013), in der gezeigt wurde, dass männliche *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$ -Träger im Vergleich zu *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ - und *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ -Individuen ein niedrigeres OPG/RANKL-Verhältnis aufweisen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der bisher wenig beachtete *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$ -Genotyp einen genetischen Risikofaktor für eine niedrige trabekuläre Knochenmasse und vertebrale Frakturen im Menschen darstellen könnte. Diese Hypothese wurde durch eine krankenhausbasierte Fall-Kontroll-Studie von Zhang et al. (2014) unterstützt, in der Patienten mit vertebrealen Frakturen eine signifikant höhere Frequenz des *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$ -Genotyps aufweisen als gesunde Kontrollen.

Um die Schwierigkeiten humaner Studien zu umgehen und den Einfluss der humanen ApoE-Isoformen im Mausmodell untersuchen zu können, wurden von Dieckmann et al. (2013) ApoE-Knock-in-Mäuse, die jeweils eine humane Isoform anstelle des murinen ApoE exprimieren, in Bezug auf ihren Knochenphänotyp untersucht. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen ApoE-Isoformen die trabekuläre Knochenmasse und Stabilität unterschiedlich beeinflussen. So weisen ApoE2- im Vergleich zu ApoE3- und ApoE4-Knock-in-Mäusen einen erhöhten Knochenumbau auf, wobei jedoch die Knochenresorption überwiegt. Dies führt zu einer reduzierten trabekulären Knochenmasse und Stabilität, während der kortikale Knochen davon unbeeinflusst ist. Die ApoE4-Knock-in-Mäuse zeigen hingegen einen niedrigeren Knochen turnover und weisen eine höhere trabekuläre Knochenmasse und biomechanische Stabilität auf (Dieckmann et al., 2013).

Zusammenfassend stellt ApoE in Mäusen und wahrscheinlich auch im Menschen einen wichtigen Regulator des Knochenstoffwechsels dar, dessen zelluläre und molekulare Wirkungsmechanismen und Funktionen jedoch noch größtenteils unverstanden sind.

1.4 Ziele der Arbeit

Apolipoprotein E stellt eine wichtige Komponente des Lipoproteinstoffwechsels dar und ist an der Aufnahme von TRL-Remnant-Partikeln aus dem Blutkreislauf beteiligt. Es ist bekannt, dass *ApoE*^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Knochenmasse aufweisen und ApoE daher einen Regulator des Knochenstoffwechsels darstellt (Bartelt et al., 2010; Nikolov et al., 2010; Schilling et al., 2005). Dennoch ist bis dato unklar, aus welchen Zelltypen das ApoE stammt, das maßgeblich für den Knochenmetabolismus von Bedeutung ist.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, sollte in dieser Arbeit zunächst das Expressionsmuster von *ApoE* im Knochengewebe und in knochenspezifischen Zelltypen analysiert werden. Anschließend sollte der Einfluss von ApoE auf die Osteoblastendifferenzierung mittels primärer Calvaria- und Knochenmark-Osteoblasten *in vitro* untersucht werden. Um schließlich die Rolle von knocheneigenem ApoE unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, sollten verschiedene Mausmodelle generiert werden, in denen das Gen für ApoE mit Hilfe des Cre/loxP-Systems früh (*ApoE*^{fllox/fllox}-*Runx2-Cre*) oder spät (*ApoE*^{fllox/fllox}-*OC-Cre*) in der Osteoblastendifferenzierung oder in Osteoklasten (*ApoE*^{fllox/fllox}-*LysM-Cre*) deletiert wird. Nach der Charakterisierung der Mausmodelle bezüglich ihrer *ApoE*-Expression auf Gewebe- und Zellebene sollte die Knochenstruktur mittels Histomorphometrie und μ -Computer-Tomographie analysiert werden und dadurch die Bedeutung von Osteoblasten- und Osteoklasten-ApoE für den Knochenstoffwechsel bestimmt werden. Durch die Messung von Knochenbauparametern im Serum und Urin der Mäuse und Analyse des Differenzierungsverhaltens der entsprechenden primären Zelltypen sollten schließlich weitere Hinweise auf die Wirkungsmechanismen von ApoE im Knochen gefunden werden. Ergänzend sollte zudem untersucht werden, ob osteogenes ApoE einen Einfluss auf den systemischen Energiestoffwechsel hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Arbeitsgeräte

ABI Prism, 7900 HT Detection System	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Absaugpumpe	ABM Greiffenberger, Marktredwitz (DE)
AccuCheck Aviva Messgerät+Teststreifen	Roche, Mannheim (DE)
Accu-jet [®] Pipettierhelfer	Brand, Wertheim (DE)
Autotechnikon	Enno Vieth Mikrotome, Wiesmoor (DE)
Binokular h33	Hund, Wetzlar (DE)
BioDocAnalyze Digital	Biometra, Göttingen (DE)
Biotrak II Plate Reader	Amersham, Buckinghamshire (GB)
CO ₂ -Brutschrank cytoperm 2	Heraeus, Hanau (DE)
Cubis [®] Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen (DE)
Entwicklungsmaschine OPTIMAX	Protec, Oberstenfeld (DE)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (DE)
Genesis Freedom 200	Tecan, Männedorf (CH)
Horizontalschüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA, Labortechnik, Staufen i. Br. (DE)
Magnetrührer	IKA, Labortechnik, Staufen i. Br. (DE)
MicroCT 40	Scanco Medical, Bassersdorf (CH)
Mikrowelle	Sharp, Osaka (JP)
NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen (DE)
Neubauer-Zählkammer improved	Plan Optik, Elsoff (DE)
Nikon A1 Laser Scanning Mikroskop	Nikon, Düsseldorf (DE)
Operationsbesteck	Aesculap, Braun, Melsungen (DE)
Osteomeasure Histomorphometrie System	OsteoMetrics, Decatur, GA (USA)
Peristaltikpumpe	Gilson, Middleton, WI (USA)
pH-Meter	Mettler Toledo, Schwerzenbach (CH)
Pipetten Pipetman 10/200/1000 µl	Gilson, Middleton, WI (USA)
PowerPac 300 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
Primo Vert Zellkulturmikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena (DE)
REAX 2000 Schüttler	Heidolph, Schwabach (DE)
Röntgengerät	Faxitron, Wheeling, IL (USA)
ROTANTA TRC	Hettich, Tuttlingen (DE)
Rotationsmikrotom CUT 4060	MicroTec, Walldorf (DE)
Sigma 1-15K Tischzentrifuge	Sigma Microfuges, Osterode am Harz (DE)
sterile Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau (DE)

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen (DE)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (DE)
TissueLyser	Qiagen, Hilden (DE)
Wasserbad	Gesellschaft f Labortechnik, Burgwedel (DE)
Wide Mini-Sub [®] Cell GT System	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)

2.1.2 Software

Biochrom Data Capture	Amersham, Buckinghamshire (GB)
BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen (DE)
Gemini [™]	Tecan, Männedorf (CH)
MicroCT Software	Scanco Medical, Bassersdorf (CH)
Microsoft Office Standard Edition 2010	Microsoft, Redmond (USA)
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen (DE)
Nikon NIS-Elements Confocal A1 Software	Nikon, Düsseldorf (DE)
Osteomeasure [™] Software	OsteoMetrics, Decatur, GA (USA)
Pannoramic Viewer	3DHitech, Budapest (HU)
SDS Software 2.2	Life Technologies, Waltham, MA (USA)

2.1.3 Gebrauchsmaterial

Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun, Melsungen (DE)
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde (DE)
Filtropur V25, 0,2 µm Vacuum Filter	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Mamoray HDR PQ Röntgenfilm	Agfa HealthCare, Mortsel (BE)
MicroAmp [®] Optical Adhesive Film	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
MicroAmp [®] Optical 384-Well Reaction Plate	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Microvette [®] CB 300 Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Mikrotiterplatten (96-Well-Format, V-Form)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Nunc [™] 4-Well Chamber Slides	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Nunc [™] 6-/12-Well-Zellkultur-Platten	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Nunc [™] Kollagen-beschichtete 12-Well-Platten	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Nunc [™] Maxisorp-Immuno Moduls	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Nunc [™] Mikrotiterplatten (96-Well-Format)	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Objektträger, superfrost	Menzel Gläser, Braunschweig (DE)
Omnifix [®] -F Feindosierungsspritzen 1 ml	B. Braun, Melsungen (DE)
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim (DE)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf (DE)
Petrischalen 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Pipettenspitzen 10 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Pipettenspitzen 200/1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Pipettenspitzen 200/1000 µl (RNase frei)	Sarstedt, Nümbrecht (DE)

Reaktionsgefäß 50 ml	BD Falcon, Heidelberg (DE)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel 15 ml	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Stabpipetten 5/10/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Sterican® Einmalinjektionskanülen	B. Braun, Melsungen (DE)
Steriflip 50 ml	Millipore, Darmstadt (DE)
Verschließbare Reaktionsgefäße 1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg (DE)
Zellsieb (Porengröße: 40/70 µm)	BD Falcon, Heidelberg (DE)

2.1.4 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Alexa Fluor®488 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA (USA)
Alkaline Buffer Solution (1,5 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Antibody Diluent S0809	Dako, Hamburg (DE)
ApoE-Antikörper (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX (USA)
ApoE-Antikörper, HRP-konjugiert (GTX40261)	GeneTex, Irvine, CA (USA)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen (DE)
Aro Olivenöl (native)	Metro, Düsseldorf (DE)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Benzoylperoxid	Merck, Darmstadt (DE)
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg (DE)
Calcein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Chloroform (CHCl ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Cholesterin (CHOD-PAP) Kit	Roche, Mannheim (DE)
Cy TM 3 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Goat IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA (USA)
DAPI-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Desoxynukleosidtriphosphat Mix (dNTP, je 10 mM)	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Diethylether	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃ ELISA Kit	BlueGene Biotech, Shanghai (CN)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (N ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt (DE)
Dispase (grade II, 1,8 U/l)	Roche, Mannheim (DE)
DPX-Einschlussmittel	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
DreamTaq Green DNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Eukitt® Quick-hardening Mounting Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Formalin (37 %)	Merck, Darmstadt (DE)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
GIBCO® Antibiotic-Antimycotic (100 x)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)

GIBCO® Fötiales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
GIBCO® Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
GIBCO® Phosphat-Pufferlösung (PBS, 1 x)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
GIBCO® DMEM/F-12, HEPES	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
GIBCO® DMEM+GlutaMax™, 4,5 g/l Glukose	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
D-Glukose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Glycin	Merck, Darmstadt (DE)
Hämatoxylin, Mayer's	Dako, Hamburg (DE)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
HyClone™ Fötiales Kälberserum (FCS)	Perbio Science, Bonn (DE)
Isotone Kochsalz-Lösung, 0,9 % NaCl	B. Braun, Melsungen (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (DE)
Kaninchen-Serum	Dako, Hamburg (DE)
Ketamin (10 mg/ml)	Albrecht, Aulendorf (DE)
Kollagenase D	Roche, Mannheim (DE)
Kollagenase Typ IA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
LASQcdiet® Rod16-R	LASvendi, Soest (DE)
Liquid Permanent Red K0640	Dako, Hamburg (DE)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , 25mM)	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ *6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt (DE)
α-Minimum Essential Medium Eagle (α-MEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
2-Methoxyethylacetat	Merck, Darmstadt (DE)
Methylmethacrylat	Merck, Darmstadt (DE)
MicroVue™ Creatinine Assay Kit	Quidel, San Diego, CA (USA)
MicroVue™ DPD EIA Kit	Quidel, San Diego, CA (USA)
Mouse Osteocalcin ELISA Kit	Immutopics, San Clemente, CA (USA)
Mouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Quantikine ELISA Kit	
Mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Quantikine ELISA Kit	
Murine M-CSF	PeptoTech, Rocky Hill, NJ (USA)
Murine sRANK Ligand	PeptoTech, Rocky Hill, NJ (USA)
N,N-Dimethyl-p-Toluidin	Merck, Darmstadt (DE)
Natrimhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T.Baker, Deventer (NL)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natrium-L-laktat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)

Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck, Darmstadt (DE)
Natronlauge (1 M)	Merck, Darmstadt (DE)
Nonylphenolpolyglykoether	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
NucleoSpin RNA II	Macherey und Nagel, Düren (DE)
Osteocalcin-Antikörper (FL-95)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX (USA)
Paraformaldehyde (PFA, 20 %)	Electron Microscopy Science, Hatfield (USA)
Percoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Phosphatase Substrat (40 mg Kapseln)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Phosphat-Pufferlösung (PBS, 10 x)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Pikrinsäure (gesättigt)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
p-Nitrophenol Standard Solution (10 mM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Polyklonale Rabbit Anti-Goat Immunglobuline, biotinyliert (E 0466)	Dako, Hamburg (DE)
Polyklonale Swine Anti-Rabbit Immunglobuline, biotinyliert (E 0353)	Dako, Hamburg (DE)
Precipath	Roche, Mannheim (DE)
Primer für PCR	Eurofins, Ebersberg (DE)
ProLong [®] Gold Antifade Reagent	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
qPCR MasterMix Plus w/o UNG	Eurogentec, Seraing (BE)
QuantiChrom [™] Calcium Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, CA (USA)
QuantiChrom [™] Phosphate Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, CA (USA)
Rompun (2 %)	Bayer, Leverkusen (DE)
Roti [®] -Safe GelStain	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Salpetersäure (konz.)	Merck, Darmstadt (DE)
Salzsäure (1 M)	Merck, Darmstadt (DE)
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt (DE)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Schweine-Serum	Dako, Hamburg (DE)
SeaKem [®] LE Agarose	Lonza, Basel (CH)
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt (DE)
TaqMan [®] Gene Expression Assays (20 x)	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Target Retrieval Solution	Dako, Hamburg (DE)
TMB Microwell Peroxidase Substrat System	KLP, Gaithersburg, MD (USA)
Toluidinblau O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Triglyceride (GPO-PAP) Kit	Roche, Mannheim (DE)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Triton X-100	Roth, Karlsruhe (DE)
TRIzol	Life Technologies, Waltham, MA (USA)
Tween20	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
VECTASTAIN [®] ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)

Xylol

Th. Geyer, Renningen (DE)

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

STE-Puffer

100 mM NaCl
20 mM TRIS
20 mM EDTA
1 % SDS
in dest. H₂O, pH 7,4

1 x TBE-Puffer

89 mM TRIS
89 mM H₃BO₃
2 mM EDTA
in dest. H₂O

α-Minimum Essential Medium (α-MEM)

10,1 g/l α-MEM-Pulver
26,2 mM NaHCO₃
in dest. H₂O, steril filtriert, pH 7,3

Digestionsmedium für Calvaria

0,05 g Kollagenase Type IA
0,1 g Dispase (grade II, 1,8 U/l)
in 50 ml α-MEM, steril filtriert

Osteoblasten-Kulturmedium

10 % HyClone FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
in α-MEM, steril, pH 7,3

Verdaumedium für Knorpel

60 mg Kollagenase D
in 10 ml DMEM/F-12, HEPES
steril angesetzt

Chondrozyten-Kulturmedium

10 % HyClone FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
2 % Antibiotic-Antimycotic
in DMEM/F-12, HEPES, steril

Osteoklasten-Kulturmedium

10 % GIBCO FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
in α-MEM, steril, pH 6,9

Narkoselösung

2,3 ml Rompun (2 %)
1,0 ml Ketamin (10 mg/ml)
6,7 ml NaCl-Lösung (0,9 %)

Hepatozyten-Kulturmedium

10 % GIBCO FCS
2 % Antibiotic-Antimycotic
in DMEM+GlutaMax™, 4,5 g/l Glukose

10 x Perfusionspuffer

1,4 M NaCl
50 mM KCl
8 mM MgCl₂*6 H₂O
16 mM Na₂HPO₄
4 mM KH₂PO₄
in dest. H₂O

1 x Perfusionspuffer

100 ml 10 x Perfusionspuffer
2,1 g/l NaHCO₃
0,745 g/l EDTA
2,970 g/l Glukose
0,846 g/l Natriumlaktat
0,022 g/l Natriumpyruvat
ad 1 l dest. H₂O steril filtriert, 37 °C, pH 7,4

PGST

0,5 % Glycin
0,05 % Saponin
1 % Triton X-100
in PBS, pH 7,4

Calceinlösung

0,15 M NaCl
0,238 M NaHCO₃
10 mg/ml Calcein
in dest. H₂O, steril filtriert, 4 °C, dunkel

Infiltrationslösung

3,3 g Benzoylperoxid, getrocknet
100 ml Nonylphenolpolyglykoether
1000 ml Methylmethacrylat, entstabilisiert

Sodaformollösung

12,5 g Na₂CO₃
187 ml dest. H₂O
62,5 ml Formalin (37 %)

Phosphatase-Substrat-Puffer

40 mg Phosphatase-Substrat (1 Kapsel)
10 ml dest. H₂O
10 ml Alkaline buffer solution (1,5 M)

IMF-Blocklösung

0,5 % Glycin
0,05 % Saponin
2 % BSA
in PBS, pH 7,4

TBS-Puffer

20 mM TRIS
140 mM NaCl
in dest. H₂O, pH 7,6

Gießlösung

6,6 g Benzoylperoxid, getrocknet
100 ml Nonylphenolpolyglykoether
1000 ml Methylmethacrylat, entstabilisiert

van Gieson-Färbelösung

2,5 g Säurefuchsin
900 ml gesättigte Pikrinsäure
100 ml Glycerin
5 ml konzentrierte Salpetersäure

ApoE-Blockingpuffer

0,1 M NaH₂PO₄
0,15 M NaCl
1,0 mM EDTA
0,055 % Tween20
1,0 % BSA
in dest. H₂O, pH 7,0

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung und Zucht verschiedener Mausmodelle

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter standardisierten Bedingungen in einem 12-Stunden-Hell-/Dunkelrhythmus gehalten und mit einer Standard-Nagerdiät (LASQCdiet[®] Rod16-R) ad libitum gefüttert. Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tiereschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Stadt Hamburg durchgeführt.

Folgende vier Mausmodelle wurden für diese Arbeit verwendet: *ApoE*^{-/-}, *ApoE*^{fllox/fllox}-*Runx2-Cre*, *ApoE*^{fllox/fllox}-*OC-Cre* und *ApoE*^{fllox/fllox}-*LysM-Cre*. Das *ApoE*^{-/-}-Mausmodell (Piedrahita et al. (1992); genetischer Hintergrund: C57BL/6J) wurde von Jackson Laboratory gekauft. Die anderen drei Mausmodelle, in denen das *ApoE*-Gen zelltypspezifisch über das Cre/loxP-System deletiert wird, wurden eigens für diese Arbeit gekreuzt. Dafür wurden *ApoE*^{fllox/fllox}-Mäuse (genOway, genetischer Hintergrund: C57BL/6J), in denen Exon 2 bis Exon 4 des *ApoE*-Gens von *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung flankiert sind, mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle unterschiedlicher zelltypspezifischer Promotoren (*Runx2-Cre*: Rauch et al. (2010), *OC-Cre*: Zhang et al. (2002), *LysM-Cre*: Clausen et al. (1999)) exprimieren, verpaart. Um eine Cre-vermittelte Keimbahnrekombination der geflochtenen Allele während der Spermatogenese zu vermeiden, wurden für die Zucht keine Cre-positiven Männchen verwendet. In den resultierenden *ApoE*^{fllox/fllox}-*Cre*⁺-Mäusen („Promotor“-*Cre*⁺) kommt es spezifisch in den Zelltypen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, zu einer DNA-Rekombination an den *loxP*-Stellen, wobei der dazwischenliegende *ApoE*-Genabschnitt deletiert wird. Als Kontrolltiere dienen *ApoE*^{fllox/fllox}-Mäuse ohne Cre-Transgen („Promotor“-*Cre*⁻) aus dem gleichen Wurf.

Die Gewinnung von Urinproben erfolgte im ungefasteten Zustand zur Mittagszeit (Lagerung bei -20 °C). Für die Gewinnung von Blut- und Gewebeproben wurden die Tiere vier Stunden gefastet, anschließend mit einer letalen Dosis Ketamin/Rompun betäubt und eine finale Blutentnahme durch Herzpunktion durchgeführt. Die Organe wurden entnommen und sofort in 3,7 % Formalin oder TRIzol konserviert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Genotypisierung der Mauslinien

Für die Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien wurden den Tieren zur DNA-Isolierung kleine Schwanzbiopsien entnommen und das Gewebe in 700 µl STE-Puffer und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 42 °C und leichtem Schütteln mindestens vier Stunden verdaut. Anschließend wurden die Proben mit 70 µl 10 %-iger SDS-Lösung versetzt und dann die Proteine mit 270 µl 5 M NaCl-Lösung gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurden zur DNA-Fällung 450 µl des Überstands mit 900 µl 70 %-igem Ethanol versetzt und 30 Minuten mit 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet, in 40 µl H₂O (Aqua ad iniectabilia) resuspendiert und für die entsprechende Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

2.2.2.1 *ApoE*-Knockout-PCR

Zur Bestimmung des *ApoE*-Knockouts wurde eine PCR mit einer 3-Primer-Strategie verfolgt und nach dem in Tabelle 1 angegebenen Schema durchgeführt.

Primersequenzen:

ApoE180 5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3'

ApoE181 5'-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3'

ApoE182 5'-GCC GCC CCG ACT GCA TCT-3'

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen			
		Schritt	Temp	Zeit	Zyklen
Genomische DNA	2 µl	Denaturierung	94 °C	180 s	1 x
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol	Denaturierung	94 °C	25 s	
MgCl ₂	0,5 mM	Annealing	61 °C	40 s	38 x
dNTP	0,4 mM	Elongation	72 °C	40 s	
DMSO	1 µl	Finale	72 °C	300 s	
Primer	je 0,8 µM	Elongation	72 °C	300 s	
DreamTaq DNA-Polymerase	1,25 U	Kühlung	4 °C	∞	
Reaktionsvolumen	25 µl				

Tabelle 1: PCR-Bedingungen zur Detektion des *ApoE*-Knockout-Allels.

Zur Analyse der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Wildtyp: 155 bp, *ApoE*-Ko: 245 bp) und ein 100-bp-DNA-Marker mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 90 V für 60 Minuten aufgetrennt (Agarosegel: 2 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, 4 µl Roti-Safe pro 100 ml) und dann zur Auswertung mittels UV-Licht detektiert (siehe Abbildung 6).

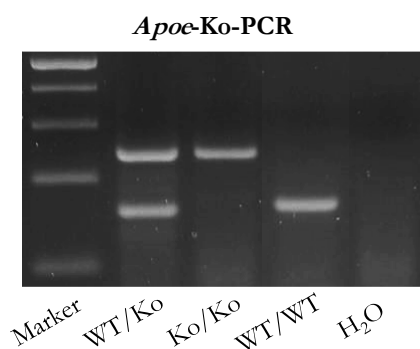


Abbildung 6: Darstellung der möglichen Amplifikate der *ApoE*-Ko-PCR.

Neben dem DNA-Marker (500, 400, 300, 200, 100 bp) sind die PCR-Produkte einer heterozygoten *ApoE*-Ko- (*ApoE*^{+/-}: 155 bp und 245 bp), homozygoten *ApoE*-Ko- (*ApoE*^{-/-}: 245 bp) und Wildtypmaus (155 bp) dargestellt. Ein PCR-Ansatz ohne DNA (H₂O) dient als Negativkontrolle.

2.2.2.2 *ApoE_flox*-PCR

Um das gefloxtete *ApoE*-Allel nachzuweisen, wurde eine PCR mit einer 2-Primer-Strategie verwendet und nach dem in Tabelle 2 angegebenen Schema durchgeführt.

Primersequenzen:

21748flp-MER1 5'-GTG GCC CTG TCC CAA GCA CCT CTC T-3'

21749flp-MER1 5'-CCC ATG CCT ACA ATC CAG GGG TAG G-3'

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen			
		Schritt	Temp	Zeit	Zyklen
Genomische DNA	2 µl	Denaturierung Denaturierung Annealing Elongation Finale Elongation	94 °C 94 °C 66 °C 72 °C 72 °C	120 s 30 s 60 s 60 s 420 s	1 x 35 x 1 x
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol				
MgCl ₂	0,5 mM				
dNTPs	0,2 mM				
Primer	je 0,4 µM				
DreamTaq DNA-Polymerase	1,25 U	Kühlung	4 °C	∞	
Reaktionsvolumen	25 µl				

Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Detektion des *ApoE_flox*-Allels.

Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Wildtyp: 452 bp, *ApoE_flox*: 604 bp) neben einem 100-bp-DNA-Marker mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 90 V für 60 Minuten aufgetrennt (Agarosegel: 1,7 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, 4 µl Roti-Safe pro 100 ml) und dann zur Auswertung mittels UV-Licht detektiert (siehe Abbildung 7).

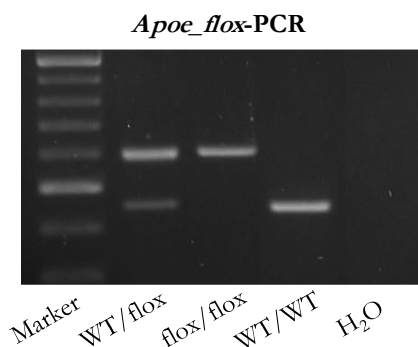


Abbildung 7: Darstellung der möglichen Amplifikate der *ApoE_flox*-PCR.

Neben dem DNA-Marker (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 bp) sind die PCR-Produkte einer für *ApoE* heterozygot-gefloxten (604 und 452 bp), homozygot-gefloxten (604 bp) und Wildtypmaus (452 bp) dargestellt. Ein PCR-Ansatz ohne DNA (H₂O) dient als Negativkontrolle.

2.2.2.3 *Runx2-Cre*-PCR

Zur Bestimmung des *Runx2-Cre*-Transgens wurde eine PCR mit einer 3-Primer-Strategie verfolgt und nach dem in Tabelle 3 angegebenen Schema durchgeführt.

Primersequenzen:

Cbfa1_24 5'-CCA GGA AGA CTG CAA GAA GG-3'
 Cbfa1_25 5'-TGG CTT GCA GGT ACA GGA G-3'
 Cbfa1_30 5'-GGA GCT GCC GAG TCA ATA AC-3'

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen			
		Schritt	Temp	Zeit	Zyklen
Genomische DNA	2 µl	Denaturierung	95 °C	300 s	1 x
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol	Denaturierung	95 °C	30 s	
dNTPs	0,2 mM	Annealing	59 °C	30 s	
Primer	je 0,4 µM	Elongation	72 °C	60 s	
DreamTaq DNA Polymerase	1,25 U	Finale Elongation	72 °C	600 s	1 x
Reaktionsvolumen	25 µl	Kühlung	4 °C	∞	

Tabelle 3: PCR-Bedingungen zur Detektion des *Runx2-Cre*-Transgens.

Zur weiteren Analyse wurden die PCR-Produkte (Wildtyp: 800 bp, *Runx2-Cre*-Transgen: 600 bp) und ein 100-bp-DNA-Marker mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 90 V für 60 Minuten aufgetrennt (Agarosegel: 1,7 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, 4 µl Roti-Safe pro 100 ml) und dann zur Auswertung mittels UV-Licht detektiert (siehe Abbildung 8).

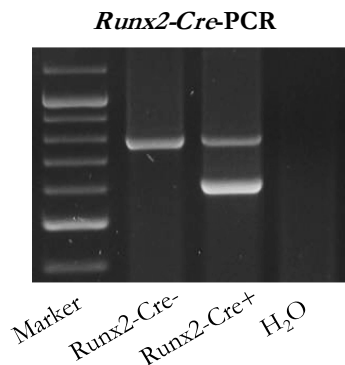


Abbildung 8: Darstellung der möglichen Amplifikate der *Runx2-Cre*-PCR.

Neben dem DNA-Marker (1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400 bp) sind die PCR-Produkte einer Wildtyp- (800 bp) und *Runx2-Cre*-transgenen Maus (800 und 600 bp) dargestellt. Ein PCR-Ansatz ohne DNA (H₂O) dient als Negativkontrolle.

2.2.2.4 *OC-Cre*-PCR

Um das *OC-Cre*-Transgen nachzuweisen, wurde eine PCR mit vier Primern (*OCre* for/rev: Transgen, oIMR7338/7339: interne Kontrolle) nach dem in Tabelle 4 angegebenen Schema durchgeführt.

Primersequenzen:

OCre for	5'-CAA ATA GCC CTG GCA GAT TC-3'
OCre rev	5'-TGA TAC AAG GGA CAT CTT CC-3'
oIMR7338	5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'
oIMR7339	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'

Im Anschluss wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Wildtyp (interne Kontrolle): 324 bp, *OC-Cre*-Transgen: 280 bp) und ein 100-bp-DNA-Marker mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 90 V für 60 Minuten aufgetrennt (Agarosegel: 2 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, 4 µl Roti-Safe pro 100 ml) und dann zur Auswertung mittels UV-Licht detektiert (siehe Abbildung 9).

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen			
Genomische DNA	2 µl	Schritt	Temp	Zeit	Zyklen
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol	Denaturierung	94 °C	120 s	1 x
MgCl ₂	0,5 mM	Denaturierung	94 °C	20 s	2 x
dNTPs	0,3 mM	Annealing	60 °C	15 s	
Primer	je 0,4 µM	Elongation	72 °C	15 s	2 x
DreamTaq DNA-Polymerase	1,25 U	Denaturierung	94 °C	20 s	
Reaktionsvolumen	25 µl	Annealing	59 °C	15 s	2 x
		Elongation	72 °C	15 s	
		Denaturierung	94 °C	20 s	2 x
		Annealing	58 °C	15 s	
		Elongation	72 °C	15 s	
		Denaturierung	94 °C	20 s	2 x
		Annealing	57 °C	15 s	
		Elongation	72 °C	15 s	
		Denaturierung	94 °C	20 s	2 x
		Annealing	56 °C	15 s	
		Elongation	72 °C	15 s	
		Denaturierung	94 °C	20 s	25 x
		Annealing	55 °C	15 s	
		Elongation	72 °C	15 s	
		Finale	72 °C	120 s	1 x
		Elongation	72 °C	15 s	
		Kühlung	4 °C	∞	

Tabelle 4: PCR-Bedingungen zur Detektion des *OC-Cre*-Transgens.

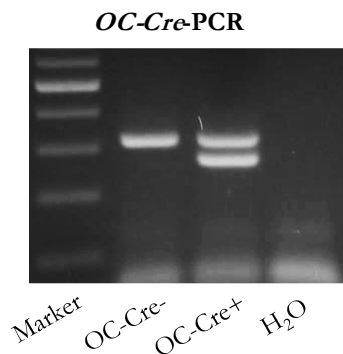


Abbildung 9: Darstellung der möglichen Ampfrikate der *OC-Cre*-PCR.

Neben dem DNA-Marker (600, 500, 400, 300, 200, 100 bp) sind die PCR-Produkte einer Wildtyp- (324 bp) und *OC-Cre*-transgenen Maus (280 bp) dargestellt. Ein PCR-Ansatz ohne DNA (H₂O) dient als Negativkontrolle.

2.2.2.5 *LysM-Cre-PCR*

Zum Nachweis des *LysM-Cre*-Transgens wurde eine 3-Primerstrategie verfolgt, wobei jedoch für die interne Kontrolle und das Transgen zwei getrennte PCR-Ansätze verwendet wurden (siehe Tabelle 5).

Primersequenzen:

oIMR3066 5'-CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG-3'

oIMR3067 5'-CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC-3'

oIMR3068 5'-TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC-3'

Reaktionsansatz: Wildtyp		Reaktionsbedingungen			
		Schritt	Temp	Zeit	Zyklen
Genomische DNA	2 µl	Denaturierung	94 °C	180 s	1 x
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol	Denaturierung	94 °C	30 s	
dNTPs	0,2 mM	Annealing	63 °C	60 s	
Primer oIMR3067	1,0 µM	Elongation	72 °C	60 s	
Primer oIMR3068	0,3 µM	Finale Elongation	72 °C	120 s	1 x
DreamTaq DNA Polymerase	1,25 U	Kühlung	4 °C	∞	
Reaktionsvolumen					
Reaktionsansatz: <i>LysM-Cre</i> -Transgen		Tabelle 5: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>LysM-Cre</i> -Transgens.			
Genomische DNA	2 µl				
DreamTaq Green Buffer 10 x	0,1 Vol				
dNTPs	0,2 mM				
Primer oIMR3067	1,0 µM				
Primer oIMR3066	0,5 µM				
DreamTaq DNA Polymerase	1,25 U				
Reaktionsvolumen	25 µl				

Nach Beendigung der PCR wurden beide Ansätze vereinigt, um die PCR-Produkte (Wildtyp: 350 bp, *LysM-Cre*-Transgen: 700 bp) gemeinsam mit einem 100-bp-DNA-Marker mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 90 V für 60 Minuten aufzutrennen (Agarosegel: 1,6 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, 4 µl Roti-Safe pro 100 ml) und dann mittels UV-Licht zu detektieren (siehe Abbildung 10).

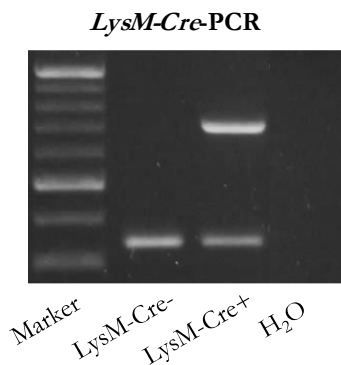


Abbildung 10: Darstellung der möglichen Amplifikate der *LysM-Cre*-PCR.

Neben dem DNA-Marker (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 bp) sind die PCR-Produkte einer Wildtyp- (350 bp) und *LysM-Cre*-transgenen Maus (350 und 700 bp) dargestellt. Ein PCR-Ansatz ohne DNA (H₂O) dient als Negativkontrolle.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellkultur-Inkubator.

2.2.3.1 Differenzierung von primären Osteoblasten aus Calvaria

Zur Isolierung von primären Osteoblasten aus Calvaria wurden neugeborene Mäuse (3-4 Tage alt) mit Diethylether betäubt, desinfiziert und unter sterilen Bedingungen durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Calvaria aus dem Schädel präpariert und in eiskaltem PBS gesammelt. Für den folgenden Verdau wurde das PBS abgesaugt, durch 5-10 ml frisch angesetztes Digestionsmedium (0,1 % Kollagenase Ia, 0,2 % Dispase, 37 °C) ersetzt und die Calvaria dann bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach zehn Minuten wurde das Verdaumedium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Nach weiteren zehn Minuten wurde das Digestionsmedium erneut gewechselt. Anschließend folgten noch drei weitere 10-minütige Verdauerschritte, bei denen jedoch die Calvaria-Überstände gesammelt wurden. Danach wurden die gesammelten Überstände durch ein Zellsieb (40 µm Porengröße) filtriert und die Calvariareste verworfen. Die Zellsuspension wurde fünf Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen in Osteoblasten-Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in einer Dichte von 8600 Zellen/cm² ausgesetzt. Nach knapp 24 Stunden wurde das Kulturmedium das erste Mal gewechselt. Anschließend wurde das Kulturmedium jeden dritten Tag erneuert. Sobald die Zellen zu 80 % konfluent waren (Tag 0), wurden sie durch Stimulation mit Ascorbat (50 µg/ml) und β-Glycerophosphat (10 mM) zu Osteoblasten differenziert. Die Stimulanten wurden ab Differenzierungsbeginn bei jedem Mediumwechsel frisch dazugegeben. An

den Tagen 6, 12 und 21 wurden die Zellkulturüberstände vor dem Mediumwechsel oder Ernten der Zellen gesammelt.

2.2.3.2 Differenzierung von primären Osteoblasten aus Knochenmark

Um primäre Osteoblasten aus dem Knochenmark zu gewinnen, wurde eine Maus (etwa zehn Wochen alt) mit CO₂ betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden beide Femora und Tibiae unter sterilen Bedingungen präpariert und das Knochenmark nach Eröffnung der Markhöhle herauszentrifugiert (1 min, 400 g). Das Knochenmark wurde dann in Osteoblasten-Kulturmedium aufgenommen und durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) filtriert. Die Zellsuspension wurde nun fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet wieder in Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in einer Dichte von $1,4 \times 10^6$ Zellen/cm² ausgesetzt. Nach drei Tagen wurde das Kulturmedium das erste Mal gewechselt. Anschließend wurde das Kulturmedium jeden dritten Tag erneuert. Sobald die Zellen 80 % Konfluenz erreicht hatten (Tag 0), wurden sie durch Stimulation mit Ascorbat (50 µg/ml) und β-Glycerophosphat (10 mM) zu Osteoblasten differenziert. Die Stimulantien wurden ab Differenzierungsbeginn bei jedem Mediumwechsel frisch dazugegeben.

2.2.3.3 Isolierung von primären Chondrozyten

Für die Isolierung von primären Chondrozyten wurden junge Mäuse (sieben Tage alt) durch Dekapitation getötet, der Körper desinfiziert, die Hinterbeine (Femur und Tibia) herauspräpariert und in steriles PBS gegeben. Unter einem Binokular wurden dann die Epiphysen von Muskelfasern befreit, von den bereits verknöcherten Teilen der Knochen getrennt und in 5 ml eiskaltes Verdaumedium (6 mg/ml Kollagenase D) gegeben. Nach der Präparation wurden die Epiphysen 90 Minuten bei 37 °C im Verdaumedium geschüttelt, das Gewebe dann durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren zerkleinert und daraufhin nochmals 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das restliche Gewebe durch erneutes Pipettieren aufgelöst und die Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) filtriert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1200 rpm) wurde das Zellpellet in Chondrozyten-Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von $5,75 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesetzt. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen zwei Tage später bei Konfluenz geerntet.

2.2.3.4 Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmark

Um primäre Osteoklasten aus Knochenmark zu gewinnen, wurde eine Maus (etwa zwölf Wochen alt) mit CO₂ betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden beide Femora und Tibiae unter sterilen Bedingungen präpariert und das Knochenmark nach Eröffnung der Markhöhle herauszentrifugiert (1 min, 400 g). Das Knochenmark wurde dann in Osteoklasten-Kulturmedium aufgenommen und durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) filtriert. Die Zellsuspension wurde nun fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet wieder in Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in einer Dichte von $1,05 \times 10^6$ Zellen/cm² ausgesetzt. Nach drei Tagen wurde das Kulturmedium das erste Mal gewechselt und die Zellen durch Stimulation mit M-CSF (20 ng/ml) und RANKL (40 ng/ml) zu Osteoklasten differenziert.

2.2.3.5 Isolierung von primären Hepatozyten

Die Gewinnung von primären Hepatozyten aus Mauslebern erfolgte nach dem Protokoll von Meredith (1988). Zur Isolation wurden etwa zwölf Wochen alte Mäuse verwendet, die mittels intraperitonealer Injektion einer Narkoselösung betäubt wurden. Dann wurde der Körper desinfiziert, die Bauchhöhle eröffnet und die Leber für ca. eine Stunde über die Pfortader mit O₂-gesättigtem Perfusionspuffer perfundiert (1 x, Flussrate: 7-8 ml/min). Anschließend wurde die Leber in 25 ml Hepatozyten-Kulturmedium zerkleinert und die entstandene Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) filtriert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (4 min, 28 g, langsame Beschleunigung und Bremsung) und das Zellpellet in 8 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Aufreinigung der Hepatozyten wurde die Zellsuspension mit 13,9 ml Percoll und 2,1 ml 10 x Perfusionspuffer gemischt und für sechs Minuten bei 855 g (langsame Beschleunigung und Bremsung) zentrifugiert. Der Überstand mit den nicht-parenchymalen und toten Zellen wurde verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und die Hepatozyten dann in einer Dichte von $7,15 \times 10^4$ Zellen/cm² auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten ausgesetzt. Nach einer Stunde wurde das Medium gewechselt und die Hepatozyten nach vier Stunden geerntet.

2.2.3.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Visualisierung der Expression und Lokalisation von ApoE und Osteocalcin in Osteoklasten wurden Knochenmarkszellen –wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben– isoliert, auf

4-Well-Chamber-Slides ausgesetzt und bis Tag 6 zu Osteoblasten differenziert. Die Osteoblasten wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mindestens 30 Minuten mit 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, dreimal für fünf Minuten mit PGST permeabilisiert und anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten mit Blocklösung inkubiert. Für die Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die entsprechenden Antikörper (ApoE-Antikörper (M-20), Osteocalcin-Antikörper (FL-95)) 1:50 in IMF-Blocklösung verdünnt und für eine Stunde bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Für die Negativkontrolle wurde reine IMF-Blocklösung verwendet. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Osteoblasten zweimal kurz mit PBS und zweimal für fünf Minuten mit PGST gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei 37 °C mit den entsprechenden sekundären Antikörpern und DAPI inkubiert. Die Antikörper-DAPI-Lösungen wurden ebenfalls in IMF-Blocklösung angesetzt (CyTM3 Donkey Anti-Goat IgG: 1:500, Alexa Fluor[®]488 Goat Anti-Rabbit IgG: 1:200, DAPI-Lösung: 1:1000). Im Anschluss wurden die Zellen mindestens dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und dann mittels ProLong[®] Gold Antifade Reagenz eingedeckelt.

2.2.4 RNA-Isolierung und quantitative Real-Time-PCR

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen oder Gewebe in TRIzol aufgenommen, mittels TissueLyser (1-4 x, 3 min, 20 Hz) homogenisiert, anschließend mit $\frac{1}{5}$ Volumen Chloroform versetzt, 20 Sekunden gevortext und nachfolgend für 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde abgenommen und mit gleichem Volumen 70 %-igem Ethanol gemischt, um die RNA zu fällen. Dann wurde die RNA-Lösung auf eine Säule des NucleoSpin RNA II-Kits gegeben und die weiteren Schritte nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde photometrisch mittels NanoDrop bestimmt.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (0,5 µg RNA, 0,1 Vol RT Buffer (10 x), 4 mM dNTPs, 0,1 Vol RT Random Primers (10 x), 1 U/µl RNase Inhibitor, 2,5 U/µl MultiScribe[™] Reverse Transcriptase, Reaktionsvolumen: 25 µl) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C und 5 Sekunden bei 85 °C.

Zur Untersuchung und Quantifizierung der Expression bestimmter Gene wurde mit der hergestellten cDNA eine TaqMan® Real-Time-PCR durchgeführt (TaqMan® Gene Expression Assay: *mAlpl*: Mm01187117_m1; *mAcp5*: Mm00475698_m1; *mApoe*: Mm00437573_m1; *mBglap*: Mm03413826_mH; *mCalcr*: Mm00432271_m1; *mCol10a1*: Mm00487041_m1; *mCol1a1*: Mm00801666_g1; *mCtsk*: Mm00484039_m1; *mIbsp*: Mm00492555_m1; *mMmp13*: Mm00439491_m1; *mRplp0*: Mm01974474_gH; *mRunx2*: Mm00501584_m1; *mSox9*: Mm00448840_m1; *mTbp*: Mm00446973_m1; *mTnfrsf11b*: Mm00435452_m1; *mTnfrsf11*: Mm01313943_m1). Die cDNA wurde dafür 1:4 verdünnt, 5 µL der cDNA-Verdünnung mit 25 µL Mastermix (15 µL qPCR MasterMix Plus w/o UNG, 1,5 µL TaqMan® Gene Expression Assay, 8,5 µL RNase-freies H₂O) gemischt und aus diesem Reaktionsansatz Vierfachwerte à 5 µL auf eine 384-Well-Platte pipettiert. Diese wurde durch eine Folie verschlossen, zwei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend die TaqMan® Real-Time-PCR unter folgenden Reaktionsbedingungen mit einem ABI Prism®7900HT Detektionssystem durchgeführt (Aktivierung: 600 s bei 95 °C, dann 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C (Denaturierung) und 60 s bei 60 °C (Annealing/Elongation)). Zur Auswertung wurde der Schwellenwert C_t (Cycle of Threshold) verwendet und die Genexpression nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung des Referenzgens *Tbp* (TATA-box Binding Protein) oder *Rplp0* (Ribosomal Protein, Large, P0) berechnet.

2.2.5 Metabolische Untersuchungen an der Maus

Für die metabolischen Untersuchungen wurden ca. 20 Wochen alte männliche Mäuse verwendet und deren Körpergewicht und Futteraufnahme dokumentiert.

2.2.5.1 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Zur Durchführung des oralen Glukose-Toleranz-Tests wurden die Tiere vier Stunden gefastet, ihnen dann 1,0 mg Glukose/g Körpergewicht (in 200 µL 0,9 %-iger NaCl-Lösung) per Gavage verabreicht und die Veränderungen der Glukosekonzentration im Blut 0, 15, 30, 60 und 120 min nach der Gavage mit AccuCheck Aviva-Teststreifen bestimmt.

2.2.5.2 Oraler Fett-Toleranz-Test (OFTT)

Zur Durchführung des oralen Fett-Toleranz-Tests wurden die Tiere vier Stunden gefastet, ihnen dann wenige Blutstropfen aus dem Schwanz mit einer Microvette® CB 300 Lithium-

Heparin entnommen (Nullwert) und ihnen anschließend 200 µl natives Olivenöl per Gavage verabreicht. Zur Bestimmung der Veränderungen der Cholesterin- und Triglycerid-Konzentration im Blut wurde den Tieren 60, 120 und 240 min nach der Gavage erneut Blut abgenommen und nachfolgend die Lipide im Plasma gemessen (siehe 2.2.7.2).

2.2.6 Knochenstrukturanalysen

Für die Analyse der verschiedenen Knochenstrukturparameter wurden 12 und 26 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Zur Bestimmung der Knochenbildungsrate wurde den Mäusen neun und zwei Tage vor ihrem Tod eine Calceinlösung (30 mg Calcein/kg Körpergewicht) injiziert. Nach der finalen Herzblutentnahme wurden die Skelette freipräpariert, aufgespannt und 24 Stunden in 3,7 %-igem Formalin fixiert. Dann wurden diese für weitere 24 Stunden in 70 %-igem Ethanol entwässert und anschließend in 80 %-igem Ethanol gelagert. Die intakten Skelette wurden geröntgt (36 kV, 2 s) und dann die Wirbelkörper L₂-L₄ und die Femora für weitere Analysen (siehe 2.2.6.2 und 2.2.6.3) entnommen.

2.2.6.1 Immunhistochemie

Zum Nachweis von ApoE und Osteocalcin im Knochengewebe der Maus wurde das Gewebe in 3,7 %-igem Formalin fixiert und freundlicherweise im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie (UKE) aufgearbeitet und gefärbt. Dazu wurden die distalen Femora zunächst entcalcifiziert, in Paraffin eingebettet und 5-µm-Sagittal-Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert, zweimal für vier Minuten in Target Retrieval Solution in einer Mikrowelle bei 700 W erhitzt und nach dem Abkühlen zweimal für fünf Minuten mit TBS gewaschen. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen auf den Schnitten mit 10 %-igem Kaninchen- bzw. Schweine-Serum (in TBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Inkubation mit ApoE-Antikörper (M-20, Santa Cruz Biotechnology, 1:250) bzw. Osteocalcin-Antikörper (FL-95, Santa Cruz Biotechnology, 1:20) in Antibody Diluent S0809 für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten mit TBS-T (0,1 % Tween20 in TBS) und dann einmal fünf Minuten mit TBS gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit den entsprechenden biotinylierten Rabbit Anti-Goat- (1:40 in TBS) bzw. Swine Anti-Rabbit-Antikörpern (1:40 in TBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten (2 x 5 min mit TBS-T, 1 x 5 min mit TBS) wurden die Schnitte für

30 Minuten mit einem Avidin-alkalische Phosphatase-Komplex (VECTASTAIN® ABC-AP Kit) inkubiert, wiederum mit TBS gewaschen und die alkalische Phosphatase-Aktivität schließlich mittels Liquid Permanent Red visualisiert. Daraufhin wurde die Substratlösung mit Wasser abgewaschen, die Schnitte mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt und mit Eukitt® eingedeckelt.

2.2.6.2 Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Analyse wurden die Wirbelkörper L₂-L₄ nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1-5 h 70 % EtOH, 1 h 70 % EtOH, 1 h 80 % EtOH, 1 h 80 % EtOH, 1 h 96 % EtOH, 1 h 96 % EtOH, 1 h 96 % EtOH, 1 h 96 % EtOH, 1 h abs. EtOH, 1 h abs. EtOH, 1 h abs. EtOH, 1 h abs. EtOH) für 24 Stunden in Infiltrationslösung gegeben und dann nochmal für mindestens 48 Stunden in neuer Infiltrationslösung inkubiert. Anschließend wurden die Wirbelkörper in Methylmethacrylat eingebettet (10 ml Gießlösung + 0,05 ml N,N-Dimethyl-p-Toluidin) und dann mit einem Rotationsmikrotom 5- μ m- und 12- μ m-Hartschnitte in Frontalebene angefertigt. Die 5- μ m-Schnitte wurden mit von Kossa/van Gieson (2.2.6.2.1) oder mit Toluidinblau (2.2.6.2.2) gefärbt. Die Analyse des trabekulären Knochenvolumens/Gewebevolumen (BV/TV), der Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelanzahl (Tb.N), des Trabekelabstandes (Tb.Sp), der Osteoidoberfläche (O.S/BS) und des Osteoidvolumens (OV/BV) erfolgte anhand der von Kossa-/van Gieson-gefärbten Schnitte, die Bestimmung der Osteblastenzahl (N.Ob/B.Pm) und -oberfläche (Ob.S/BS) sowie der Osteoklastenzahl (N.Oc/B.Pm) und -oberfläche (Oc.S/BS) anhand der Toluidinblau-gefärbten Schnitte. Die 12- μ m-Schnitte wurden nicht gefärbt und für die Bestimmung der Knochenbildungsrate (BFR/BS) nach der Calcein-Doppelmarkierungsmethode verwendet. Alle Messungen wurden nach den Standards der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) unter Verwendung des Osteomeasure Histomorphometrie Systems durchgeführt.

2.2.6.2.1 Von Kossa-/van Gieson-Färbung

Für die von Kossa-/van Gieson-Färbung wurden die Schnitte zunächst von Kunststoff befreit (3 x 5 min in 2-Methoxyethylacetat) und dann durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (je 2 min: 2 x abs. EtOH, 1 x 96 % EtOH, 1 x 80 % EtOH, 1 x 70 % EtOH, 1 x 50 % EtOH und 1 x dest. H₂O). Anschließend folgte die Färbung der Schnitte nach folgendem Protokoll: 5 min in 3 %-iger Silbernitratlösung, 10 min in dest. H₂O, 5 min in So-

daformollösung, 10 min in dest. H₂O, 5 min in 5 %-iger Natriumthiosulfatlösung, 10 min in Leitungswasser, 20 min in van Gieson-Färbelösung. Daraufhin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Leitungswasser, 80 % EtOH, 96 % EtOH, 2 x abs. EtOH), dreimal fünf Minuten in Xylol inkubiert und dann mit DPX eingedeckelt.

2.2.6.2.2 Toluidinblau-Färbung

Für die Toluidinblau-Färbung mussten die Schnitte zunächst von Kunststoff befreit (3 x 5 min in 2-Methoxyethylacetat) und dann durch eine absteigende Alkoholreihe geführt werden (je 2 min: 2 x abs. EtOH, 1 x 96 % EtOH, 1 x 80 % EtOH, 1 x 70 % EtOH, 1 x 50 % EtOH und 1 x dest. H₂O). Anschließend folgte die Färbung der Schnitte für 30 Minuten in 1 %-iger Toluidinblaulösung pH 4,5. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (dest. H₂O, 50 % EtOH, 70 % EtOH, 80 % EtOH, 96 % EtOH, 2 x abs. EtOH), dreimal fünf Minuten in Xylol inkubiert und dann mit DPX eingedeckelt.

2.2.6.3 μ -Computer-Tomographie-Analysen

Die μ -Computer-Tomographie (μ CT)-Messungen wurden freundlicherweise im Institut für Osteologie und Biomechanik (UKE) durchgeführt. Die Aufnahme der Femora erfolgte in Ethanol bei 55 kV, 145 μ A und 200 ms mit einer Auflösung von 10 μ m pro Voxel. Die Analyse des kortikalen Knochens fand in einem 1-mm-dicken Querschnitt der zentralen femoralen Diaphyse statt und der trabekuläre Knochen des distalen Femurs wurde in einem 1,5-mm-dicken Bereich proximal der Wachstumsfuge gemessen. Die Bestimmung des Schwellenwerts erfolgte basierend auf einer Kalibrierung mittels eines Calcium-Hydroxylapatit (HA)-Festkörpers, wobei sich für den kortikalen und trabekulären Knochen ein Schwellenwert von 498 mg HA/cm³ und 388 mg HA/cm³ ergab. Die Erfassung der kortikalen und trabekulären Knochenbereiche erfolgte automatisch durch einen Bildanalyse-Algorithmus des Herstellers. Die Femurlänge, das trabekuläre Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV), die Trabekelanzahl (Tb.N), die Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelabstand (Tb.Sp), die kortikale Fläche (Ct.Ar), die Gesamtgewebefläche (Tt.Ar), das Verhältnis der kortikalen Fläche zur Gesamtgewebefläche (Ct.Ar/Tt.Ar) und die volumetrische Knochenmineraldichte (vBMD) wurden unter Verwendung der MicroCT Software (Scanco Medical) bestimmt. Für die Auswertung der kortikalen Dicke (Ct.Th) wurde das Abstandstransformationsmodell verwendet.

2.2.7 Analysen von Blut, Urin und Zellkulturüberständen

2.2.7.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurde genutzt, um die Konzentration von bestimmten Proteinen (ApoE, OC, OPG, RANKL, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und Desoxypyridinolin (DPD)) mittels spezifischer Antikörper zu quantifizieren.

Zur Bestimmung der ApoE-Konzentration wurden die Mausseren 1:500 in ApoE-Blockpuffer verdünnt. Zudem wurde eine Standardreihe (ApoE: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0 ng/ml) aus einem Plasma-Pool bekannter ApoE-Konzentration mit Blockpuffer hergestellt. Anschließend wurden je 100 µl der Proben bzw. Standards pro Vertiefung einer Maxisorp-Immuno Modul-Mikrotiterplatte in Doppelwerten aufgetragen und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit 300 µl Waschpuffer (1 x PBS + 0,02 % Tween20, pH 7,4) pro Vertiefung gewaschen und 100 µl anti-ApoE-HRP-Antikörperlösung (GTX40261, 1:2000 in ApoE-Blockpuffer) pro Vertiefung aufgetragen. Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln wurde der ELISA wieder dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und dann durch Zugabe von 100 µl TMB Microwell Peroxidase Substratlösung entwickelt. Nach etwa 20 Minuten wurde die Farbreaktion mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die ApoE-Konzentration wurde schließlich anhand der Standardreihe berechnet.

Die Konzentration von Osteocalcin (Mouse Osteocalcin ELISA Kit, Immutopics), OPG (Mouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B Quantikine ELISA Kit, R&D Systems), RANKL (Mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems), 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (Mouse 1,25 dihydroxy vitamin D₃ Elisa kit, BlueGene Biotech) und DPD (MicroVue™ DPD EIA, Quidel) wurde mit kommerziellen Kits nach Herstellerangaben bestimmt. Die DPD-Konzentration im Urin wurde anschließend auf den entsprechenden Kreatinin-Wert (siehe 2.2.7.2) bezogen.

2.2.7.2 Kolorimetrische Messungen

Die Bestimmung der Konzentration von Cholesterin und Triglyceriden in Serum- und Plasmaproben erfolgte durch einen enzymatischen Farbttest. Dazu wurden die Proben 1:20 in PBS verdünnt sowie eine Standardreihe (Cholesterin: 15, 7,5, 3,75, 1,88, 0,94, 0,47, 0 mg/dl; Triglyceride: 18,9, 9,45, 4,73, 2,36, 1,18, 0,59, 0 mg/dl) aus Precipath bekannter

Cholesterin- und Triglycerid-Konzentration in PBS hergestellt. Anschließend wurden je 100 µl der Proben bzw. Standards pro Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte in Doppelwerten aufgetragen und dann je 200 µl CHOL- (Cholesterin CHOD-PAP, Roche) bzw. TG-Reagenz (Triglyceride GPO-PAP, Roche) zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen und die Konzentration anhand der Standardreihe berechnet.

Die Messung der Calcium- (QuantiChrome™ Calcium Assay Kit, BioAssay Systems) und Phosphat-Konzentration (QuantiChrome™ Phosphate Assay Kit, BioAssay Systems) in Mausseren und der Kreatinin-Konzentration (MicroVue™ Creatinine Assay Kit, Quidel) in Urinproben wurde mit kommerziellen Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.7.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Für die Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurde eine Standardreihe des Endprodukts (p-Nitrophenol: 90, 72, 54, 36, 18, 9, 0 µM) aus einer p-Nitrophenol-Standardlösung (10 mM, Sigma) in 0,02 M NaOH angesetzt. Zur Herstellung der Phosphatase-Substrat-Pufferlösung wurde eine 40-mg-Kapsel Phosphatase-Substrat (= p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma) in 10 ml dest. H₂O gelöst, dann mit gleichem Volumen Alkaline Buffer Solution (1,5 M, Sigma) gemischt und auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden je 5 µl Serum in Doppelwerten in Reaktionsgefäßen vorgelegt und die Enzymreaktion durch Zugabe von je 50 µl vorgewärmter Phosphatase-Substrat-Pufferlösung gestartet. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymreaktion mit je 500 µl 0,05 M NaOH gestoppt. Daraufhin wurden je 300 µl der Proben bzw. Standards auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte anhand der Extinktionswerte der Standardreihe, der Reaktionszeit (30 min) und des Verdünnungsfaktors der Proben (1:111).

2.2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Unter der Grundannahme normalverteilter Messwerte wurden die statistischen Analysen mit Hilfe des zweiseitig ungepaarten Student'schen T-Tests durchgeführt. Statistische Signifikanz bezogen auf die Wildtypkontrolle wurde bei einem P-Wert kleiner als 0,05 angenommen (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Funktion von aus Knochen stammendem Apolipoprotein E für den Knochenstoffwechsel *in vivo* und *in vitro* untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe eines globalen *ApoE*^{-/-}-Mausmodells (Piedrahita et al., 1992) zunächst die Expression von *ApoE* im Knochengewebe und in knochenspezifischen Zelltypen analysiert und die Bedeutung von ApoE für die Osteoblasten-Differenzierung *in vitro* untersucht (Abschnitt 3.1). Um *in vivo* die Funktion von ApoE in den verschiedenen knochenspezifischen Zelltypen analysieren zu können, wurden verschiedene Mausmodelle generiert, in denen das Gen für ApoE mit Hilfe des Cre/loxP-Systems früh (*ApoE*^{lox/lox}-*Runx2-Cre*, Abschnitt 3.2) oder spät (*ApoE*^{lox/lox}-*OC-Cre*, Abschnitt 3.3) in der Osteoblasten-Differenzierung oder in Osteoklasten/Makrophagen (*ApoE*^{lox/lox}-*LysM-Cre*, Abschnitt 3.4) deletiert wird. Dazu wurden *ApoE*^{lox/lox}-Mäuse, in denen die Exone 2-4 des *ApoE*-Gens von *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung flankiert sind, mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle unterschiedlicher zelltypspezifischer Promotoren (*Runx2-Cre*, *OC-Cre* oder *LysM-Cre*) exprimieren, gekreuzt (Abbildung 11).

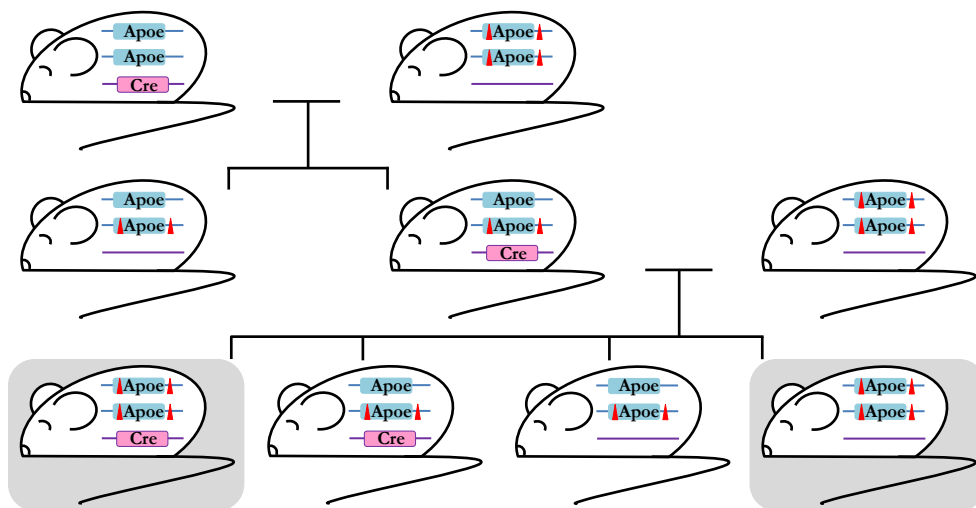


Abbildung 11: Kreuzungsschema zur Generierung eines konditionellen *ApoE*-Ko-Mausmodells.

Zur Kreuzung eines konditionellen *ApoE*-Knockout-Mausmodells wird eine Maus mit einem Cre-Transgen (unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors) mit einer *ApoE*^{lox/lox}-Maus verpaart (*loxP*-Stellen: rote Dreiecke). Die für *ApoE* heterozygot-gefloxten Cre-positiven Nachkommen werden wiederum mit *ApoE*^{lox/lox}-Mäusen gekreuzt, woraus schließlich die gewünschten *ApoE*^{lox/lox}-*Cre*⁺-Mäuse und die dazugehörigen Kontrolltiere (*ApoE*^{lox/lox}-Mäuse) hervorgehen.

In den resultierenden *ApoE*^{lox/lox}-*Cre*⁺-Mäusen kommt es dann zelltypspezifisch zu einer DNA-Rekombination an den *loxP*-Stellen, wodurch der dazwischenliegende *ApoE*-

Genabschnitt entfernt und damit die Genfunktion zerstört wird. Alle anderen Körperzellen sind davon nicht betroffen und weisen eine normale Genfunktion auf. Die auf diese Weise erzeugten Mausmodelle wurden anschließend charakterisiert, wobei der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Knochenstruktur gelegt wurde.

3.1 Voruntersuchungen im *ApoE*^{-/-}-Mausmodell

Wie in Abschnitt 1.3.2 erwähnt, wurde von Schilling et al. (2005) gezeigt, dass *ApoE*-defiziente Mäuse eine erhöhte Knochenmasse mit gesteigerter Knochenbildungsrate aufweisen. Um herauszufinden, ob dieser Phänotyp durch knocheneigenes ApoE oder aber durch einen systemischen Einfluss zustande kommt, wurde zu Beginn dieser Arbeit zunächst die Expression von ApoE im Knochengewebe selbst und in den verschiedenen knochenspezifischen Zelltypen analysiert und dann der Einfluss von ApoE auf die Osteoblastendifferenzierung *in vitro* untersucht.

3.1.1 Expression von ApoE im Knochen

Um die Relevanz von knocheneigenem ApoE abschätzen zu können, war es zunächst von Interesse das Expressionsmuster von *ApoE* in den unterschiedlichen Knochenarealen zu untersuchen und mit den Expressionsniveaus anderer Gewebe zu vergleichen. *ApoE*-mRNA wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen, wobei die meisten Organe ein mit den Knochengeweben vergleichbares Expressionsniveau aufwiesen.

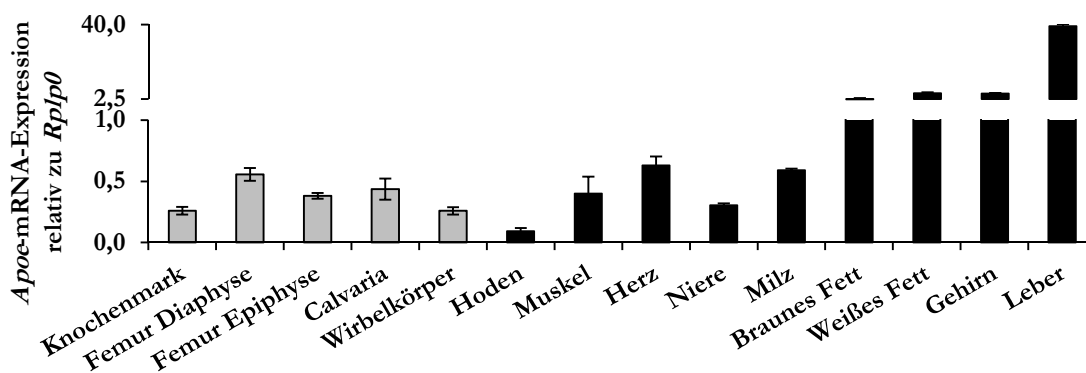


Abbildung 12: *ApoE*-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben der Maus.

ApoE-mRNA wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen, wobei die meisten Organe außer den Fettgeweben, dem Gehirn und der Leber ein mit den Knochengeweben (in Grau dargestellt) vergleichbares Expressionsniveau aufwiesen. Das Expressionsmuster von *ApoE* wurde in 3 Monate alten Mäusen ($n \geq 3$) durch qRT-PCR bestimmt, wobei *Rplp0* als Referenzgen diente.

Nur in den Fettgeweben, dem Gehirn und insbesondere der Leber wurden erheblich höhere *ApoE*-mRNA-Kopienzahlen gemessen (Abbildung 12). Betrachtet man die verschiedenen

Knochenareale genauer, fällt vor allem die höhere *ApoE*-Expression im Femurschaft auf, in welchem vor allem terminal differenzierte Zellen der Osteoblastenlinie, wie Osteozyten, vorkommen. Um herauszufinden, welche Zelltypen für die Expression von *ApoE* im Knochen verantwortlich sind, wurden verschiedene knochenspezifische primäre Zellen aus Mäusen isoliert und deren *ApoE*-Expression mit der von primären murinen Hepatozyten, welche die überwiegende Menge an ApoE im Körper produzieren, verglichen. Von den knochenspezifischen Zelltypen transkribierten Chondrozyten nur vernachlässigbare Mengen an *ApoE*-mRNA, wohingegen Osteoblasten (vor allen aus dem Knochenmark abstammende) und Osteoklasten relativ große Mengen produzierten (Abbildung 13).

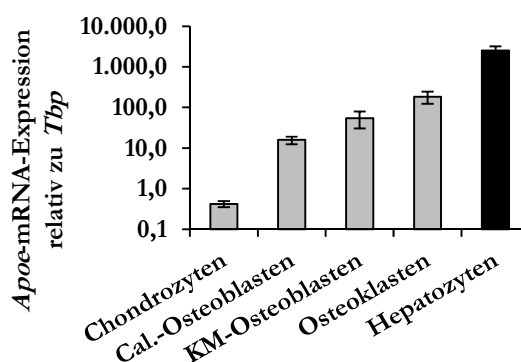


Abbildung 13: *ApoE*-mRNA-Expression in murinen primären Zellen.

In den untersuchten Primärzellen war die *ApoE*-mRNA-Expression in Chondrozyten am geringsten, wohingegen Osteoblasten und Osteoklasten deutlich höhere Mengen produzierten. Die *ApoE*-Expressionsniveaus der verschiedenen murinen primären Zellen (Calvaria-Osteoblasten: Tag 21, Knochenmark-Osteoblasten: Tag 12; knochenspezifische Zelltypen in Grau dargestellt) wurden durch qRT-PCR-Analyse bestimmt. Dabei diente *Tbp* als Referenzgen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Experimenten.

Da in *ApoE*^{-/-}-Mäusen jedoch vor allem die Knochenbildung gesteigert und die Resorption unverändert ist (Schilling et al., 2005), wurde der Fokus der Arbeit zunächst auf die Rolle von ApoE in Osteoblasten gelegt. So wurde im nächsten Schritt die Produktion von ApoE in Osteoblasten mittels Immunhistochemie in vivo (Abbildung 14A) und Immunfluoreszenz in vitro (Abbildung 14B) auf Proteinebene veranschaulicht. Zur eindeutigen Identifizierung von Osteoblasten wurden diese zusätzlich für das osteoblastenspezifische Protein Osteocalcin angefärbt und der distale Femur bzw. Knochenmark-Osteoblasten von *ApoE*^{-/-}-Mäusen als Negativkontrollen für die ApoE-Färbung verwendet.

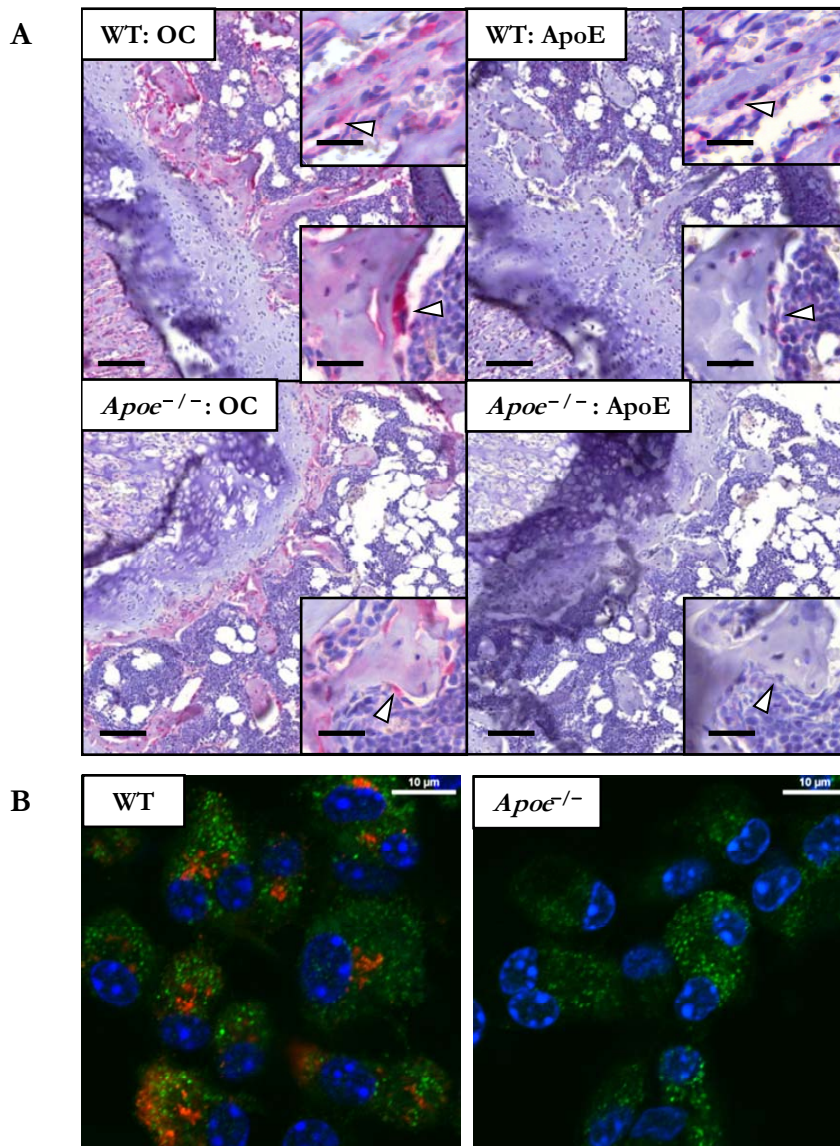


Abbildung 14: Immunfärbungen von ApoE und Osteocalcin im Knochengewebe und in primären KM-Osteoblasten.

(A) Mittels Immunhistochemie wurde Osteocalcin (OC) oder Apolipoprotein E (ApoE) mit Fast Red in sagittalen 5- μ m-Serienschnitten des distalen Femurs von Wildtyp- und *ApoE*^{-/-}-Mäusen angefärbt (Maßstab: 100 μ m, Vergrößerung: 25 μ m). (B) Die Immunfluoreszenzfärbung von ApoE (rot) und Osteocalcin (grün) erfolgte in primären Wildtyp- und *ApoE*^{-/-}-KM-Osteoblasten (Tag 6) (Maßstab: 10 μ m).

3.1.2 Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären Osteoblasten

Da gezeigt wurde, dass ApoE von Osteoblasten selbst exprimiert wird, sollte im nächsten Schritt die Bedeutung von ApoE, das von Osteoblasten selbst synthetisiert wird, für die Osteoblastendifferenzierung untersucht werden. Einen ersten Hinweis darauf, dass ApoE eine wichtige Rolle in der Osteoblastendifferenzierung spielen könnte, lieferte die starke Induktion der *ApoE*-Expression im Differenzierungsverlauf von Calvaria-Osteoblasten.

Bezogen auf Tag 6 der Differenzierung stieg die *ApoE*-mRNA-Menge bis Tag 12 um das 2,8-Fache und bis Tag 21 sogar um das 5,3-Fache an (Abbildung 15).

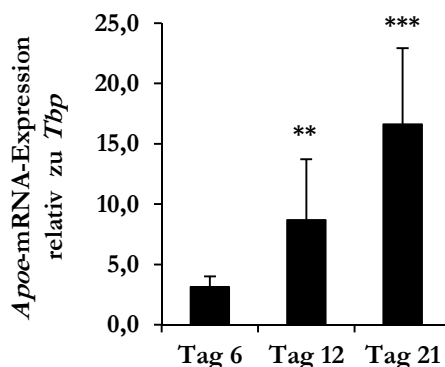


Abbildung 15: Induktion der *ApoE*-mRNA-Expression während der Calvaria-Osteoblastendifferenzierung.

Im Differenzierungsverlauf von primären Calvaria-Osteoblasten zeigte sich ein starker Anstieg der *ApoE*-Expression. Die mRNA-Expression von *ApoE* während der osteoblastären Differenzierung wurde mittels qRT-PCR-Analyse untersucht, wobei die Expression auf das Referenzgen *Tbp* normiert wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Bei der Berechnung der statistischen Signifikanz wurde jeweils auf Tag 6 Bezug genommen.

Des Weiteren wurden primäre Calvaria-Osteoblasten aus heterozygoten und homozygoten *ApoE*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen isoliert und ihr Differenzierungspotential zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 6 (Abbildung 16A) und Tag 21(B)) verglichen. Die Expression von *ApoE* war in den *ApoE*^{+/-}-Osteoblasten wie erwartet zu beiden Zeitpunkten auf etwa die Hälfte reduziert und in den *ApoE*^{-/-}-Zellen gar nicht mehr nachweisbar. Bezüglich der mRNA-Expression der anderen untersuchten Gene unterschieden sich die *ApoE*^{+/-}-Osteoblasten zu keinem Zeitpunkt vom Expressionsniveau der Wildtypzellen. Somit reicht ein funktionelles *ApoE*-Allel aus, um die Funktion von ApoE hinsichtlich der Expression von Osteoblastendifferenzierungsmarkern in Osteoblasten *in vitro* aufrechtzuerhalten. In den *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten hingegen waren die Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase (*Alpl*), Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*), Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht, wobei die Unterschiede im späteren Differenzierungsverlauf (Tag 21) noch deutlich zunahmten. Dabei wurde vor allem das Gen für Osteocalcin besonders stark induziert, d. h. an Tag 6 bereits um das 3-fache und an Tag 21 um das 11-fache der Wildtyp-Expression. Die Genexpression der Osteoklasten regulierenden Proteine Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) war im frühen Differenzierungsstadium nicht verändert, wohingegen es im späteren Differenzierungsverlauf zu einer deutlich erhöhten *Tnfsf11*-mRNA-Expression in den *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten kam.

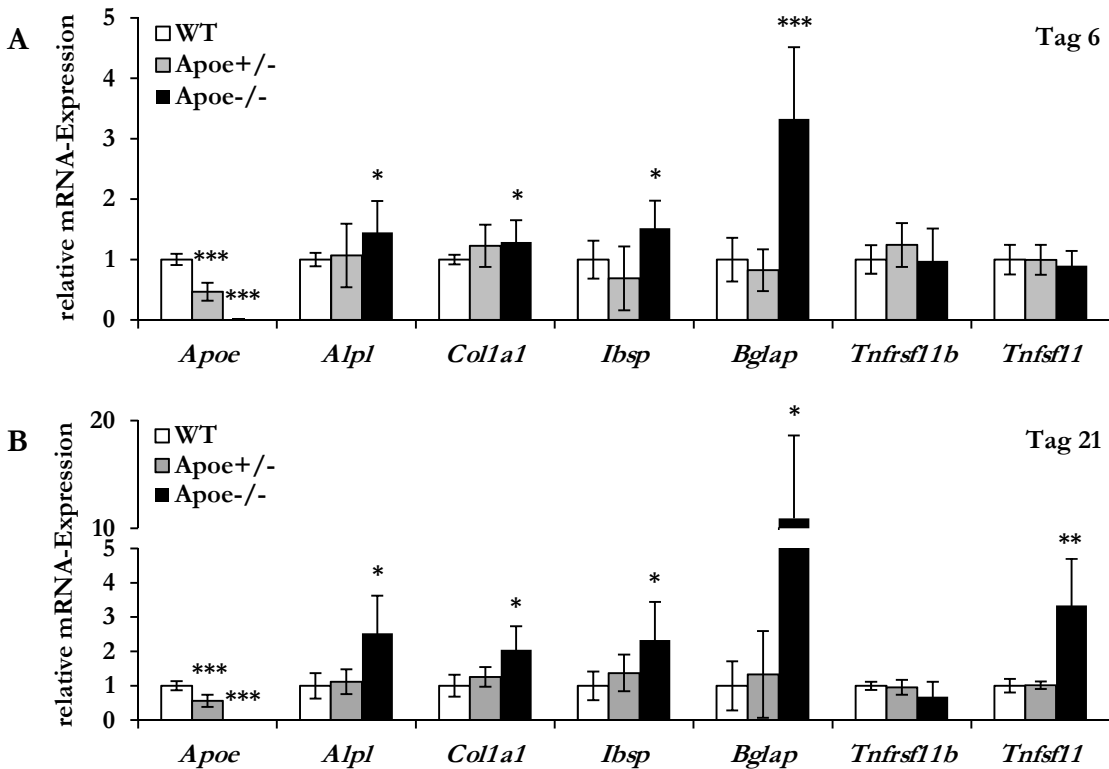


Abbildung 16: Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären Calvaria-Osteoblasten.

In den *ApoE*^{-/-}-Calvaria-Osteoblasten waren die Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase (*Alpl*), Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*), Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) zu beiden Zeitpunkten (Tag 6 (A) und Tag 21 (B)) signifikant erhöht, während sich die *ApoE*^{+/-}-Osteoblasten in ihrer mRNA-Expression zu keinem Zeitpunkt von den Wildtypzellen unterschieden. Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) waren im frühen Differenzierungsstadium nicht verändert, wohingegen es in den *ApoE*^{-/-}-Zellen später zu einer erhöhten *Tnfsf11*-mRNA-Expression kam. Die Expression der Osteoblastenmarker wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf die Expression des Wildtyps dargestellt. Statistische Signifikanz wurde immer in Bezug auf den Wildtyp berechnet.

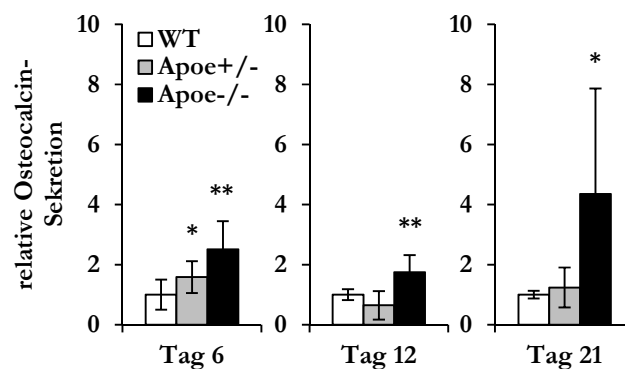


Abbildung 17: Einfluss von ApoE auf die OC-Sekretion von primären Calvaria-Osteoblasten.

Die Sekretion von Osteocalcin war bei den *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht, während die OC-Sekretion der *ApoE*^{+/-}-Osteoblasten kaum von der der Wildtypzellen abwich. Die Osteocalcin-Sekretion von Calvaria-Osteoblasten wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Osteoblastendifferenzierung (Tag 6, Tag 12 und Tag 21) bestimmt und die Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten als relative Werte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp angegeben. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls immer in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

Da sich eine *ApoE*-Defizienz in Osteoblasten am stärksten auf die *Bglap*-Expression auswirkte, wurde zusätzlich zur mRNA-Expression die Osteocalcin-Sekretion von Calvaria-Osteoblasten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 17). Die Osteocalcin-Sekretion in den Zellkulturüberstand der *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten war ebenfalls zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht und nahm im Differenzierungsverlauf zu, während die *ApoE*^{+/-}-Osteoblasten nur an Tag 6 der Differenzierung eine leicht erhöhte Osteocalcin-Sekretion zeigten und diese ansonsten nicht von der der Wildtypzellen abwich.

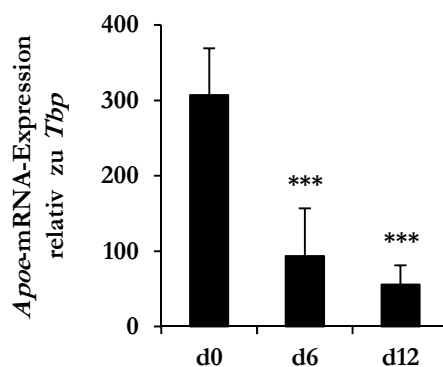


Abbildung 18: Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression während der KM-Osteoblasten-Differenzierung.

Im Differenzierungsverlauf von primären Knochenmark-Osteoblasten nahm die *ApoE*-mRNA-Expression stark ab. Die Expressionsanalyse von *ApoE* während der osteoblastären Differenzierung wurde mittels qRT-PCR durchgeführt, wobei die Expression auf das Referenzgen *Tbp* normiert wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Bei der Berechnung der statistischen Signifikanz wurde jeweils auf Tag 0 Bezug genommen.

Nach eigenen Beobachtungen unterscheiden sich Calvaria-Osteoblasten in ihrem Differenzierungsverhalten von KM-Osteoblasten. Vor allem differenzieren KM-Osteoblasten deutlich schneller und weisen eine verstärkte Mineralisierungskapazität auf. Außerdem wird *ApoE* in KM-Osteoblasten im Gegensatz zu Calvaria-Osteoblasten während der Differenzierung herunterreguliert (Abbildung 18). Daher wurde die Rolle von ApoE zusätzlich in KM-Osteoblasten untersucht. Im undifferenzierten Zustand von KM-Osteoblasten (Tag 0, Abbildung 19A) glichen die Expressionsverhältnisse denen der Calvaria-Osteoblasten an Tag 6. Jedoch nahmen die Expressionsunterschiede der Osteoblastenmarker zwischen den Genotypen im Differenzierungsverlauf (Tag 12, Abbildung 19B) nicht wie bei den Calvaria-Osteoblasten zu, sondern ab. Trotz dieser Tendenz wurden die Osteoblastenmarkerergebnisse in den *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten an Tag 12 immer noch signifikant höher exprimiert als in den Wildtypzellen. Zudem zeigte sich in den differenzierten *ApoE*^{-/-}-KM-Osteoblasten auch eine signifikant höhere *Tnfrsf11*-mRNA-Expression, wobei die *Tnfrsf11b*-mRNA-Expression unverändert blieb.

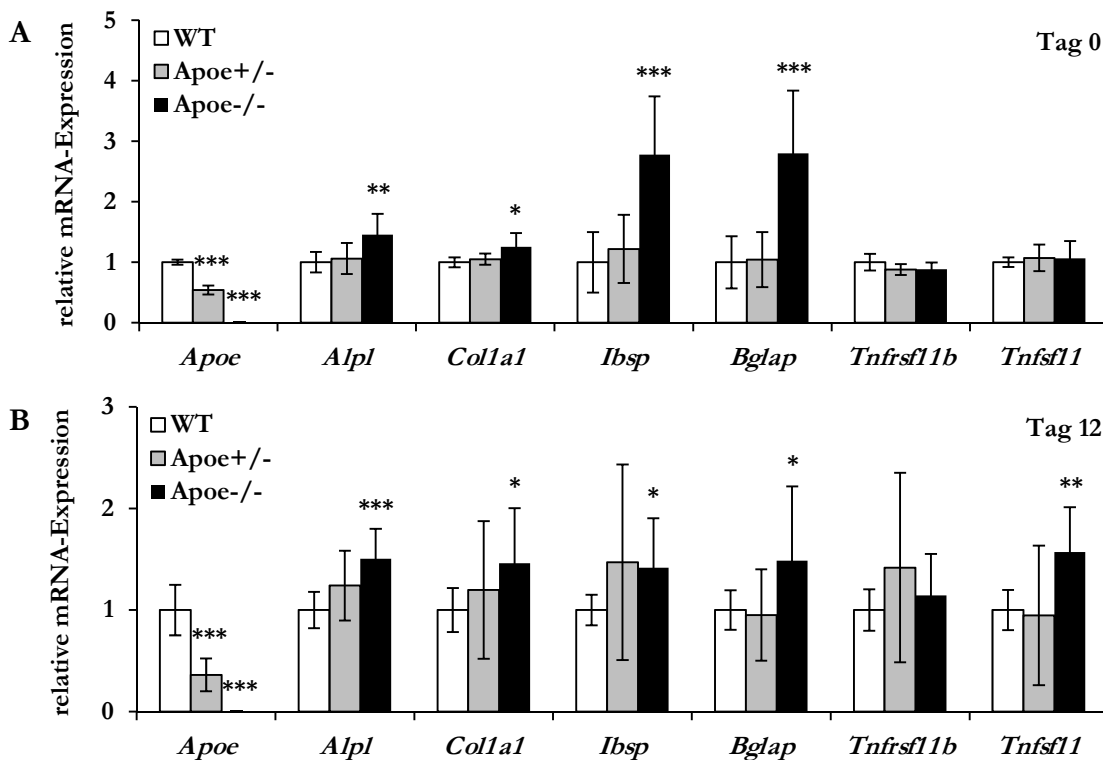


Abbildung 19: Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären KM-Osteoblasten.

Die Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase (*Alpl*), Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*), Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) waren in den *Apoe*^{-/-}-Knochenmark-Osteoblasten zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Tag 0 (A) und Tag 12 (B)) signifikant erhöht, während sich die *Apoe*^{+/-}-Osteoblasten in ihrer mRNA-Expression zu keinem Zeitpunkt von den Wildtypzellen unterschieden. Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) waren im undifferenzierten Zustand nicht verändert, wohingegen es in den *Apoe*^{-/-}-Zellen später zu einer erhöhten *Tnfsf11*-mRNA-Expression kam. Die Expression der Osteoblastenmarker wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

Folglich nimmt die inhibierende Wirkung von ApoE auf die Expression der Osteoblastendifferenzierungsmarker von KM-Osteoblasten während der Differenzierung ab, während sie bei Calvaria-Osteoblasten ansteigt und damit der jeweiligen Änderung der *Apoe*-mRNA-Expression folgt.

3.2 Charakterisierung des *Apoe*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodells

Da der globale *Apoe*-Knockout in Mäusen zu einer erhöhten Knochenmasse führt (Schilling et al., 2005) und gezeigt wurde, dass ApoE in vitro die Expression von Osteoblastenmarkern während der Osteoblastendifferenzierung inhibiert, sollte zur Unterscheidung von systemischen und osteoblastenspezifischen Effekten von ApoE ein konditionelles *Apoe*-Knockout-Mausmodell verwendet werden. Um im nächsten Schritt spezifisch die Funktion von Osteoblasten-ApoE in vivo untersuchen zu können, wurden daher

ApoE^{flox/flox}-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Runx2*-Promotors exprimieren (Rauch et al., 2010). *Runx2* ist ein spezifischer Marker der Osteoblastenlinie, dessen Promotor früh in der Osteoblastenentwicklung aktiv ist (Ducy et al., 1997). Neben seiner Expression in Osteoblasten ist *Runx2* noch in der terminalen Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten nachweisbar (Enomoto et al., 2000). Somit erlaubt dieses Mausmodell, die Funktion von ApoE in den Zellen der Osteoblastenlinie während der gesamten osteoblastären Entwicklung *in vivo* zu untersuchen.

3.2.1 Osteoblastenspezifische Reduktion von ApoE

Vor Beginn der phänotypischen Analysen wurde überprüft, ob es in den Cre-tragenden Mäusen zu einer spezifischen und effizienten Reduktion von ApoE in Osteoblasten kommt. Die Expression von *ApoE* im Knochengewebe war je nach Lokalisation um 45-71 % reduziert, während in den anderen untersuchten Geweben keine signifikante Abnahme zu beobachten war (Abbildung 20). Wie erwartet, zeigte sich auch bei der ApoE-Konzentration im Serum kein Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 21).

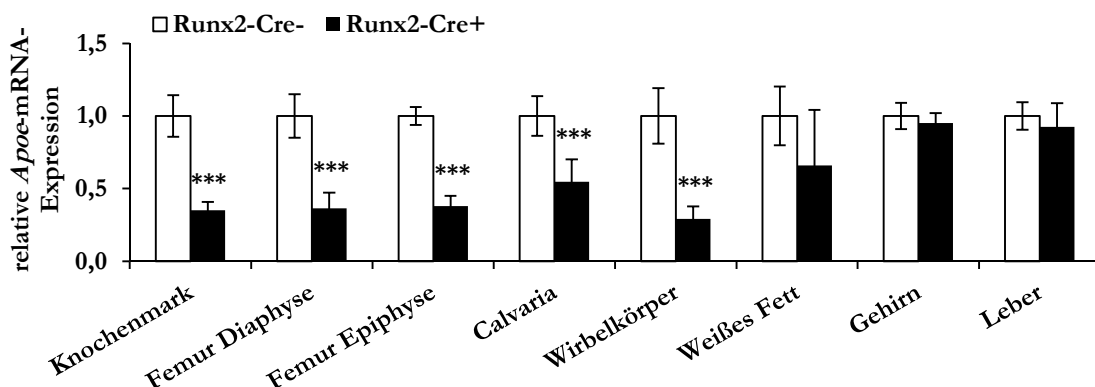


Abbildung 20: Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression im Knochengewebe von *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mäusen.

In den *Runx2-Cre*-positiven *ApoE*^{flox/flox}-Mäusen wurde die mRNA-Expression von *ApoE* in allen Knochengeweben signifikant reduziert, während die anderen untersuchten Gewebe nicht beeinflusst wurden. Die *ApoE*-mRNA-Expression wurde in Geweben von drei Monate alten männlichen *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mäusen (n = 6) mittels qRT-PCR bestimmt, wobei die Messwerte auf das Referenzgen *Rplp0* normiert und dann als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt wurden. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls immer in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

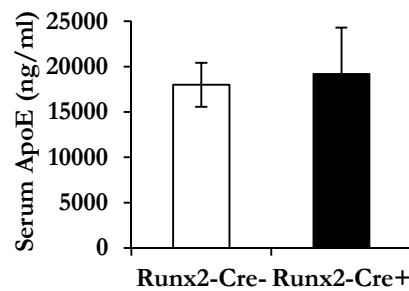


Abbildung 21: Konzentration von ApoE im Serum von $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mäusen.

Bei der Messung der ApoE-Konzentration in Seren von drei Monate alten männlichen $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mäusen ($n \geq 5$) mittels ELISA wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt.

Bei der Analyse der jeweiligen primären Knochenzelltypen zeigte sich eine Reduktion der $ApoE$ -mRNA-Expression um 64 % in Chondrozyten, 59 % in Calvaria-Osteoblasten und 38 % in Knochenmark-Osteoblasten von $Runx2-Cre$ -positiven $ApoE^{flox/flox}$ -Tieren (Abbildung 22). In Chondrozyten betrug die $ApoE$ -mRNA-Expression jedoch nur etwa ein Prozent der Expression von Osteoblasten (Abbildung 13).

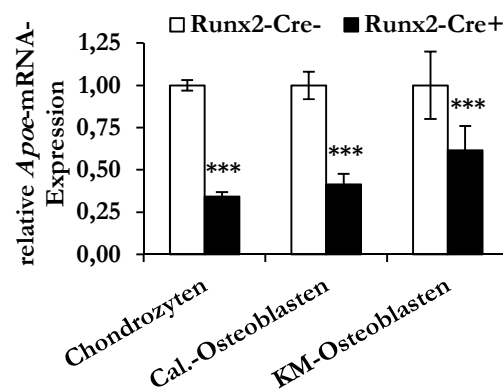


Abbildung 22: Reduktion der $ApoE$ -mRNA-Expression in primären $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Knochenzelltypen.

Die mRNA-Expression von $ApoE$ wurde in primären Chondrozyten und Osteoblasten (Calvaria-Osteoblasten: Tag 12, Knochenmark-Osteoblasten: Tag 12) aus $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ + -Mäusen signifikant reduziert. Die $ApoE$ -mRNA der primären Knochenzelltypen wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei die Messwerte auf das Referenzgen Tbp normiert und dann als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt wurden. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls immer in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

3.2.2 Untersuchung des Energiestoffwechsels

Im $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mausmodell wurden die Tiere im erwarteten Verhältnis gemäß den mendelschen Regeln geboren und hatten ein gesundes unauffälliges Erscheinungsbild. Zudem unterschieden sie sich nicht in ihrem Körpergewicht oder ihrer täglichen Nahrungsaufnahme (Abbildung 23).

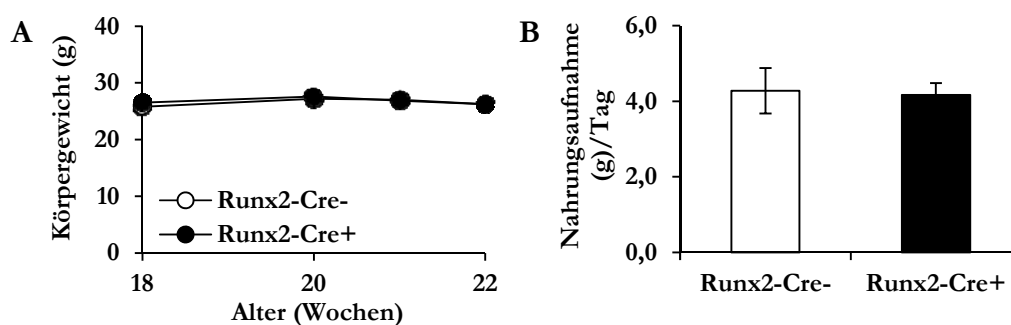


Abbildung 23: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme von $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mäusen.

Im (A) Körpergewicht und (B) der Nahrungsaufnahme/Tag von $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mäusen wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Für die Untersuchung wurden männliche Mäuse ($n \geq 6$) ab einem Alter von 18 Wochen verwendet.

Da $ApoE^{-/-}$ -Mäuse durch die Akkumulation von cholesterinreichen Lipoproteinpartikeln im Plasma eine spontane Hypercholesterinämie entwickeln (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992) und zudem im adipösen Zustand eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität aufweisen (Bartelt et al., 2011b; Gao et al., 2007), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Osteoblasten-ApoE einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel hat. Da männliche Mäuse keine zyklusabhängigen Hormonschwankungen aufweisen, werden diese standardmäßig für metabolische Untersuchungen verwendet. Zur Analyse des Energiemetabolismus wurde daher zum einen die Glukoseaufnahme männlicher $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre$ -Mäuse im Alter von vier Monaten durch einen oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) untersucht.

Dazu wurden die Tiere vier Stunden gefastet, ihr basaler Glukosewert gemessen (~ 130 mg/dl) und ihnen dann 1,0 mg Glukose/g Körpergewicht per Gavage verabreicht. Die Veränderungen der Glukosekonzentration im Blut wurden dann 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Gavage bestimmt (Abbildung 24A). Nach der oralen Glukosegabe stieg die Glukose-Konzentration im Blut der Mäuse sofort an und erreicht bereits nach 15 Minuten ihr Maximum bei etwa 260 mg/dl. Anschließend nahm die Blut-Glukose wieder kontinuierlich ab und befand sich nach etwa 120 Minuten fast auf ihrem Basalniveau. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

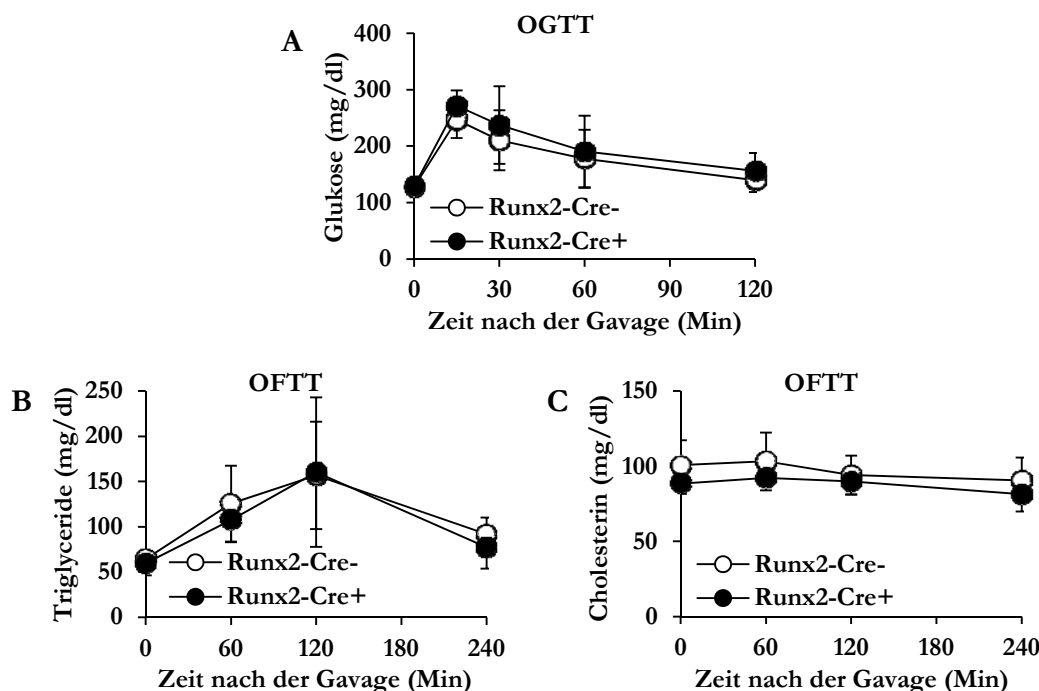


Abbildung 24: Orale Glukose-Toleranz-Test und orale Fett-Toleranz-Test von *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen.

Bei der Untersuchung des Energiestoffwechsels war in männlichen *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen ($n \geq 6$) mittels (A) oralem Glukose-Toleranz-Test (OGTT) im Alter von vier Monaten und (B und C) oralem Fett-Toleranz-Test (OFTT) im Alter von fünf Monaten kein Unterschied zwischen den Genotypen messbar. Den gefasteten Tieren wurde beim OGTT 1,0 mg Glukose/g Körpergewicht und beim OFTT 200 μ l Olivenöl per Gavage verabreicht.

Zum anderen wurde die postprandiale Lipidclearance männlicher *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäuse im Alter von fünf Monaten durch einen oralen Fett-Toleranz-Test (OFTT) analysiert. Dafür wurde den Mäusen nach vierstündiger Nahrungskarenz Olivenöl oral verabreicht und zur Triglycerid- und Cholesterinbestimmung nach 0, 60, 120 und 240 Minuten Plasma entnommen. Nach der Gavage stieg die Triglycerid-Konzentration im Blut der Mäuse von einem Basalwert von etwa 60 mg/dl an und erreichte nach etwa 120 Minuten ihr Maximum bei etwa 160 mg/dl. Daraufhin sank die Triglycerid-Konzentration im Blut wieder ab bis sie nach 240 Minuten fast ihr Basalniveau erreichte (Abbildung 24B). Die Cholesterinwerte der *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäuse lagen im gefasteten Zustand bei etwa 100 mg/dl und veränderten sich während des OFTT kaum (Abbildung 24C). Im Verlauf des OFTT wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Somit hat Osteoblasten-ApoE zumindest unter nicht-adipösen Bedingungen keinen Einfluss auf die orale Glukosetoleranz und die postprandiale Lipidclearance männlicher *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäuse.

3.2.3 Analyse der Knochenstruktur

Die Untersuchungen des skelettalen Phänotyps von *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mäusen wurden standardmäßig anhand weiblicher Tiere durchgeführt. Die Röntgenaufnahmen von drei und sechs Monate alten Weibchen zeigten makroskopisch keine Auffälligkeiten in der Skelettarchitektur und -entwicklung, sowie der Knochenstruktur (Abbildung 25).

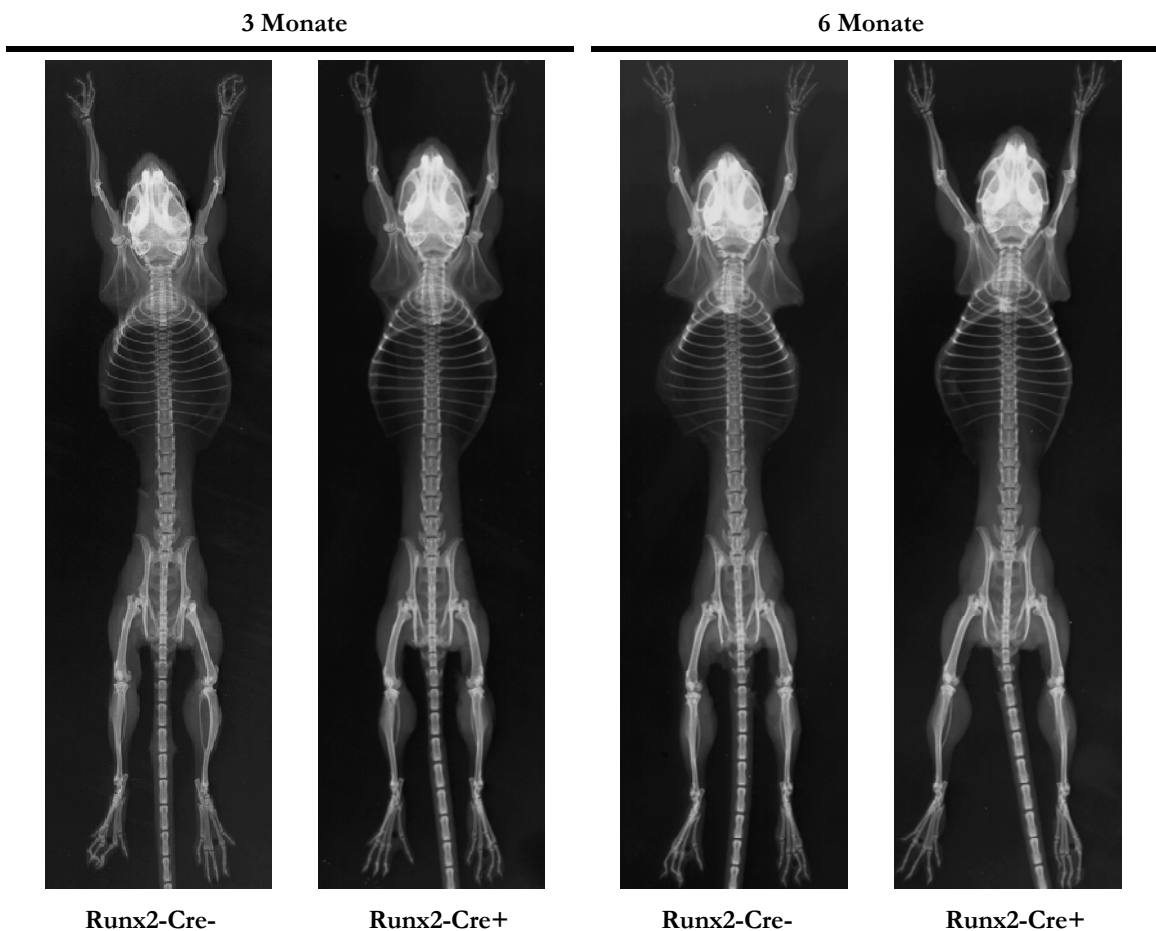


Abbildung 25: Röntgenaufnahmen der Skelette von *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mäusen.

Die Röntgenbilder von drei und sechs Monate alten weiblichen *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mäusen zeigen exemplarisch, dass die Tiere makroskopisch eine normale Skelettarchitektur und Knochenstruktur aufweisen.

3.2.3.1 Histomorphometrische Analyse der Lendenwirbelkörper

Interessanterweise ergab die histomorphometrische Analyse der Lendenwirbelkörper, dass der Knochenphänotyp des osteoblastenspezifischen *ApoE*-Knockout-Mausmodells nicht den des globalen *ApoE*^{-/-}-Mausmodells widerspiegelt. Es zeigte sich bei der Untersuchung von nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten Schnitten der Lendenwirbelkörper in den *Runx2-Cre*-tragenden *ApoE*^{flox/flox}-Mäusen im Alter von drei Monaten eine

leichte und im Alter von sechs Monaten schließlich eine signifikante Reduktion (um 25 %) des trabekulären Knochenvolumens (BV/TV) (Abbildung 26A und B).

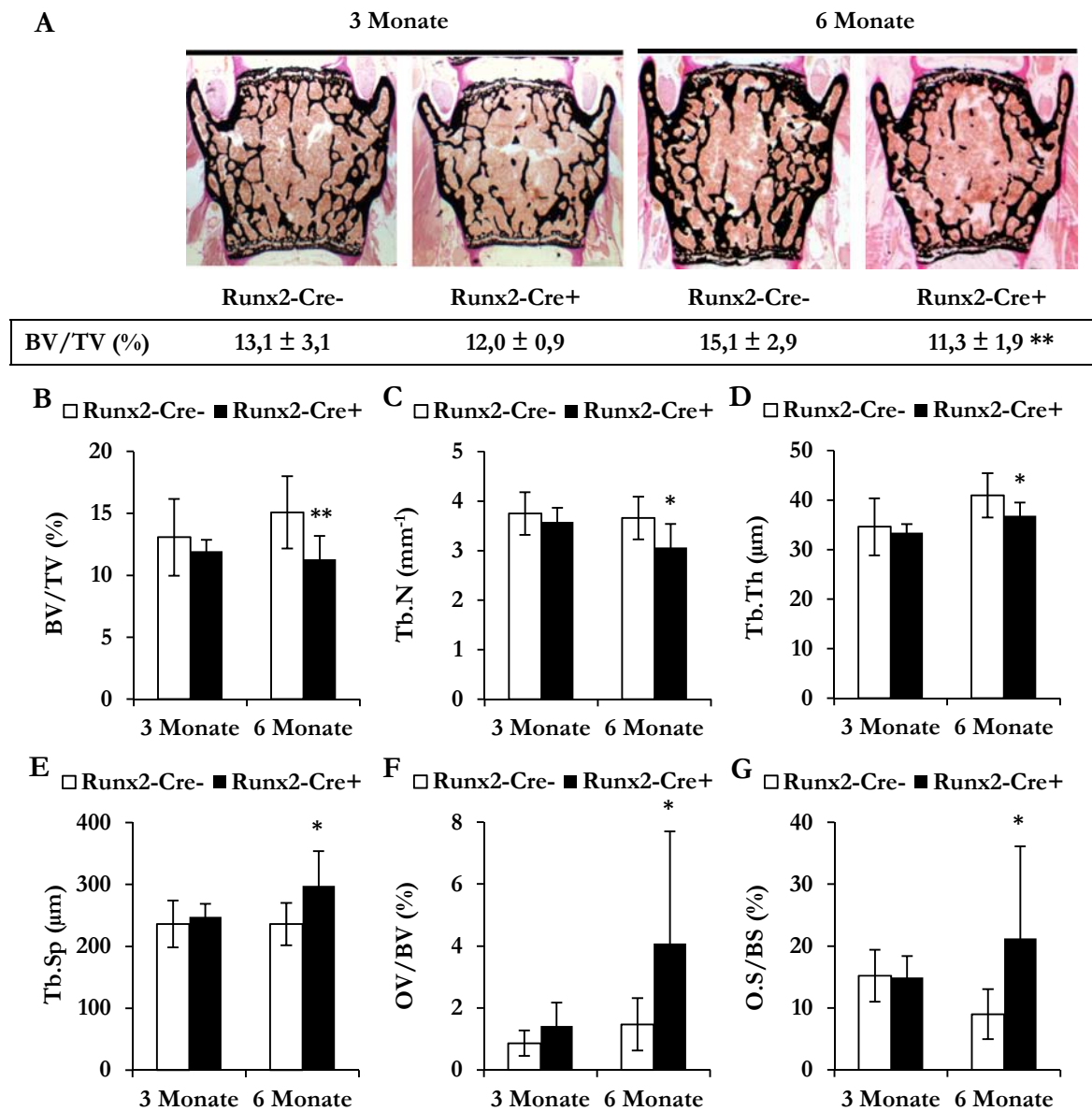


Abbildung 26: Histomorphometrische Analyse von *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Lendenwirbelkörpern.

(A) Die Analyse von nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten 5-µm-Schnitten der Lendenwirbelkörper ($n \geq 8$) zeigte in den sechs Monate alten Cre-tragenden *ApoE*^{flox/flox}-Weibchen eine deutliche Reduktion (B) des trabekulären Knochenvolumen/Gewebevolumen-Verhältnisses (BV/TV) mit entsprechenden Unterschieden in (C) der Trabekelanzahl (Tb.N), (D) der Trabekeldicke (Tb.Th) sowie (E) des Trabekelabstandes (Tb.Sp). Zudem waren bei diesen Tieren (F) das Osteoidvolumen (OV/BV) und (G) die Osteoidoberfläche (O.S/BS) stark erhöht.

Passend dazu waren im Alter von sechs Monaten die Trabekelanzahl (Tb.N) und -dicke (Tb.Th) in den Wirbelkörpern dieser Tiere erniedrigt und der Trabekelabstand (Tb.Sp) erhöht. Zusätzlich wiesen die Wirbelkörper der Osteoblasten-ApoE-defizienten Tiere ein deutlich gesteigertes Osteoidvolumen (OV/BV) und eine stark vergrößerte Osteoidober-

fläche (O.S/BS) auf (Abbildung 26C-G). Im nächsten Schritt wurde die Osteoblastenanzahl (N.Ob/B.Pm) und -oberfläche (Ob.S/BS) sowie die Knochenbildungsrate (BFR/BS) bestimmt, wobei aber keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt wurden (Abbildung 27A-C). Der Verlust von Osteoblasten-ApoE führte aber zu einer massiven Steigerung der Osteoklastenanzahl (N.Oc/B.Pm) und -oberfläche (Oc.S/BS) in den sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen (Abbildung 27D-E).

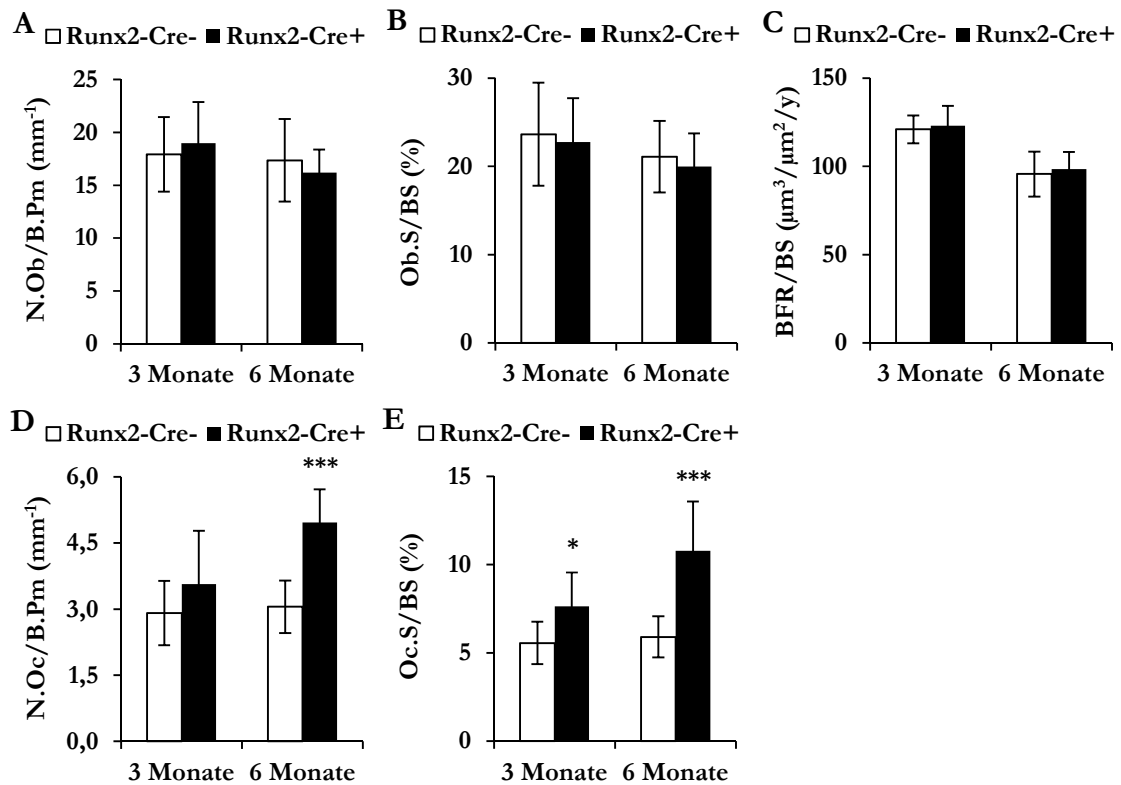


Abbildung 27: Zytometrische und dynamische Parameter von *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Lendenwirbelkörpern.

Osteoblasten-ApoE hatte keinen Einfluss auf (A) die Osteoblastenanzahl (N.Ob/B.Pm) und (B) -oberfläche (Ob.S/BS) sowie (C) die Knochenbildungsrate (BFR/BS). Wohingegen (D) die Osteoklastenanzahl (N.Oc/B.Pm) und (E) -oberfläche (Oc.S/BS) in sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Mäusen signifikant erhöht waren. Die zellulären Parameter wurden anhand von Toluidinblau-gefärbten 5-µm-Schnitten der Lendenwirbelkörper ($n \geq 8$) bestimmt, während für die Messung der Knochenbildungsrate nach der Calcein-Doppelmarkierungsmethode nicht-gefärbte 12-µm-Schnitte verwendet wurden.

3.2.3.2 µ-Computer-Tomographie-Analyse der Femora

Ergänzend zu den Histomorphometrie-Daten der Lendenwirbelkörper wurde der Knochenphänotyp der *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Mäuse durch dreidimensionale Messungen der Femora mittels µ-Computer-Tomographie (µCT) bestätigt. Das Längenwachstum der Femora wurde nicht durch Osteoblasten-ApoE beeinflusst. Der Wegfall von Osteoblasten-

ApoE führte aber auch in den Femora zu einem deutlich verminderten trabekulären Knochenvolumen (um 34 %) mit entsprechenden Tendenzen in der Trabekelanzahl, der Trabekeldicke sowie des Trabekelabstandes. Zudem kam es auch zu einer Reduktion der volumetrische Knochenmineraldichte (vBMD) um 22 % (Abbildung 28).

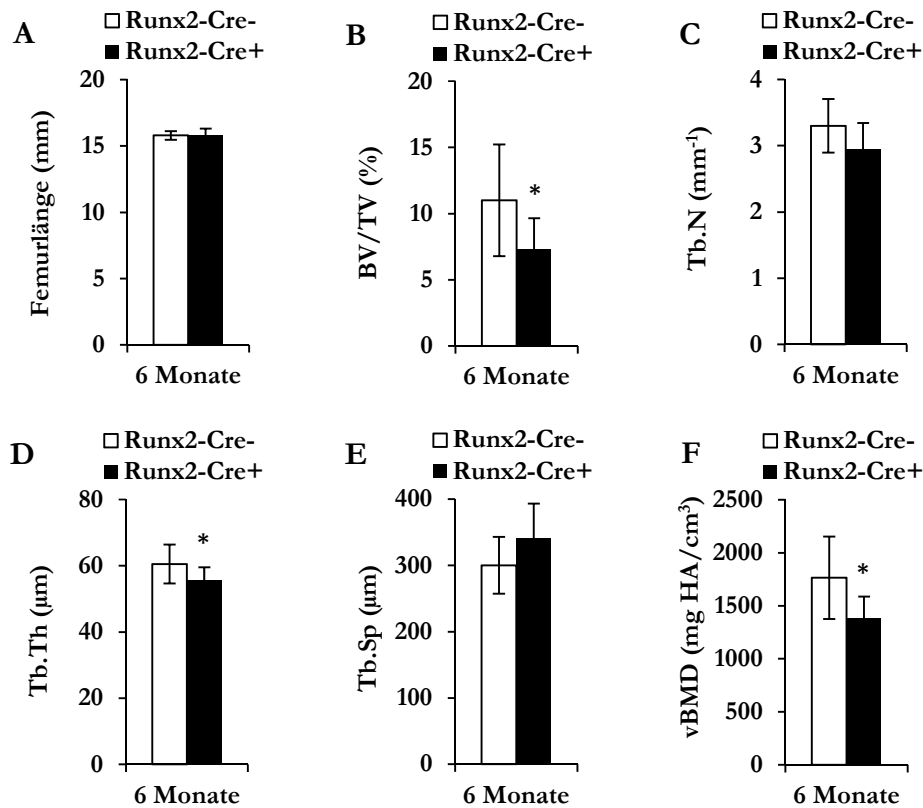


Abbildung 28: Analyse der trabekulären Mikroarchitektur von *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Femora.

Die μ CT-Analyse der Femora von sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Weibchen ($n = 10$) zeigte keinen Unterschied in (A) der Femurlänge, aber eine deutliche Reduktion (B) des trabekulären Knochenvolumen/Gewebevolumen-Verhältnisses (BV/TV) mit entsprechenden Tendenzen in (C) der Trabekelanzahl (Tb.N), (D) der Trabekeldicke (Tb.Th) sowie (E) des Trabekelabstandes (Tb.Sp) der Cre-positiven Tiere verglichen mit Kontrolltieren. Zudem hatten die Cre-positiven Tiere (F) eine signifikant erniedrigte volumetrische Knochenmineraldichte (vBMD).

Während sich aus Osteoblasten stammendes ApoE deutlich auf die trabekuläre Knochenstruktur auswirkt, sind dessen Effekte auf die kortikale Knochenmorphologie gering. So wurden in den Femora bezüglich der kortikalen Knochenfläche (Ct.Ar), der Gesamtquerschnittsfläche (Tt.Ar) sowie der Dicke der Kortikalis (Ct.Th) keine Unterschiede zwischen den Genotypen der *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäuse gemessen. Nur das Verhältnis von kortikaler Knochenfläche zur Gesamtquerschnittsfläche (Ct.Ar/Tt.Ar) war in den sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Mäusen erniedrigt (Abbildung 29).

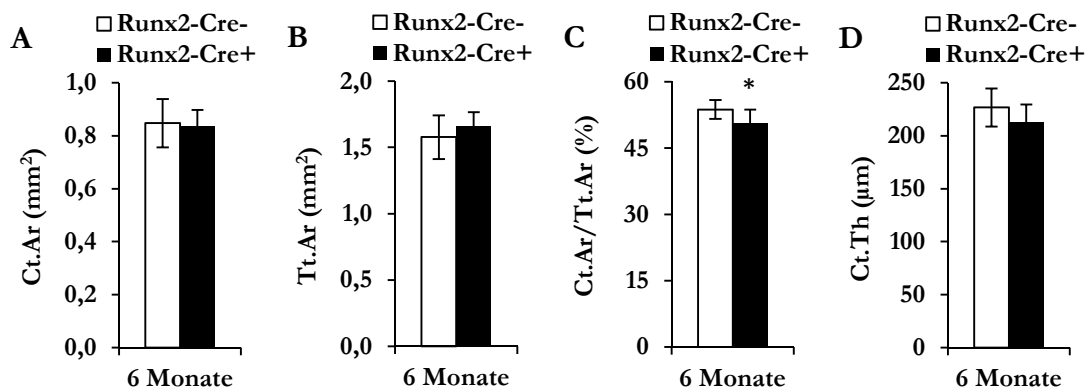


Abbildung 29: Analyse der kortikalen Knochenmorphologie von *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre*-Femora.

Osteoblasten-ApoE hatte keinen Einfluss auf (A) die kortikale Knochenfläche (Ct.Ar), (B) die Gesamtquerschnittsfläche (Tt.Ar) sowie (D) die kortikale Dicke (Ct.Th). Nur (C) das Verhältnis von kortikaler Knochenfläche zur Gesamtquerschnittsfläche (Ct.Ar/Tt.Ar) war in den sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre+*-Mäusen (n = 10) im Vergleich zu Kontrolltieren leicht erniedrigt.

Zusammenfassend führt der osteoblastenspezifische *ApoE*-Knockout in sechs Monate alten Weibchen zu einer verminderten trabekulären Knochenmasse bei stark erhöhtem Osteoid. Dabei ist jedoch die Osteoblastenanzahl und -aktivität unbeeinflusst, während die Osteoklastenanzahl massiv erhöht ist.

3.2.4 Bestimmung von Knochenumbau markern im Serum und Urin

Um den zugrunde liegenden Mechanismen des beobachteten Knochenphänotyps der *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre+*-Mäuse auf die Spur zu kommen, wurden verschiedene Knochenumbau marker im Serum und Urin der Mäuse bestimmt. Zuvor wurde überprüft, dass die ApoE-, Triglycerid- und Cholesterin-Konzentration auch im Serum der weiblichen Tiere unverändert sind und diese Faktoren somit keinen Einfluss auf den Knochenphänotyp haben (Abbildung 30).

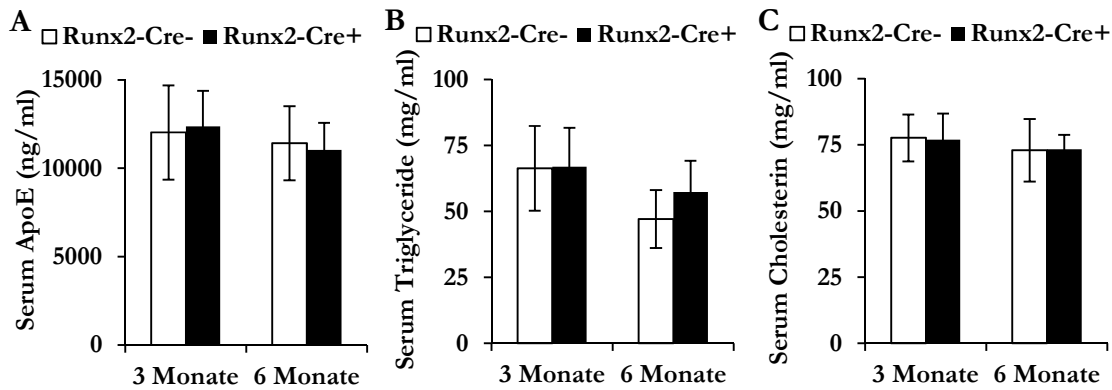


Abbildung 30: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre*-Mäusen.

Osteoblasten-ApoE hatte weder einen Einfluss auf (A) die ApoE-Konzentration noch auf (B) die Triglycerid- und (C) Cholesterin-Konzentration im Serum von drei und sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre*-Mäusen ($n \geq 9$).

Bei der Untersuchung der Knochenumbau-marker wurden in Übereinstimmung mit der Knochenstrukturanalyse in den drei Monate alten Tieren keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt, wohingegen die älteren sechs Monate alten Tiere deutliche Veränderungen zeigten. Die alkalische Phosphatase-Aktivität war unverändert, wohingegen die Konzentration des Knochenbildungs- und Turnover-Markers Osteocalcin bei osteoblastenspezifischer ApoE-Defizienz signifikant anstieg. Außerdem war der Wert für das Kollagenabbauprodukt Desoxypyridinolin (DPD)/Kreatinin im Urin der Cre-positiven Weibchen stark erhöht, was übereinstimmend mit der massiven Zunahme der Osteoklastenzahl im Knochen darauf hinweist, dass der Knochenphänotyp zumindest teilweise durch gesteigerte Resorption verursacht wird (Abbildung 31A-C). Die Messung der Osteoklasten regulierenden Proteine OPG und RANKL im Serum ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen. In den Cre-positiven Mäusen war das OPG/RANKL-Verhältnis aber tendenziell erniedrigt, erreichte aber keine statistische Signifikanz (Abbildung 31D-F). Des Weiteren war die Konzentration von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 zwischen den Genotypen nicht verändert und es lag keine Störung des Calcium- und Phosphat-Haushalts im Serum vor (Abbildung 31G-I).

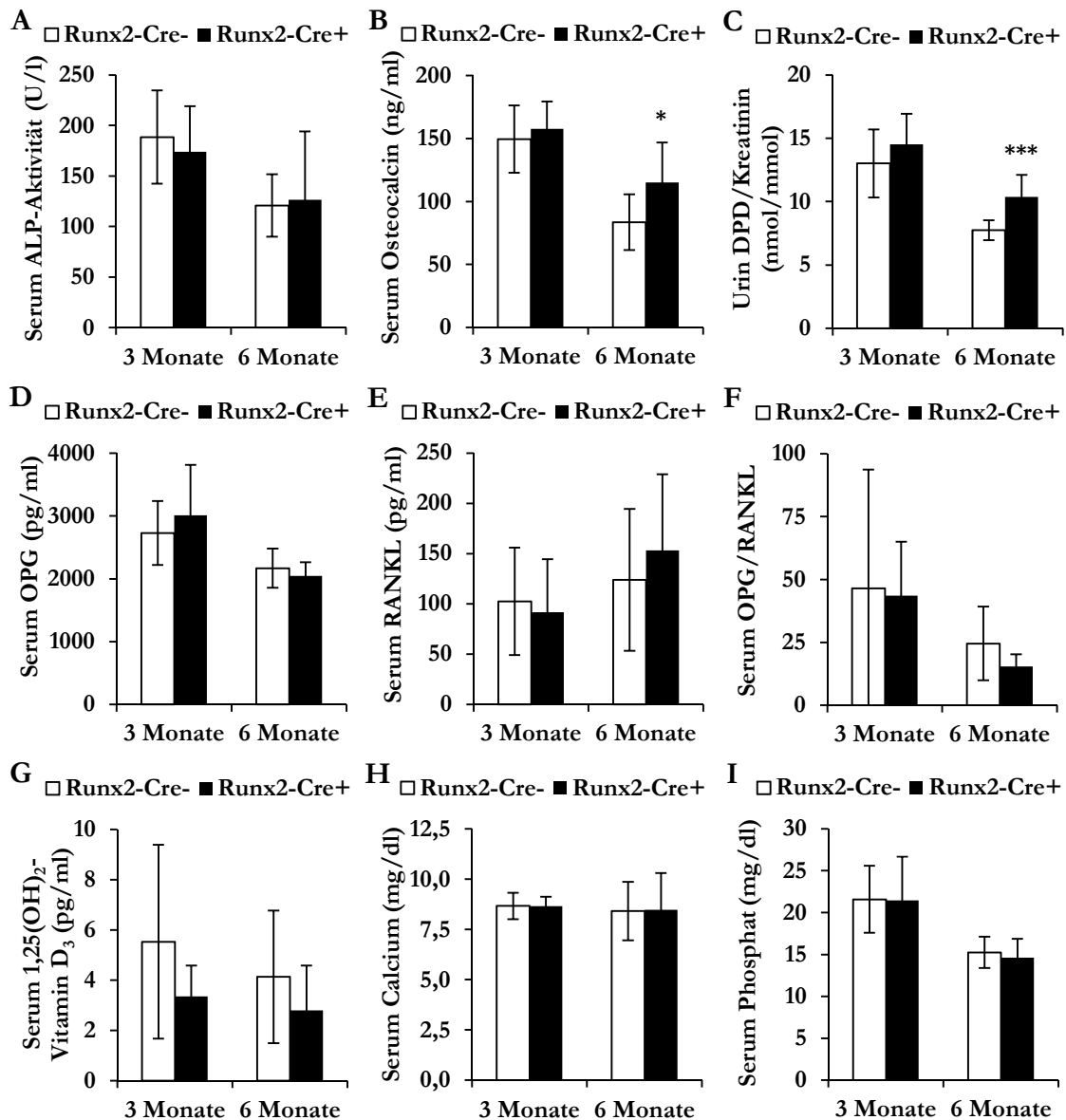


Abbildung 31: Analyse von Knochenbaumarkern in *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen.

Eine Defizienz an Osteoblasten-ApoE wirkte sich nicht auf (A) die alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität von drei und sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen ($n \geq 9$) aus, steigerte aber in sechs Monate alten Cre-positiven Mäusen die Konzentration von (B) Osteocalcin im Serum und (C) DPD/Kreatinin im Urin. Dabei kam es aber zu keinen signifikanten Veränderungen in der Serumkonzentration von (D) Osteoprotegerin (OPG), (E) Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) und (F) dem OPG/RANKL-Verhältnis sowie von (G) 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (H) Calcium und (I) Phosphat.

Bei männlichen *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen wurden bei der Blut- und Urinanalyse weder im Alter von drei noch von fünf Monaten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt (Tabelle 6). Folglich weisen die fünf Monate alten *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Männchen im Gegensatz zu den sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Weibchen weder eine erhöhte Osteocalcin-Konzentration im Blut noch eine gesteigerte Konzentration des Resorptionsmarkers DPD/Kreatinin im Urin auf.

Parameter	3 Monate		5 Monate	
	Runx2-Cre-	Runx2-Cre+	Runx2-Cre-	Runx2-Cre+
Apolipoprotein E (ng/ml)	18000 ± 2416	19192 ± 5116	16219 ± 2151	14703 ± 2117
Triglyceride (mg/dl)	72,2 ± 16,0	74,6 ± 11,9	73,0 ± 18,8	67,4 ± 12,8
Cholesterin (mg/dl)	79,4 ± 3,7	86,0 ± 3,6 *	87,9 ± 7,8	85,6 ± 6,5
ALP-Aktivität (U/l)	92,4 ± 17,6	117,7 ± 21,7	---	---
Osteocalcin (ng/ml)	72,2 ± 9,1	77,7 ± 17,7	40,8 ± 11,7	40,3 ± 14,5
DPD/Kreatinin (nmol/mmol)	---	---	6,1 ± 1,1	6,2 ± 0,8

Tabelle 6: Blut- und Urinparameter von männlichen drei Monate alten (Serum, n ≥ 5) und fünf Monate alten (Plasma, n ≥ 6) $Apoe^{\text{lox/lox}}$ -Runx2-Cre-Mäusen.

3.2.5 Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von primären $Apoe^{\text{lox/lox}}$ -Runx2-Cre-Osteoblasten

Da sich der Knochenphänotyp des globalen $Apoe^{-/-}$ -Mausmodells grundlegend von dem der $Apoe^{\text{lox/lox}}$ -Runx2-Cre-Mäuse unterscheidet, wurde im nächsten Schritt überprüft, wie sich der osteoblastenspezifische $Apoe$ -Knockout auf die Differenzierung der betroffenen primären Zellen auswirkt und ob Unterschiede zu primären Osteoblasten aus $Apoe^{-/-}$ -Mäusen bestehen (siehe Abbildung 16 und Abbildung 19).

In primären Calvaria-Osteoblasten (Tag 12) wirkte sich die osteoblastenspezifische $Apoe$ -Defizienz nicht auf die mRNA-Expression des essentiellen Transkriptionsfaktors Runx-related Transcription Factor 2 (*Runx2*) aus, führte aber bei den Osteoblastenmarkern alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I $\alpha 1$ und Integrin-binding Sialoprotein tendenziell zu einer Steigerung der mRNA-Expression. Nur die mRNA-Expression von Osteocalcin war in den Runx2-Cre-positiven $Apoe^{\text{lox/lox}}$ -Zellen eindeutig erhöht. Die mRNA-Expression der Osteoklasten regulierenden Gene *Tnfrsf11b* und *Tnfsf11* war zu diesem Differenzierungszeitpunkt nicht verändert (Abbildung 32). Folglich zeigen die $Apoe^{\text{lox/lox}}$ -Runx2-Cre+-Calvaria-Osteoblasten ein vergleichbares Expressionsverhalten wie $Apoe^{-/-}$ -Osteoblasten, wenn auch die Effekte weniger deutlich ausfallen.

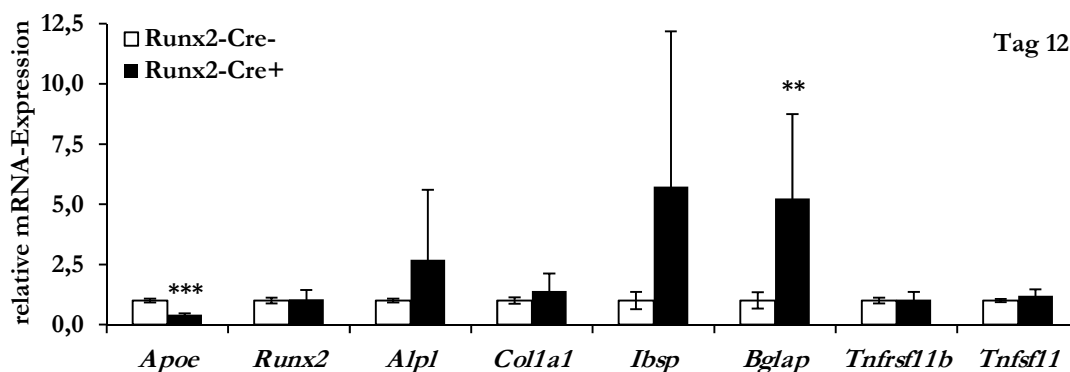


Abbildung 32: Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf das mRNA-Expressionsverhalten von primären Calvaria-Osteoblasten.

Eine Osteoblasten-ApoE-Defizienz hatte in Calvaria-Osteoblasten keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2), führte aber bei den Osteoblastenmarkern alkalische Phosphatase (*Alpl*), Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*), Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) tendenziell zu einer Steigerung der mRNA-Expression, wobei jedoch nur die Expressionssteigerung von *Bglap* statistische Signifikanz erreichte. Die mRNA-Expression von Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) war hingegen nicht verändert. Die mRNA-Expression der Osteoblastengene wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den Wildtyp berechnet.

KM-Osteoblasten mit einer osteoblastenspezifischen *ApoE*-Defizienz wiesen ebenfalls ein ähnliches Expressionsmuster wie primäre KM-Osteoblasten aus *ApoE*^{-/-}-Mäusen auf. In den undifferenzierten Zellen (Tag 0) waren die Osteoblastenmarker Integrin-binding Sialoprotein und Osteocalcin im Vergleich zu den Kontrollzellen am stärksten induziert. Dieser Effekt nahm während der Differenzierung (Tag 6) ab und verschwand an Tag 12 schließlich vollständig. Die mRNA-Expression der alkalischen Phosphatase und von Kollagen Typ I $\alpha 1$ war hingegen zu keinem der drei Zeitpunkte verändert. Im Gegensatz zu den Knochenbildungsmarkern, bei denen der ApoE-Effekt im Laufe der Differenzierung abnahm, wirkte sich die Osteoblasten-ApoE-Defizienz im undifferenzierten Zustand nicht auf die Expression von Osteoprotegerin und RANK Ligand aus, führte aber während der Differenzierung zu einer Abnahme der *Tnfrsf11b*- und einer Steigerung der *Tnfsf11*-mRNA-Expression (Abbildung 33).

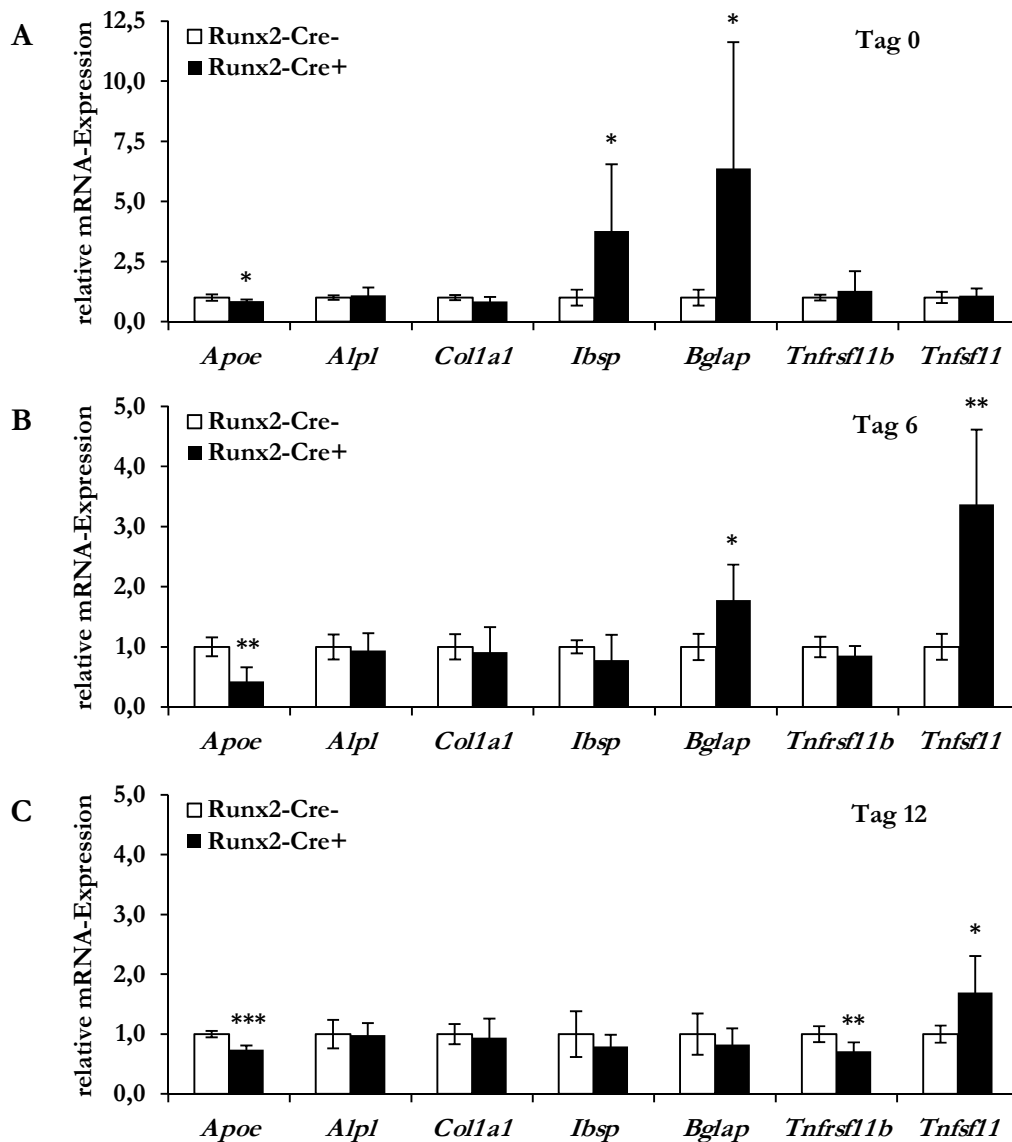


Abbildung 33: Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf das Differenzierungsverhalten von primären Knochenmark-Osteoblasten.

In den KM-Osteoblasten beeinflusste Osteoblasten-ApoE zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte die mRNA-Expression der alkalischen Phosphatase (*Alpl*) und von Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*). Die mRNA-Expression von Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) war in den Cre-positiven Zellen hingegen an Tag 0 (A) deutlich erhöht. Dieser Effekt nahm während der Differenzierung (Tag 6; B) jedoch ab und verschwand an Tag 12 (C) vollständig. Auf die mRNA-Expression von Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) wirkte sich die Osteoblasten-ApoE-Defizienz im undifferenzierten Zustand nicht aus, führte aber während der Differenzierung zu einer Abnahme der *Tnfrsf11b*- und einer Steigerung der *Tnfsf11*-mRNA-Expression. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

In primären Chondrozyten hatte ApoE keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Runx2 und der Chondrozytengene Sex Determining Region Y (SRY)-box 9 (*Sox9*), Kollagen Typ X $\alpha 1$ (*Col10a1*) und Matrix-Metalloproteinase 13 (*Mmp13*) (Abbildung 34).

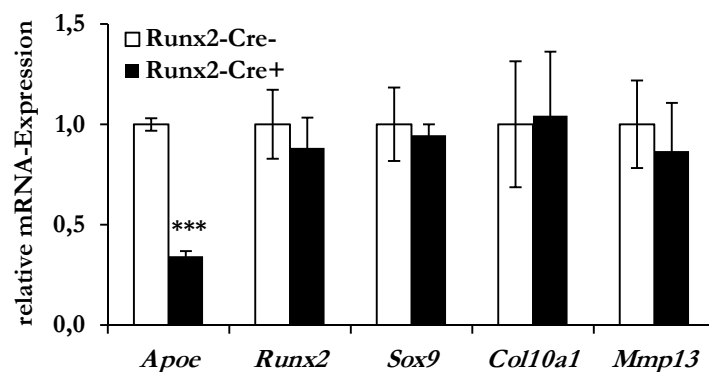


Abbildung 34: Einfluss von ApoE auf das Expressionsverhalten von primären Chondrozyten.

In primären Chondrozyten hatte Apolipoprotein E (*Apoe*) keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Runt-related Transcription Factor 2 (*Runx2*), Sex Determining Region Y(SRY)-box 9 (*Sox9*), Kollagen Typ X α 1 (*Col10a1*) und Matrix-Metalloproteinase 13 (*Mmp13*). Die mRNA-Expression der Chondrozytenmarker wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

3.3 Charakterisierung des *Apoe*^{flx/flx}-*OC-Cre*-Mausmodells

Es sollte nun untersucht werden, in welchem Differenzierungsstadium -früh während der Osteoblastendifferenzierung oder spät in terminal differenzierten Osteoblasten und Osteozyten- die Expression von *Apoe* eine Bedeutung für den Knochenstoffwechsel hat. Dazu wurde ein weiteres Mausmodell erzeugt, indem *Apoe*^{flx/flx}-Mäuse mit *OC-Cre*-Mäusen verpaart wurden. Der humane 3,5-kb-Osteocalcin-Promotor ist erst in reifen vollständig differenzierten Osteoblasten aktiv und bietet die nötige Effizienz, um die Expression der Cre-Rekombinase in den gewünschten Zellen zu ermöglichen (Zhang et al., 2002). Zudem stellt Osteocalcin das häufigste nicht-kollagene Protein der Knochenmatrix dar und ist der einzige bekannte spezifische Marker reifer Osteoblasten (Hauschka et al., 1989). Somit erlaubt dieses Mausmodell, die Funktion von ApoE spezifisch in reifen terminal differenzierten Osteoblasten und den daraus hervorgehenden Osteozyten in vivo zu untersuchen ohne die frühen Osteoblasten-Differenzierungsstadien zu beeinflussen.

3.3.1 Osteoblastenspezifische Reduktion von ApoE

Bevor die *Apoe*^{flx/flx}-*OC-Cre*-Mäuse bezüglich ihres Phänotyps untersucht werden konnten, wurde zunächst die Reduktion der *Apoe*-Expression auf ihre Spezifität und Effizienz überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Apoe* im Knochenmark, das nur undifferenzierte Osteoblastenvorläuferzellen enthält, wie erwartet nicht reduziert war, während es spezifisch in den Knochengeweben je nach Lokalisation zu einer Abnahme der *Apoe*-

Expression um 28-39 % kam. Erstaunlicherweise war die *ApoE*-mRNA jedoch in den Calvaria nicht signifikant reduziert (Abbildung 35). Die untersuchten Kontrollgewebe zeigten erwartungsgemäß ebenfalls keine *ApoE*-mRNA-Abnahme und die ApoE-Konzentration im Serum war im Vergleich zu den Kontrolltieren auch unverändert (Abbildung 36).

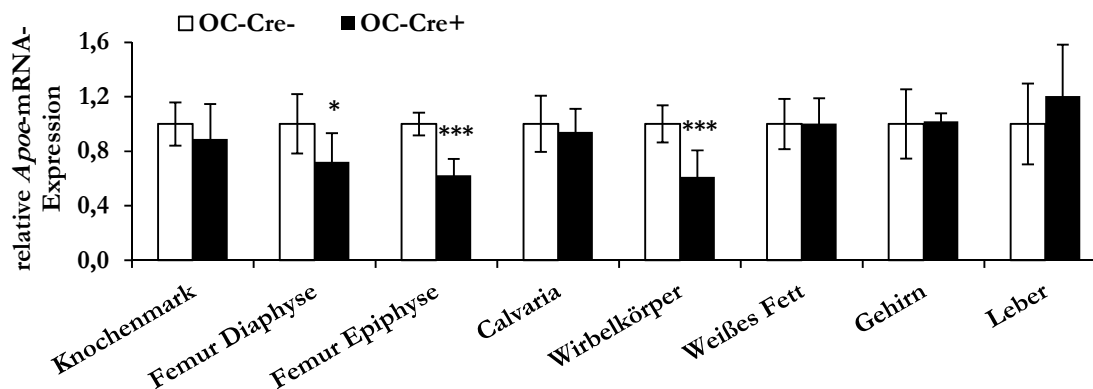


Abbildung 35: Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression im Knochengewebe von *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen.

Die *ApoE*-mRNA-Expression wurde spezifisch in den Knochengeweben reduziert, während das Knochenmark und die anderen untersuchten Kontrollgewebe nicht beeinflusst wurden. Die *ApoE*-mRNA-Expression wurde in Geweben von drei Monate alten *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen ($n \geq 5$) mittels qRT-PCR bestimmt, wobei die Messwerte auf das Referenzgen *Tbp* normiert und dann als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt wurden. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls immer in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

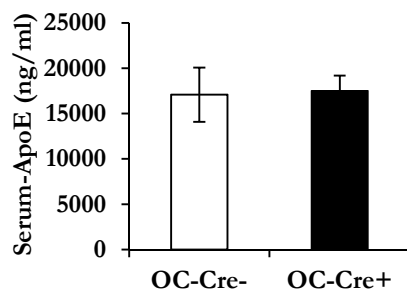


Abbildung 36: Konzentration von ApoE im Serum von *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen.

Bei der Messung der ApoE-Konzentration in Seren von zwei Monate alten *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen ($n \geq 7$) mittels ELISA wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt.

Die nachfolgende Analyse von primären Knochenzellen aus *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen ergab, dass die *ApoE*-Expression in Chondrozyten anders als in den *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mäusen nicht reduziert wurde, wohingegen es in den Cre-positiven Calvaria-Osteoblasten zu einer Abnahme um 74 % und in Knochenmark-Osteoblasten zu einer Reduktion um 26 % kam (Abbildung 37). Die starke Reduktion der *ApoE*-Expression in den primären Calvaria-Osteoblasten zeigte somit, dass der *OC*-Promotor sehr wohl auch in Calvaria aktiv ist, der Anteil an reifen Osteoblasten dort aber wahrscheinlich im Vergleich zu anderen *ApoE*-exprimierenden Zellen gering ist. Folglich wurde mit der Untersuchung von Geweben und

primären Zellen gezeigt, dass es mit dem *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Mausmodell möglich ist, speziell die Funktion von ApoE reifer Osteoblasten *in vivo* zu untersuchen.

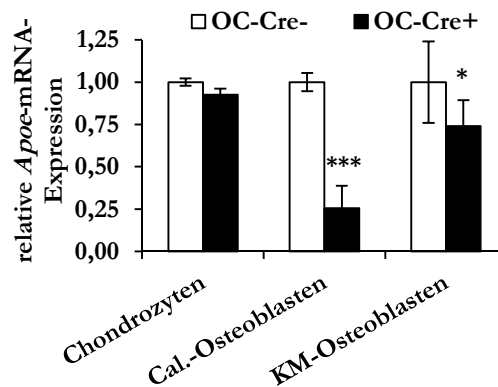


Abbildung 37: Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression in primären *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Knochenzellen.

Die mRNA-Expression von *ApoE* wurde nur in primären Osteoblasten (Calvaria-Osteoblasten: Tag 12, Knochenmark-Osteoblasten: Tag 12) jedoch nicht in Chondrozyten von *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Mäusen signifikant reduziert. Die *ApoE*-mRNA-Menge der primären Knochenzellen wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei die Messwerte auf das Referenzgen *Tbp* normiert und dann als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt wurden. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

3.3.2 Untersuchung des Energiestoffwechsels

Im *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Mausmodell wurden die Tiere wie erwartet in einem Verhältnis gemäß den mendelschen Regeln geboren, hatten ein gesundes Erscheinungsbild und unterschieden sich nicht in ihrem Körpergewicht oder ihrer täglichen Nahrungsaufnahme von den Kontrolltieren (Abbildung 38).

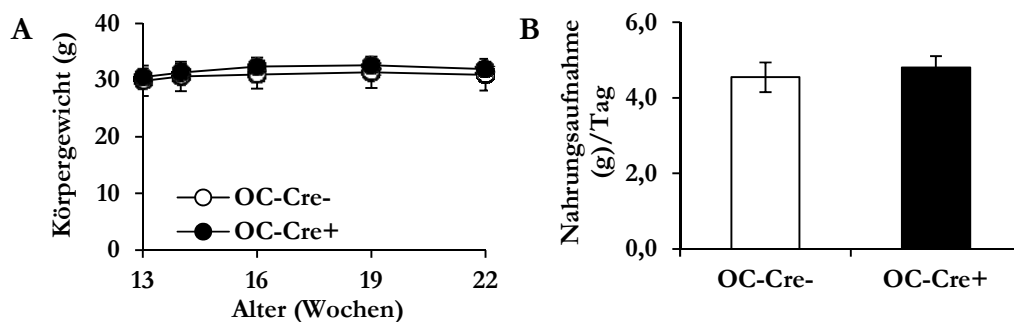


Abbildung 38: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme von *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Mäusen.

(A) Im Körpergewicht und (B) der Nahrungsaufnahme/Tag von *ApoE*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-*OC-Cre*-Mäusen wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Für die Untersuchung wurden männliche Mäuse ($n \geq 7$) ab einem Alter von 13 Wochen verwendet.

Zudem wirkte sich eine *ApoE*-Defizienz in reifen Osteoblasten ebenfalls nicht auf die orale Glukose-Toleranz und die postprandiale Lipidclearance männlicher Mäuse aus. So wiesen drei Monate alte *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*⁺-Männchen wie die entsprechenden Kontrolltiere im gefasteten Zustand einen Blut-Glukosewert von etwa 120 mg/dl auf, der während des oralen Glukose-Toleranz-Tests zunächst anstieg, nach etwa 15 Minuten sein Maximum bei ca. 230 mg/dl erreichte und dann wieder kontinuierlich abnahm (Abbildung 39A). Die Analyse des postprandialen Lipidstoffwechsels in vier Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Mäusen durch einen oralen Fett-Toleranz-Test ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Nach der Öl-Gavage stiegen die Triglyceride im Blut der Mäuse von etwa 100 mg/dl in einem Zeitraum von 60 bis 120 Minuten auf ihr Maximum von etwa 150 mg/dl an. Daraufhin sank die Triglycerid-Konzentration im Blut wieder ab bis sie nach 240 Minuten ihr Basalniveau erreichte (Abbildung 39B). Die Cholesterinwerte der Mäuse lagen im gefasteten Zustand bei etwa 115 mg/dl und veränderten sich während des OFTT kaum (Abbildung 39C).

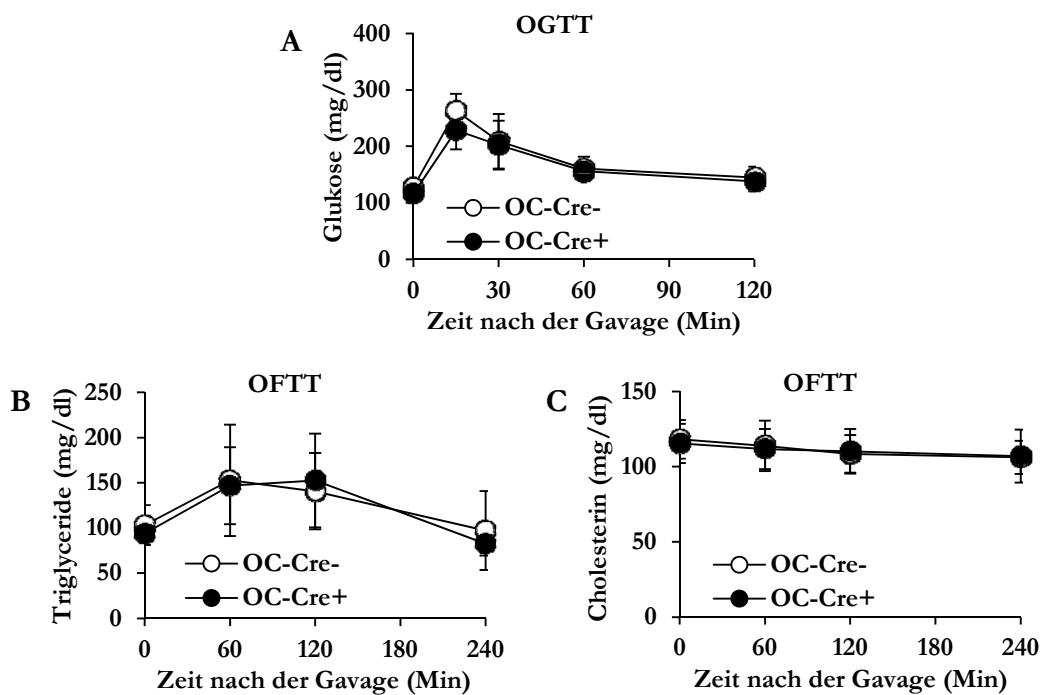


Abbildung 39: Orale Glukose-Toleranz-Test und orale Fett-Toleranz-Test von *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Mäusen.

Bei der Untersuchung des Energiestoffwechsels war in männlichen *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Mäusen ($n \geq 7$) mittels (A) orale Glukose-Toleranz-Test (OGTT) im Alter von drei Monaten und (B und C) orale Fett-Toleranz-Test (OFTT) im Alter von vier Monaten kein Unterschied zwischen den Genotypen messbar. Den gefasteten Tieren wurde beim OGTT 1,0 mg Glukose/g Körpergewicht und beim OFTT 200 μ l Olivenöl per Gavage verabreicht.

3.3.3 Analyse der Knochenstruktur

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ApoE, das speziell von terminal differenzierten reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert wird, ebenfalls den Knochenstoffwechsel beeinflusst. In Röntgenaufnahmen von drei und sechs Monate alten $ApoE^{flox/flox}$ - $OC-Cre+$ -Weibchen waren erwartungsgemäß wie bei den $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre+$ -Mäusen keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen in der Skelettarchitektur oder der Knochenstruktur erkennbar (Abbildung 40). Da der Knochenphänotyp der weiblichen $ApoE^{flox/flox}$ - $Runx2-Cre+$ -Mäuse altersabhängig ist und sich nur bei sechs Monate alten Tieren ausprägt, wurden die folgenden Analysen des Knochenstoffwechsels im $ApoE^{flox/flox}$ - $OC-Cre$ -Mausmodell auf sechs Monate alte weibliche Tiere beschränkt.

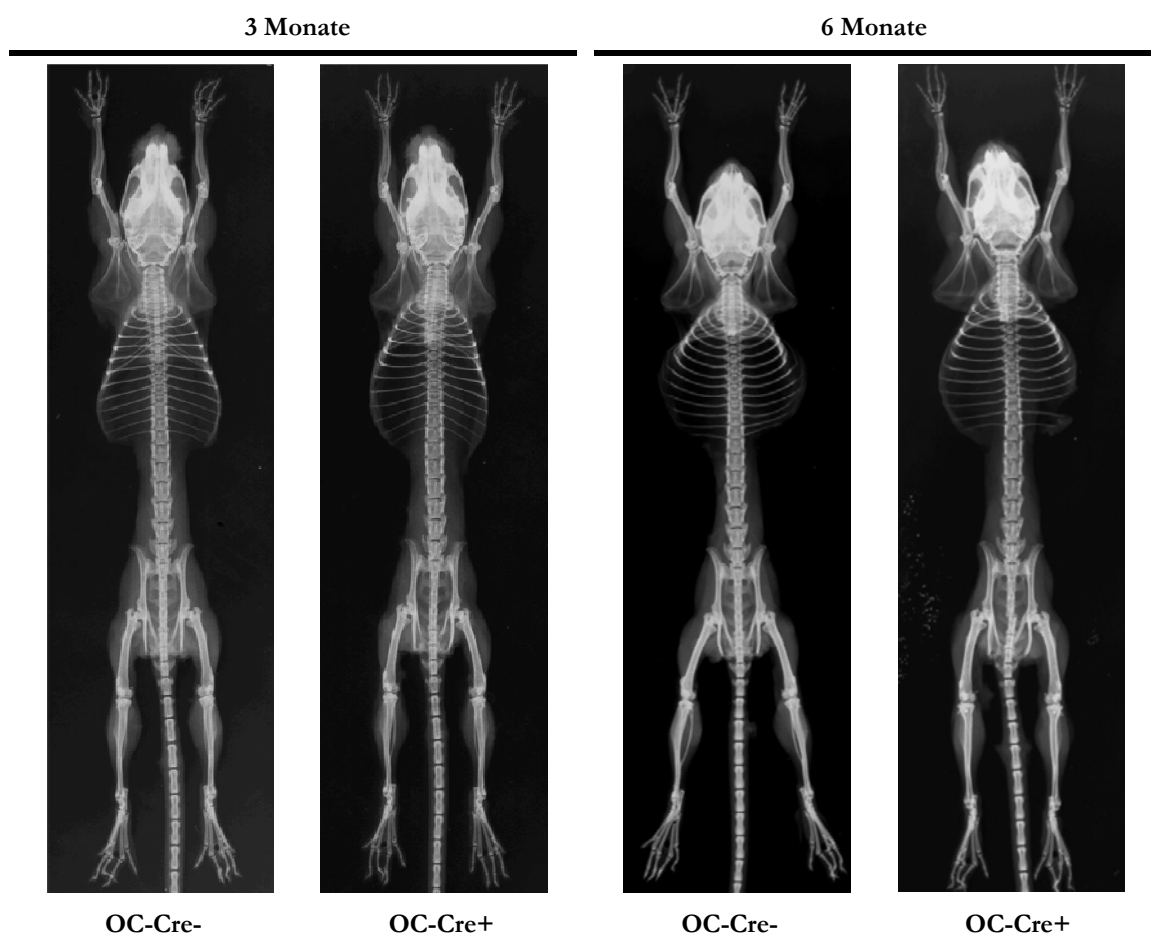


Abbildung 40: Röntgenaufnahmen der Skelette von $ApoE^{flox/flox}$ - $OC-Cre$ -Mäusen.

Die Röntgenbilder von drei und sechs Monate alten weiblichen $ApoE^{flox/flox}$ - $OC-Cre$ -Mäusen zeigen exemplarisch, dass die Tiere makroskopisch eine normale Knochenarchitektur und -struktur aufweisen.

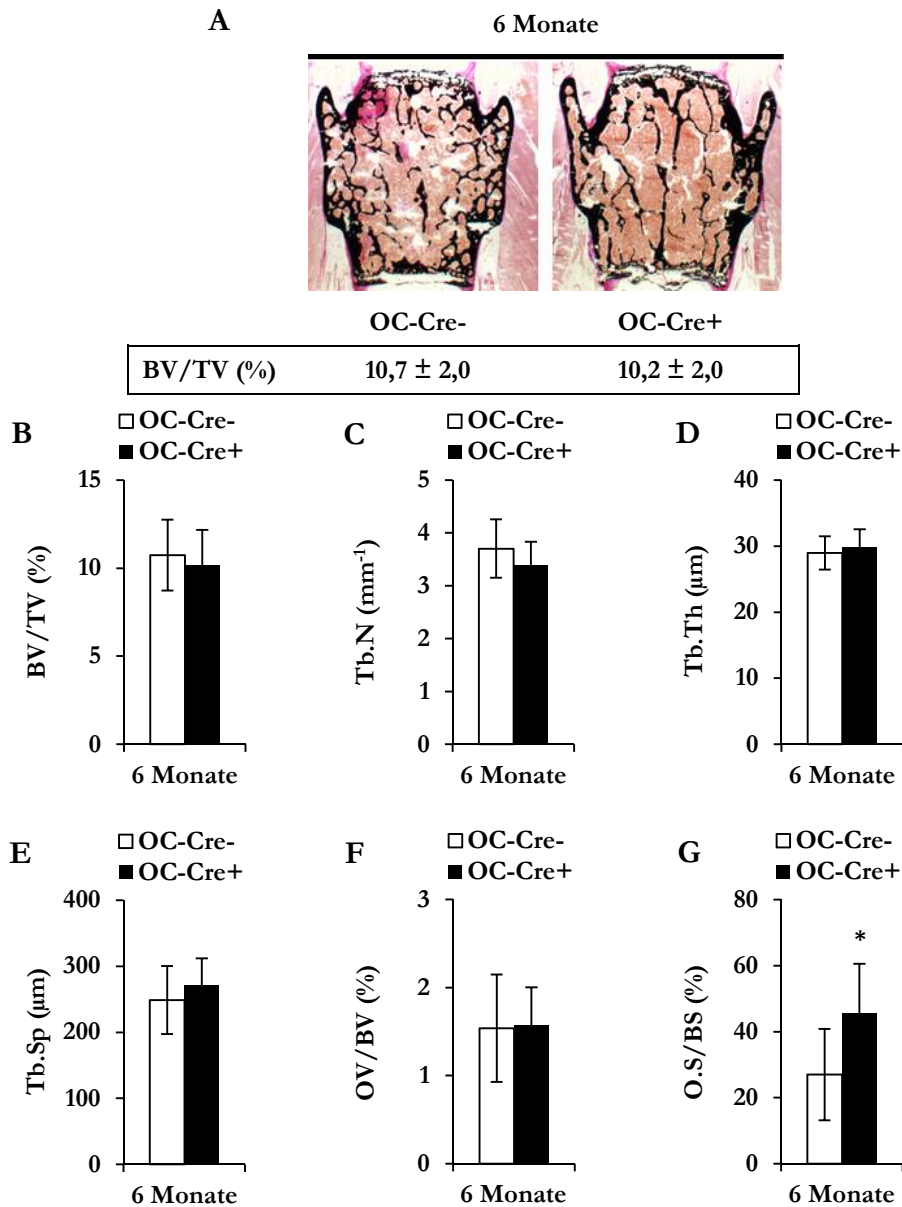


Abbildung 41: Histomorphometrische Analyse von *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Lendenwirbelkörpern.

(A) Die Analyse von nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten 5- μ m-Schnitten der Lendenwirbelkörper zeigte in den sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Weibchen ($n = 8$) zwischen den Genotypen keine Unterschiede in (B) dem trabekulären Knochenvolumenanteil (BV/TV), (C) der Trabekelanzahl (Tb.N), (D) der Trabekeldicke (Tb.Th) sowie (E) dem Trabekelabstand (Tb.Sp). (F) Das Osteoidvolumen (OV/BV) war ebenfalls unverändert, wohingegen jedoch (G) die Osteoidoberfläche (O.S/BS) in den Cre-tragenden Tieren stark erhöht war.

Bei der anschließenden histomorphometrischen Analyse der Lendenwirbelkörper von *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Mäusen zeigte sich, dass ApoE in reifen Osteoblasten keine wichtige Rolle mehr für die Knochenstruktur spielt. So ergab die Untersuchung der nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten Schnitte keine Veränderungen des trabekulären Knochenvolumens und damit auch keine Unterschiede in der Trabekelanzahl und -dicke sowie dem Trabekelabstand (Abbildung 41A-E). Außerdem zeigten sich keine

Unterschiede im Osteoidvolumen. Dennoch war die Osteoidoberfläche in den *OC-Cre*-tragenden *ApoE^{flox/flox}*-Mäusen wie im *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mausmodell stark vergrößert (Abbildung 41F-G).

Um herauszufinden durch welche Faktoren es zu der stark erhöhten Osteoidoberfläche bei sonst unveränderten Knochenstrukturparametern kommt, wurde im nächsten Schritt die Osteoblastenzahl und -oberfläche sowie die Knochenbildungsrate in den *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen bestimmt. Dabei wurden zwischen den Genotypen keine Unterschiede festgestellt. Zudem hatte das ApoE reifer Osteoblasten ebenfalls keinen Einfluss auf die Osteoklastenzahl und -oberfläche der sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäuse (Abbildung 42).

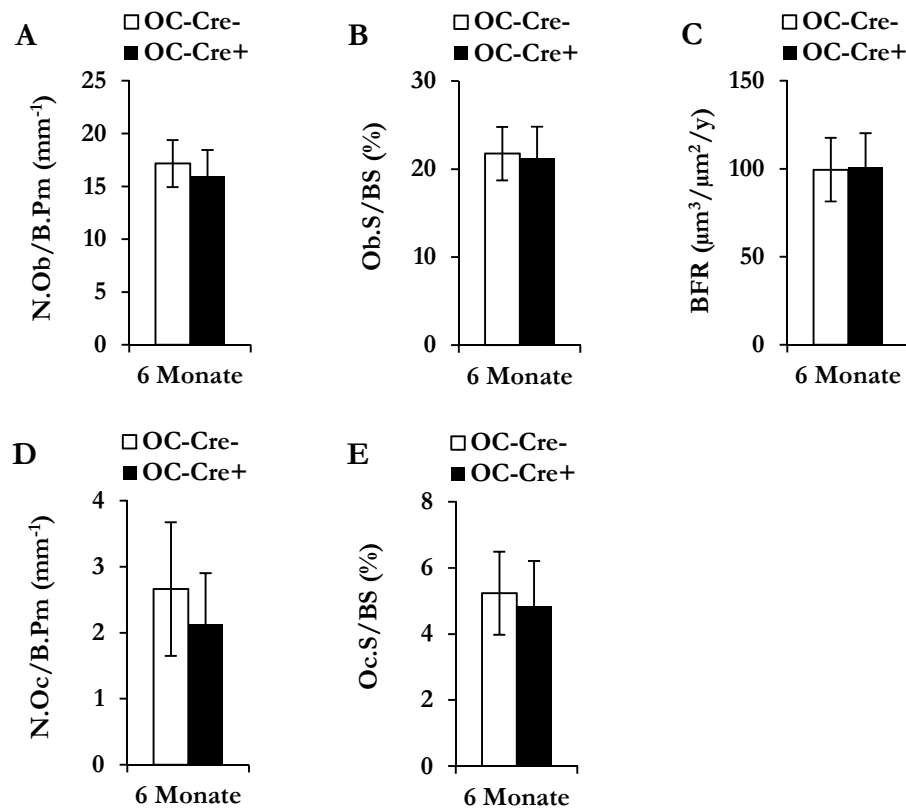


Abbildung 42: Zytometrische und dynamische Parameter von *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Lendenwirbelkörpern.

ApoE reifer Osteoblasten und Osteozyten hat keinen Einfluss auf (A) die Osteoblastenzahl (N.Ob/B.Pm) und (B) -oberfläche (Ob.S/BS), (C) die Knochenbildungsrate (BFR) sowie (D) die Osteoklastenzahl (N.Oc/B.Pm) und (E) -oberfläche (Oc.S/BS) von sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen. Die zellulären Parameter wurden anhand von Toluidinblau-gefärbten 5-µm-Schnitten der Lendenwirbelkörper ($n = 8$) bestimmt, während für die Messung der Knochenbildungsrate nach der Calceindoppelmarkierungsmethode nicht-gefärbte 12-µm-Schnitte verwendet wurden.

Zusammenfassend wirkt sich das aus reifen Osteoblasten und Osteozyten stammende ApoE zwar auf die Osteoidoberfläche, nicht aber auf die trabekuläre Knochenmasse, Knochenbildungsrate und Anzahl der verschiedenen Knochenzellen aus.

3.3.4 Bestimmung von Knochenbaumarkern im Serum und Urin

Um den Phänotyp der *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre+*-Mäuse abschließend zu charakterisieren, wurden verschiedene Knochenbaumarker im Serum und Urin der Mäuse bestimmt und überprüft, dass die ApoE-, Triglycerid- und Cholesterin-Konzentration auch im Serum der weiblichen Tiere unverändert sind und diese Faktoren somit keinen Einfluss auf den Knochenphänotyp haben (Abbildung 43).

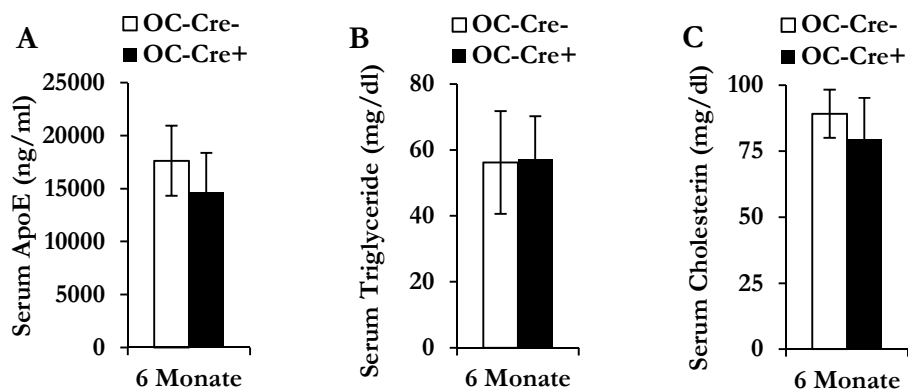


Abbildung 43: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen.

ApoE aus terminal differenzierten reifen Osteoblasten und Osteozyten hatte weder einen Einfluss auf (A) die ApoE-Konzentration noch auf (B) die Triglycerid- und (C) Cholesterin-Konzentration im Serum von sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen ($n \geq 9$).

Bei der Analyse der Knochenbaumarker zeigten sich in Übereinstimmung mit der Knochenstrukturuntersuchung ebenfalls keine Unterschiede zwischen den sechs Monate alten *OC-Cre*-positiven *ApoE^{flox/flox}*-Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Neben der alkalischen Phosphatase-Aktivität, war im Gegensatz zu den *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre+*-Mäusen auch die Konzentration des Knochenbildungs- und Turnover-Markers Osteocalcin und des Kollagenabbauprodukts DPD/Kreatinin in *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre+*-Weibchen nicht erhöht. Die Konzentrationsbestimmung der Osteoklasten regulierenden Proteine OPG und RANKL im Serum sowie das OPG/RANKL-Verhältnis ergaben ebenfalls keine Veränderungen zwischen den Genotypen. Des Weiteren hatten die Tiere normale Calcium- und Phosphat-Spiegel im Serum (Abbildung 44).

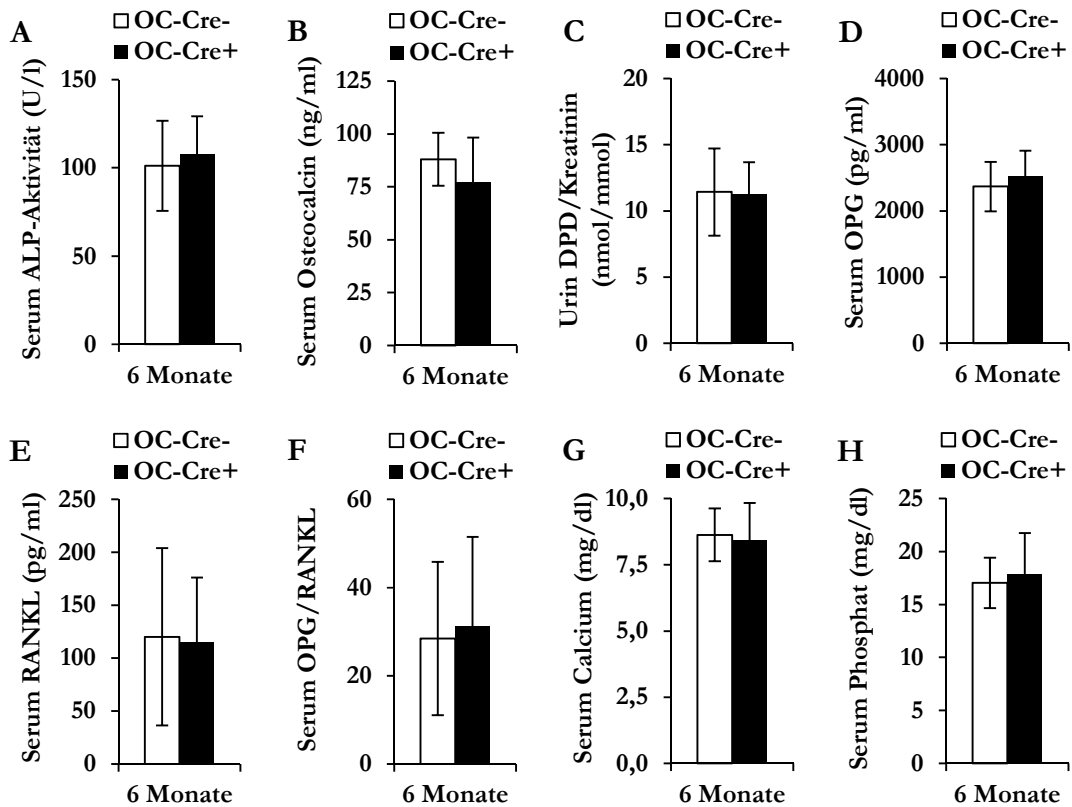


Abbildung 44: Analyse von Knochenbaumarkern in *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen.

Eine Defizienz an ApoE aus reifen Osteoblasten wirkte sich in sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mäusen ($n \geq 10$) weder auf (A) die alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität und (B) die Osteocalcin-Konzentration im Serum noch auf (C) das DPD/Kreatinin-Verhältnis im Urin aus. Zudem kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen der Serumkonzentration von (D) Osteoprotegerin (OPG), (E) Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) und (F) dem OPG/RANKL-Verhältnis sowie von (G) Calcium und (H) Phosphat.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ApoE, das von reifen vollständig differenzierten Osteoblasten und Osteozyten hergestellt wird, abgesehen von der Osteoidproduktion in vivo keine wichtige Rolle für die Regulation des Knochenstoffwechsels spielt oder dessen Funktion größtenteils durch exogenes ApoE kompensiert werden kann.

3.3.5 Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von primären *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Osteoblasten

Da das aus terminal differenzierten Osteoblasten stammende ApoE in vivo nur noch einen Einfluss auf die Osteoidproduktion hat, sollte zuletzt untersucht werden, ob das zelleigene ApoE speziell in differenzierten reifen Osteoblasten und Osteozyten noch eine Funktion in vitro besitzt. Zu diesem Zweck wurden primäre Osteoblasten aus *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-

Mäusen isoliert und analysiert, ob der Wegfall von ApoE in reifen Osteoblasten die Expression von verschiedenen Osteoblastenmarkern beeinflusst.

In primären Calvaria-Osteoblasten (Tag 12) wirkte sich die *ApoE*-Defizienz der reifen Osteoblasten nicht bzw. kaum auf die mRNA-Expression von frühen Osteoblastenmarkern wie alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I $\alpha 1$ aus. Wohingegen die mRNA-Expression der späteren Osteoblastenmarker wie Integrin-binding Sialoprotein und Osteocalcin in den *OC-Cre*-positiven Zellen eindeutig erhöht war. Die Genexpression der Osteoklasten regulierenden Proteine OPG und RANKL war zu diesem Differenzierungszeitpunkt hingegen nicht verändert (Abbildung 45).

Da in diesem *ApoE*-Knockout-Modell nur reife Osteoblasten betroffen sind, waren die beobachteten Effekte in den primären Calvaria-Osteoblastenkulturen im Vergleich zum kompletten *ApoE*-Knockout abgeschwächt und erwartungsgemäß nur Gene betroffen, die im späteren Differenzierungsverlauf angeschaltet werden.

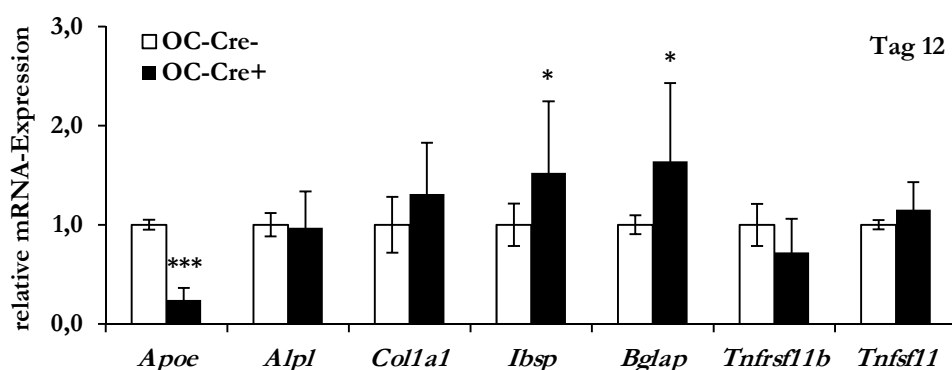


Abbildung 45: Veränderungen des Expressionsverhaltens von *ApoE*^{flx/flx}-*OC-Cre*-Calvaria-Osteoblasten.

Eine Defizienz an ApoE aus reifen Osteoblasten hatte in Calvaria-Osteoblasten keinen bzw. kaum Einfluss auf die mRNA-Expression der alkalische Phosphatase (*Alpl*) und von Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*), führte aber bei den späteren Osteoblastenmarkern wie Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Bglap*) zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression. Hingegen war die mRNA-Expression von Osteoprotegerin (*Tnfrsf11b*) und RANK Ligand (*Tnfsf11*) nicht verändert. Die mRNA-Expression der osteoblastenspezifischen Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus vier unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den Wildtyp berechnet.

Da es bei den *ApoE*^{flx/flx}-*OC-Cre*+ Osteoblasten erst im differenzierten Zustand zu einer Deletion des *ApoE*-Gens kommt, wurden KM-Osteoblasten nur an Tag 6 (Abbildung 46A) und Tag 12 (Abbildung 46B) der Differenzierung untersucht. Bis auf die mRNA-Expression der alkalischen Phosphatase, die durch den Wegfall von ApoE reifer Osteoblasten gehemmt wurde, ähnelte das Expressionsmuster der *ApoE*^{flx/flx}-*OC-Cre*+ KM-Osteoblasten dem der *ApoE*^{flx/flx}-*Runx2-Cre*+ KM-Osteoblasten. So blieb die mRNA-

Expression von Kollagen Typ I $\alpha 1$ und Integrin-binding Sialoprotein zu beiden Zeitpunkten von der *ApoE*-Expression unbeeinflusst. Während die mRNA-Expression von Osteocalcin in den Cre-positiven Zellen an Tag 6 deutlich hochreguliert war, nahm dieser Effekt jedoch mit der weiteren Differenzierung (Tag 12) ab. Zudem führte die *ApoE*-Defizienz in reifen Osteoblasten während der Differenzierung tendenziell zu einer Abnahme der *Tnfrsf11b*- und einer Steigerung der *Tnfsf11*-mRNA-Expression.

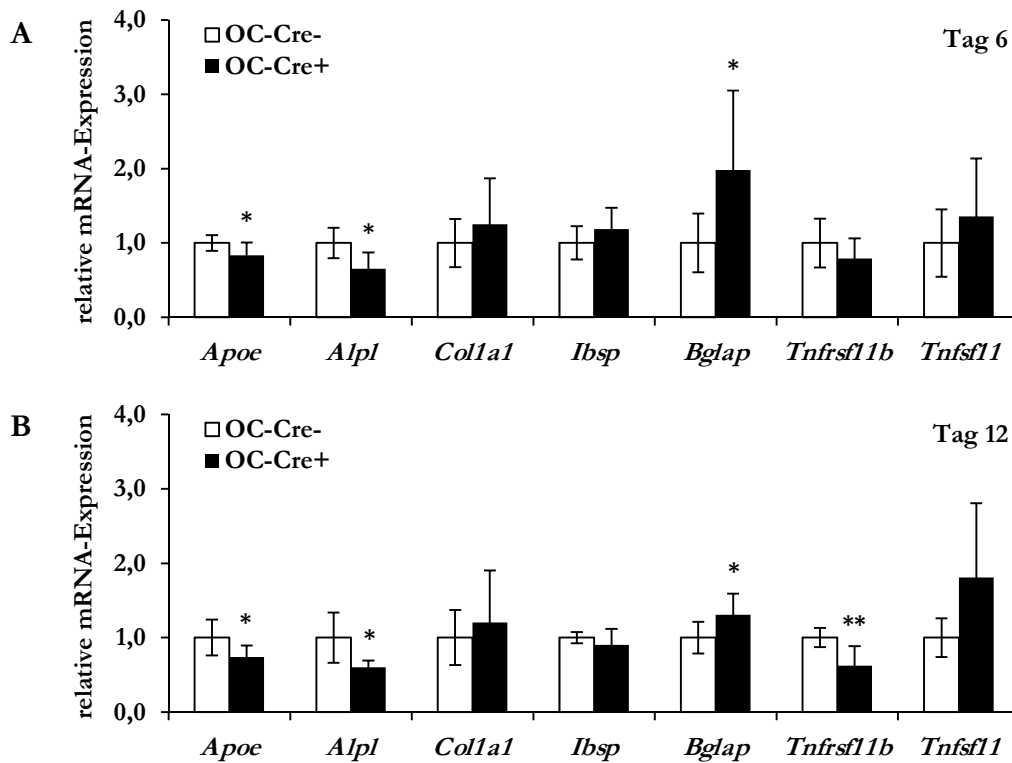


Abbildung 46: Veränderungen des Differenzierungsverhaltens von *ApoE*^{flox/flox}-OC-Cre-KM-Osteoblasten.

In den KM-Osteoblasten förderte das ApoE reifer Osteoblasten zu beiden untersuchten Zeitpunkten die mRNA-Expression der alkalischen Phosphatase (*Alpl*), während die Expression von Kollagen Typ I $\alpha 1$ (*Col1a1*) und Integrin-binding Sialoprotein (*Ibsp*) unbeeinflusst blieb. Nur die mRNA-Expression von Osteocalcin (*Bglap*) war in den Cre-positiven Zellen an Tag 6 (A) deutlich erhöht. Dieser Effekt nahm während der weiteren Differenzierung (Tag 12; B) jedoch ab. Zudem führte die *ApoE*-Defizienz bei zunehmender Differenzierung tendenziell zu einer Abnahme der *Tnfrsf11b*- und einer Steigerung der *Tnfsf11*-mRNA-Expression. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

Wie das Differenzierungsverhalten der *ApoE*^{-/-}- und *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-KM-Osteoblasten bereits vermuten liesen, wies auch das Expressionsverhalten der *ApoE*^{flox/flox}-OC-Cre⁺-KM-Osteoblasten darauf hin, dass ApoE in den KM-Osteoblasten zu späteren Differenzierungsstadien stark an Bedeutung verliert. Außerdem zeigen die beiden osteoblastenspezifischen Mausmodelle deutlich, dass Osteoblasten-ApoE in vivo vor allem wäh-

rend der frühen Stadien der Osteoblastenentwicklung eine wichtige Funktion im Knochenstoffwechsel einnimmt und in reifen Osteoblasten schließlich zunehmend entbehrlich wird.

3.4 Charakterisierung des *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mausmodells

In Hinblick auf die Unterschiede zwischen den Knochenphänotypen des globalen *ApoE*-Knockouts- und der osteoblastenspezifischen *ApoE*-Knockout-Mausmodelle ist es von Interesse der Rolle von ApoE in Osteoklasten nachzugehen. Da außerdem in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass Osteoklasten große Mengen an *ApoE*-mRNA exprimieren (Abbildung 13) und zudem von Kim et al. (2013) berichtet wurde, dass ApoE in vitro die Osteoklastogenese hemmt, sollte im letzten Teil dieser Arbeit die Funktion von Osteoklasten-ApoE in vivo untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *ApoE^{flox/flox}*-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *LysM*-Promotors exprimieren (Clausen et al., 1999; Kenner et al., 2004). Lysozym M wird in Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen exprimiert (Cross et al., 1988), aus denen schließlich Osteoklasten hervorgehen können. Somit erlaubt dieses Mausmodell, die Funktion von ApoE, das von Monozyten/Makrophagen und davon abstammenden Osteoklasten exprimiert wird, in Bezug auf den Knochenstoffwechsel in vivo zu untersuchen.

3.4.1 Osteoklastenspezifische Reduktion von ApoE

Zu Beginn der Charakterisierung des *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mausmodells wurde zunächst überprüft, ob es in den Knochengeweben zu einer effizienten Reduktion der *ApoE*-Expression kommt. Dabei zeigte sich, dass die *ApoE*-Expression in den *LysM-Cre*-positiven *ApoE^{flox/flox}*-Tieren im Knochen je nach Lokalisation um 36-63 % reduziert war. Da Makrophagen auch in anderen Geweben vorkommen und es in diesem Mausmodell daher nicht zu einer knochenspezifischen Reduktion der *ApoE*-Expression kommt, wurde auf die Analyse der *ApoE*-Expression in nicht-knöchernen Geweben verzichtet. Die Untersuchung der ApoE-Konzentration im Serum zeigte jedoch, dass die ApoE-Produktion der Leber durch das *LysM-Cre*-Transgen nicht beeinträchtigt wurde und Makrophagen-/Osteoklasten-ApoE mengenmäßig nur einen unwesentlichen Anteil am Gesamt-ApoE im Serum ausmacht (Abbildung 47).

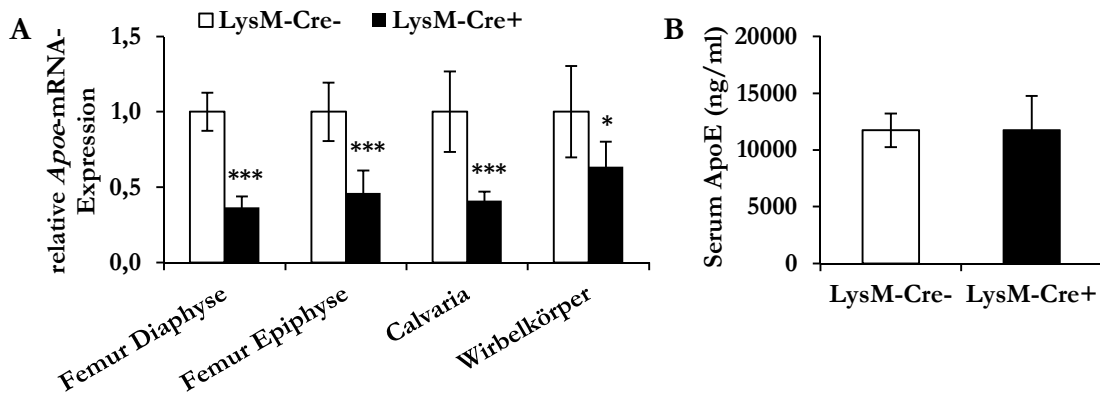


Abbildung 47: ApoE-Expression im Knochen und Serum von $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*-Mäusen.

(A) Im Knochengewebe von drei Monate alten $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*+ -Mäusen ($n = 6$) war die *ApoE*-mRNA-Expression signifikant reduziert, während bei der Bestimmung (B) der ApoE-Konzentration im Serum von zwei Monate alten $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*-Mäusen ($n = 6$) mittels ELISA keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen waren. Die *ApoE*-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei die Messwerte auf das Referenzgen *Tbp* normiert und dann als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt wurden. Statistische Signifikanz wurde in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

Zudem bewirkte das *LysM-Cre*-Transgen in primären $ApoE^{flox/flox}$ -Osteoklasten eine Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression um 95 %, was sich jedoch nicht auf die Genexpression der Osteoklastenmarker Tartrate-resistent Acid Phosphatase (*Acp5*), Calcitonin-Rezeptor (*Calcr*) und Cathepsin K (*Ctsk*) auswirkte (Abbildung 48).

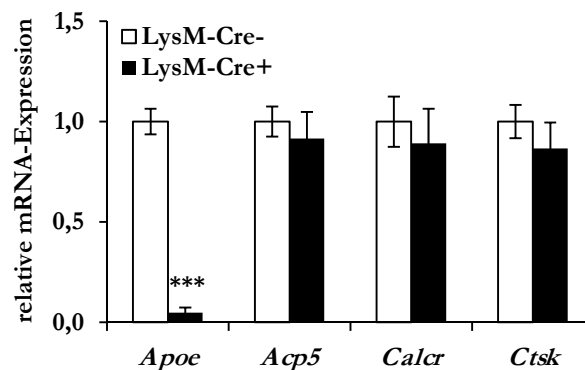


Abbildung 48: Expressionsanalyse von primären $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*-Osteoklasten.

In primären $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*+ -Osteoklastenkulturen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Apolipoprotein E (*ApoE*)-mRNA-Expression. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der Osteoklastenmarker Tartrate-resistent Acid Phosphatase (*Acp5*), Calcitonin-Rezeptor (*Calcr*) und Cathepsin K (*Ctsk*). Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt, die Messwerte aus zwei unabhängigen Experimenten auf das Referenzgen *Tbp* normiert und als Relativwerte bezogen auf den jeweiligen Wildtyp dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp berechnet.

3.4.2 Analyse der Knochenstruktur

Im $ApoE^{flox/flox}$ -*LysM-Cre*-Mausmodell wurden die Tiere im erwarteten Verhältnis gemäß den mendelschen Regeln geboren, hatten ein gesundes Erscheinungsbild und unterschieden sich nicht in ihrem Körpergewicht.

Um den Einfluss von ApoE aus Makrophagen und Osteoklasten auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen, folgte zunächst eine makroskopische Analyse der Skelettarchitektur und der Knochenstruktur durch Röntgenaufnahmen. Diese lies in den drei und sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennen (Abbildung 49).

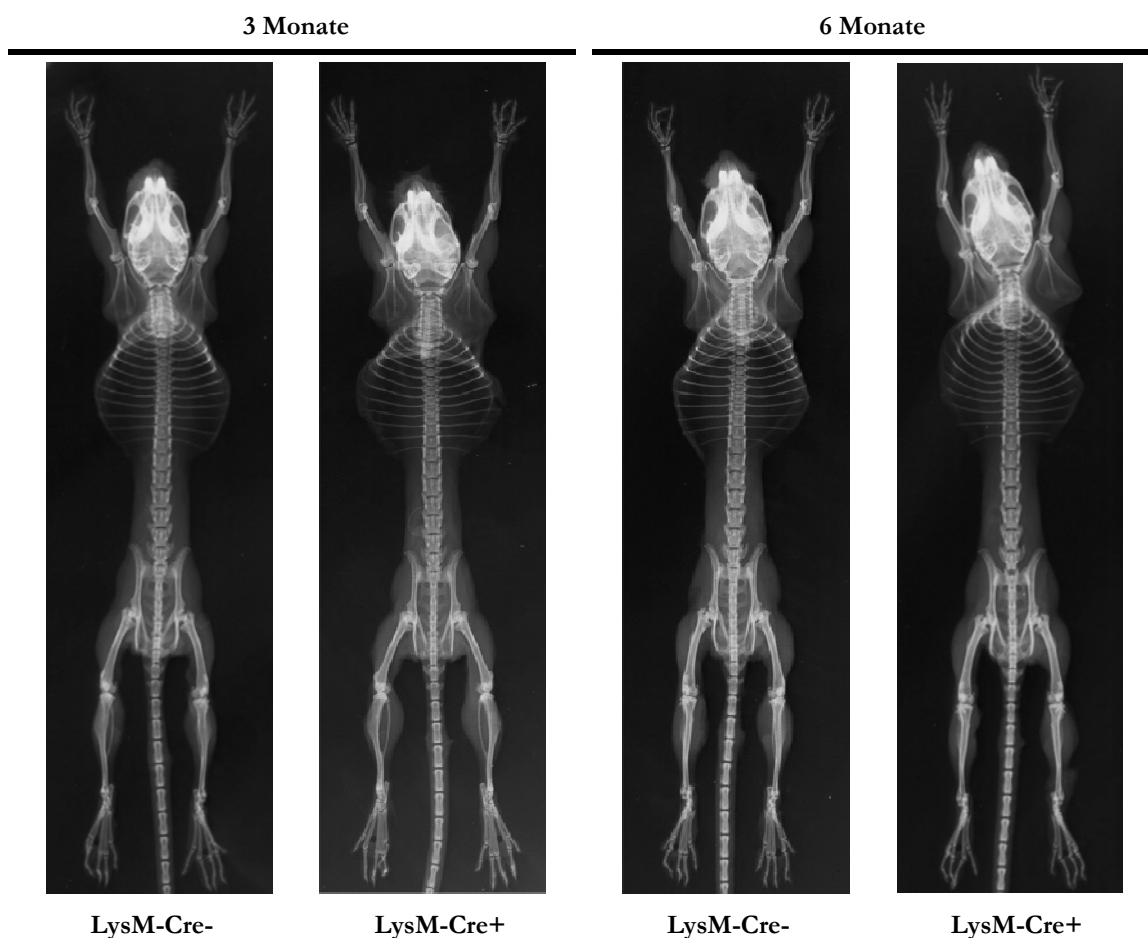


Abbildung 49: Röntgenaufnahmen der Skelette von *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen.

Die Röntgenbilder von drei und sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen zeigen exemplarisch, dass die Tiere makroskopisch eine normale Knochenarchitektur und -struktur aufweisen.

3.4.2.1 Histomorphometrische Analyse der Lendenwirbelkörper

Die nachfolgende histomorphometrische Untersuchung der Lendenwirbelkörper von *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen ergab, dass Makrophagen- und Osteoklasten-ApoE keine bedeutende Rolle für die Knochenstruktur der Wirbelkörper spielt. Dies bedeutet im Detail, dass die Analyse der nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten Schnitte der Lendenwirbelkörper der sechs Monate alten Weibchen keine Veränderungen des trabec-

kulären Knochenvolumens und somit auch keine Unterschiede in der Trabekelanzahl, -dicke sowie dem Trabekelabstand erkennen lassen (Abbildung 50).

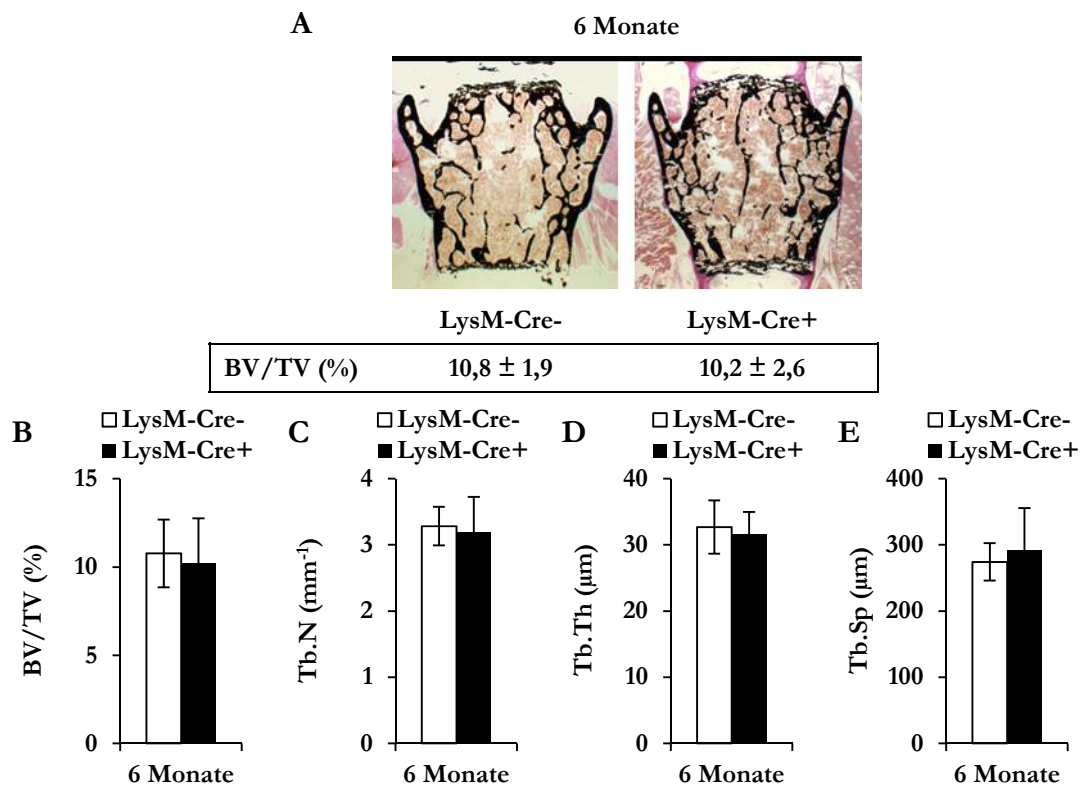


Abbildung 50: Histomorphometrische Analyse von *ApoE*^{flox/flox}-*LysM-Cre*-Lendenwirbelkörpern.

(A) Die Analyse von nicht-entcalcifizierten von-Kossa-/van-Gieson-gefärbten 5-µm-Schnitten der Lendenwirbelkörper zeigte in den sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*LysM-Cre*-Weibchen (n = 11) zwischen den Genotypen keine Unterschiede in (B) dem trabekulären Knochenvolumenanteil (BV/TV), (C) der Trabekelanzahl (Tb.N), (D) der Trabekeldicke (Tb.Th) sowie (E) dem Trabekelabstand (Tb.Sp).

3.4.2.2 µ-Computer-Tomographie-Analyse der Femora

Zur Analyse der Knochenstruktur in einem weiteren Knochenareal wurden Femora von sechs Monate alten weiblichen *ApoE*^{flox/flox}-*LysM-Cre*⁺- und entsprechenden Kontrollmäusen durch dreidimensionale µCT-Messungen untersucht. Es zeigte sich auch in den Femora, dass Makrophagen- und Osteoklasten-ApoE weder einen Einfluss auf das Längenwachstum noch auf das trabekuläre Knochenvolumen, die Trabekelanzahl, die Trabekeldicke sowie den Trabekelabstand haben. Zudem waren auch keine Veränderungen der volumetrischen Knochenmineraldichte messbar (Abbildung 51).

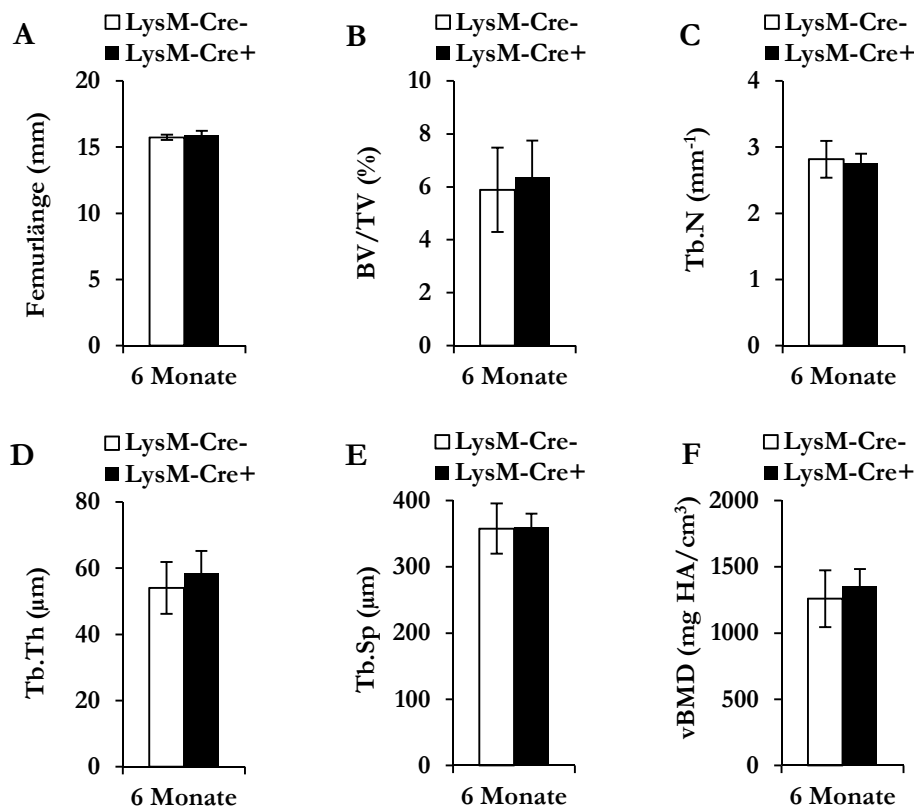


Abbildung 51: Analyse der trabekulären Mikroarchitektur von *Apoe*^{flox/flox}-*LysM-Cre*-Femora.

Die μ CT-Analyse der Femora von sechs Monate alten *Apoe*^{flox/flox}-*LysM-Cre*-Weibchen ($n = 11$) zeigt keinen Unterschied in (A) der Femurlänge, (B) dem trabekulären Knochenvolumen/Gewebevolumen-Verhältnis (BV/TV), (C) der Trabekelanzahl (Tb.N), (D) der Trabekeldicke (Tb.Th), (E) des Trabekelabstandes (Tb.Sp) sowie (F) der volumetrischen Knochenmineraldichte (vBMD).

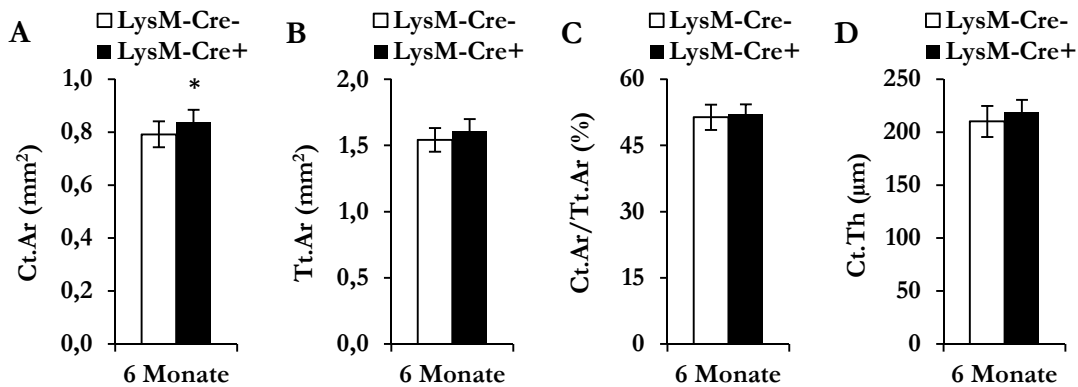


Abbildung 52: Analyse der kortikalen Knochenmorphologie von *Apoe*^{flox/flox}-*LysM-Cre*-Femora.

Makrophagen- und Osteoklasten-ApoE wirkte sich leicht hemmend auf (A) die kortikale Knochenfläche (Ct.Ar) aus, beeinflusste aber weder (B) die Gesamtgewebefläche (Tt.Ar), (C) das Verhältnis von kortikaler Knochenfläche zu Gesamtgewebefläche (Ct.Ar/Tt.Ar) noch (D) die Dicke der Kortikalis (Ct.Th) von sechs Monate alten weiblichen *Apoe*^{flox/flox}-*LysM-Cre*⁺-Mäusen ($n = 11$).

Die Analyse der kortikalen Knochenmorphologie ergab hingegen einen geringen Effekt von Makrophagen- und Osteoklasten-ApoE. So war in den sechs Monate alten *Apoe*^{flox/flox}-*LysM-Cre*⁺-Mäusen zwar die kortikale Knochenfläche der Femora leicht erhöht, aber we-

der die Gesamtquerschnittsfläche, das Verhältnis von kortikaler Knochenfläche zur Gesamtquerschnittsfläche noch die kortikale Dicke wurden durch Makrophagen- und Osteoklasten-ApoE beeinflusst (Abbildung 52).

3.4.3 Bestimmung von Knochenumbau markern im Serum und Urin

Um den Phänotyp der sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre*-Mäuse abschließend zu charakterisieren, wurde überprüft, ob die ApoE-, Triglycerid- und Cholesterin-Konzentration sowie verschiedene Knochenumbau marker im Serum und Urin der Mäuse verändert sind.

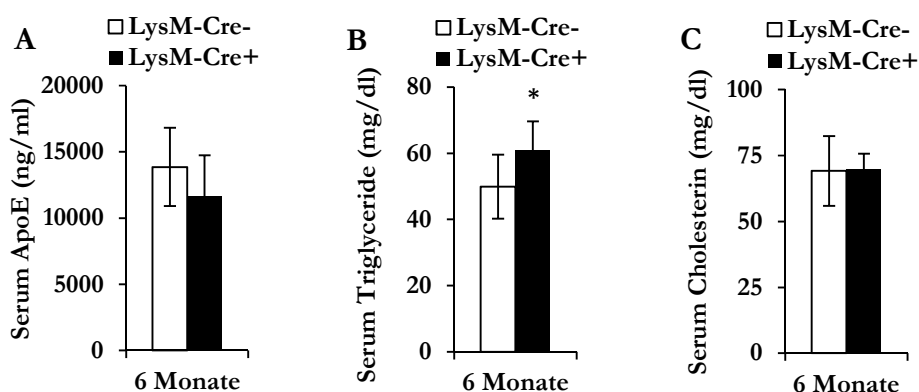


Abbildung 53: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von *ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre*-Mäusen.

ApoE aus Makrophagen und Osteoklasten hatte keinen Einfluss auf (A) die ApoE-Konzentration im Serum von sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre*-Mäusen ($n \geq 8$). Dessen Wegfall führte aber zu einer Erhöhung (B) der Triglycerid-Konzentration während (C) die Cholesterin-Konzentration unverändert blieb.

Die untersuchten Tiere wiesen alle normale ApoE-, Triglycerid- und Cholesterin-Konzentrationen im Serum auf, wobei der Triglycerid-Wert der *ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre+*-Mäuse jedoch leicht erhöht war (Abbildung 53).

Die Analyse der Knochenumbau marker ergab in Übereinstimmung mit der Knochenstrukturuntersuchung ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den sechs Monate alten *LysM-Cre*-positiven *ApoE^{fllox/fllox}*-Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Eine Makrophagen-/Osteoklasten-ApoE-Defizienz führte zwar zu einer erhöhten alkalischen Phosphatase-Aktivität, hatte aber ansonsten keinen Einfluss auf den Knochenbildungs- und Turnover-Marker Osteocalcin und den Knochenresorptionsmarker DPD/Kreatinin. Das osteoprotektive Protein OPG war zudem im Serum von *LysM-Cre*-positiven *ApoE^{fllox/fllox}*-Mäusen etwas erniedrigt, während jedoch die Konzentration von RANKL und das

OPG/RANKL-Verhältnis nicht verändert waren. Des Weiteren zeigten sich im Serum auch keine Effekte auf den Calcium- und Phosphat-Haushalt (Abbildung 54).

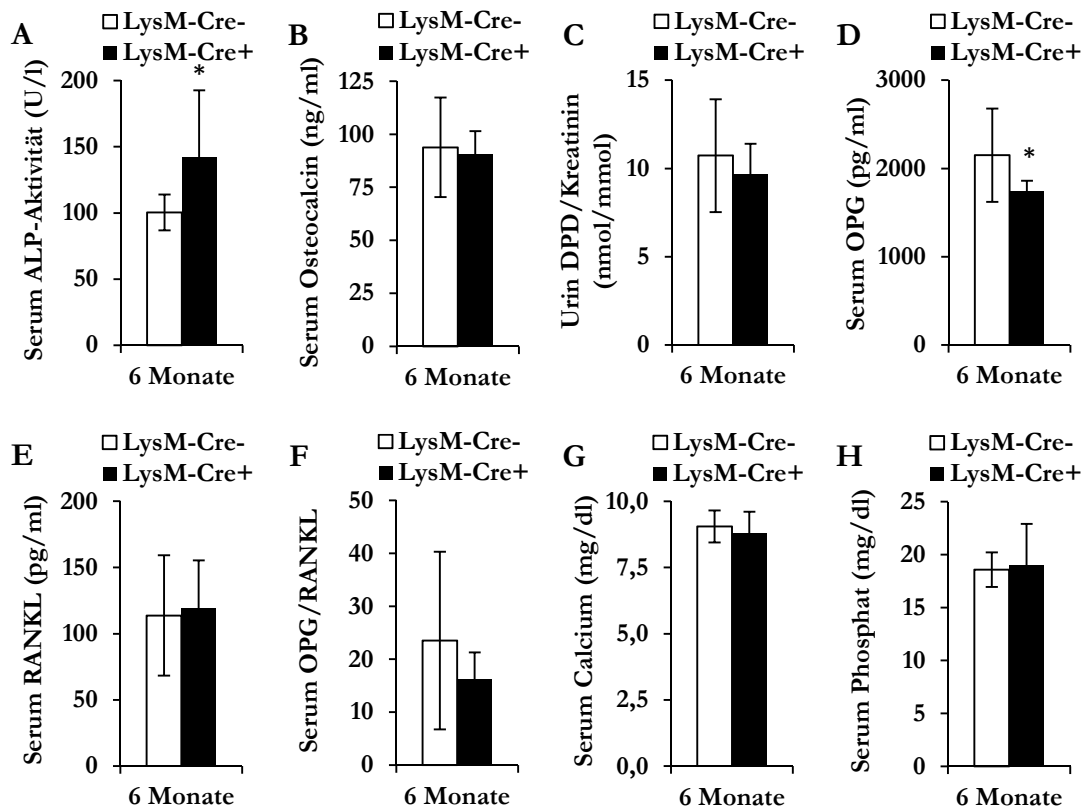


Abbildung 54: Analyse von Knochenumbau markern in weiblichen *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen.

Eine Defizienz an Makrophagen-/Osteoklasten-ApoE führte in sechs Monate alten weiblichen *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre*-Mäusen ($n \geq 9$) zu einer erhöhten (A) alkalischen Phosphatase (ALP)-Aktivität im Serum, hatte aber keinen Einfluss auf (B) die Serum-Osteocalcin-Konzentration noch auf (C) DPD/Kreatinin im Urin. Außerdem war die Serumkonzentration von (D) Osteoprotegerin (OPG) in den *ApoE^{flox/flox}-LysM-Cre+*-Mäusen erniedrigt, während die Werte von (E) Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) und (F) des OPG/RANKL-Verhältnisses sowie von (G) Calcium und (H) Phosphat unverändert waren.

Die Ergebnisse zeigen folglich, dass ApoE, das von Makrophagen und Osteoklasten produziert wird, in vivo keine offensichtliche Bedeutung für den Knochenstoffwechsel hat oder zumindest dessen Funktion bei einem Wegfall desselbigen vollständig durch exogenes ApoE kompensiert werden kann.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Apolipoprotein E, das aus dem Knochengewebe selbst stammt, eine wichtige Funktion in der Regulation des Knochenstoffwechsels einnimmt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst dargestellt, dass ApoE im Knochengewebe selbst, insbesondere in den knochenbildenden Osteoblasten und den knochenabbauenden Osteoklasten, exprimiert wird und dass ApoE *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Osteoblastendifferenzierung ausübt (Abschnitt 3.1). Um die Bedeutung von ApoE in den verschiedenen knochenspezifischen Zelltypen unter physiologischen Bedingungen analysieren zu können, wurden mit Hilfe des Cre/loxP-Systems verschiedene Mausmodelle generiert, in denen es zu einer spezifischen Deletion des *ApoE*-Gens entweder früh (*ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre*, Abschnitt 3.2) bzw. spät (*ApoE^{fllox/fllox}-OC-Cre*, Abschnitt 3.3) in der Osteoblastendifferenzierung oder in Osteoklasten/Makrophagen (*ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre*, Abschnitt 3.4) kommt, und diese anschließend bezüglich ihres Energie- und Knochenstoffwechsels charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das zelleigene ApoE vor allem in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung von Bedeutung für den Knochenstoffwechsel ist, in vollständig differenzierten Osteoblasten und Osteozyten hingegen kaum noch eine Rolle hinsichtlich der untersuchten Parameter spielt. Sechs Monate alte *ApoE^{fllox/fllox}-Runx2-Cre*+Weibchen weisen im Vergleich zu den entsprechenden *ApoE^{fllox/fllox}*-Kontrolltieren eine verringerte trabekuläre Knochenmasse auf, die durch einen erhöhten Knochenabbau bei unveränderter Knochenbildung trotz gesteigerter Osteoidproduktion verursacht wird. Im Gegensatz dazu wurden im *ApoE^{fllox/fllox}-OC-Cre*-Mausmodell bis auf eine Vergrößerung der Osteoidoberfläche keine Veränderungen bezüglich der Knochenstruktur festgestellt. Außerdem scheint das von Osteoklasten und Makrophagen stammende ApoE ebenfalls keine essentielle Rolle für den Knochenstoffwechsel zu spielen, da bei der Analyse des *ApoE^{fllox/fllox}-LysM-Cre*-Mausmodells ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen in der Knochenstruktur zutage traten.

4.1 Expression von ApoE im Knochen

Die Idee, dass ApoE eine wichtige Rolle im Knochengewebe und vor allem in Osteoblasten spielen könnte, beruht hauptsächlich auf der von Schilling et al. (2005) veröffentlichten Studie, in der gezeigt wurde, dass die *ApoE*-Expression während der Calvaria-Osteoblastendifferenzierung stark hochreguliert wird und *ApoE*^{-/-}-Mäuse eine gesteigerte Knochenbildungsrate und damit einhergehend eine erhöhte Knochenmasse aufweisen. In zwei weiteren Studien zum Knochenphänotyp von *ApoE*^{-/-}-Mäusen wurde diese Beobachtung bestätigt (Bartelt et al., 2010; Nikolov et al., 2010). Wie bereits seit den 1980er Jahren bekannt ist, wird ApoE vornehmlich von der Leber produziert, zu einem geringeren Anteil jedoch auch in peripheren Organen wie der Niere, dem Gehirn, den Hoden und der Milz (Elshourbagy et al., 1985; Newman et al., 1985). In den unterschiedlichen Skelettstrukturen, wie den Femora, Calvaria und Wirbelkörpern wird *ApoE* auf einem vergleichbaren Niveau mit den meisten anderen peripheren Organen exprimiert. Nur die Fettgewebe, das Gehirn und vor allem die Leber weisen deutlich höhere Expressionswerte auf (Abbildung 12). Außerdem wird *ApoE*-mRNA in allen primären knochenspezifischen Zelltypen hergestellt, wobei Chondrozyten jedoch nur sehr niedrige Expressionswerte zeigen, während Osteoblasten und Osteoklasten deutlich höhere Werte aufweisen (Abbildung 13 und Abbildung 14). Dies deutet darauf hin, dass ApoE vor allem eine wichtige Rolle in Osteoblasten und Osteoklasten einnimmt. Auf dieser Beobachtung basierend wurde im Folgenden die Funktion von ApoE spezifisch in Osteoblasten und Osteoklasten studiert.

4.2 Einfluss von ApoE auf die Osteoblastendifferenzierung in vitro

In primären Osteoblastenkulturen wirkt sich ApoE inhibierend auf die Osteoblastendifferenzierung aus. Eine *ApoE*-Defizienz führt in beiden untersuchten Osteoblastenzelltypen zu einer signifikant erhöhten Expression von Osteoblastenmarkergenen, wobei die Produktion und Sekretion von Osteocalcin besonders stark induziert wird. Zudem nimmt die inhibierende Wirkung von ApoE bei Calvaria-Osteoblasten im Differenzierungsverlauf stark zu, während sich diese bei KM-Osteoblasten hingegen im Verlauf der Differenzierung deutlich abschwächt (Abbildung 16, Abbildung 17 und Abbildung 19). In gleicher Weise ändert sich in diesen Zellen auch die *ApoE*-mRNA-Expression. Während der Differenzierung von Calvaria-Osteoblasten nimmt die mRNA-Expression von *ApoE* stark zu (Abbildung 15, Schilling et al. (2005)), wohingegen diese während der KM-Osteoblastendifferenzierung herunterreguliert wird (Abbildung 18). Somit folgt die inhibie-

rende Wirkung von ApoE sinnvollerweise seinem eigenen Expressionsniveau. Besitzen die Zellen hingegen nur ein funktionelles *ApoE*-Allel, unterscheiden sie sich bezüglich der Expression von Osteoblastendifferenzierungsmarkern nicht von den Wildtyp-Osteoblasten. Das deutet darauf hin, dass bereits ein *ApoE*-Allel ausreicht, um die Funktion von ApoE in Osteoblasten aufrechtzuerhalten. Über die zugrunde liegenden Mechanismen, über die ApoE die Osteoblastendifferenzierung *in vitro* hemmt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur gemutmaßt werden. Eine sehr naheliegende Erklärung für das erhöhte Differenzierungspotential der *ApoE*^{-/-}-Osteoblasten könnte der Wegfall der inhibitorischen Wirkung von ApoE auf den WNT-Signalweg sein. Dieser Signalweg ist essentiell für die Osteoblastenreifung und wird durch die Bindung von WNT-Proteinen an Frizzled-Rezeptoren und deren Co-Rezeptoren LRP5/6 aktiviert (Manolagas, 2014). Außerdem ist bereits bekannt, dass ApoE an diese Co-Rezeptoren und den negativen WNT-Regulator LRP1 binden kann (Kim et al., 1998; Zilberberg et al., 2004) und insbesondere das humane ApoE4 in undifferenzierten PC12-Zellen über LRP5 und LRP6 inhibitorisch auf den kanonischen WNT-Signalweg einwirkt (Caruso et al., 2006). Ein weiterer möglicher Mechanismus über den ApoE die osteogene Differenzierung regulieren könnte, stellt der Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-Signalweg dar. PDGF-BB wirkt über den PDGF-Rezeptor β hemmend auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen ein (Tokunaga et al., 2008). Der ApoE-Rezeptor LRP1 moduliert als Co-Rezeptor die Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors (Boucher et al., 2002; Loukinova et al., 2002) und kontrolliert in murinen Fibroblasten die Ubiquitinierung und Endozytose des PDGF-Rezeptors β (Takayama et al., 2005). Daher wäre es möglich, dass ApoE über seine Funktion als Ligand von LRP1 auf den PDGF-Signalweg in Osteoblasten einwirkt und damit deren Differenzierung reguliert.

4.3 Bedeutung von Osteoblasten-ApoE *in vivo*

Um auch unter physiologischen Bedingungen die Bedeutung von dem ApoE, das speziell von Osteoblasten hergestellt wird, untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene osteoblastenspezifische *ApoE*-Knockout-Mausmodelle über das Cre/loxP-System generiert. Im ersten Modell (*ApoE*^{fllox/fllox}-*Runx2-Cre*) wird das *ApoE*-Gen bereits zu Beginn der Osteoblastendifferenzierung deletiert. Dies ermöglicht es die Funktion von ApoE in allen Stadien der osteoblastären Entwicklung *in vivo* zu untersuchen. Im zweiten Mausmodell (*ApoE*^{fllox/fllox}-*OC-Cre*) kommt es hingegen erst in vollständig differenzierten Osteoblasten zur Deletion des *ApoE*-Gens und somit sind in diesen Tieren nur reife Osteoblasten und Osteo-

zyten von der *ApoE*-Defizienz betroffen. Durch den Vergleich der beiden Mausmodelle ist es daher möglich herauszufinden, zu welchen Differenzierungsstadien ApoE die Osteoblastenfunktion beeinflusst.

Bei der Charakterisierung der beiden Mausmodelle zeigte sich wie erwartet, dass es im *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mausmodell in allen Knochengeweben inklusive dem Knochenmark, das eine Vielzahl von Osteoblastenvorläuferzellen jedoch keine reifen Osteoblasten enthält, zu einer hoch signifikanten Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression kommt, während die anderen untersuchten Gewebe wie die Leber keine Veränderungen in der *ApoE*-mRNA-Expression zeigen (Abbildung 20). Erwartungsgemäß ist die ApoE-Konzentration im Serum dieser Tiere ebenfalls nicht verändert (Abbildung 21). In primären Zellkulturen zeigt sich zudem, dass es neben den beiden untersuchten Osteoblastentypen auch in Chondrozyten zu einer signifikanten Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression kommt (Abbildung 22). Dies lässt sich dadurch erklären, dass der verwendete osteoblastenspezifische *Runx2*-Promotor auch in der terminalen Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten aktiviert wird (Ducy et al., 1997; Enomoto et al., 2000). Da Chondrozyten nur sehr geringe Mengen an *ApoE*-mRNA produzieren und ApoE keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von Chondrozyten hat (Abbildung 34), ist es äußerst unwahrscheinlich, dass das von Chondrozyten hergestellte ApoE einen Einfluss auf den Phänotyp des *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mausmodells hat.

Auch im *ApoE^{flox/flox}-OC-Cre*-Mausmodell ist eine signifikante Abnahme von *ApoE*-mRNA spezifisch im Knochen messbar, während die *ApoE*-mRNA-Expression der anderen Gewebe und die ApoE-Konzentration im Serum nicht verändert ist (Abbildung 35 und Abbildung 36). Jedoch fällt die Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression in den Knochengeweben erwartungsgemäß geringer als im *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mausmodell aus, da in diesem Modell nur reife Osteoblasten und Osteozyten von der *ApoE*-Defizienz betroffen sind. Daher kommt es auch im Knochenmark dieser Tiere zu keiner Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression. Erstaunlicherweise ist jedoch auch in den Calvaria keine Abnahme der *ApoE*-mRNA-Expression messbar, obwohl es in den aus Calvaria isolierten primären Osteoblasten zu einer starken Abnahme der *ApoE*-mRNA-Expression kommt (Abbildung 37). Möglicherweise ist der Anteil an reifen Osteoblasten im Vergleich zu anderen *ApoE*-exprimierenden Zellen in den Calvaria zu gering, um deren Verlust an *ApoE* messen zu können.

4.3.1 Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf den Energiestoffwechsel

Zur Analyse des Phänotyps der beiden osteoblastenspezifischen *ApoE*-Knockout-Modelle wurde zunächst deren Energiestoffwechsel untersucht, da ApoE ein zentrales Molekül des Lipoproteinstoffwechsels darstellt und bekannt ist, dass ein globaler *ApoE*-Knockout in Mäusen auf Grund der Akkumulation von cholesterinreichen Remnant-Lipoproteinen zur Entstehung einer spontanen Hypercholesterinämie und schließlich zur Entwicklung von Atherosklerose führt (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). *ApoE*^{-/-}-Mäuse sind unter adipösen Bedingungen durch einen partiell verbesserten metabolischen Zustand gekennzeichnet: sie nehmen weniger Gewicht zu und zeigen eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität verglichen mit Wildtyptieren (Bartelt et al., 2010; Gao et al., 2007). Außerdem weisen *ApoE*^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Konzentration von untercarboxyliertem Osteocalcin im Serum auf (Schilling et al., 2005), von dem gezeigt wurde, dass es zu einer gesteigerten Insulin-Sekretion sowie einer verbesserten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität führen kann (Ferron et al., 2008; Lee et al., 2007). Die Analyse des Energiestoffwechsels ergab jedoch in beiden Mausmodellen, dass Osteoblasten-ApoE in etwa vier Monate alten Männchen unter normalen Ernährungsbedingungen weder einen Einfluss auf das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme noch auf die Cholesterin- und Triglycerid-Werte im Plasma hat und auch die Glukosetoleranz und postprandiale Lipidclearance nicht beeinflusst (Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 38, Abbildung 39). Da sich im Verlauf dieser Arbeit jedoch gezeigt hat, dass zumindest das *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodell einen alters- und geschlechtsabhängigen Phänotyp aufweist, der unter anderem durch eine erhöhte Osteocalcin-Konzentration im Serum gekennzeichnet ist, wird es interessant sein zu überprüfen, ob sechs Monate alte *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*+/-Weibchen unter normalen Ernährungsbedingungen oder unter dem metabolischen Stress einer Hochfettdiät eine verbesserte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz zeigen.

4.3.2 Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf den Knochenstoffwechsel

Die Untersuchung des Knochenphänotyps der osteoblastenspezifischen Mausmodelle führte zu überraschenden Ergebnissen. Im Gegensatz zum globalen *ApoE*^{-/-}-Mausmodell, das durch eine erhöhte Knochenmasse gekennzeichnet ist, weist das *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodell einen altersabhängigen Knochenphänotyp auf, der sich mit zunehmendem Alter durch eine erniedrigte trabekuläre Knochenmasse auszeichnet (Abbildung 26). Diese

kommt dadurch zustande, dass die Knochenbildungsrate in diesen Tieren im Gegensatz zum *ApoE*^{-/-}-Mausmodell nicht erhöht, stattdessen die Osteoklastenzahl und -aktivität jedoch massiv gesteigert ist (Abbildung 27). Außerdem ist das Osteoidvolumen und die Osteoidoberfläche auf den Trabekeln der sechs Monate alten Weibchen stark vergrößert, was zusammen mit der nicht-erhöhten Knochenbildungsrate und der erniedrigten Knochenmineraldichte des trabekulären Knochens auf eine leichte Mineralisierungsstörung hindeutet (Abbildung 26 und Abbildung 28). Im kortikalen Knochen sind hingegen nur minimale Veränderungen festzustellen (Abbildung 29). Da im Urin der fünf Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Männchen im Gegensatz zu den sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Weibchen keine Erhöhung des Knochenresorptionsmarkers DPD/Kreatinin messbar ist (Tabelle 6), wäre es zudem möglich dass der Knochenphänotyp des *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodells nicht nur alters- sondern auch geschlechtsabhängig ist. Um diesen Verdacht zu bestätigen, müsste der Knochenphänotyp der männlichen Mäuse jedoch noch im Detail analysiert werden.

Im Gegensatz zum *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodell haben sechs Monate alte *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*⁺-Weibchen keinen offensichtlichen Knochenphänotyp. So zeigen diese Tiere weder Veränderungen in der trabekulären Knochenmasse noch in der Knochenbildungsrate und der Knochenresorption. Allein die Osteoidoberfläche ist wie im *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodell signifikant erhöht (Abbildung 41 und Abbildung 42). Dies deutet darauf hin, dass der nur bei einem früh in der Osteoblastendifferenzierung stattfindenden *ApoE*-Knockout auftretende Knochenphänotyp mechanistisch von dem in beiden Mausmodellen vorhandenem Osteoidphänotyp getrennt ist.

Der Knochenphänotyp der osteoblastenspezifischen *ApoE*-Knockout-Mäuse stellt einen Defekt in der Regulation von Knochenumbauprozessen im erwachsenen Skelett dar, da der Phänotyp sowohl altersabhängig ist als auch hauptsächlich den trabekulären Knochen betrifft, der am stärksten an Knochenumbauprozessen beteiligt ist. Folglich stellt sich die Frage, wie das aus Osteoblasten stammende ApoE Knochen-Remodeling-Prozesse beeinflusst.

Der Knochenaufbau, in Form der Knochenbildungsrate und des Knochenbildungsmarkers ALP, ist im *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁻ und *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Mausmodell im Gegensatz zum globalen *ApoE*^{-/-}-Mausmodell nicht gesteigert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass exogenes ApoE (aus dem Blut oder Knochenmark) die osteoblastäre *ApoE*-Defizienz teilweise

kompensieren kann, indem es, wie in Abschnitt 4.2 bereits diskutiert, inhibitorisch auf die Osteoblastendifferenzierung einwirkt. Zusätzlich weisen die beiden osteoblastenspezifischen *ApoE*-Knockout-Modelle jedoch eine Osteoidose auf (Abbildung 26 und Abbildung 41). Gängige Ursachen, die zu einer Osteoidose führen, sind ein Vitamin-D-Mangel, der durch eine niedrige 25-Hydroxylvitamin-D-Konzentration, erhöhte PTH-Werte, Hypophosphatämie und eine gesteigerte alkalische Phosphatase-Aktivität im Serum charakterisiert ist, eine renale Fehlfunktion und genetische Defekte, die zu einer Hypophosphatasie führen (Whyte und Thakker, 2013). In den untersuchten Mausmodellen wurde jedoch keines dieser klassischen Symptome nachgewiesen (Abbildung 31 und Abbildung 44). Eine andere Erklärung für die beobachtete Osteoidose könnte sein, dass das exogene ApoE möglicherweise nicht in der Lage ist in den *ApoE*-defizienten Osteoblasten die Produktion von Osteoidmatrixproteinen vollständig zu normalisieren, was somit zu einer erhöhten Osteoidablagerung führen würde. Da die Mineralisierung des überschüssigen Osteoids aber nicht durch eine erhöhte ALP-Aktivität gefördert wird, könnte es zu einer verzögerten Mineralisierung und schließlich zu einer Akkumulation von unmineralisiertem Osteoid kommen. Zur Klärung der Frage, ob die Osteoidose primär durch eine erhöhte Osteoidproduktion oder durch eine Mineralisierungsstörung verursacht wird, könnte die Bestimmung der Mineral-Appositionsrate dienen.

Der dem Knochenbildungsprozess gegenüberstehende Knochenabbau ist hingegen nur im *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*-Mausmodell stark erhöht und führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Knochenmasse. Da der verstärkte Knochenabbau in diesem Mausmodell zudem mit einer erhöhten Osteocalcin-Konzentration im Serum einhergeht (Abbildung 31), obwohl keine gesteigerte Knochenbildung vorliegt, wäre es möglich, dass die erhöhte Osteocalcin-Konzentration durch die Freisetzung von Osteocalcin bei der Knochenresorption zustande kommt. Ein solcher Mechanismus wurde bereits von Ferron et al. (2010) beschrieben und wird als Mechanismus zur der Freisetzung des hormonell aktiven untercarboxylierten Osteocalcin aus dem Knochen diskutiert. Gemäß dieser Hypothese kommt es über eine Osteoblasten vermittelte Aktivierung von Osteoklasten in Folge des Knochenresorptionsprozesses zur Decarboxylierung des in der Knochenmatrix gespeicherten Osteocalcins, welches anschließend in die Zirkulation freigesetzt wird und dort seine Wirkung als Hormon ausüben kann. Sollte dieser Mechanismus für die erhöhte Osteocalcin-Konzentration verantwortlich sein, könnten die sechs Monate alten *ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre*+ Weibchen eine verbesserte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz aufweisen (siehe Ab-

schnitt 4.3.1). Für diesen Mechanismus würde außerdem sprechen, dass die fünf Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Männchen (Tabelle 6) und vor allem die sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*⁺-Weibchen (Abbildung 44), in denen ApoE speziell in den Osteocalcin produzierenden Zellen ausgeschaltet ist, weder eine Veränderung in der Osteocalcin-Konzentration im Serum noch in der Knochenresorption aufweisen.

Es stellt sich weiterhin die Frage, wie bzw. warum es in den sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Weibchen zu der starken Aktivierung von Osteoklasten kommt. Da sich das *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Mausmodell vom *ApoE*^{flox/flox}-*OC-Cre*-Modell nur darin unterscheidet, dass im *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*-Modell auch Prä-Osteoblasten von der Deletion des *ApoE*-Gens betroffen sind, müsste die *ApoE*-Defizienz speziell in Prä-Osteoblasten entweder zu einer gesteigerten Expression eines Osteoklasten stimulierenden Faktors wie RANKL und TNF α oder einer verminderten Expression eines Osteoklasten hemmenden Faktors wie OPG führen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurden in Zellkulturexperimenten eine signifikante Steigerung der *Tnfrsf11*-mRNA-Expression und teilweise zusätzlich eine deutlich verminderte *Tnfrsf11b*-mRNA-Expression in primären *ApoE*^{-/-}- und *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Osteoblasten gemessen (Abbildung 16, Abbildung 19 und Abbildung 33). Im Serum der *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Weibchen sind zwar keine signifikanten Veränderungen der OPG- und RANKL-Konzentration messbar, dennoch ist das OPG/RANKL-Verhältnis leicht erniedrigt und begünstigt somit tendenziell die Osteoklastenaktivierung (Abbildung 31). Da RANKL zudem primär als Transmembranprotein vorkommt und die Osteoklastogenese in dieser Form am effektivsten stimulieren kann (Hikita et al., 2006), ist die Serumkonzentration von RANKL nur eingeschränkt aussagekräftig. Daher wird es von Interesse sein zu überprüfen, ob die RANKL-Expression im Knochengewebe von sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Weibchen auf mRNA- und vor allem auf Protein-Ebene erhöht ist.

Es bleibt weiterhin die Frage offen, welche altersabhängigen Mechanismen in Prä-Osteoblasten durch ApoE beeinflusst sind und schließlich zur Aktivierung von Osteoklasten führen. Eine Hypothese, wie Osteoblasten-ApoE die Osteoklastenaktivität kontrollieren könnte, wäre, dass eine *ApoE*-Defizienz in Osteoblasten zu erhöhtem oxidativem Stress führt. Der erhöhte oxidative Stress würde dann wiederum die Expression von RANKL steigern und die Expression von OPG hemmen, was schließlich in einer Aktivierung von Osteoklasten und einem Knochenabbau resultieren würde. In Einklang mit dieser Hypo-

these wurde bereits in den 1990er Jahren gezeigt, dass ApoE anti-oxidative Eigenschaften besitzt, da es in *ApoE*^{-/-}-Mäusen zu einer erhöhten Lipidoxidation im Plasma kommt (Hayek et al., 1994). Außerdem fördert eine *ApoE*-Defizienz die Zunahme von oxidativem Stress im Gehirn (Shea et al., 2002), während eine Überexpression von ApoE in humanen Adipozyten vor H₂O₂-induzierten oxidativen Schäden schützt (Tarnus et al., 2009). Darüber hinaus wurde von Bai et al. (2005) gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in murinen Osteoblasten die Expression von RANKL stimulieren. Des Weiteren führt durch Homocystein induzierter oxidativer Stress in Ratten-Osteoblasten ebenfalls zu einer Zunahme der RANKL- und Abnahme der OPG-Synthese und fördert damit den Verlust von Knochenmasse (Vijayan et al., 2013). Zudem ist die altersbedingte Abnahme der Knochenstabilität zeitlich mit einer kontinuierlichen Zunahme an oxidativem Stress im Knochenmark von C57BL/6-Mäusen assoziiert (Almeida et al., 2007), und dieser wird als zentraler pathogenetischer Mechanismus der altersbedingten Abnahme der Knochenmasse angesehen (Manolagas, 2010). Einen Hinweis auf eine geschlechtsabhängige Regulation von oxidativem Stress liefert darüber hinaus eine Studie von Ali et al. (2006), in der gezeigt wurde, dass weibliche C57/Bl6-Mäuse im Gehirn stärkerem oxidativem Stress ausgesetzt sind als männliche Mäuse. Folglich wäre es möglich, dass die anti-oxidativen Eigenschaften von ApoE vor allem in weiblichen Mäusen von Bedeutung sind, da diese eine höhere Empfänglichkeit für oxidativen Stress besitzen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste noch untersucht werden, ob ROS und die Oxidation von Proteinen, DNA oder Lipiden in primären Osteoblastenkulturen und im Knochengewebe von sechs Monate alten *ApoE*^{flox/flox}-*Runx2-Cre*⁺-Weibchen erhöht sind und wie sich eine ApoE-Defizienz oder Überexpression von ApoE in Osteoblasten unter oxidativem Stress -wie er unter anderem durch H₂O₂ ausgelöst wird- auf die RANKL- und OPG-Expression auswirkt.

4.4 Bedeutung von Osteoklasten- und Makrophagen-ApoE in vivo

Osteoklasten stellen den zweiten knochenspezifischen Zelltyp dar, der große Mengen an *ApoE*-mRNA exprimiert (Abbildung 13), obwohl die Expression von ApoE während der RANKL-induzierten Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten herunterreguliert wird (Kim et al., 2013). Um die Rolle von ApoE in Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen, den Monozyten/Makrophagen, im lebenden Organismus untersuchen zu können, wurde ein drittes konditionelles *ApoE*-Knockout-Mausmodell (*ApoE*^{flox/flox}-*LysM-Cre*) generiert und

speziell die Funktion von Osteoklasten- und Makrophagen-ApoE im Knochenstoffwechsel untersucht.

Wie erwartet, wurde bei der Charakterisierung des *ApoE*^{flx/flx}-*LysM-Cre*-Mausmodells in allen untersuchten Knochengeweben eine signifikante Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression beobachtet (Abbildung 47). Weil zudem bekannt ist, dass gewebespezifische Makrophagen, wie die Kupfferzellen der Leber oder die Mikroglia des Gehirns, Teil der Zellpopulation vieler Organe sind (Davies et al., 2013) und es in diesem Mausmodell daher nicht zu einer knochenspezifischen Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression kommt, wurde davon abgesehen noch andere nicht-knöcherner Gewebe auf ihre *ApoE*-mRNA-Expression hin zu kontrollieren. Da die ApoE-Konzentration im Serum der *ApoE*^{flx/flx}-*LysM-Cre*+ Mäuse jedoch nicht reduziert ist (Abbildung 47) und es in primären Osteoklastenkulturen zu einer Reduktion der *ApoE*-mRNA-Expression um über 95 % kommt (Abbildung 48), kann davon ausgegangen werden, dass es in diesem Mausmodell zu einer spezifischen und effizienten Deletion von *ApoE* in Osteoklasten und Makrophagen kommt.

Desweiteren zeigen sechs Monate alte *ApoE*^{flx/flx}-*LysM-Cre*+ Weibchen keine Veränderungen bezüglich ihres Körpergewichts oder ihres Cholesterin-Spiegels im Serum (Abbildung 53), was mit einer Studie von Van Eck et al. (2000) im Einklang steht, in der der Cholesterinstoffwechsel von C57Bl/6-Wildtyp-Tieren untersucht wurde, nachdem ihnen *ApoE*^{-/-}-Knochenmark transplantiert worden war. Außerdem weisen die *ApoE*^{flx/flx}-*LysM-Cre*+ Weibchen leicht erhöhte Triglycerid-Werte im Serum auf, was zu einem deutlich stärkeren Ausmaß ebenfalls in globalen *ApoE*^{-/-}-Mäusen beobachtet wurde (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Weitere Untersuchungen der *ApoE*^{flx/flx}-*LysM-Cre*+ Weibchen zeigten zudem, dass Osteoklasten- und Makrophagen-ApoE keine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel spielen. So hat eine Osteoklasten-/Makrophagen-ApoE-Defizienz keinen Einfluss auf die trabekuläre Knochenmasse und Knochenmineraldichte und resultiert nur in einer leichten Erhöhung der kortikalen Knochenfläche (Abbildung 50 bis Abbildung 52). Außerdem zeigen die Tiere keine Veränderungen in der Knochenresorption. Dafür ist jedoch erstaunlicherweise im Serum die alkalische Phosphatase-Aktivität erhöht und die OPG-Konzentration leicht erniedrigt, was aber das OPG/RANKL-Verhältnis letztendlich nicht merklich verändert (Abbildung 54). Da die ALP-Aktivität im Serum nicht alleine durch den Knochen sondern auch durch andere Organe wie die Leber und die Niere bestimmt wird und es zudem nicht bekannt ist, dass dieses Enzym von Osteoklasten oder Makrophagen

selbst produziert wird, müsste zunächst über die gewebespezifische Glykosylierung der ALP-Moleküle bestimmt werden, welches Organ für die erhöhte ALP-Aktivität verantwortlich ist. Letztendlich lässt sich aus diesen Ergebnissen jedoch schlussfolgern, dass ApoE aus Osteoklasten und Makrophagen *in vivo* keine bedeutende Rolle im Knochen zu spielen scheint. Die Arbeit von Kim et al. (2013) weist zwar *in vitro* auf eine Hemmung der Osteoklastenaktivität durch ApoE hin, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduziert werden konnte (Abbildung 48). Dies lässt sich aber möglicherweise dadurch erklären, dass in dieser Arbeit zum Teil andere Osteoklastenmarkergene gemessen wurden und die *ApoE*-Defizienz der Osteoklasten womöglich durch die noch vorhandene Restexpression von ApoE (~5 %) ausgeglichen werden kann. Letzteres würde aber auch implizieren, dass die Funktion von Osteoklasten eigenem ApoE vermutlich auch *in vivo* durch exogenes ApoE erfüllt werden kann und diese dadurch in diesem Mausmodell nicht zutage tritt. Dies ist aber dennoch unwahrscheinlich, da im globalen *ApoE*^{-/-}-Mausmodell ebenfalls keine Veränderungen in der Osteoklastenanzahl und -aktivität beobachtet wurden (Nikolov et al., 2010; Schilling et al., 2005).

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass ApoE vor allem in den frühen Stadien der Osteoblastendifferenzierung eine wichtige regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel, insbesondere bei Knochen-Remodeling-Prozessen, einnimmt, während es in reifen Osteoblasten und Osteozyten sowie in Osteoklasten keine bedeutende Rolle spielt oder zumindest dessen Funktion ebenso durch exogenes ApoE erfüllt werden kann. Außerdem weisen die Daten darauf hin, dass Osteoblasten-ApoE insbesondere bei der Entstehung eines alters- und geschlechtsabhängigen Knochenmasseverlusts im Rahmen der postmenopausalen Osteoporose beteiligt sein könnte.

5. Zusammenfassung

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein wichtiger Bestandteil von Lipoproteinen und vermittelt als Ligand von Mitgliedern der LDL-Rezeptor-Familie die Endozytose dieser Lipoproteine. Im Mausmodell verursacht eine *ApoE*-Defizienz eine Akkumulation von Remnant-Lipoproteinen und führt im Knochen zu einer erhöhten Knochenmasse, die aus einer gesteigerten Knochenbildung bei unveränderter Knochenresorption resultiert. Bisher ist nicht bekannt, aus welchen Zelltypen das ApoE stammt, das maßgeblich für den Knochenmetabolismus von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass ApoE im Knochengewebe selbst, insbesondere in den knochenbildenden Osteoblasten und den knochenabbauenden Osteoklasten, exprimiert wird und *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Osteoblastendifferenzierung ausübt. Des Weiteren wurde mit Hilfe von verschiedenen konditionellen *ApoE*-Knockout-Mausmodellen spezifisch die Bedeutung von Osteoblasten- und Osteoklasten-ApoE für die Knochenstruktur und den systemischen Energiestoffwechsel untersucht. Osteoblasten-ApoE hat unter normalen diätetischen Bedingungen keinen Einfluss auf die postprandiale Lipoprotein-Clearance und die Glukosetoleranz männlicher Mäuse. Eine interessante Beobachtung ergab sich aber aus der Knochenanalyse der Knockout-Mausmodelle: die Deletion von *ApoE* in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung führt zu einem alters- und geschlechtsabhängigen Knochenphänotyp, der den Phänotyp des globalen *ApoE*-Knockouts nicht widerspiegelt. So zeigen sechs Monate, nicht aber drei Monate alte Weibchen eine Reduktion der trabekulären Knochenmasse, die durch eine erhöhte Osteoklastenzahl und Knochenresorption bei unveränderter Knochenbildungsrate verursacht wird. Außerdem weisen diese Tiere eine gesteigerte Osteocalcin-Konzentration im Serum auf. In fünf Monate alten Männchen sind die Knochenresorption und Serum-Osteocalcin-Konzentration hingegen nicht verändert. ApoE vollständig differenzierter Osteoblasten und Osteozyten spielt hingegen nach den Ergebnissen dieser Arbeit hinsichtlich der untersuchten Endpunkte keine bedeutende Rolle; genetisch bedingte *ApoE*-Defizienz in diesen Zelltypen hat im Mausmodell keinen Einfluss auf die gemessenen Knochenparameter. Der osteoklastenspezifische *ApoE*-Knockout wirkt sich ebenfalls nicht auf die Knochenstruktur von sechs Monate alten weiblichen Mäusen aus.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ApoE vor allem in den frühen Stadien der Osteoblastendifferenzierung eine wichtige regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel, insbesondere bei Knochen-Remodeling-Prozessen, einnimmt. In reifen Osteoblasten und Osteozyten sowie in Osteoklasten scheint das von diesen Zelltypen selbst synthetisierte ApoE keine bedeutende Rolle zu spielen. In den frühen Stadien der Osteoblastendifferenzierung hingegen führt eine *ApoE*-Defizienz über alterierte Zell-Zell-Kommunikation mit Osteoklasten zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität und einem konsekutivem Knochenmasseverlust. Osteoblasten-ApoE stellt somit wahrscheinlich einen physiologischen Modulator alters- und geschlechtsabhängiger Veränderungen der Knochenarchitektur des erwachsenen Skeletts dar.

6. Summary

Apolipoprotein E (apoE) is an important component of lipoproteins. As a ligand for members of the LDL receptor family, it mediates the endocytosis of these lipoproteins. Genetic *ApoE* deficiency in mice causes an accumulation of remnant lipoproteins but also results in a high-bone mass phenotype with increased bone formation while bone resorption is unaffected. Up to now it is unknown from which cell type the apoE that regulates the bone metabolism is derived from.

In this thesis it was shown for the first time that apoE is expressed in the bone tissue itself, particularly in bone forming osteoblasts and bone resorbing osteoclasts, and has an inhibitory effect on osteoblast differentiation in vitro. Furthermore, the specific impact of osteoblast- and osteoclast-apoE on bone structure and systemic energy metabolism was examined by making use of various conditional cell-type specific *ApoE* knockout mouse models. There is no impact of osteoblast-apoE on the postprandial lipoprotein clearance and the glucose tolerance of male mice under normal dietary conditions. Interestingly, the deletion of *ApoE* in the early stages of osteoblast differentiation results in an age- and sex-dependent bone phenotype which does not reflect the global *ApoE* knockout phenotype. Hence, three months old female mice do not possess a bone phenotype yet, whereas the trabecular bone mass of six months old females is reduced. This reduction is caused by an increased number of osteoclasts and increased bone resorption, while the bone formation rate remains unchanged. In addition, these mice exhibit an elevated serum osteocalcin concentration. In contrast, the bone resorption and the serum osteocalcin concentration of five months old males are unchanged. There is no significant influence of apoE derived from mature osteoblasts and osteocytes on bone metabolism, as an *ApoE* deficiency in these cell types has neither an effect on the bone mass nor on the number and activity of bone cells of six months old females. Furthermore, osteoclast-apoE is of no essential importance with regard to bone metabolism as the osteoclast-specific *ApoE* knockout has no influence on the bone structure of six months old female mice.

Altogether these findings show that in early stages of osteoblast differentiation apoE has a crucial regulatory function in bone metabolism, especially in bone remodeling processes. In mature osteoblasts and osteocytes as well as osteoclasts its role seems to be rather negli-

ble or its function can also be fulfilled by exogenous apoE. In early stages of osteoblast differentiation deficiency in *ApoE* results in an elevated number and activity of osteoclasts likely by inducing RANKL expression. In consequence of the increased bone resorption there is a decline in bone mass. Hence, osteoblast-ApoE modulates bone resorption, influencing cell-cell communication of osteoblasts and osteoclasts. In summary this work provides evidence for an involvement of osteoblast-apoE in age- and sex-related changes in bone architecture affecting the adult skeleton.

Literaturverzeichnis

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. und Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, NY)* 271, 518-520.
- Addison, W.N., Nakano, Y., Loisel, T., Crine, P. und McKee, M.D. (2008). MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 23, 1638-1649.
- Akiyama, H., Kim, J.E., Nakashima, K., Balmes, G., Iwai, N., Deng, J.M., Zhang, Z., Martin, J.F., Behringer, R.R., Nakamura, T., *et al.* (2005). Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14665-14670.
- Ali, S.S., Xiong, C., Lucero, J., Behrens, M.M., Dugan, L.L. und Quick, K.L. (2006). Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress. *Aging cell* 5, 565-574.
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Roberson, P.K., Kousteni, S., O'Brien, C.A., Bellido, T., Parfitt, A.M., *et al.* (2007). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *The Journal of biological chemistry* 282, 27285-27297.
- Almeida, M., Martin-Millan, M., Ambrogini, E., Bradsher, R., 3rd, Han, L., Chen, X.D., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., O'Brien, C.A., Jilka, R.L., *et al.* (2010). Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA-binding-independent actions of the ERalpha. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 769-781.
- Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hessle, L., Dhanyamraju, R., Atti, E., Camacho, N.P. und Millan, J.L. (2004). Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *The American journal of pathology* 164, 841-847.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* 257, 79-83.
- Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E.F., Mak, T.W., Serfling, E., *et al.* (2005). Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 202, 1261-1269.
- Atkins, G.J., Rowe, P.S., Lim, H.P., Welldon, K.J., Ormsby, R., Wijenayaka, A.R., Zelenchuk, L., Evdokiou, A. und Findlay, D.M. (2011). Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *Journal of bone and mineral*

- research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 26, 1425-1436.
- Bachner, D., Schroder, D., Betat, N., Ahrens, M. und Gross, G. (1999). Apolipoprotein E (ApoE), a Bmp-2 (bone morphogenetic protein) upregulated gene in mesenchymal progenitors (C3H10T1/2), is highly expressed in murine embryonic development. *BioFactors* (Oxford, England) 9, 11-17.
- Bai, X.C., Lu, D., Liu, A.L., Zhang, Z.M., Li, X.M., Zou, Z.P., Zeng, W.S., Cheng, B.L. und Luo, S.Q. (2005). Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *The Journal of biological chemistry* 280, 17497-17506.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V. und Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS genetics* 2, e216.
- Baron, R., Neff, L., Louvard, D. und Courtoy, P.J. (1985). Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *The Journal of cell biology* 101, 2210-2222.
- Barragan-Adjemian, C., Nicoletta, D., Dusevich, V., Dallas, M.R., Eick, J.D. und Bonewald, L.F. (2006). Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcified tissue international* 79, 340-353.
- Bartelt, A., Beil, F.T., Schinke, T., Roeser, K., Ruether, W., Heeren, J. und Niemeier, A. (2010). Apolipoprotein E-dependent inverse regulation of vertebral bone and adipose tissue mass in C57Bl/6 mice: modulation by diet-induced obesity. *Bone* 47, 736-745.
- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., *et al.* (2011a). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* 17, 200-205.
- Bartelt, A., Orlando, P., Mele, C., Ligresti, A., Toedter, K., Scheja, L., Heeren, J. und Di Marzo, V. (2011b). Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe(-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetologia* 54, 2900-2910.
- Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Weinstein, M.M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R.L., Wong, J.S., *et al.* (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell metabolism* 5, 279-291.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. und Stanley, K.K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.
- Bellido, T., Ali, A.A., Gubrij, I., Plotkin, L.I., Fu, Q., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C. und Jilka, R.L. (2005). Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 146, 4577-4583.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D. und MacDougald, O.A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3324-3329.

- Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R. und Gluck, S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science (New York, NY)* *245*, 855-857.
- Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R.G. und Herz, J. (2002). Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *The Journal of biological chemistry* *277*, 15507-15513.
- Boyce, B.F., Rosenberg, E., de Papp, A.E. und Duong le, T. (2012). The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European journal of clinical investigation* *42*, 1332-1341.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.
- Caruso, A., Motolese, M., Iacovelli, L., Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Gaviraghi, G. und Caricasole, A. (2006). Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *Journal of neurochemistry* *98*, 364-371.
- Chen, J.R., Plotkin, L.I., Aguirre, J.I., Han, L., Jilka, R.L., Kousteni, S., Bellido, T. und Manolagas, S.C. (2005). Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *The Journal of biological chemistry* *280*, 4632-4638.
- Chow, J.W., Wilson, A.J., Chambers, T.J. und Fox, S.W. (1998). Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *13*, 1760-1767.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. und Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* *8*, 265-277.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. und Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, NY)* *261*, 921-923.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A. und Renkawitz, R. (1988). Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 6232-6236.
- Dallas, S.L., Prideaux, M. und Bonewald, L.F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews* *34*, 658-690.
- Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., Jr. und Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International journal of biological sciences* *5*, 474-488.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E. und Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* *14*, 986-995.
- Davignon, J., Gregg, R.E. und Sing, C.F. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* *8*, 1-21.

- DeKoter, R.P., Walsh, J.C. und Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *The EMBO journal* *17*, 4456-4468.
- Dieckmann, M., Beil, F.T., Mueller, B., Bartelt, A., Marshall, R.P., Koehne, T., Amling, M., Ruether, W., Cooper, J.A., Humphries, S.E., *et al.* (2013). Human apolipoprotein E isoforms differentially affect bone mass and turnover in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *28*, 236-245.
- Dobnig, H. und Turner, R.T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* *136*, 3632-3638.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M. und Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* *100*, 197-207.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M. und Karsenty, G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development* *13*, 1025-1036.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. und Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* *89*, 747-754.
- Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., *et al.* (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* *434*, 514-520.
- Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W. und Taylor, J.M. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 203-207.
- Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T. und Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *The Journal of biological chemistry* *275*, 8695-8702.
- Faccio, R., Novack, D.V., Zallone, A., Ross, F.P. und Teitelbaum, S.L. (2003). Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. *The Journal of cell biology* *162*, 499-509.
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G. und Ducy, P. (2008). Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 5266-5270.
- Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P. und Karsenty, G. (2010). Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* *142*, 296-308.
- Forwood, M.R. (1996). Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *11*, 1688-1693.
- Fuller, K., Lawrence, K.M., Ross, J.L., Grabowska, U.B., Shiroo, M., Samuelsson, B. und Chambers, T.J. (2008). Cathepsin K inhibitors prevent matrix-derived growth factor degradation by human osteoclasts. *Bone* *42*, 200-211.

- Fuller, K., Murphy, C., Kirstein, B., Fox, S.W. und Chambers, T.J. (2002). TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* *143*, 1108-1118.
- Fulzele, K., Riddle, R.C., DiGirolamo, D.J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., Faugere, M.C., Aja, S., Hussain, M.A., Bruning, J.C., *et al.* (2010). Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* *142*, 309-319.
- Galea, G.L., Meakin, L.B., Sugiyama, T., Zebda, N., Sunter, A., Taipaleenmaki, H., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Lanyon, L.E. und Price, J.S. (2013). Estrogen receptor alpha mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor beta. *The Journal of biological chemistry* *288*, 9035-9048.
- Gao, J., Katagiri, H., Ishigaki, Y., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kanzaki, M., Yamamoto, T.T., *et al.* (2007). Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes* *56*, 24-33.
- Gibbons, G.F., Islam, K. und Pease, R.J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et biophysica acta* *1483*, 37-57.
- Goldberg, I.J., Eckel, R.H. und Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research* *50 Suppl*, S86-90.
- Gordon, D.A., Wetterau, J.R. und Gregg, R.E. (1995). Microsomal triglyceride transfer protein: a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends in cell biology* *5*, 317-321.
- Grigoriadis, A.E., Wang, Z.Q., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H.A. und Wagner, E.F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science (New York, NY)* *266*, 443-448.
- Haas, M.E., Attie, A.D. und Biddinger, S.B. (2013). The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *24*, 391-397.
- Harada, S. und Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* *423*, 349-355.
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen, E.F., Mosekilde, L. und Melsen, F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *16*, 1575-1582.
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E. und Gundberg, C.M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews* *69*, 990-1047.
- Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J.G. und Aviram, M. (1994). Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications* *201*, 1567-1574.
- Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. und Beisiegel, U. (2002). Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *Journal of molecular medicine* *80*, 576-584.
- Herz, J., Qiu, S.Q., Oesterle, A., DeSilva, H.V., Shafi, S. und Havel, R.J. (1995). Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in

- mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 4611-4615.
- Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. und Tanaka, S. (2006). Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *The Journal of biological chemistry* *281*, 36846-36855.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Spelsberg, T.C. und Riggs, B.L. (1999). Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* *140*, 4367-4370.
- Hu, H., Hilton, M.J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D.M. und Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development (Cambridge, England)* *132*, 49-60.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R. und Boyce, B.F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nature medicine* *2*, 1132-1136.
- Hunter, G.K., Hauschka, P.V., Poole, A.R., Rosenberg, L.C. und Goldberg, H.A. (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *The Biochemical journal* *317 (Pt 1)*, 59-64.
- Ichida, F., Nishimura, R., Hata, K., Matsubara, T., Ikeda, F., Hisada, K., Yatani, H., Cao, X., Komori, T., Yamaguchi, A., *et al.* (2004). Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* *279*, 34015-34022.
- Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J., Reddy, S.V., Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., *et al.* (2004). Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *The Journal of clinical investigation* *114*, 475-484.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E. und Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation* *92*, 883-893.
- Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M. und Manolagas, S.C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *13*, 793-802.
- Kajimura, D., Lee, H.W., Riley, K.J., Arteaga-Solis, E., Ferron, M., Zhou, B., Clarke, C.J., Hannun, Y.A., DePinho, R.A., Guo, X.E., *et al.* (2013). Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. *Cell metabolism* *17*, 901-915.
- Kameda, T., Mano, H., Yuasa, T., Mori, Y., Miyazawa, K., Shiokawa, M., Nakamaru, Y., Hiroi, E., Hiura, K., Kameda, A., *et al.* (1997). Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *The Journal of experimental medicine* *186*, 489-495.
- Kamiya, N., Ye, L., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yamauchi, M., Kronenberg, H.M., Feng, J.Q. und Mishina, Y. (2008). BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development (Cambridge, England)* *135*, 3801-3811.

- Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H., Glass, D.A., 2nd, Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.H., Brayton, C.F., *et al.* (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of cell biology* *157*, 303-314.
- Kenner, L., Hoebertz, A., Beil, F.T., Keon, N., Karreth, F., Eferl, R., Scheuch, H., Szremska, A., Amling, M., Schorpp-Kistner, M., *et al.* (2004). Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *The Journal of cell biology* *164*, 613-623.
- Khosla, S., Melton, L.J., 3rd und Riggs, B.L. (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *26*, 441-451.
- Kim, D.H., Inagaki, Y., Suzuki, T., Ioka, R.X., Yoshioka, S.Z., Magoori, K., Kang, M.J., Cho, Y., Nakano, A.Z., Liu, Q., *et al.* (1998). A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *Journal of biochemistry* *124*, 1072-1076.
- Kim, W.S., Kim, H.J., Lee, Z.H., Lee, Y. und Kim, H.H. (2013). Apolipoprotein E inhibits osteoclast differentiation via regulation of c-Fos, NFATc1 and NF-kappaB. *Experimental cell research* *319*, 436-446.
- Kodama, H., Yamasaki, A., Abe, M., Niida, S., Hakeda, Y. und Kawashima, H. (1993). Transient recruitment of osteoclasts and expression of their function in osteopetrotic (op/op) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *8*, 45-50.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* *89*, 755-764.
- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. und Jentsch, T.J. (2001). Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* *104*, 205-215.
- Kuipers, F., Jong, M.C., Lin, Y., Eck, M., Havinga, R., Bloks, V., Verkade, H.J., Hofker, M.H., Moshage, H., Berkel, T.J., *et al.* (1997). Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. *The Journal of clinical investigation* *100*, 2915-2922.
- Kwon, O.H., Lee, C.K., Lee, Y.I., Paik, S.G. und Lee, H.J. (2005). The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochemical and biophysical research communications* *335*, 437-446.
- Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P.J., Grewal, T., Beisiegel, U. und Heeren, J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* *204*, 105-111.
- Landis, W.J. und Silver, F.H. (2009). Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells, tissues, organs* *189*, 20-24.
- Lee, H.W., Kim, S.Y., Kim, A.Y., Lee, E.J., Choi, J.Y. und Kim, J.B. (2009). Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *27*, 2254-2262.

- Lee, M.H., Kim, Y.J., Kim, H.J., Park, H.D., Kang, A.R., Kyung, H.M., Sung, J.H., Wozney, J.M., Kim, H.J. und Ryoo, H.M. (2003). BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *The Journal of biological chemistry* 278, 34387-34394.
- Lee, N.K. und Karsenty, G. (2008). Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19, 161-166.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., *et al.* (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
- Lee, S.K. und Lorenzo, J.A. (1999). Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140, 3552-3561.
- Long, F. (2012). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 27-38.
- Lorget, F., Kamel, S., Mentaverri, R., Wattel, A., Naassila, M., Maamer, M. und Brazier, M. (2000). High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 268, 899-903.
- Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, I., Lawrence, D.A. und Strickland, D.K. (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *The Journal of biological chemistry* 277, 15499-15506.
- Luo, X.H., Guo, L.J., Xie, H., Yuan, L.Q., Wu, X.P., Zhou, H.D. und Liao, E.Y. (2006). Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21, 1648-1656.
- Manolagas, S.C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews* 31, 266-300.
- Manolagas, S.C. (2014). Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas* 78, 233-237.
- Martin, A., Liu, S., David, V., Li, H., Karydis, A., Feng, J.Q. und Quarles, L.D. (2011). Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 2551-2562.
- Meredith, M.J. (1988). Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. *Cell biology and toxicology* 4, 405-425.
- Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L.A., Laatsch, A. und Heeren, J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 280, 21553-21560.
- Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J.D. und Hurley, M.M. (2000). Disruption of the fibroblast growth factor-

- 2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *The Journal of clinical investigation* *105*, 1085-1093.
- Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T. und Sodek, J. (1991). Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *The Biochemical journal* *274 (Pt 2)*, 513-520.
- Nakasaki, M., Yoshioka, K., Miyamoto, Y., Sasaki, T., Yoshikawa, H. und Itoh, K. (2008). IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone* *43*, 869-879.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17-29.
- Nampei, A., Hashimoto, J., Hayashida, K., Tsuboi, H., Shi, K., Tsuji, I., Miyashita, H., Yamada, T., Matsukawa, N., Matsumoto, M., *et al.* (2004). Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *Journal of bone and mineral metabolism* *22*, 176-184.
- Napoli, N., Pedone, C., Pozzilli, P., Lauretani, F., Ferrucci, L. und Incalzi, R.A. (2010). Adiponectin and bone mass density: The InCHIANTI study. *Bone* *47*, 1001-1005.
- Newman, P., Bonello, F., Wierzbicki, A.S., Lumb, P., Savidge, G.F. und Shearer, M.J. (2002). The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *17*, 426-433.
- Newman, T.C., Dawson, P.A., Rudel, L.L. und Williams, D.L. (1985). Quantitation of apolipoprotein E mRNA in the liver and peripheral tissues of nonhuman primates. *The Journal of biological chemistry* *260*, 2452-2457.
- Niemeier, A., Kassem, M., Toedter, K., Wendt, D., Ruether, W., Beisiegel, U. und Heeren, J. (2005). Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *20*, 283-293.
- Niemeier, A., Niedzielska, D., Secer, R., Schilling, A., Merkel, M., Enrich, C., Rensen, P.C. und Heeren, J. (2008). Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. *Bone* *43*, 230-237.
- Niemeier, A., Schinke, T., Heeren, J. und Amling, M. (2012). The role of apolipoprotein E in bone metabolism. *Bone* *50*, 518-524.
- Nikolov, I.G., Joki, N., Nguyen-Khoa, T., Ivanovski, O., Phan, O., Lacour, B., Druke, T.B., Massy, Z.A., Dos Reis, L.M., Jorgetti, V., *et al.* (2010). Chronic kidney disease bone and mineral disorder (CKD-MBD) in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal failure. *Bone* *47*, 156-163.
- Novack, D.V. und Teitelbaum, S.L. (2008). The osteoclast: friend or foe? *Annual review of pathology* *3*, 457-484.
- Oldberg, A., Franzen, A. und Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *83*, 8819-8823.

- Oshima, K., Nampei, A., Matsuda, M., Iwaki, M., Fukuhara, A., Hashimoto, J., Yoshikawa, H. und Shimomura, I. (2005). Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 520-526.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., *et al.* (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796-809.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J.J., Khosla, S. und Oursler, M.J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20764-20769.
- Peng, X.D., Xie, H., Zhao, Q., Wu, X.P., Sun, Z.Q. und Liao, E.Y. (2008). Relationships between serum adiponectin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese men. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 387, 31-35.
- Peter, I., Crosier, M.D., Yoshida, M., Booth, S.L., Cupples, L.A., Dawson-Hughes, B., Karasik, D., Kiel, D.P., Ordovas, J.M. und Trikalinos, T.A. (2011). Associations of APOE gene polymorphisms with bone mineral density and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22, 1199-1209.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M. und Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4471-4475.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M. und Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Posner, A.S. (1985). The mineral of bone. *Clinical orthopaedics and related research*, 87-99.
- Rall, S.C., Jr., Weisgraber, K.H. und Mahley, R.W. (1982). Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* 257, 4171-4178.
- Rauch, A., Seitz, S., Baschant, U., Schilling, A.F., Illing, A., Stride, B., Kirilov, M., Mandic, V., Takacz, A., Schmidt-Ullrich, R., *et al.* (2010). Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell metabolism* 11, 517-531.
- Recker, R., Lappe, J., Davies, K.M. und Heaney, R. (2004). Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, 1628-1633.
- Redgrave, T.G. und Small, D.M. (1979). Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *The Journal of clinical investigation* 64, 162-171.
- Riggs, B.L., Melton, L.J., Robb, R.A., Camp, J.J., Atkinson, E.J., McDaniel, L., Amin, S., Rouleau, P.A. und Khosla, S. (2008). A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young

- adult women and men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 23, 205-214.
- Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldrige, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E., *et al.* (2008). Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of biological chemistry* 283, 5866-5875.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E. und Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *The Journal of clinical investigation* 101, 689-695.
- Sabesin, S.M. und Frase, S. (1977). Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *Journal of lipid research* 18, 496-511.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P. und von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13453-13458.
- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K. und Vaananen, H.K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science (New York, NY)* 276, 270-273.
- Schilling, A.F., Schinke, T., Munch, C., Gebauer, M., Niemeier, A., Priemel, M., Streichert, T., Rueger, J.M. und Amling, M. (2005). Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20, 274-282.
- Schneider, W.J., Kovanen, P.T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Utermann, G., Weber, W., Havel, R.J., Kotite, L., Kane, J.P., Innerarity, T.L., *et al.* (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *The Journal of clinical investigation* 68, 1075-1085.
- Setälä, N.L., Holopainen, J.M., Metso, J., Wiedmer, S.K., Yohannes, G., Kinnunen, P.K., Ehnholm, C. und Jauhiainen, M. (2007). Interfacial and lipid transfer properties of human phospholipid transfer protein: implications for the transfer mechanism of phospholipids. *Biochemistry* 46, 1312-1319.
- Shea, T.B., Rogers, E., Ashline, D., Ortiz, D. und Sheu, M.S. (2002). Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free radical biology & medicine* 33, 1115-1120.
- Shinoda, Y., Yamaguchi, M., Ogata, N., Akune, T., Kubota, N., Yamauchi, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., *et al.* (2006). Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *Journal of cellular biochemistry* 99, 196-208.
- Sitara, D., Kim, S., Razzaque, M.S., Bergwitz, C., Taguchi, T., Schuler, C., Erben, R.G. und Lanske, B. (2008). Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS genetics* 4, e1000154.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. und McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13, 2072-2086.

- Stengard, J.H., Zerba, K.E., Pekkanen, J., Ehnholm, C., Nissinen, A. und Sing, C.F. (1995). Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* *91*, 265-269.
- Steppan, C.M., Crawford, D.T., Chidsey-Frink, K.L., Ke, H. und Swick, A.G. (2000). Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory peptides* *92*, 73-78.
- Surgi, B.S., Targ, M.E. und Robinson, D.S. (1978). The degradation of very low density lipoprotein by the extrahepatic tissues of the rat. *Biochimica et biophysica acta* *529*, 331-341.
- Takahashi, N., Udagawa, N. und Suda, T. (1999). A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochemical and biophysical research communications* *256*, 449-455.
- Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Jones, S.J., Boyde, A. und Suda, T. (1988). Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* *122*, 1373-1382.
- Takayama, Y., May, P., Anderson, R.G. und Herz, J. (2005). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). *The Journal of biological chemistry* *280*, 18504-18510.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., *et al.* (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell* *3*, 889-901.
- Takeda, S., Elefteriou, F., Lévassieur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P. und Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* *111*, 305-317.
- Tam, C.S., Heersche, J.N., Murray, T.M. und Parsons, J.A. (1982). Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* *110*, 506-512.
- Tan, S.D., de Vries, T.J., Kuijpers-Jagtman, A.M., Semeins, C.M., Everts, V. und Klein-Nulend, J. (2007). Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone* *41*, 745-751.
- Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T.R., Peng, X., Hu, J., *et al.* (2009). TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature medicine* *15*, 757-765.
- Tarnus, E., Wassef, H., Carmel, J.F., Rondeau, P., Roche, M., Davignon, J., Bernier, L. und Bourdon, E. (2009). Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS letters* *583*, 2042-2048.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. und Ikeda, K. (2007). Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism* *5*, 464-475.
- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M.D., Burguera, B. und Riggs, B.L. (1999). Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* *140*, 1630-1638.

- Tokunaga, A., Oya, T., Ishii, Y., Motomura, H., Nakamura, C., Ishizawa, S., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Umezawa, A., Kanamori, M., *et al.* (2008). PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *23*, 1519-1528.
- Tondravi, M.M., McKercher, S.R., Anderson, K., Erdmann, J.M., Quiroz, M., Maki, R. und Teitelbaum, S.L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* *386*, 81-84.
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N. und Komori, T. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *16*, 2017-2026.
- Tremollieres, F. und Ribot, C. (2010). Bone mineral density and prediction of non-osteoporotic disease. *Maturitas* *65*, 348-351.
- Tu, A.Y., Nishida, H.I. und Nishida, T. (1993). High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *The Journal of biological chemistry* *268*, 23098-23105.
- Tu, X., Rhee, Y., Condon, K.W., Bivi, N., Allen, M.R., Dwyer, D., Stolina, M., Turner, C.H., Robling, A.G., Plotkin, L.I., *et al.* (2012). Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* *50*, 209-217.
- Tysiewicz-Dudek, M., Pietraszkiewicz, F. und Drozdowska, B. (2008). Alzheimer's disease and osteoporosis: common risk factors or one condition predisposing to the other? *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* *10*, 315-323.
- Ubaidus, S., Li, M., Sultana, S., de Freitas, P.H., Oda, K., Maeda, T., Takagi, R. und Amizuka, N. (2009). FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *Journal of electron microscopy* *58*, 381-392.
- Utermann, G., Kindermann, I., Kaffarnik, H. und Steinmetz, A. (1984). Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Human genetics* *65*, 232-236.
- Van Eck, M., Herijgers, N., Vidgeon-Hart, M., Pearce, N.J., Hoogerbrugge, P.M., Groot, P.H. und Van Berkel, T.J. (2000). Accelerated atherosclerosis in C57Bl/6 mice transplanted with ApoE-deficient bone marrow. *Atherosclerosis* *150*, 71-80.
- Vezeridis, P.S., Semeins, C.M., Chen, Q. und Klein-Nulend, J. (2006). Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* *348*, 1082-1088.
- Vijayan, V., Khandelwal, M., Manglani, K., Singh, R.R., Gupta, S. und Surolia, A. (2013). Homocysteine alters the osteoprotegerin/RANKL system in the osteoblast to promote bone loss: pivotal role of the redox regulator forkhead O1. *Free radical biology & medicine* *61c*, 72-84.
- Walker, D.G. (1975). Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science (New York, NY)* *190*, 784-785.
- Wang, C.S., Hartsuck, J. und McConathy, W.J. (1992). Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* *1123*, 1-17.
- Wang, N., Rumney, R.M., Yang, L., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Skerry, T.M. und Gartland, A. (2013). The P2Y(13) receptor regulates extracellular ATP metabolism

- and the osteogenic response to mechanical loading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28, 1446-1456.
- Wang, N., Silver, D.L., Costet, P. und Tall, A.R. (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *The Journal of biological chemistry* 275, 33053-33058.
- Watanuki, M., Sakai, A., Sakata, T., Tsurukami, H., Miwa, M., Uchida, Y., Watanabe, K., Ikeda, K. und Nakamura, T. (2002). Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17, 1015-1025.
- Whyte, M.P. und Thakker, R.V. (2013). Rickets and osteomalacia. *Medicine* 41, 594-599.
- Williams, G.A., Callon, K.E., Watson, M., Costa, J.L., Ding, Y., Dickinson, M., Wang, Y., Naot, D., Reid, I.R. und Cornish, J. (2011). Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26, 1698-1709.
- Williams, G.A., Wang, Y., Callon, K.E., Watson, M., Lin, J.M., Lam, J.B., Costa, J.L., Orpe, A., Broom, N., Naot, D., *et al.* (2009). In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. *Endocrinology* 150, 3603-3610.
- Winkler, D.G., Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., *et al.* (2003). Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal* 22, 6267-6276.
- Woo, K.M., Kim, H.M. und Ko, J.S. (2002). Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-X(L). *Experimental & molecular medicine* 34, 340-346.
- Xiao, G., Jiang, D., Ge, C., Zhao, Z., Lai, Y., Boules, H., Phimphilai, M., Yang, X., Karsenty, G. und Franceschi, R.T. (2005). Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *The Journal of biological chemistry* 280, 30689-30696.
- Yagi, M., Ninomiya, K., Fujita, N., Suzuki, T., Iwasaki, R., Morita, K., Hosogane, N., Matsuo, K., Toyama, Y., Suda, T., *et al.* (2007). Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 992-1001.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature medicine* 7, 941-946.
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., *et al.* (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387-398.
- Yoshikawa, Y., Kode, A., Xu, L., Mosialou, I., Silva, B.C., Ferron, M., Clemens, T.L., Economides, A.N. und Kousteni, S. (2011). Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *Journal of*

- bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 26, 2012-2025.
- Young, S.C. und Hui, D.Y. (1999). Pancreatic lipase/colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells. *The Biochemical journal* 339 (Pt 3), 615-620.
- Yu, K., Xu, J., Liu, Z., Sobic, D., Shao, J., Olson, E.N., Towler, D.A. und Ornitz, D.M. (2003). Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development (Cambridge, England)* 130, 3063-3074.
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine* 13, 791-801.
- Zhang, M., Xuan, S., Bouxsein, M.L., von Stechow, D., Akeno, N., Faugere, M.C., Malluche, H., Zhao, G., Rosen, C.J., Efstratiadis, A., *et al.* (2002). Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *The Journal of biological chemistry* 277, 44005-44012.
- Zhang, R., Lu, Y., Ye, L., Yuan, B., Yu, S., Qin, C., Xie, Y., Gao, T., Drezner, M.K., Bonewald, L.F., *et al.* (2011). Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26, 1047-1056.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A. und Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, NY)* 258, 468-471.
- Zhang, S.Q., Zhang, W.Y., Ye, W.Q., Zhang, L.J. und Fan, F. (2014). Apolipoprotein E gene E2/E2 genotype is a genetic risk factor for vertebral fractures in humans: a large-scale study. *International orthopaedics* 38, 1665-1669.
- Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T. und Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell metabolism* 4, 111-121.
- Zilberberg, A., Yaniv, A. und Gazit, A. (2004). The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 17535-17542.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen knochenspezifischen Zelltypen.....	2
Abbildung 2: Transkriptionelle Kontrolle der osteoblastären, chondrozytären, adipozytären und myozytären Differenzierung.	3
Abbildung 3: Mechanismus der Knochenresorption durch aktivierte Osteoklasten.	8
Abbildung 4: Regulation der Skeletthomöostase und der Knochenmasse.	10
Abbildung 5: Exogener und endogener Lipoproteintransport.	15
Abbildung 6: Darstellung der möglichen Amplifikate der <i>ApoE</i> -Ko-PCR.	31
Abbildung 7: Darstellung der möglichen Amplifikate der <i>ApoE_{flox}</i> -PCR.	32
Abbildung 8: Darstellung der möglichen Amplifikate der <i>Runx2-Cre</i> -PCR.....	33
Abbildung 9: Darstellung der möglichen Amplifikate der <i>OC-Cre</i> -PCR.	34
Abbildung 10: Darstellung der möglichen Amplifikate der <i>LysM-Cre</i> -PCR.	36
Abbildung 11: Kreuzungsschema zur Generierung eines konditionellen <i>ApoE</i> -Ko-Mausmodells.....	47
Abbildung 12: <i>ApoE</i> -mRNA-Expression in verschiedenen Geweben der Maus.....	48
Abbildung 13: <i>ApoE</i> -mRNA-Expression in murinen primären Zellen.	49
Abbildung 14: Immunfärbungen von ApoE und Osteocalcin im Knochengewebe und in primären KM-Osteoblasten.	50
Abbildung 15: Induktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression während der Calvaria-Osteoblastendifferenzierung.	51
Abbildung 16: Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären Calvaria-Osteoblasten.....	52
Abbildung 17: Einfluss von ApoE auf die OC-Sekretion von primären Calvaria-Osteoblasten.....	52
Abbildung 18: Reduktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression während der KM-Osteoblastendifferenzierung.....	53
Abbildung 19: Einfluss von ApoE auf die Differenzierung von primären KM-Osteoblasten.....	54

Abbildung 20: Reduktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression im Knochengewebe von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	55
Abbildung 21: Konzentration von ApoE im Serum von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	56
Abbildung 22: Reduktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression in primären <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Knochenzelltypen.....	56
Abbildung 23: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	57
Abbildung 24: Oraler Glukose-Toleranz-Test und oraler Fett-Toleranz-Test von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	58
Abbildung 25: Röntgenaufnahmen der Skelette von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	59
Abbildung 26: Histomorphometrische Analyse von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Lendenwirbelkörpern.....	60
Abbildung 27: Zytometrische und dynamische Parameter von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Lendenwirbelkörpern.....	61
Abbildung 28: Analyse der trabekulären Mikroarchitektur von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Femora.....	62
Abbildung 29: Analyse der kortikalen Knochenmorphologie von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Femora.....	63
Abbildung 30: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	64
Abbildung 31: Analyse von Knochenumbau markern in <i>ApoE^{flox/flox}-Runx2-Cre</i> -Mäusen.....	65
Abbildung 32: Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf das mRNA-Expressionsverhalten von primären Calvaria-Osteoblasten.....	67
Abbildung 33: Einfluss von Osteoblasten-ApoE auf das Differenzierungsverhalten von primären Knochenmark-Osteoblasten.....	68
Abbildung 34: Einfluss von ApoE auf das Expressionsverhalten von primären Chondrozyten.....	69
Abbildung 35: Reduktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression im Knochengewebe von <i>ApoE^{flox/flox}-OC-Cre</i> -Mäusen.....	70
Abbildung 36: Konzentration von ApoE im Serum von <i>ApoE^{flox/flox}-OC-Cre</i> -Mäusen.....	70
Abbildung 37: Reduktion der <i>ApoE</i> -mRNA-Expression in primären <i>ApoE^{flox/flox}-OC-Cre</i> -Knochenzellen.....	71
Abbildung 38: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme von <i>ApoE^{flox/flox}-OC-Cre</i> -Mäusen.....	71

Abbildung 39: Oraler Glucose-Toleranz-Test und oraler Fett-Toleranz-Test von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Mäusen.	72
Abbildung 40: Röntgenaufnahmen der Skelette von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Mäusen.	73
Abbildung 41: Histomorphometrische Analyse von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Lendenwirbelkörpern.	74
Abbildung 42: Zytometrische und dynamische Parameter von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Lendenwirbelkörpern.	75
Abbildung 43: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Mäusen.	76
Abbildung 44: Analyse von Knochenumbaumarkern in <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Mäusen.	77
Abbildung 45: Veränderungen des Expressionsverhaltens von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -Calvaria-Osteoblasten.	78
Abbildung 46: Veränderungen des Differenzierungsverhaltens von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>OC-Cre</i> -KM-Osteoblasten.	79
Abbildung 47: ApoE-Expression im Knochen und Serum von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Mäusen.	81
Abbildung 48: Expressionsanalyse von primären <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Osteoklasten.	81
Abbildung 49: Röntgenaufnahmen der Skelette von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Mäusen.	82
Abbildung 50: Histomorphometrische Analyse von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Lendenwirbelkörpern.	83
Abbildung 51: Analyse der trabekulären Mikroarchitektur von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Femora.	84
Abbildung 52: Analyse der kortikalen Knochenmorphologie von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Femora.	84
Abbildung 53: Untersuchung von Lipidparametern im Serum von <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Mäusen.	85
Abbildung 54: Analyse von Knochenumbaumarkern in weiblichen <i>ApoE</i> ^{flox/flox} - <i>LysM-Cre</i> -Mäusen.	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>ApoE</i> -Knockout-Allels.	31
Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>ApoE_{flox}</i> -Allels.	32
Tabelle 3: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>Rumx2-Cre</i> -Transgens.....	33
Tabelle 4: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>OC-Cre</i> -Transgens.....	34
Tabelle 5: PCR-Bedingungen zur Detektion des <i>LysM-Cre</i> -Transgens.	35
Tabelle 6: Blut- und Urinparameter von männlichen drei Monate alten (Serum, n ≥ 5) und fünf Monate alten (Plasma, n ≥ 6) <i>ApoE^{flox/flox}-Rumx2-Cre</i> -Mäusen.	66

Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	α -Minimum Essential Medium
ABCA1	ATP Binding Cassette A1
<i>Acp5</i>	Acid Phosphatase 5, Tartrate resistant; TRAP
ALP	Alkalische Phosphatase
<i>Apl</i>	Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney
Anti-Anti	Antibiotic-Antimycotic
AP-1	Activator Protein-1
Apo	Apolipoprotein
Arg	Arginin
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
ATP	Adenosintriphosphat
BFR/BS	Bone Formation Rate per Bone Surface
<i>Bglap</i>	Bone Gamma-carboxyglutamate Protein, Osteocalcin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
BV/TV	Bone volume per total volume
C/EBP	CCAAT-Enhancer-binding Protein
Cal.	Calvaria
Calcr	Calcitonin-Rezeptor
CM	Chylomikronen
Col	Kollagen
CR	Chylomikronen-Restpartikel
C_t	Cycle of Threshold
Ct.Ar	Cortical Bone Area
Ct.Th	Cortical Thickness
Ctsk	Cathepsin K
Cys	Cystein
DC-STAMP	Dendritic Cell-specific Transmembrane Protein
Dlx5	Distal-less Homeobox 5
DMP1	Dentin Matrix Protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPD	Desoxypyridinolin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum

FGF	Fibroblast Growth Factor
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-anchored High-density Lipoprotein-binding Protein 1
HA	Hydroxylapatit
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
<i>Ibsp</i>	Integrin-binding Sialoprotein
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
Ihh	Indian Hedgehog
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
Ko	Knockout
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-Rezeptor-related Protein
LysM	Lysozym M
μ CT	μ -Computer-Tomographie
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating Factor
MEF2	Myocyte-enhancer Factor 2
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
Mmp13	Matrix Metallopeptidase 13
MRF	Myogenic Regulatory Factor
MSC	Mesenchymale Stammzelle
Msx2	Msh Homeobox Homologue 2
MTP	Microsomal Triglyceride Transferprotein
N.Ob/B.Pm	Number of Osteoblasts per Bone Perimeter
N.Oc/B.Pm	Number of Osteoclasts per Bone Perimeter
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T Cells c1
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
O.S/BS	Osteoid Surface per Bone Surface
Ob.S/BS	Osteoblast Surface per Bone Surface
OC	Osteocalcin
Oc.S/BS	Osteoclast Surface per Bone Surface
OFTT	Orales Fett-Toleranz-Test
OGTT	Orales Glukose-Toleranz-Test
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix

OV/BV	Osteoid Volume per Bone Volume
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyde
PHEX	Phosphate-regulating Gene with Homologies to Endopeptidases on the X Chromosome
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ
PTH	Parathormon
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROS	Reactive Oxygen Species; reaktive Sauerstoffspezies
Rplp0	Ribosomal Protein, Large, P0
rpm	Rounds per Minute
Runx2	Runt-related Transcription Factor 2
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERMs	Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismen
SOST	Sclerostin
Sox	SRY-box
SR-BI	Scavenger Receptor BI
SRY	Sex Determining Region Y
STAT1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness
Tbp	TATA-box Binding Protein
TGF	Transforming Growth Factor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
<i>Tnfrsf11b</i>	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11B; Osteoprotegerin
<i>Tnfsf11</i>	Tumor Necrosis Factor (Ligand) superfamily, Member 11; RANKL
TRAP	Tartrate-resistant Acid Phosphatase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRL	Triglyceridreiche Lipoproteine
Tt.Ar	Total Cross-sectional Area
vBMD	Volumetric Bone Mineral Density
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wildtyp

Verwendete Gefahrstoffe

Substanz	Gefahrensymbole	H-Sätze	P-Sätze
Alkaline Buffer Solution	GHS07 (Xi)	H315, H319	P305+P351+P338
Antibiotic-Antimycotic	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H315, H317, H319, H334, H335, H361	P304+P340, P304+P341, P305+P351+P338, P312, P332+P313, P337+P313
Benzoylperoxid	GHS01 (E), GHS02 (F), GHS07 (Xi)	H241, H319, H317	P220, P280, P305+P351+P338, P412, P420
Borsäure	GHS08 (Xn)	H360FD	P201, P308+P313
Chloroform	GHS06 (T), GHS08 (Xn)	H351, H361d, H331, H302, H372, H319, H315	P302+P352, P314
Diethylether	GHS02 (F), GHS07 (Xi)	H224, H302, H336	P210, P240, P403+P233
N,N-Dimethylformamid	GHS02 (F), GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H360D, H226, H332, H312, H319	P201, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313
N,N-Dimethyl-p-toluidin	GHS06 (T), GHS08 (Xn)	H331, H311, H301, H373, H412	P261, P273, P280, P301+P310, P311
Dispase	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H315, H319, H334	P305+P351+P338, P337+P313, P332+P313, P261, P304+P341, P285
DPX-Einschlussmittel	GHS02 (F), GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H225, H304, H336, H312+H332, H315, H360Df, H373	P201, P210, P261, P280, P301+P310, P308+P313
EDTA	GHS07 (Xi)	H319	P305+P351+P338
Ethanol	GHS02 (F)	H225	P210
Eukitt-Einschlussmittel	GHS02 (F), GHS07 (Xi)	H226, H312, H315, H332	P280
Formaldehyd	GHS05 (C), GHS06 (T), GHS08 (Xn)	H350, H341, H301, H311, H331, H314, H317	P301+P310, P320, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P361, P405, P501

Hämatoxylin	GHS07 (Xi)	H302, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Ketamin	GHS07 (Xi)	H302, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Kollagenase	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H315, H319, H334, H335	P261, P305+P351+P338, P342+P311
2-Methoxyethylacetat	GHS02 (F), GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H226, H360FD, H302, H312, H332	P201, P241; P302+P352, P303+P361+P353, P405; P501
Methylmethacrylat	GHS02 (F), GHS07 (Xi)	H225, H315, H317, H335	P210, P233, P280, P302+P352, P304+P340, P403+P235
Natriumdodecylsulfat	GHS02 (F), GHS06 (I)	H228, H302; H311, H315, H319, H335	P210, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P309+P310
Natronlauge	GHS05 (C)	H290, H314	P301+P330+P331 P305+P351+P338, P308+P310, P280
Nonylphenolpolyglykolether	GHS05 (C), GHS07 (Xi), GHS09 (N)	H302, H318, H411	P273, P280, P501, P301+P312, P305+P351+P338
Penicillin/Streptomycin	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H315, H320, H317, H334, H335, H361	P304+P340, P312, P305+P351+P338, P337+P313, P303+P361+P353, P332+P313, P264
Pikrinsäure (gesättigt)	GHS02 (F), GHS06 (I)	H228, H301, H311, H332	P210, P280, P301+P310, P312
Rompun	GHS06 (I)	H301	P301+P310
Salpetersäure	GHS03 (O), GHS05 (C)	H272, H314, H290	P260, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309+P310
Salzsäure	GHS05 (C), GHS07 (Xi)	H314; H335, H290	P234; P260; P305+P351+P338, P303+P361+P353, P304+P340, P309+P311, P501

Schwefelsäure	GHS05 (C)	H314, H290	P280, P309+P310, P301+P330+P331, P305+P351+P338,
Silbernitrat	GHS03 (O), GHS05 (C), GHS09 (N)	H272, H314, H410	P273, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309+P310
Triton X-100	GHS05 (C), GHS07 (Xi)	H302, H318	P262, P280, P305+P351+P338, P313
TRIzol	GHS05 (C), GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	H314, H341, H373, H412, H302, H312, H332, H335	P301+P312, P304+P340, P310, P301+P330+P331, P303+P361+P353; P305+P351+P338, P308+P313, P273, P280
Xylol	GHS02 (F), GHS07 (Xi)	H226, H312, H332, H315	P302+P352

Gefahrenhinweise - H-Sätze:

H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H304	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312:	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.

- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H320 Verursacht Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise - P-Sätze:

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P210 Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- P220 Von Kleidung/brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/Lüftungsanlagen/Beleuchtung/... verwenden.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Dampf vermeiden.
- P264 Nach Handhabung Hände gründlich waschen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- P284 Atemschutz tragen.
- P301 Bei Verschlucken:
- P302 Bei Berührung mit der Haut:
- P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- P304 Bei Einatmen:
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:

-
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 Grad C aussetzen.
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P501 Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften.

Danksagung

Zu aller erst geht mein Dank an Andreas Niemeier für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit, für die inspirierenden und motivierenden Gespräche und für das Vertrauen, dass du mir die ganze Zeit entgegen gebracht hast.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Andrea Rentmeister bedanken, dass sie freundlicherweise die Betreuung im Fachbereich Chemie und die Begutachtung meiner Doktorarbeit übernommen hat.

Zudem geht mein Dank an Timo Beil, Till Köhne und Mona Neven für die Einführung in und Hilfe bei den Messungen der Knochenstrukturparameter.

Jörg Heeren, Alex Bartelt und Markus Heine möchte ich dafür danken, dass ihr mir bei Problemen ebenfalls jeder Zeit beratend zur Seite standet und mich immer unterstützt habt. Meinen Mitdoktoranden Kirstin, Clara, Krissi, Denise, Luci, Anna und Nils möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, die schönen Gespräche und die entstandene Freundschaft danken. Bei euch habe ich mich immer zu Hause gefühlt und ihr wart auch in schwierigen Zeiten immer für mich da. In gleichem Maße danke ich meinen ehemaligen Kollegen Leah, Barbara, Karo, Britti und Christian für die schöne gemeinsame Zeit.

Mein ganz besonderer Dank geht zudem an Walter. Es war für mich eine große Freude und Ehre neben und mit dir im Labor zu arbeiten. Ohne deine aufmunternden Worte und tatkräftige Unterstützung wäre ich so manches Mal verzweifelt.

Ebenfalls danke ich Birgit, Evi, Sandra, Marianne und Annette für eure Unterstützung und ständige Bereitschaft bei Problemen zu helfen. Schließlich möchte ich mich noch bei Christine, Dieter, Ludger, Klaus und allen anderen Mitgliedern des IBMZ für die tolle Stimmung, motivierende Arbeitsatmosphäre und allgegenwärtige Hilfsbereitschaft bedanken. Es ist wirklich eine große Freude, Teil dieses Instituts sein zu dürfen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie und ganz besonders Julian, dass ihr mich in jeder Hinsicht immer so großartig unterstützt und mir die Sicherheit gebt, dass ihr immer für mich da seid.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 26. September 2014

Brigitte Margit Müller

Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.