

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Prof. Dr. med. Michael Amling

Untersuchung der osteoanabolen Funktion des Signalmoleküls Wnt1

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lorenz Paul Leopold Ulsamer
aus Würzburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am
21.02.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Thorsten Schinke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
PD Dr. Dr. Johannes Keller

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DAS SKELETTSYSTEM	1
1.2	MECHANISMEN DER KNOCHENENTWICKLUNG	1
1.3	ZUSAMMENSETZUNG DER KNOCHENMATRIX	3
1.4	DIFFERENZIERUNG UND FUNKTION DER KNOCHENZELLEN	4
1.4.1	OSTEOBLASTEN	4
1.4.2	OSTEOZYTEN	5
1.4.3	OSTEOKLASTEN	7
1.4.4	BELEGZELLEN	8
1.5	KNOCHENUMBAU	8
1.6	OSTEOPOROSE	12
1.7	DIE FAMILIE DER WNT-PROTEINE	14
1.8	DIE WNT SIGNALKASKADE	15
1.9	DIE FUNKTIONEN DER WNT-LIGANDEN	18
1.10	AUFGABENSTELLUNG	19
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
2.1	MATERIAL	20
2.1.1	GERÄTE	20
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIAL	21
2.1.3	CHEMIKALIEN	22
2.1.4	KITS	23
2.1.5	ENZYME	23
2.1.6	PRIMER FÜR DIE PCR	24
2.1.6.1	Primersequenzen für die Genotypisierung	24
2.1.6.2	Primer für die qRT-PCR	24
2.1.7	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	24
2.2	METHODEN	27
2.2.1	UNTERSUCHTE MAUSMODELLE	27
2.2.1.1	Osteoblasten-spezifische Wnt1 Überexpression	27
2.2.1.2	Lrp5-Defizienz	28
2.2.1.3	Tierhaltung	28
2.2.2	GENOTYPISIERUNG	28
2.2.3	CALCEIN-MARKIERUNG	30
2.2.4	PRÄPARATION DER MÄUSE	30

2.2.5	RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	31
2.2.5.1	Kontaktradiographie	31
2.2.5.2	Mikro-Computertomographie	31
2.2.6	HISTOLOGIE	31
2.2.6.1	Acrylat-Histologie der Knochen	31
2.2.6.2	Von Kossa/van Gieson-Färbung.....	32
2.2.6.3	Toluidinblau-Färbung.....	32
2.2.7	HISTOMORPHOMETRISCHE ANALYSE	33
2.2.8	RNA ISOLATION AUS ORGANEN	33
2.2.8.1	cDNA-Synthese	34
2.2.8.2	qRT-PCR	34
2.2.9	ZELLKULTUR.....	35
2.2.9.1	Osteoblasten des Schädeldachs	35
2.2.9.2	Osteoblasten des Knochenmarks.....	35
2.2.9.3	Wachstumskurve	36
2.2.9.4	Kolonie-bildende Einheiten	36
2.2.9.5	Bromdesoxyuridin Test.....	36
2.2.9.6	Isolation von Proteinen	37
2.2.9.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.2.10	STATISTISCHE ANALYSE	37
3	ERGEBNISSE	39
3.1	KNOCHENHISTOLOGIE NACH ÜBEREXPRESSION VON WNT1	39
3.1.1	STRUKTURPARAMETER DES TRABEKULÄREN KNOCHENS NACH UNTERSCHIEDLICHEN INDUKTIONSZEITRÄUMEN	39
3.1.2	ANALYSE WEIBLICHER TIERE BEZÜGLICH GESCHLECHTSSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE VON WNT1 AUF DEN KNOCHEN	42
3.1.3	UNTERSUCHUNG DER KNOCHENSTRUKTUR IM μ CT	43
3.1.4	ZELLULÄRE HISTOMORPHOMETRIE NACH ÜBEREXPRESSION VON WNT1	45
3.1.5	ANALYSE DER KNOCHENNEUBILDUNG	46
3.2	EXPRESSIONSPROFIL VON WNT1 IN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEARTEN.....	48
3.3	UNTERSUCHUNGEN DES WNT1 SIGNALWEGES IN VITRO	49
3.3.1	PROLIFERATION TRANSGENER OSTEOLASTEN	49
3.3.2	KOLONIE-BILDENDE EINHEITEN	50
3.4	AUSWIRKUNGEN EINER LRP5-DEFIZIENZ AUF DEN EFFEKT VON WNT1	51

4	<u>DISKUSSION</u>	<u>54</u>
4.1	<u>WNT1-MUTATIONEN IM KNOCHENSTOFFWECHSEL</u>	<u>54</u>
4.2	<u>WNT1-SIGNALÜBERMITTLUNG</u>	<u>57</u>
4.3	<u>WNT1 ALS ANSATZPUNKT EINER OSTEOANABOLEN THERAPIE.....</u>	<u>60</u>
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>64</u>
6	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>66</u>
7	<u>QUELENNACHWEIS</u>	<u>68</u>
8	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>78</u>
9	<u>LEBENS LAUF.....</u>	<u>79</u>
10	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</u>	<u>80</u>

1 Einleitung

1.1 Das Skelettsystem

Knochen sind vitale, gut durchblutete Organe, die sich aus unterschiedlichen Gewebearten zusammensetzen und zahlreiche Funktionen erfüllen. Sie bilden mit Muskeln, Sehnen und Bändern den Bewegungsapparat, eine stabilisierende Einheit, die es erlaubt, die Kontraktion der Skelettmuskulatur in Bewegungen umzusetzen. Die leichte und gleichermaßen widerstandsfähige Knochenstruktur erlaubt dem Menschen den aufrechten Gang und schützt zugleich die empfindlichen und überlebenswichtigen inneren Organe wie das Herz, die Lunge und das zentrale Nervensystem. Durch das Einlagern von Calcium und Phosphat, welches dem Knochen Festigkeit verleiht, wird er zudem zum Reservoir für die Regulation des Elektrolythaushaltes (Sommerfeldt und Rubin, 2001, Tamamura und Yamaguchi, 2012). Darüber hinaus ist das rote Knochenmark, welches sich in den Markräumen vieler größerer Knochen findet, ein zentrales Organ der Blutbildung. Dort beheimatete Vorläuferzellen, die hämatopoetischen Stammzellen sind nach Spezialisierung in der Lage, vielerlei lebenswichtige Funktionen zu erfüllen. So ist deren Differenzierung essentiell für die Sauerstoffversorgung, die Blutgerinnung und die Immunabwehr des Körpers (Smith und Yee, 1992, Birbrair und Frenette, 2016).

1.2 Mechanismen der Knochenentwicklung

Die Neubildung von Knochensubstanz ist ein fortwährender Prozess, beginnend mit der Anlage des Skelettsystems beim Fetus, über die Reifung der Knochenstruktur und das Längenwachstum der Knochen in der Kindheit und Jugend bis hin zur Heilung von Frakturen und dem kontinuierlichen Umbau der Knochensubstanz im Erwachsenenalter. Um den zeitlichen und strukturellen Anforderungen der Knochenformation gerecht zu werden, bestehen verschiedene Wege, Knochensubstanz zu bilden. Die Knochenentwicklung in der Embryonalzeit beginnt zunächst mit einer groben Anlage der späteren Knochenstruktur aus Vorläuferzellen des Knochens und Bindegewebes, den sogenannten mesenchymalen Stammzellen. Darauf aufbauend lassen sich

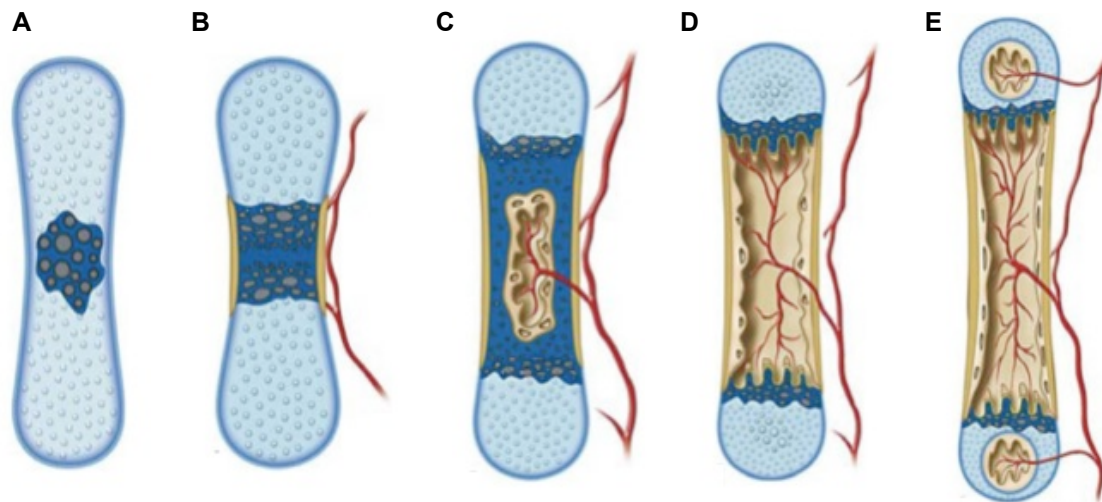


Abbildung 1: Die enchondrale Ossifikation. **A:** Knorpelgerüst mit hypertrophierenden Zellen im Zentrum. **B:** Differenzierung randständiger Mesenchymzellen zu Osteoblasten, welche eine Knochenmanschette bilden. **C:** Durch einsprossende Gefäße eingewanderte Osteoblasten, die ein primäres Ossifikationszentrum bilden. **D:** Expansion der Ossifikation. **E:** Bildung sekundärer Ossifikationszentren an den Epiphysen. Abgrenzung einer dazwischenliegenden Wachstumszone, der späteren Epiphysenfuge (angepasst nach van Dijk, Cobben et al. 2011).

zwei grundlegende Mechanismen der Knochenbildung differenzieren: Vereinzelte, später eher kompakte Knochen, wie Teile des Gesichtsschädels, das Schädeldach und das Schlüsselbein entstehen durch desmale Ossifikation. Hierzu differenzieren die mesenchymalen Stammzellen unmittelbar zu Osteoblasten, welche Inseln der Knochengrundsubstanz bilden, die später durch Anlagerung neuer Schichten spangenartig zu einem Knochengeflecht zusammenwachsen (Bilezikian et al., 2002). Der überwiegende Teil des menschlichen Skeletts entwickelt sich jedoch durch enchondrale Ossifikation (Abbildung 1), bei der zunächst ein Knorpelmodell angelegt wird, welches als Vorlage des späteren Knochens dient. Dies birgt den Vorteil, dass durch die schnelle Knorpelbildung eine vorübergehende Stützfunktion gewährleistet werden kann. Chondrozyten, die ebenfalls aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen, produzieren zunächst Knorpelmatrix, die zum größten Teil aus Kollagen Typ II und wasseranlagernden Proteinen besteht (Mackie et al., 2008). Die Chondrozyten im Bereich der Diaphyse des heranreifenden Knochens hypertrophieren anschließend, stellen ihre Kollagenproduktion auf Kollagen Typ X um, mineralisieren die umliegende Knorpelmatrix und induzieren durch Sekretion des Wachstumsfaktors *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) das Einsprossen von Gefäßen. Mesenchymzellen der äußeren Schicht des

Vorläuferknochens entwickeln sich zu Osteoblasten, welche von außen mit der Anlagerung einer Knochenmanschette an das Knorpelmodell beginnen. Über die Gefäßversorgung wandern Osteoblasten-Vorläuferzellen aus der perichondralen Zone in das Zentrum ein und beginnen nach Differenzierung zu Osteoblasten auch dort mit der Bildung von Knochensubstanz (Colnot et al., 2004). Das Knochengerüst kann nun durch Anlagerung und Hypertrophie von Chondrozyten an den Endpunkten erweitert werden. Eingewanderte Chondroklasten bauen die Knorpelmatrix ab und schaffen Raum für die Bildung von Knochengewebe durch Osteoblasten. Bei der Reifung der Röhrenknochen entstehen neben dem Ossifikationskern der Diaphyse auch an den Knochenenden Ossifikationszentren woraus die späteren Epiphysen entstehen. Zwischen Epi- und Diaphyse bleibt auch nach der Geburt eine unverknöcherte Zone, die Epiphysenfuge. Dort befinden sich Reserven an Stammzellen und Chondrozyten die dem Knochen durch sukzessive enchondrale Ossifikation das Längenwachstum ermöglichen (Karsenty et al., 2009, Mackie et al., 2011).

1.3 Zusammensetzung der Knochenmatrix

Neben Knochenzellen, die einen verhältnismäßig geringen Anteil des Knochenvolumens ausmachen, besteht der ausgereifte Knochen größtenteils aus extrazellulärer Knochenmatrix. Die Grundbausteine dieser Matrix sind zugfeste Typ-I-Kollagenfasern im Verbund mit druckstabilen Hydroxylapatitkristallen, sowie geringere Mengen weiterer Matrixproteine wie Osteopontin und Osteocalcin, welche zur Bindung der Kalksalze beitragen (Young et al., 1992). Im Rahmen der beschriebenen Knochenneubildung und der Frakturheilung entsteht zunächst Geflechtknochen, den ein eher unstrukturiertes Geflecht aus Kollagenfasern durchsetzt. Um den späteren Anforderungen an Belastbarkeit und niedrigem Eigengewicht gerecht zu werden, wird er im Rahmen der Knochenreifung zum größten Teil in Lamellenknochen umgewandelt. Dieser lässt sich strukturell in zwei Bestandteile untergliedern: Im Inneren befinden sich die schwammartig angeordneten Knochentrabekel der *Spongiosa*. Sie setzen sich aus Lamellen einheitlich gestaffelter Kollagenfaserbündel zusammen, welche parallel zur Trabekeloberfläche ausgerichtet sind. Umgeben ist dieser trabekuläre

Knochenanteil von der *Kompakta*, welche sich durch dicht aneinandergelagerte Knochenmatrix und eine Gliederung in die funktionellen Einheiten der *Osteone* kennzeichnet. Im Zentrum eines Osteons verläuft ein Strang von Kapillargefäßen und Nerven im sogenannten *Havers-Kanal*. Dieser ist umschlossen von helikal angeordneten Lamellen aus Kollagenfibrillen. Durch Variation der Verlaufsrichtung dieser helikalen Fasern ergibt sich eine seilartige, belastbare Struktur. Die Havers-Kanäle werden von den *Volkman-Kanälen* als orthogonal verlaufendes Pendant zu einem Netz verknüpft. Diese Hauptversorgungswege werden erweitert durch feinere Knochenkanälchen, welche feine dendritische Ausläufer der stationären Knochenzellen, der *Osteozyten* enthalten. Durch dieses Geflecht wird den Osteozyten eine flächendeckende Kommunikation und Nährstoffversorgung ermöglicht. Die Trabekel der Spongiosa enthalten keine Gefäßkanäle, sodass die dortige Versorgung und endokrine Kommunikation größtenteils auf der Diffusion aus den Knochenmarksgefäßen beruht (Clarke, 2008, Komori, 2013, Reznikov et al., 2014).

1.4 Differenzierung und Funktion der Knochenzellen

1.4.1 Osteoblasten

Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben entwickeln sich Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen. Diese Stammzellen sind darüberhinaus in der Lage, zu einer Vielzahl weiterer spezialisierter Zelltypen, wie Fett- und Muskelzellen heranzureifen (Bassett und Herrmann, 1961). Das Durchlaufen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der osteogenen Differenzierung wird durch mehrere systemische und lokale Signale reguliert. Zum ersten Differenzierungsstadium, der Osteoprogenitorzelle, aus der sich anschließend neben Osteoblasten auch Chondrozyten entwickeln, trägt der Transkriptionsfaktor *RUNX2* (Runt-related transcription factor 2) bei (Nakashima und de Crombrughe, 2003). Die Bedeutsamkeit dieses Schrittes wird beispielweise bei heterozygoten Mutationen von *RUNX2* deutlich, welche im Rahmen des Krankheitsbildes der kleidokranialen Dysplasie schwere Fehlbildungen von Knochen und Zähnen auslösen (Zeng et al., 2017). Die

finale Differenzierung vom Prä-Osteoblasten zum reifen Osteoblasten fördern die Transkriptionsfaktoren ATF4 und Osx. Dysfunktionale Mutationen von *ATF4* führen zu verzögerter Knochenreifung (Yang et al., 2004, Yu et al., 2013). Das Unterbinden der Expression von Osx, einem Runx2 nachgeschalteten Transkriptionsfaktor, führt im Mausmodell zum vollständigen Ausbleiben der Knochenbildung (Nakashima et al., 2002). Neben diesen Faktoren ist auch der Wnt-Signalweg an der Osteoblasten-Differenzierung beteiligt, indem er die Reifung der Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten kontrolliert. So begünstigt beispielsweise eine Inaktivierung von β -Catenin, eines zentralen Faktors des kanonischen Wnt-Signalweges, die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Chondrozyten statt zu Osteoblasten (Day et al., 2005).

Im differenzierten Zustand sind die Osteoblasten in der Lage, Knochenmatrix zu bilden. Dazu lagern sie sich zu einer epithelartigen Schicht zusammen und sezernieren an ihrer apikalen, dem Knochen zugewandten Fläche das Strukturprotein Kollagen Typ I sowie die Proteine Osteopontin und Osteocalcin (Young et al., 1992, Blair et al., 2017). Die Osteoblasten sind dabei durch tight junctions zu einer Barriere verbunden, welche die entstehende Knochenoberfläche von der Umgebung abtrennt. So kann die für die Mineralisierung des Osteoids benötigte Konzentration an Phosphat- und Calciumionen durch Calciumkanäle und membranständige alkalische Phosphatasen bereitgestellt werden. Zudem wird die Reaktion der Ionen zu Hydroxylapatit durch den Abtransport der entstehenden Protonen mittels apikaler Cl^-/H^+ -Antiporter gefördert (Larroure et al., 2015).

1.4.2 Osteozyten

Werden Osteoblasten im Rahmen der Knochenbildung von mineralisierter Matrix umschlossen, können sie sich in eine finale Differenzierungsstufe umwandeln, in der sie als Osteozyten bezeichnet werden. Ihre äußere Morphologie wandelt sich dabei von der kubischen Form der Osteoblasten zu einer dendritischen Form, gekennzeichnet durch einen rundlichen Zellkörper mit großem Nucleus und langen fingerförmigen Ausläufern. Diese Ausläufer sind eingebettet in die beschriebenen Knochenkanälchen und über Schnittstellen,

die sogenannten *gap-junctions* miteinander verknüpft (Bonewald, 2011). Das so entstehende, den Knochen durchziehende Netzwerk dient als Sensor, um Schwankungen der mechanischen Belastung und Defekte der Konchenmatrix zu registrieren und die Knochenstruktur entsprechend anzupassen (Burger und Klein-Nulend, 1998, Xiao und Quarles, 2015). Über ihre Ausläufer sind die Osteozyten sowohl mit den Zellen der Knochenoberfläche als auch mit dem Blutgefäßsystem verbunden. So sind sie trotz Ihrer Ummantelung von Knochenmatrix in der Lage, den Knochenstoffwechsel maßgeblich zu beeinflussen (Bonewald, 2011). Auch wenn über die Regulation der Osteozyten-Differenzierung und -Ummauerung bisher nur wenig bekannt ist, gibt es Hinweise darauf, dass es sich nicht um einen passiven, kontinuierlichen Prozess handelt. So ist beispielsweise die Migration der Osteoblasten als Einleitung der Ummauerung von der ausreichenden Mineralisierung des Knochens abhängig (Robin et al., 2016). Um die charakteristischen Zellausläufer auszubilden, ist die Expression der Protease *membrane-type 1 matrix metalloprotease* (MT1-MMP) zur Spaltung von Kollagen Typ-I erforderlich (Holmbeck et al., 2005).

Neben der Regulation des Knochenumbaus durch den Einfluss auf Osteoblasten und Osteoklasten, auf den in 1.5 eingegangen wird, kann der Osteozyt auch aktiv am Umbau der Knochenmatrix teilnehmen. Die Zelle ist in der Lage in dem flüssigkeitsgefüllten Raum, welcher die Zellkörper und -Ausläufer umgibt, ein saures Milieu zu schaffen und so die Demineralisierung des angrenzenden Knochens einzuleiten. Die freigesetzten organischen Bestandteile wie Kollagen werden anschließend von Enzymen abgebaut. Diese osteozytische Osteolyse wird beispielsweise bei erhöhtem Calcium- und Phosphatbedarf während der Stillzeit beobachtet (Qing et al., 2012). Eine Regulation der Osteolyse durch Osteozyten erfolgt möglicherweise über Vitamin D. So zeigt sich in einer Studie mit Vitamin D-Rezeptor defizienten Mäusen eine Vergrößerung der Lakunen um die Osteozyten (Qing et al., 2012, Rolvien et al., 2017). Daneben gibt es Hinweise auf eine osteoblastische Aktivität der Osteozyten, wie beispielsweise die Mineralisierung des umgebenden Knochens (Zambonin Zallone et al., 1983, Qing et al., 2012). Da die Osteozyten durch ihre Anzahl und ihre Zellausläufer ein verhältnismäßig

großer Anteil der Knochenoberfläche umgibt und sie durch ihre Verbindung mit dem Gefäßsystem für endokrine Signale gut erreichbar sind (Marotti et al., 1995), bietet die bisher wenig erforschte, aktive Teilnahme der Zellen am Knochenstoffwechsel einen interessanten Ansatzpunkt für künftige Studien.

1.4.3 Osteoklasten

Die Vorläuferzellen der Osteoklasten, die hämatopoetischen Stammzellen sind in der Lage, sich zu Subtypen mit unterschiedlichsten Funktionen zu entwickeln. So dienen die kernlosen Erythrozyten dem Sauerstofftransport, die spezialisierungsfähigen B-Lymphozyten der Produktion von Antikörpern und die eigenständig beweglichen Makrophagen der Phagozytose und Präsentation von Antigenen (Birbrair und Frenette, 2016). Die mehrkernigen Osteoklasten entstehen als knochenspezifische Makrophagen durch Fusion mehrerer einkerniger Zellen aus der Familie der Monozyten (Teitelbaum, 2000). Wichtig hierbei ist unter anderem der systemisch aktive *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), welcher insbesondere die Proliferation und Differenzierung der mononukleären Vorläuferzellen fördert (Aeschlimann und Evans, 2004). Der sowohl durch Osteoblasten als auch durch Osteozyten lokal sezernierte Faktor RANKL (*receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand*), auf den in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden soll, bindet an den Rezeptor RANK auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen und fördert sowohl die Zellfusion als auch die Differenzierung der Vorläuferzellen. Mäuse mit einer Defizienz von RANKL oder M-CSF sind nicht dazu in der Lage, reife Osteoklasten auszubilden, was bereits Tage nach der Geburt schwerste *Osteopetrose* verursacht. Das Krankheitsbild charakterisiert sich durch die abnorme Anhäufung von Knochenmasse mit Verschmälerung der Markräume und die erhöhte Frakturanfälligkeit des Knochens, hervorgerufen durch eine gestörte Mikroarchitektur (Yoshida et al., 1990, Kong et al., 1999).

Die Fähigkeit zur Osteolyse erlangt der Osteoklast durch die Errichtung einer abgeschlossenen Zone zwischen seiner Oberfläche und dem Knochen mit Hilfe eines Adhäsionsapparates, der sogenannten *sealing zone* (Luxenburg et al., 2007). Die angrenzende Oberfläche der Zellmembran ist durch Vorwölbungen vergrößert (*ruffled border*). In dem entstandenen Kompartiment

kann der Osteoklast den pH-Wert durch Sezernierung von Salzsäure über Chloridkanäle und Protonen-Pumpen auf 4,5 senken, wodurch die mineralischen Knochenanteile gelöst werden (Vaananen et al., 2000). Durch ebenfalls sezernierte, proteolytisch aktive Enzyme, wie Cathepsin K und Metalloproteasen werden die freigelegten organischen Knochenanteile abgebaut. Die organischen Fragmente sowie das gelöste Kalzium und Phosphat werden nach Aufnahme in den Osteoklasten dem Stoffwechsel zugeführt (Nesbitt und Horton, 1997, Teitelbaum, 2000).

1.4.4 Belegzellen

Neben der Umwandlung zum Osteozyten und der Apoptose sind die Zellen der Osteoblasten-Linie in der Lage zu Belegzellen zu differenzieren. Diese umhüllen als epithelartige Schicht die nicht im Umbau befindlichen Anteile der Knochenmatrix (Miller et al., 1989). Auch wenn die Funktion der Belegzellen noch nicht abschließend entschlüsselt wurde, sprechen neuere Erkenntnisse dafür, dass auch diese Zellen einen wichtigen Beitrag zu einem intakten Knochenstoffwechsel leisten. So konnte nachgewiesen werden, dass Belegzellen in der Lage sind, sich wieder in aktive Osteoblasten umzuwandeln, um dem Knochen neben den mesenchymalen Stammzellen als Reservoir z.B. in Phasen eines erhöhten Osteoblasten-Bedarfs zu dienen (Matic et al., 2016).

1.5 Knochenumbau

Neben den Phasen des Wachstums findet auch nach Schluss der Wachstumsfugen ein lebenslanger Umbau des Knochens statt. Dies birgt den Vorteil, die optimal auf die gegebene Belastung ausgerichteten Trabekel einer Veränderung der Belastungssituation anpassen zu können. Deutlich ist dieser Effekt beispielsweise bei Sportlern, wie Tennis- oder Squashspielern zu beobachten, welche eine dominante Extremität besonders beanspruchen. Hier kann auch bei Beginn der Sportart im Erwachsenenalter ein Zuwachs in der Knochendichte der beanspruchten Extremität beobachtet werden (Kannus et al., 1995, Kontulainen et al., 2003). Einer anhaltend verringerten Belastung kann die Knochenstruktur ebenfalls angepasst werden. Beispiel hierfür ist der

Knochenschwund in postoperativ länger nicht belastbaren Extremitäten oder bei krankheitsbedingter Bettlägrigkeit (Leblanc et al., 1990, Bauman et al., 1999). In gesunden Menschen ist der Mechanismus beispielsweise nach Raumfahrtmissionen zu beobachten, nach denen aufgrund der fehlenden Gravitation bei mangelnder gezielter Aktivität schnell ein Rückgang der Knochensubstanz beobachtet werden kann (Orwoll et al., 2013).

Durch die ständige Krafteinwirkung entstehen trotz der vorgestellten Eigenschaften auch im gesunden Knochen mikroskopisch feine Risse, welche den Knochen in ihrer Summe für Frakturen anfällig machen können. Um die Widerstandsfähigkeit des Knochens langfristig zu erhalten, muss das Knochengewebe somit fortwährend erneuert werden. Durch die Mikrorisse kann es im Netzwerk der Osteozyten zur Apoptose einzelner Zellen kommen. Hierdurch werden Signalstoffe ausgeschüttet, um Zellen zum lokalen Knochenumbau und somit zur Reparatur des beschädigten Knochenareals zu rekrutieren (Verborgt et al., 2000, Cardoso et al., 2009).

Zum Knochenumbau schließen sich Osteoblasten und Osteoklasten zu Zellverbänden zusammen, welche als *basic multicellular units* (BMU) bezeichnet werden. Koordiniert in diesen Einheiten legen Osteoklasten Resorptionskanäle in der Kompakta bzw. Lakunen in der Spongiosa frei, die von nachfolgenden Osteoblasten mit neuer Knochenmasse aufgefüllt werden (Martin, 1994). Die Aktivität und Anzahl dieser Zellen bedarf einer präzisen Kontrolle, um die Gesamtbilanz an Knochenaufbau und -Abbau langfristig im Gleichgewicht zu halten. Die Koordination findet sowohl durch zentrale endokrine, als auch durch lokale parakrine Signalwege statt, deren wichtigste in Abbildung 2 dargestellt sind (Pogoda et al., 2005). Ein wichtiger endokriner Regulator ist das von der Nebenschilddrüse ausgeschüttete Parathormon (PTH), welches über unterschiedliche Mechanismen den Blutcalciumspiegel steuert. So fördert es zum einen die Rückresorption von Calcium aus der Niere und zusätzlich indirekt - über die Stimulation der Bildung des Hormons Calcitriol - die enterale Calciumresorption. Zum anderen regt es die Osteoblasten zu einer vermehrten Ausschüttung des Hormons RANKL an, welches neben dem bereits erwähnten, positiven Einfluss auf die Proliferation der Osteoklasten deren Aktivität stimuliert.

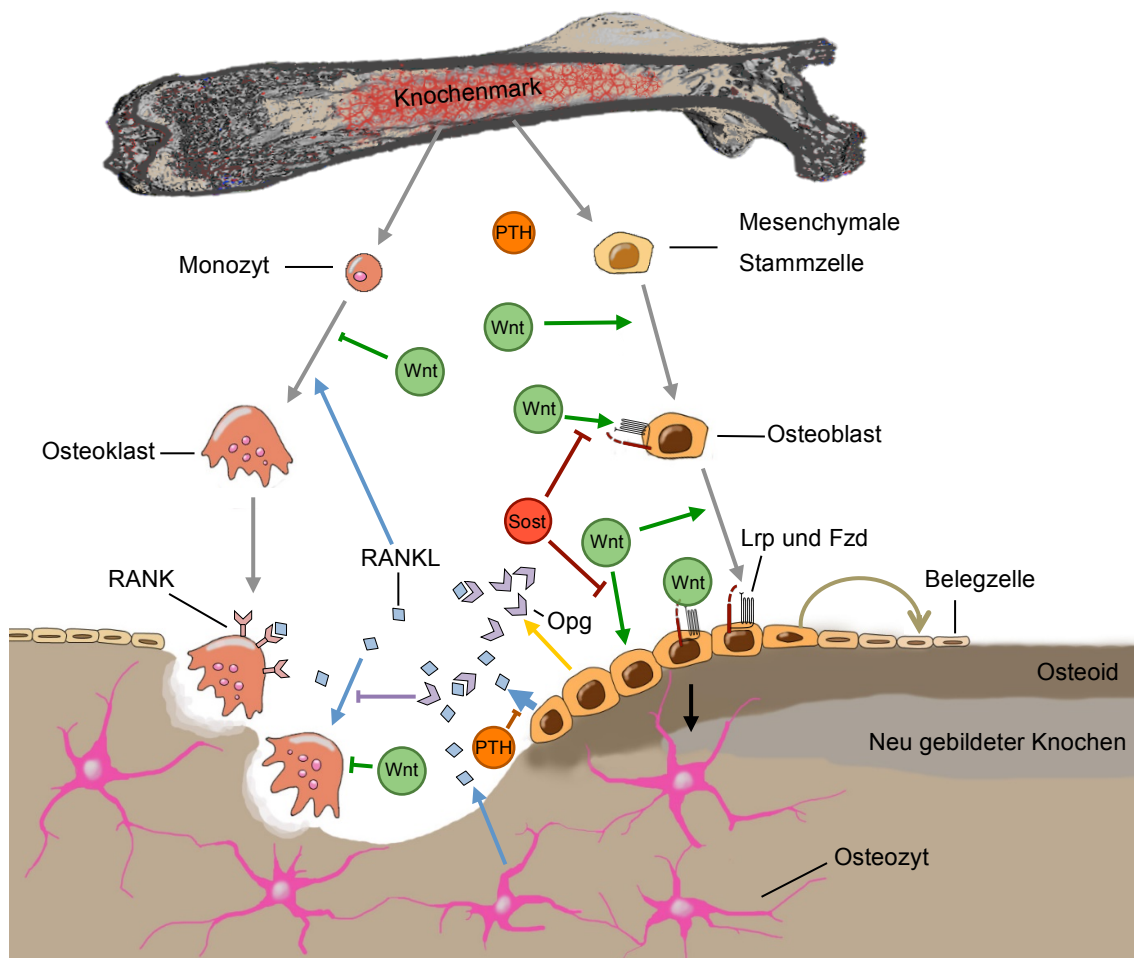


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Knochenbaus. Dargestellt sind die wichtigsten Zelllinien und Signalwege des Knochenbaus. Aus Stammzellen des Knochenmarks entspringen sowohl die Monozyten als auch die mesenchymalen Stammzellen als Vorläufer der Osteoklasten als auch die mesenchymalen Stammzellen als Vorläufer der Osteoblasten. Die Osteoklasten legen Resorptionslakunen frei, welche dann von den Osteoblasten mit neuer Knochenmatrix aufgefüllt werden. In diesem Zuge können Osteoblasten durch Matrix umschlossen werden und sich zu den stationären Osteozyten umwandeln, welche miteinander zu einem Netzwerk verknüpft sind und den Knochenstoffwechsel regulieren. Daneben ist eine Umwandlung der Osteoblasten zu an der Oberfläche verbleibenden Belegzellen möglich. RANKL fördert die Resorption durch Bindung an den Osteoklasten über seinen Rezeptor RANK. Opg neutralisiert RANKL durch Bindung. Wnt bindet an die Lrp- und Fzd-Rezeptoren der Osteoblasten und fördert den Knochenaufbau. Die Bindung von Wnt an Lrp wird durch Sost blockiert, welches so indirekt den Knochenaufbau schwächt. Das endokrine PTH vermindert die Ausschüttung von RANKL durch die Osteoblasten.

Der hierdurch gesteigerte Abbau von Knochenmatrix ist eine weitere Möglichkeit von RANKL die Calciumfreisetzung in den Blutkreislauf zu steigern. Die Feinregulation des Systems erfolgt über den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin (OPG), welcher ebenfalls von Osteoklasten und Osteozyten exprimiert wird und RANKL durch dessen Bindung inaktiviert (Nakashima et al., 2011, Xiong et al., 2015).

Das Hormon Calcitonin wird beim Menschen in den C-Zellen der Schilddrüse produziert. Das strukturell ähnliche Lachs-Calcitonin wird als anti-resorptives Medikament eingesetzt, da es in pharmazeutischer Dosierung den Blutcalciumspiegel senkt, indem es die Aktivität der Osteoklasten hemmt (Inzerillo et al., 2004). In seiner physiologischen Rolle koppelt Calcitonin Osteoklasten und Osteoblasten, indem es in den Osteoklasten die Ausschüttung des Hormons Sphingosin-1-Phosphat (S1P) hemmt. S1P vermittelt die Rekrutierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zum Ort des Knochenumbaus und fördert das Überleben der Osteoblasten. Calcitonin schwächt folglich in physiologischen Konzentrationen indirekt über eine verringerte Ausschüttung von S1P die Knochenformation (Pederson et al., 2008, Keller et al., 2014, Meshcheryakova et al., 2017). Ein weiterer wichtiger endokriner Regulator ist das Hormon Östrogen, welches durch unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise durch Inhibierung des vorgestellten Osteoklasten-Differenzierungsfaktors M-CSF die Knochenresorption mindert (Pacifici, 1996, Riggs, 2000).

An der lokalen Regulation des Knochenumbaus sind mehrere Liganden aus der Wnt-Familie, der Wnt-Co-Rezeptor Lrp5 und dessen Inhibitor Sclerostin (SOST) beteiligt. Inaktivierende Mutationen von *LRP5* führen im Menschen zu Osteoporose führen, während aktivierende *LRP5*-Mutationen eine gesteigerte Knochenbildung bedingen (Brunkow et al., 2001, Gong et al., 2001). Das hauptsächlich durch die Osteozyten hergestellte SOST unterbindet über die Blockade von Lrp5 die osteoanabole Wirkung der Wnt-Liganden. Eine verminderte Expression von *Sost* und ein folglich vermehrter Knochenaufbau wird beispielsweise bei erhöhter mechanischer Belastung im Mausmodell beobachtet (Robling et al., 2008, Tu et al., 2012). Loss-of-function Mutationen von *SOST* werden im Menschen mit dem Krankheitsbild der Sclerosteose assoziiert, welches sich durch ein abnormes Knochenwachstum charakterisiert. Dadurch kann es zu einer Einengung von Organen, beispielsweise der Hirnnerven mit entsprechenden neurologischen Ausfallserscheinungen kommen (Brunkow et al., 2001). Eine Regulation des SOST-Signals kann wiederum durch PTH erfolgen. So wird eine verminderte Transkription von *Sost*

durch PTH-Gabe in Maus- und Humanexperimenten beobachtet (Keller und Kneissel, 2005, Drake et al., 2010, Wijenayaka et al., 2016).

Ist das Gleichgewicht der Gegenspieler im Knochenumbau durch Fehlregulation auf die Seite der Osteoklasten verlagert, nimmt die Dichte des Knochengewebes ab. Über längere Zeit führt ein derartiger Knochenschwund zur Knochenarmut, der sogenannten *Osteopenie*, welche eine Vorstufe zum Krankheitsbild der Osteoporose darstellt (Unnanuntana et al., 2010). Dem gegenüber stehen bei dauerhafter Verlagerung des Gleichgewichtes zugunsten des Knochenaufbaus Erkrankungen mit pathologisch gesteigerter Knochendichte. Bei unkontrollierter Anhäufung von Knochensubstanz, wie beispielweise bei dem Krankheitsbild der Osteopetrose kann die Steigerung der Knochendichte ebenfalls mit einer erhöhten Frakturanfälligkeit einhergehen (Del Fattore et al., 2008).

1.6 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine Erkrankung des Skeletts, die sich durch einen pathologischen Rückgang der Knochenmasse und eine gestörte Mikroarchitektur des Knochengewebes kennzeichnet, was eine erhöhte Anfälligkeit für Frakturen nach sich zieht. Die Veränderungen betreffen sowohl den kortikalen als auch den trabekulären Knochenanteil. Prädeliktionsstellen für Osteoporose-assoziierte Frakturen sind insbesondere Wirbelkörper, Schenkelhals und distaler Radius, da hier bei Stürzen eine starke Belastung einwirkt (1993, Dobbs et al., 1999).

Die Osteoporose kann abhängig von der Ursache in primäre und sekundäre Subtypen unterteilt werden. Zu den primären Formen zählt die *idiopathische* (ohne erkennbare Ursache) juvenile Osteoporose, die postmenopausale Osteoporose sowie die senile Osteoporose. Als sekundär wird die Osteoporose bezeichnet, wenn ihr eine andere Erkrankung oder bekannte Beeinträchtigung des Stoffwechsels zugrunde liegt. Dazu zählen beispielsweise Störungen des Hormonhaushaltes im Rahmen der Hyperthyreose oder des Hypercortisolismus, Stoffwechselstörungen mit verminderter Calciumaufnahme wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen,

oder den Calciumhaushalt beeinträchtigende Medikamente wie die Glucocorticoide. Ebenfalls als sekundär bezeichnet man die Osteoporose durch Bewegungseinschränkung und somit Minderbelastung des Knochens beispielsweise nach unfallchirurgischen Eingriffen. Auch die Osteoporose aufgrund bestimmter genetischer Veränderungen wird zu den sekundären Formen gezählt (Lin und Lane, 2004).

Die häufigste sekundäre Form ist die postmenopausale Osteoporose, von der nahezu ein Drittel aller Frauen nach der Menopause betroffen sind (Eastell et al., 2016). Sie wird verursacht durch den postmenopausalen Rückgang der körpereigenen Produktion des Hormons Östrogen durch die Ovarien, wodurch der Umsatz an Knochensubstanz und in überwiegendem Anteil die Knochenresorption gesteigert wird. Dies bedingt zunächst einen Rückgang des trabekulären Knochenanteils, sodass in der Frühphase insbesondere die zu großen Teilen aus trabekulärem Knochen bestehenden Wirbelkörper betroffen sind. Im weiteren Verlauf sind, ähnlich zur altersbedingten Osteoporose, kortikaler und trabekulärer Knochen gleichermaßen betroffen. Diese Strukturveränderungen des Knochens sind zunächst asymptomatisch. Die vermehrten Frakturen und die daraus resultierenden Folgeerkrankungen wie beispielsweise Infektionserkrankungen durch Krankenhausaufenthalte, oder der Rückgang der Muskulatur bei längerer Inaktivität führen jedoch insbesondere im Alter zu einer Schwächung der körperlichen Konstitution und erhöhtem Leidensdruck (Cummings et al., 2002).

Zur diagnostischen Sicherung hat sich die Messung der Knochendichte von Lendenwirbelkörpern und Hüftkopf mittels *DEXA (dual energy x-ray absorptiometry)* etabliert. Sie ermöglicht die Ermittlung des Osteoporose-definierenden T-Wertes, der die Relation der gemessenen Knochendichte zum Normwert einer jungen, gesunden Person darstellt und eine Einschätzung des Frakturrisikos erlaubt (Blake und Fogelman, 2007). Eine weniger etablierte Alternative zum Osteoporose-Screening ist die Messung mittels quantitativem Ultraschall, welche ohne Anwendung ionisierender Röntgenstrahlung eine ebenbürtige Prognose des Frakturrisikos liefert (Pisani et al., 2013).

An nichtmedikamentösen und präventiven Maßnahmen ist neben der ausreichenden Zufuhr von Calcium und dem Verzicht auf Nikotin und Alkohol

insbesondere die körperliche Aktivität von großer Bedeutung. So wird durch die mechanischen Reize die Knochenformation angeregt und durch die Schulung der Koordination und des Gleichgewichtssinnes Stürze vermieden und die Frakturgefahr verringert (Body et al., 2011).

1.7 Die Familie der Wnt-Proteine

Die *Wnt1*-Gensequenz rückte zunächst als favorisierte Integrationsstelle des mouse mammary tumor virus (MMTV) im Genom der Maus in das Interesse molekulargenetischer Forschung. Die Integration der viralen DNA im Bereich dieser Sequenz konnte gehäuft in Proben aus Tumorgewebe der Brustdrüsen identifiziert werden. Dies legte nahe, dass die Sequenz eine besondere Relevanz für das abnorme Wachstum dieser Zellen hat (Nusse und Varmus, 1982). Im Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde ein homologes Pendant dieser Gensequenz identifiziert, dessen Expression die Morphogenese der Flügel unterbindet (Rijsewijk et al., 1987). Aus der Bezeichnung der dieser Gensequenz *wingless* und der Bezeichnung der beschriebenen Bindungsstelle von MMTV (engl. integration site, kurz int) setzt sich die Abkürzung für das Gen *Wnt* zusammen (Nusse et al., 1991). Die meisten Vielzeller verfügen über 19 unterschiedliche Wnt-Mitglieder, welche speziesübergreifend weitgehend identisch sind (Willert und Nusse, 2012). Es handelt sich bei den Liganden der Wnt-Familie um Glycoproteine, welche für deren Funktion als Signalstoffe aus der Zelle ausgeschleust werden (Cadigan und Nusse, 1997). Eine Gemeinsamkeit der Wnt-Mitglieder sind in einer bestimmten Abfolge angeordnete Cystein-Reste, welche durch Bildung von Disulfid-Brücken zur Proteinstruktur beitragen. Darüber hinaus besitzen die Mitglieder eine N-terminale Aminosäuresequenz, welche zur Sezernierung aus der Zelle beiträgt (Willert und Nusse, 2012). Im Zuge der posttranslationalen Modifikation werden den Wnt-Proteinen mit Hilfe der Acyltransferase *Porcupine* Palmitinsäuren angehängt. Dieser Schritt ist sowohl wichtig für die Bindung an den Fzd-Rezeptor, als auch für die Interaktion mit dem Transportprotein Wntless (Wls), welches Wnt aus der Zelle ausschleust (Komekado et al., 2007, Proffitt und Virshup, 2012).

1.8 Die Wnt Signalkaskade

Die unterschiedlichen Funktionen der Wnt-Liganden deuten darauf hin, dass mehrere Mechanismen zur Wnt-Signalvermittlung bestehen. Der am ausgiebigsten untersuchte und im Knochenstoffwechsel als vorherrschend angesehene Mechanismus wird als „kanonischer Wnt Signalweg“ bezeichnet (Baron und Kneissel, 2013). Die Signalwirkung wird hier über die intrazelluläre Konzentration des Proteins β -Catenin reguliert (Abbildung 3). Ohne extrazelluläres Wnt-Signal ist fortwährend ein Proteinkomplex bestehend aus den Proteinen Axin, Adenomatous poliposis (APC) sowie den Enzymen Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und Casein kinase 1 (CK1) aktiv, welcher β -Catenin durch Phosphorylierung und Polyubiquitinylierung zum Abbau im Proteasom markiert. Somit bleibt die β -Catenin Konzentration niedrig und der Einfluss des Signalweges auf die Genexpression wird unterdrückt. Zur Aktivierung des kanonischen Signalweges bindet ein Wnt-Ligand an einen Komplex aus einem siebenfachen Transmembran-Rezeptor der Frizzled (Fzd) Gruppe und einem Co-Rezeptor der Low density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) Gruppe. Die Bindung an der Außenseite der Zelle bewirkt eine Konformationsänderung an dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, wodurch das Protein Dishevelled (Dvl) rekrutiert wird. Das somit aktivierte Dvl sorgt für die Dissoziation des Proteinkomplexes und stoppt den Abbau von β -Catenin. So häuft sich β -Catenin in der Zelle an und diffundiert in den Zellkern. Dort dient es als Co-Aktivator der Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf (lymphoid enhancer factor/T cell factor), um so die Expression der Ziel-Gene zu aktivieren (Behrens et al., 1996, Aberle et al., 1997, Davidson et al., 2005, Clevers, 2006). Neben dem kanonischen Wnt-Signalweg gibt es mehrere Signalwege, welche als nicht-kanonisch zusammengefasst werden können. Hierzu zählt der *Wnt-Planar Cell Polarity* (PCP) Signalweg (Abbildung 3 D). Er dient der Ausrichtung von Zellen an einer bestimmten Achse im Gewebe, welche insbesondere in der Organentwicklung von großer Bedeutung ist (Seifert und Mlodzik, 2007). Der Wnt-PCP Signalweg agiert wie der kanonische Wnt-Signalweg über einen Fzd-Rezeptor, wobei hier die Rezeptoren rezeptor-tyrosine-kinase-like-orphan-receptor 2 (ROR2) und rezeptor-like tyrosine kinase (RYK) als Co-Rezeptoren fungieren (Green et al., 2014). Bei Bindung eines Wnt-Liganden wird auch hier

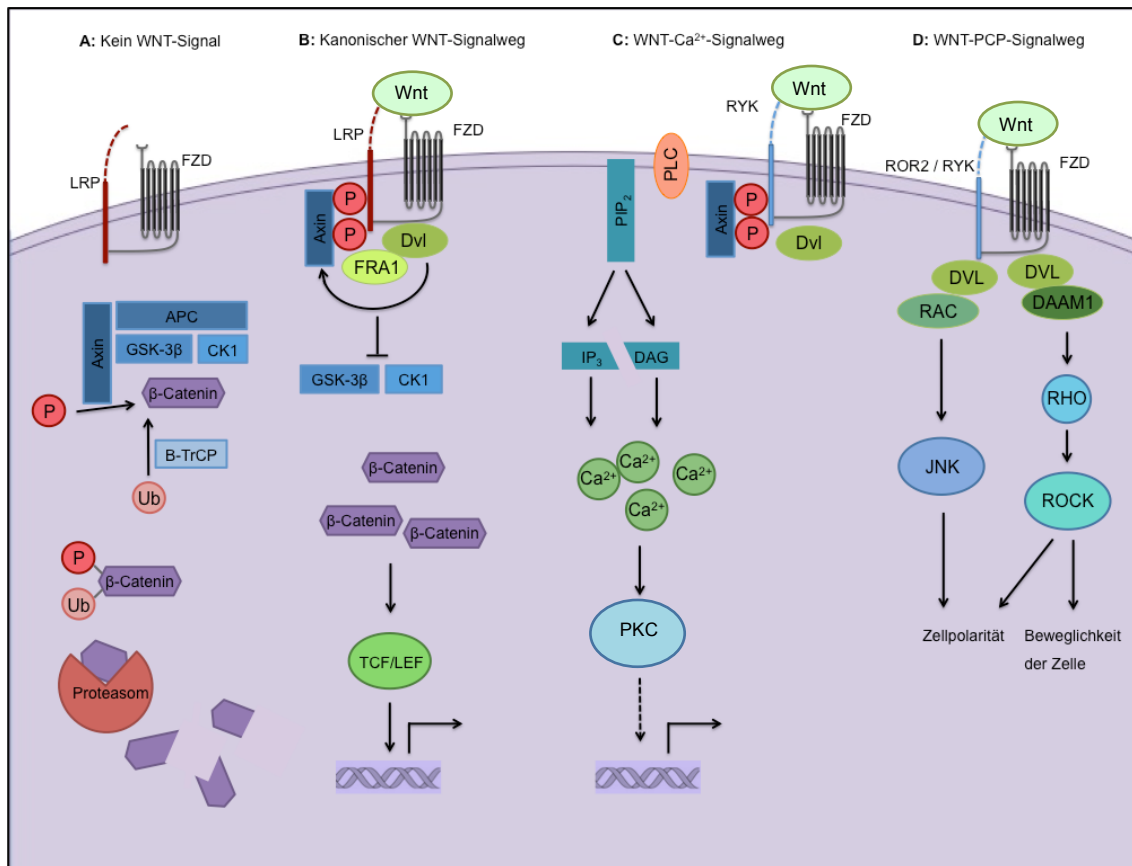


Abbildung 3: Wnt Signaltransduktion. (A) Kein Wnt-Signal: Der Proteinkomplex bestehend aus den Proteinen Axin, APC sowie den Enzymen GSK-3 β und CK1 markiert β -Catenin durch Phosphorylierung und Polyubiquitinylierung zum Abbau im Proteasom und die β -Catenin Konzentration bleibt niedrig (B) Aktivierung des kanonischen Signalweges: Ein Wnt Ligand bindet an einen Komplex aus den Rezeptoren Fzd und Lrp. Dadurch wird Dvl an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors rekrutiert, welches die Dissoziation des Proteinkomplexes einleitet und den Abbau von β -Catenin stoppt. Das sich in der Zelle anhäufende β -Catenin diffundiert in den Zellkern und dient als Co-Aktivatoren der Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf, um die Expression der Ziel-Gene zu aktivieren. (C) Wnt-Ca²⁺-Signalweg: Ein Wnt-Ligand bindet an einen Fzd-Rezeptor und RYK Co-Rezeptor. Durch Rekrutierung von Dvl an den zytoplasmatischen Anteil wird das Enzym PLC aktiviert, welches PIP₂ in die Second-Messenger IP₃ und DAG spaltet. IP₃ aktiviert die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium-Ionen bewirkt wiederum eine Aktivierung verschiedener Calcium-abhängiger Enzyme wie PKC, welche dann über die Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie NF κ B auf die Genexpression Einfluss nehmen. (D) Wnt-Planar Cell Polarity Signalweg: Bindung des Wnt Liganden an einen Fzd-Rezeptor und die Co-Rezeptoren ROR2 und RYK. Nach Rekrutierung von Dvl an den zytoplasmatischen Anteil bildet dieses einen Komplex mit DAAM1 um das G-Protein Rho zu aktivieren. Dieses wiederum aktiviert die Kinase ROCK, welche die Struktur des Zytoskeletts, die Zellpolarität und die Beweglichkeit der Zelle beeinflusst. Alternativ bildet Dvl einen Komplex mit der Kinase RAC zur Aktivierung der Jun-Kinase (JNK), welche ebenfalls auf die Zellpolarität Einfluss nimmt.

durch Konformationsänderungen am zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors Dvl rekrutiert. Dieses bildet nun einen Komplex mit dishevelled associated activator of morphogenesis1 (DAAM1) um das G-Protein Rho zu aktivieren. Rho wiederum aktiviert die Rho-associated kinase (ROCK), welche die Struktur

des Zytoskeletts, die Zellpolarität und die Beweglichkeit der Zelle beeinflusst (Semenov et al., 2007). Ein alternativer Verlauf des WNT-PCP-Signalweges nach der Rekrutierung von Dvl ist die Bildung eines Komplexes mit der Kinase RAC zur Aktivierung der *Jun-Kinase* (JNK), welche ebenfalls auf die Zellpolarität Einfluss nimmt (Boutros et al., 1998). Zu den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen zählt darüber hinaus der Wnt-Ca²⁺-Signalweg. Zu dessen Aktivierung bindet ein Wnt-Ligand ebenfalls an einen Fzd-Rezeptor, wobei es auch hier Hinweise auf die Beteiligung von RYK als Co-Rezeptor gibt (Hutchins et al., 2011). Durch Konformationsänderung des Rezeptors und Rekrutierung von Dvl an den zytoplasmatischen Anteil wird das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert, welches Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat (PIP₂) in die Second-Messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP₃ aktiviert die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium-Ionen bewirkt wiederum eine Aktivierung verschiedener Calcium-abhängiger Enzyme, wie der Proteinkinase C (PKC), welche dann über die Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie NFκB auf die Genexpression Einfluss nehmen (Sheldahl et al., 1999, De, 2011).

Neuere Studien konnten darüberhinaus zeigen, dass einige Wnt-Liganden den Mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalweg über den mTOR-komplex-1 (mTORC1) aktivieren (Inoki et al., 2006, Castilho et al., 2009, Shang et al., 2012, Esen et al., 2013, Chen et al., 2014). Er gilt als wichtiger Regulator der Proliferation, des Wachstums, der Motilität und des Überlebens der Zellen und kann durch das Immunsuppressivum Rapamycin gehemmt werden. (Laplane und Sabatini, 2012). Nach Bindung des Wnt-Liganden an einen Fzd-Rezeptor und Lrp-Co-Rezeptor wird als Signalübermittler die *Glykogensynthase-Kinase 3* (GSK3) diskutiert die auch den kanonischen Wnt-Signalweg einleitet. Bezüglich der Aktivierung oder der Inhibierung von GSK3 zur Weiterleitung des Wnt-Signals divergieren die bisherigen Studienergebnisse (Inoki et al., 2006, Castilho et al., 2009, Shin et al., 2011, Chen et al., 2014). Bei Aktivierung von mTORC1 werden die Proteine 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E - binding protein-1) und S6K1 (protein S6 kinase 1) phosphoryliert und können so die Translation beeinflussen (Laplane und Sabatini, 2012).

1.9 Die Funktionen der Wnt-Liganden

Die Wnt-Liganden sind in Vielzellern als interzelluläre Signalträger in Anlage, Wachstum und Erhalt unterschiedlichster Organe involviert. Gegenüber vielen anderen Wachstumsfaktoren agieren sie dabei in einem beschränkten Wirkungsradius als lokaler Vermittler von Zell-Zell Interaktionen. Neben dem Eingriff in die Genexpression kann der Wnt-Signalweg auch die Ausbildung des Zytoskeletts und des Spindelapparates beeinflussen (Sawa, 2012). Dadurch hat der Wnt-Signalweg Einfluss auf die Zellpolarität und die Zellmigration und kann den entstehenden Geweben durch gerichtete Proliferation eine Form verleihen, was seine Rolle bei der Anlage komplexer Organstrukturen erklärt (Goldstein et al., 2006, Huang und Niehrs, 2014, Loh et al., 2016).

Zahlreiche Studien zu Wnt-Mutationen belegen den Einfluss der Liganden auf Organanlage und Erhaltung. So wurden bei einer homozygoten *Nonsense-Mutation* von *WNT3* beim Menschen das Bild der *Tetraamelie*, der fehlenden Anlage aller vier Gliedmaßen sowie eine fehlerhafte Anlage des Gesichtsschädels und des Urogenitaltraktes beobachtet (Niemann et al., 2004). Wnt4 hat neben der Einflussnahme auf die Anlage von Nieren und Lunge auch Einfluss auf die Ausbildung des Geschlechts wie beispielsweise durch Anlage der Ovarien. So können Mutationen von *Wnt4* in Säugetieren zu einer Umwandlung vom weiblichen zum männlichen Geschlecht führen (Mandel et al., 2008). Daneben ist der Wnt-Signalweg an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt. Wnt5b und Wnt10b regulieren die Differenzierung und Proliferation der Fettzellen (Ross et al., 2000, Christodoulides et al., 2006). Mutationen der Gene beim Menschen werden mit Volkskrankheiten wie Fettleibigkeit und Diabetes in Verbindung gebracht (Kanazawa et al., 2004, Christodoulides et al., 2006). Wnt1 ist insbesondere für seinen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel bekannt. So führen Mutationen von *WNT1* zu Erkrankungen des Knochens wie der Osteogenesis imperfecta oder der Osteoporose, auf die später genauer eingegangen werden soll (Keupp et al., 2013, Laine et al., 2013). Daneben ist Wnt1 bei der Maus und beim Zebrafisch an der Anlage des zentralen Nervensystems beteiligt (McMahon et al., 1992, Ikeya et al., 1997, Lekven et al., 2003). Wnt5a koordiniert ebenfalls die Anlage des Skeletts. Beim Menschen sind Defekte in *WNT5A* mit dem *Robinow*

Syndrom, charakterisiert durch Kleinwuchs, verkürzte Gliedmaßen, kraniofaziale Dysplasie sowie Fehlbildungen der Genitalien verbunden (Person et al., 2010). Wnt16 beeinflusst die Knochendichte und die Dicke der Kortikalis. Bei Mutationen von Wnt16 ist ein Anstieg osteoporotischer Frakturen zu beobachten (Zheng et al., 2012).

1.10 Aufgabenstellung

Die Erkenntnisse der Humangenetik lassen drauf schließen, dass die Signaltransduktion aktiviert durch die Wnt-Familie ein wichtiger Mechanismus ist, um den Knochenstoffwechsel zu regulieren. Insbesondere Mutationen von Wnt1 führen im Menschen zu schweren Beeinträchtigungen des Knochenstoffwechsels. Die Auswirkungen von Mutationen des Wnt Co-Rezeptors Lrp5 auf die Knochenstruktur legen seine Beteiligung an der Übermittlung des Wnt1-Signals im Knochen nahe.

Um den Wnt1-Signalweg als osteoanabole Therapieoption zu evaluieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich durch eine Verstärkung der Wnt1-Signalaktivität im Knochen die Aktivität der Osteoblasten und somit die Knochenbildung steigern lässt. Dazu wurde ein Mausmodell mit Osteoblasten-spezifisch induzierbarer Wnt1-Überexpression auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene analysiert. Darüber hinaus sollte die Relevanz des Lrp5-Rezeptors in diesem Signalweg auch als möglicher Angriffspunkt einer solchen Therapie evaluiert werden. Dazu wurde das Modell mit einem Lrp5-defizientem Mausmodell kombiniert und die Ergebnisse mit denen der reinen Wnt1-Überexpression im Knochen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Analysenwaage (CPA224S)	Sartorius
Autotechnikon (2050)	Bavimed Laborgeräte
CO ₂ /O ₂ Brutschrank (B 6200)	Heraeus
Elektrophorese-Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories
Filmentwickler (Optimax 1170-1-0000)	Protec
Filmscanner (Scanjet G4050)	Hewlett-Packard Company
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiolab
Gel-Dokumentationsanlage (Universal Hood 75S)	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoresekammer (Sub-Cell, SDS/PAGE Mini Protean)	Bio-Rad Laboratories
Homogenisierer (Ultra-Turrax T25)	IKA®-Werke
Inkubationsschüttler (Innova 4000)	New Brunswick Scientific
Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray Sterile)	Faxitron Xray
Leica TCS SP5 II Konfokal-Mikroskop	Leica Camera
Lichtmikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss
Lichtmikroskop (IX50)	Olympus
Mikropipetten (Research Plus)	Eppendorf
Mikroskopkamera (AxioCam)	Carl Zeiss
Mikroskopkamera (DP72)	Olympus
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Versamax)	Molecular Devices
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht
PCR-System (Mastercycler pro S)	Eppendorf
pH Meter	WTW
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	INTEGRA Biosciences
Präzisionswaage (Talent TE2101)	Sartorius
Real-Time PCR System (StepOnePlus)	Applied Biosystems
Röntgen-Mikrocomputertomograf (µCT 40)	Scanco Medical
Rotationsmikrotom (Reichert-Jung Mod.1140/Autocut)	Cambridge Instruments
Schleifgerät (Pheonix Alpha)	Buehler
Sicherheitswerkbank (HS12)	Heraeus
Spektralphotometer (Nanodrop ND1000)	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro)	Biochrom
Spiegelreflexkamera (EOS 10D)	Canon
Thermoblock (Thermomixer Comfort)	Eppendorf

Tischzentrifuge (5415D, 5430R)	Eppendorf
Vortexer (Certomat MV)	B.Braun Biotechnologie International
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Wiegeschüttler (Duomax 1030)	Heidolph Instruments
Zentrifuge (GS-6)	Beckman Coulter

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth
Einweg-Untersuchungshandschuhe	Supermax Healthcare
Filterspitzen	Sarstedt
Flaschenaufsatzfilter	Thermo Fisher Scientific
Gewebekulturschale (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Becton, Dickinson and Co.
Kanülen (0, 60 x 25 mm; 0, 40 x 20 mm)	B. Braun Melsungen
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Brand
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark
qRT-PCR Dichtfolie	Thermo Fisher Scientific
qRT-PCR Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International
Rundbodenröhrchen	Greiner Bio-One International
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton, Dickinson and Co.
Skalpellklingen	C. Bruno Bayha
Spritzen	B. Braun Melsungen
Sterilfilter	Becton, Dickinson and Co.
Zellkulturflaschen (T-25, T-75, T-175)	Sarstedt
Zellkulturschalen (145mm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb (70 µm, 100 µm)	Becton, Dickinson and Co.

2.1.3 Chemikalien

Produkt	Abkürzung	Hersteller
Agarose (SeaKem® LE)		Lonza Group
Albumin Standard (2 mg/ml)	BSA	Thermo Fisher Scientific
Alkalische Phosphatase	ALP	Sigma-Aldrich
Benzoylperoxid	BPO	Merck
Bradford-Reagenz		Bio-Rad-Laboratories
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat		Sigma-Aldrich
DNA-Ladder, GeneRuler™ 1 kb		Thermo Fisher Scientific
dNTP Mix, 10mM Each		Thermo Fisher Scientific
Doxycyclin	Dox	Thermo Fisher Scientific
DPX Eindeckmittel		Sigma-Aldrich
Ethanol		Merck
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Merck
FKS für Obl (Hyclone, RYL35914)		Thermo Fisher Scientific
Formafix 3,5%		Grimm med. Logistik
Formaldehyd (37 % Lösung)		Sigma-Aldrich
Phosphate-Buffered Saline	PBS	Thermo Fisher Scientific
Hämatoxylin		Carl Roth
Isopropanol		Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat		Merck
Kohlendioxid		TMG
L-Ascorbinsäure	ASC	Sigma-Aldrich
Methylmethacrylat	MMA	Merck
Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification		Sigma-Aldrich
Monoglycol-Butylether		Sigma-Aldrich
N,N Dimethyl-p-Toluidin	DMT	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat		Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	NaF	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat		Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Avantor Performance Materials
Penicillin / Streptomycin	Pen /Strep	Thermo Fisher Scientific
Phenol		Carl Roth

Phosphatase-Inhibitor, PhosSTOP		Roche Applied Science
Pikrinsäure		Carl Roth
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat		Carl Roth Sigma-Aldrich
Propan-1,2,3-triol	Glycerin	Merck
Roti®-P/C/I (Phenol/Chlororom DNA Aufreinigungslösung)		Carl Roth
Salpetersäure (65 % Lösung)		Sigma-Aldrich
Salzsäure		Sigma-Aldrich
Säurefuchsin		Merck
Silbernitrat		Merck
Stickstoff		TMG
Toluidinblau O		GE Healthcare
Trichlormethan	Chloroform	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminome-than	Tris Base	Sigma-Aldrich
TRIzol® Reagent		Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA		Invitrogen
β-Glycerolphosphat	β-Gly	Merck
1,4-Dimethylbenzol	p-Xylol	Sigma-Aldrich
10x DreamTaq Green Buffer		Thermo Fisher Scientific
2-Methoxyethylacetat		Sigma-Aldrich

2.1.4 Kits

Produkt	Hersteller
Cell Proliferation Biotrak™ Version 2 ELISA	GE Healthcare
TaqMan-Master Mix	Applied Biosystems
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific
Phire Animal Tissue Direct PCR Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Enzyme

Name	Hersteller
Collagenase Ia from C.histolyticum	Sigma-Aldrich
Dispase II	Roche Applied Science
DNA-DreamTaq-Polymerase aus Thermus aquaticus	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Primer für die PCR

2.1.6.1 Primersequenzen für die Genotypisierung

Gen	Sequenz
ColtTA for rev	5' CTC TGC ACC TTG GTG ATC 3'
	5'GCT GCT TAA TGA GGT CGG 3'
Wnt1 for rev	5'CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG C 3'
	5'TGT CCC TAT CGA AGG ACT CTG G 3'
Lrp5 wt1 wt2 ko1 ko2	5'GGA TGG ACG GAT GGA CAG AAT G3'
	5'TGG AGC CTT TAT GCT AAC CAC AG 3'
	5'CGC TAC CGG TGG ATG TGG AAT GTG T 3'
	5'GCT GCC ACT CAT GGA GCC TTT ATG C 3'

2.1.6.2 Primer für die qRT-PCR

Gen	TaqMan-Sonde
GapdH	4308313
Wnt1	Mm01300555_g1

2.1.7 Lösungen, Puffer und Medien

Acrylat-Gießlösung	0,33 % Benzoylperoxid 11 % Nonylphenyl- polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Acrylat-Infiltrationslösung I	0,33 % Benzoylperoxid ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Acrylat-Infiltrationslösung II	0,33 % Benzoylperoxid 11 % Nonylphenyl- polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Ascorbat-Stammlösung	10 mg/ml L-Ascorbinsäure ad H ₂ O
Biopsie-Lysis-Puffer	100 mM EDTA 50 mM Tris Base 100mM NaCl

	1% SDS ad H ₂ O pH 8,0
Calcein-Lösung	0,15 M NaCl 2% NaHCO ₃ 1% Calcein
Chromalaun-Gelatine	10 % Gelatine 4 % Chromalaun Lösung 60 Stk/l kleine Thymol Kristalle ad H ₂ O
Chromalaun-Lösung	4 % Chromalaun ad H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,2 % DEPC ad H ₂ O
Minimalmedium	35 g/l α-MEM Pulver 2,2 g/l NaHCO ₃ ad H ₂ O pH 7,4
Natriumthiosulfatlösung	5 % Natriumthiosulfat ad H ₂ O
Osteoblastenmedium	10 % FKS 100 U/l Penicilin / Streptomycin ad Minimalmedium
Osteoblasten- Differenzierungsmedium	50 µg/ml Ascorbinsäure 10 mM β-Glycerophosphat ad Osteoblastenmedium
Proteinase-K-Stammlösung	10 mg/ml Proteinase K ad H ₂ O
PBS-Puffer	10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 137 mM NaCl 2 mM Kaliumhydrogenphosphat ad H ₂ O

	pH 7,4
RIPA-Puffer	1% NP-40 1% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 150 mM NaCl 2 mM EDTA 10 mM Natriumphosphat ad H ₂ O pH 7,4
Sodaformollösung	473 mM Natriumcarbonat 24,8% Formaldehydlösung ad H ₂ O
Strecklösung	80 % Isopropanol 1 Tropfen/l Monoglykol-Butylether ad H ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris Base 1 mM EDTA ad H ₂ O pH 8,0
Toluidin-Färbelösung	32,7 mM Toluidinblau O ad H ₂ O pH 4,5
Van Gieson-Färbelösung	4,27 mM Säurefuchsin 10 % Glycerin 0,5 % 65 % Salpetersäure ad gesättigte Pikrinsäure
Von Kossa-Färbelösung	194 mM Silbernitrat ad H ₂ O
β-Glycerophosphat-Stammlösung	2 M β-Glycerophosphat ad H ₂ O

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchte Mausmodelle

2.2.1.1 Osteblasten-spezifische *Wnt1* Überexpression

Zur genauen Charakterisierung der Funktionsweise und des Effekts von *Wnt1* auf den Knochenstoffwechsel war es von Interesse, eine deutlich gesteigerte Expression des Ziel-Gens im Knochengewebe zu erreichen. Darüberhinaus war die Untersuchung des Effekts auf unterschiedliche Wachstumsstadien von Interesse. Beides gelang durch das im Folgenden vorgestellte Modell, welches auf dem sogenannten TetOff-System beruht (Abbildung 4). Die in den

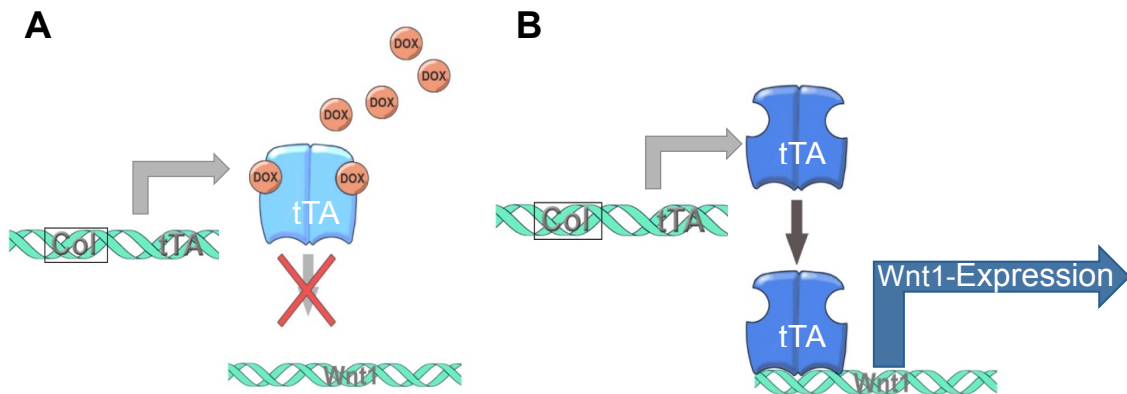


Abbildung 4: Tet-Off System zur Regulation der *Wnt1*-Expression: Unter Kontrolle des osteblasten-spezifischen Kollagen Promotors (Col) wird der Tetrazyklin-Repressor tTA (tetracycline transactivator) exprimiert. Er reguliert die Expression des zweiten Transgens, der kodierenden Sequenz von *Wnt1*. Liegen bei einem Tier beide Sequenzen vor, wird durch doxycyclinhaltiges Futter die Expression unterdrückt (A) bis das gewünschte Alter erreicht ist. Dann kann durch Absetzen des Doxycyclins die Expression von *Wnt1* stattfinden (B).

folgenden Analysen als *Transgen* bezeichneten Tiere weisen zwei zur *Wnt1*-Überexpression erforderliche Gensequenzen auf. Die erste Sequenz wird Osteblasten-spezifisch exprimiert und kodiert für einen Tetrazyklin-regulierbaren transkriptionellen Transaktivator, der sich durch Gabe von Doxycyclin inaktivieren lässt. Er reguliert die Expression des zweiten Transgens, der kodierenden Sequenz von *Wnt1*. Liegen bei einem Tier folglich beide Sequenzen vor, wird durch doxycyclinhaltiges Futter die Expression unterdrückt, bis das gewünschte Alter erreicht ist und die Expression von *Wnt1* durch Absetzen des Doxycyclins initiiert werden kann. Die Expression von *Wnt1* in

vitro konnte durch Zusetzen von Doxycyclin zum Zellkultur-Medium inhibiert und durch Absetzen aus dem Medium induziert werden.

2.2.1.2 Lrp5-Defizienz

Um darüber hinaus den Einfluss des potentiellen Wnt Co-Rezeptors Lrp5 auf den Effekt der gesteigerten *Wnt1*-Expression zu untersuchen, wurde das zuvor vorgestellte Modell mit einer globalen Lrp5-Deletion kombiniert. Die Tiere im Fokus dieser Untersuchungen wiesen somit drei Transgene auf, wobei zum Vergleich des reinen Effektes der globalen Lrp5-Deletion diese auch separat untersucht wurde.

2.2.1.3 Tierhaltung

Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in einem 12 Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Fütterung mit Doxycyclin-haltigem Futter und gewöhnlichem Trockenfutter sowie Leitungswasser ad libitum erfolgte durch die Tierpfleger. Die Bedingungen der Tierhaltung und der Organentnahme wurden von der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg begutachtet und genehmigt. Genehmigungsnummern: G68/14 (Zucht genetisch veränderter Mäuse), Org869 (Organentnahme).

2.2.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden Schwanzspitze-Biopsien verwendet, die den Tieren nach der Geburt entnommen wurden. Zur Aufreinigung der DNA wurde das Phire Animal Tissue Direct PCR Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Alternativ wurde eine Phenol-Chloroform Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 750 µl Biopsie-Lyse-Puffer versetzt und mit 0,7mg/ml Proteinase K für 2 Stunden bei 55 °C inkubiert. Darauf wurden 750 µl gebrauchsfertiger Phenol/Chloroform-Lösung (Carl Roth GmbH) mit dem Ansatz vermischt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 16000 g wurde die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo durch Zugabe von 650 µl Isopropanol die Nukleinsäuren gefällt

werden konnten. Darauf erfolgte die erneute Zentrifugation unter identischen Bedingungen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 7 min bei 16000 g wurde nochmals der Überstand abgenommen und überschüssiger Ethanol bei Raumtemperatur verdampft. Im Anschluss erfolgte das Lösen des Pellets in 50 µl TE-Puffer.

Daraufhin wurden die entsprechenden DNA Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Hierzu wurde die DreamTaq Polymerase in den in Tabelle 1 angegebenen Ansätzen und Bedingungen verwendet. Die amplifizierten DNA Sequenzen wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, wozu je nach Größe der erwarteten Produkte Agarosegele zwischen 1-2,5 % verwendet wurden.

Tabelle 1: Reaktionsansätze und –Bedingungen der PCR zur Genotypisierung

Reaktionsansatz		Vol in µl	
H ₂ O		12,5	
10x Puffer		2,5	
DMSO		0,25	
dNTPs		0,5	
Primer 1 (2pMol/µl)		4	
Primer 2 (2pMol/µl)		4	
DNA-Polymerase		0,25	
genom. DNA		1	
Reaktionsbedingungen			
	Wnt1-Luc	Col-tTA	Lrp5 ko
Initiale Denaturierung	94°C 4 min	94°C 5 min	94°C 4 min
Denaturierung	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s
Hybridisierung	52°C 40 s	60°C 30 s	58°C 45 s
Elongation	72°C 1 min	72°C 30 s	72°C 2 min
Finale Elongation	72°C 10 min	72°C 7 min	72°C 10 min
Zyklen	40	35	40

Der dem Gel in einer Konzentration von 500ng/μl beigesetzte, in die DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid erlaubte anschließend das Sichtbarmachen der DNA Banden unter UV-Licht zum Auswerten der Genotypen.

2.2.3 Calcein-Markierung

Zur Bestimmung der Parameter des Knochenwachstums in vivo wurde den Mäusen zweimalig Calcein verabreicht. Dieser fluorochrome Farbstoff bildet Chelatkomplexe mit Calcium und wird so in den frisch mineralisierten Schichten des Knochens angereichert, was unter dem Lichtmikroskop als fluoreszierende Bande sichtbar wird. Den Mäusen wurden hierzu in einem Abstand von fünf Tagen bei einwöchiger Wnt1-Induktion und sieben Tagen in den übrigen Gruppen je 100 μl Calcein-Lösung intraperitoneal injiziert.

2.2.4 Präparation der Mäuse

Die Mäuse im gewünschten Alter wurden mit einem Kohlenstoffdioxid-Sauerstoff Gemisch betäubt und mit reinem CO₂ getötet. Daraufhin wurden die Tiere gewogen. Anschließend erfolgte die Blutentnahme aus dem Herzen zur Serumgewinnung. Nach Messung der Körperlänge (Schnauzenspitze bis zum Schwanzansatz) wurden die Mäuse mit 80% Ethanol besprüht, um die Verunreinigung der später entnommenen Organe durch Haare und Staub zu vermeiden. Anschließend wurden die Mäuse gehäutet und verschiedene Organe zur histologischen Konservierung und zur Gewinnung organspezifischer RNA entnommen. Das Herauslösen von Knochenmark aus Femur und Tibia zur Gewinnung von knochenmarksspezifischer RNA und von Röhrenknochen ohne Knochenmark erfolgte wie in Punkt 2.2.9.2 beschrieben. Zur histologischen Analyse bestimmte Organe wurden in Formafix-Lösung fixiert, wohingegen Organe zur RNA-Gewinnung in flüssigem Stickstoff gefroren bzw. zur direkt anschließenden Lyse in Trizol-Lösung gegeben wurden. Die Mausskelette wurden mit gestreckten Extremitäten ebenfalls 24 Stunden in Formafix-Lösung fixiert und vor der anschließenden radiologischen Untersuchung mindestens 24 Stunden in Ethanol (80%) entwässert.

2.2.5 Radiologische Untersuchungen

2.2.5.1 Kontaktradiographie

Zur Identifikation eventueller Skelettanomalien wurden die - wie zuvor beschrieben - bis auf den Bewegungsapparat präparierten Mausskelette in einem digitalen Röntgengerät (Faxitron LX-60, Faxitron X-Ray Corp.) für 3,2 s bei 45 kV durchleuchtet, was eine projektionsradiographische Beurteilung der Skelettanteile zulässt.

2.2.5.2 Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie erlaubt durch dreidimensionale Rekonstruktionen eine plastische Darstellung der Knochenarchitektur und zugleich die präzise Erfassung von Strukturparametern. Hierzu wurden durch ein Mikro-Computertomographiegerät der Firma Scanco Medical AG Schnittbilder der präparierten rechten Femora der Mäuse erstellt und daraus dreidimensionale Modelle rekonstruiert, anhand derer sich die durchschnittliche Schichtdicke der knöchernen Kortikalis und die Knochendichte bestimmen ließen.

2.2.6 Histologie

Zur Erstellung histologischer Schnitte wurden nach erfolgter Röntgenuntersuchung der jeweils dritte und vierte Lendenwirbelkörper sowie die rechte Tibia freipräpariert. Das Anfertigen der histologischen Schnitte und der Färbungen erfolgte überwiegend durch die technischen Assistentinnen und Assistenten des Institutes für Osteologie und Biomechanik.

2.2.6.1 Acrylat-Histologie der Knochen

Um die mineralisierte Matrix des Knochens darzustellen wurde hier das Verfahren der unentkalkten Knochenhistologie angewandt. Dazu wurden die Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe mittels Autotechnikon entwässert. Die Entwässerung erfolgte für 2 x 60 min in 70 % EtOH, 3 x 60 min in 80 % EtOH, 3 x 60 min in 96 % EtOH und 4 x 60 min 100 % EtOH. Daraufhin wurden die Proben für jeweils 24 Stunden mit zwei unterschiedlichen Infiltrationslösungen behandelt, worauf die Einbettung in Acrylat-Gießlösung in

Glasgefäßen erfolgen konnte. Nach Aushärten der Blöcke bei 4°C wurde das umgebende Glas abgetrennt und die Blöcke wurden auf eine diamantartige Form um den eingebetteten Knochen zugeschnitten, um den nachfolgenden Schnittprozess zu erleichtern. Mittels Rotationsmikrotom wurden daraufhin Schnitte zweier Schnittdicken je nach Bestimmung angefertigt: Für die im Folgenden aufgeführten Färbungen wurden Präparate von 4 µm Schnittdicke verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische, dynamische Histomorphometrie erforderte dagegen ungefärbte Schnitte mit einer Schnittdicke von 12 µm. Zur besseren Vergleichbarkeit der Präparate wurden als finale Schnittebenen der Abgang der Querfortsätze der Wirbelkörper und der Abgang der Fibula aus der Tibia festgesetzt. Die Schnitte wurden auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger übertragen und mittels 80 % Isopropanollösung gestreckt. Abschließend erfolgte die Aushärtung für mindestens 12 Stunden bei 60°C.

2.2.6.2 Von Kossa/van Gieson-Färbung

Zur Darstellung der mineralisierten Knochenmatrix wurden die wie zuvor beschrieben angefertigten Präparate von 4 µm Schnittdicke nach Von Kossa/van Gieson gefärbt. In dieser Färbung erscheint mineralisierter Knochen schwarz, während sich das umliegende Binde- und Muskelgewebe rötlich abhebt. Dazu wurde das Acrylat mit 2-Methoxyethylacetat (3x 5 min) aus den Schnitten herausgelöst, worauf die Bewässerung in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten in EtOH 100 %, EtOH 96 %, EtOH 80 %, EtOH 70 %, EtOH 50 % erfolgte. Darauf wurde folgendes Färbeprotokoll angewandt: Von Kossa-Färbelösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), Sodaformollösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), Natriumthiosulfatlösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), van Gieson-Färbelösung (20 min). Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und 15 min mit Xylol behandelt. Abschließend erfolgte die Eindeckung mittels DPX.

2.2.6.3 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung erlaubt die Differenzierung unterschiedlicher Zell- und Gewebearten durch das Anfärben der Gewebebestandteile, wie beispielsweise der Zellorganellen in unterschiedlichen Blautönen, abhängig von ihrer

Basophilie. Zur Färbung wurden ebenfalls histologische Präparate von 4 µm Schnittdicke eingesetzt. Die Vor-, Nachbehandlung und Eindeckung verlief analog zu der von Kossa/van Gieson-Färbung. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten in Toluidin-Färbelösung.

2.2.7 Histomorphometrische Analyse

Um die Veränderungen in der Mikroarchitektur des Knochens durch Wnt1 zu quantifizieren, wurden die in Von Kossa/van Gieson gefärbten 4 µm Präparate mit der Bioquant Osteosoftware analysiert. Quantifiziert wurde der Anteil des Knochenvolumens am Gewebevolumen (BV/TV), die Dicke der Trabekel (Tb.Th), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und der Trabekel-Abstand (Tb.Sp). Die Analyse der zellulären Zusammensetzung des Knochens erfolgte an Toluidinblau-gefärbten Schnitten ebenfalls mit der Osteomeasure Software. Hier wurden die Zellzahlen pro Perimeter (Umfang) der angeschnittenen Knochenoberfläche (*bone perimeter*, B.Pm), aufgeschlüsselt in Osteoblasten (Ob.N. / B.Pm) und Osteoklasten (Oc.N / B.Pm) bestimmt.

2.2.8 RNA Isolation aus Organen

Aus den in Schritt 2.2.4 entnommenen Organen wurde RNA gewonnen, um mittels quantitative-realtime PCR die organspezifische Expression bestimmter Gene zu analysieren. Die einzelnen Organe wurden in 1 ml gekühltem Trizol-Reagenz mit einem Homogenisierer zerkleinert. Der entstehende Ansatz wurde mit 300 µl Chloroform vermischt. Durch 14-minütiges Zentrifugieren bei 1300 rpm und 4°C wurde der Ansatz in eine organische Phase mit den Protein-Bestandteilen, eine Interphase mit DNA, sowie eine wässrige Phase mit RNA getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und anschließend erneut für 10 min unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 70 % Ethanol mit DEPC H₂O gewaschen. Nach 5 min Zentrifugieren wurde das Pellet erneut von Ethanol befreit und für 5-10 min getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet je nach Größe in 15 – 500 µl DEPC H₂O bei 60°C für 10 min gelöst. Mittels NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) konnten Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt werden.

2.2.8.1 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von RNA zu cDNA wurde mittels Verso cDNA Kit von Thermo Fisher Scientific mit integriertem DNase-Verdau durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen und jeweils 1 µg der isolierten RNA zur cDNA-Synthese verwendet.

2.2.8.2 qRT-PCR

Zur Analyse der Genexpression wurde die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) mit dem TaqMan-Prinzip eingesetzt. Hierbei werden Sonden mit einem Fluorophor sowie einem das Fluoreszenzsignal auslöschenden Quencher eingesetzt, welche an die Vorlage-DNA zwischen den Primersequenzen binden. Wird die DNA amplifiziert, so wird die Sonde abgebaut und der Quencher kann die Fluoreszenz nicht mehr abschwächen. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zu der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Die Analyse erfolgte mittels StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System der Firma Applied Biosystems. Reaktionsansatz und -bedingungen und sind in Tabelle 2 und dargestellt. Die verwendeten Primersequenzen sowie die TaqMan-Sonden werden im Abschnitt 2.1.6.2 aufgeführt. Zur Referenz wurde das Transkript von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) verwendet und die Genexpression des Zielgens mit der Expression von Gapdh normalisiert.

Tabelle 2: Reaktionsansatz und Bedingungen der qRT-PCR

Reaktionsansatz			
TaqMan Gene Expression Master-Mix (2x)			10 µl
TaqMan Sonde			1 µl
cDNA (1:5 verdünnt)			2 µl
Reaktionsbedingungen			
PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Zyklen
Schritt 1	50	2:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	00:15	40
	60	1:00	

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Osteoblasten des Schädeldachs

Zur Gewinnung der Zellen wurden drei bis fünf Tage alte Mäuse ausgewählt, deren Schädeldach noch einen hohen Anteil undifferenzierter Knochenzellen aufweist. Nach Abtrennen des Kopfes wurde dieser in 80% Ethanol sterilisiert. Anschließend wurde das Schädeldach in einer transversalen Schnittebene vom Foramen magnum bis zu den Augenhöhlen vom Rest des Kopfes getrennt und von umliegenden Gewebe, einschließlich des Periosts befreit. Der Anteil vom Nackenansatz bis zur Lambda-Naht, welcher in diesem Wachstumsstadium vermehrt unspezifische Zellen enthält, wurde entfernt. Nach Reinigen in PBS wurden die Schädeldächer in einer Lösung der Enzyme Kollagenase und Dispase in Osteoblastenmedium für zehn Minuten bei 37°C anverdaut, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Bei der erneuten, 20-minütigen Inkubation mit den Enzymen wurden die restlichen Zellen freigesetzt. Das gelöste Material wurde daraufhin durch ein Zellsieb mit der Porengröße 70µm filtriert und anschließend sechs Minuten bei 430 g zentrifugiert, sodass ein sich Zellpellet abgesetzt hat. Zur darauffolgenden, lichtmikroskopischen Bestimmung der Zellzahl wurde das Pellet in Osteoblastenmedium resuspendiert.

2.2.9.2 Osteoblasten des Knochenmarks

Zur Gewinnung von Osteoblasten aus dem Knochenmark wurden Tiere im ausgewachsenen Alter und zur Isolation des Knochenmarks zur RNA-Extraktion sechs Wochen alte Tiere nach einwöchiger Induktion der *Wnt1*-Expression verwendet. Nach Tötung und Häutung der Tiere wurden die Hinterbeine oberhalb des Hüftkopfes vom Rumpf abgetrennt und im Kniegelenk durchtrennt. Anschließend wurde das den Knochen umgebende Gewebe so gründlich wie möglich entfernt, woraufhin die Knochenmarkskanäle durch Schnitte proximal am Femur und distal an der Tibia eröffnet wurden. Das Herauslösen des Knochenmarks erfolgte durch 15 Sekunden Zentrifugieren bei 5900 g. Dazu wurden Femora und Tibiae in an der Unterseite eröffnete PCR Gefäße als Probenhalter eingebracht, die in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen zum Auffangen des Knochenmarks positioniert wurden. Das in Osteoblastenmedium

resuspendierte Knochenmark wurde anschließend durch ein Zellsieb mit der Porengröße 70µm filtriert. Zum Ausplattieren einer einheitlichen Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml wurden die Zellzahlen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Suspension entsprechend mit Osteoblastenmedium verdünnt.

2.2.9.3 Wachstumskurve

Zur Beurteilung der Zell-Proliferation wurden die nach 2.2.9.1 gewonnenen Schädeldacht-Osteoblasten in einer Dichte von 25000 Zellen/Well in 12-Well-Platten ausplattiert und für insgesamt 7 Tage in Osteoblastenmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % rH kultiviert. Im Abstand von 24 Stunden erfolgte die Zählung von Triplikaten. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte an jedem zweiten Tag.

2.2.9.4 Kolonie-bildende Einheiten

In diesem Versuch wurde die Anzahl von zu Osteoblasten differenzierenden Zellen unter den Knochenmarkszellen genetisch unterschiedlicher Mäuse untersucht. Dazu wurden die zu Osteoblasten differenzierenden Zellkolonien mittels alkalischer Phosphatase angefärbt. Um ein korrektes Auszählen der Kolonien direkt auf den Zellkultur-Schalen zu ermöglichen, wurden hier Schalen mit einem Durchmesser von 145mm verwendet. Die nach 2.2.9.2 gewonnenen Zellen von je zwei Mäusen eines Genotyps wurden dazu in einer Dichte von 10^7 Zellen pro Kulturschale ausplattiert und für 18 Tage in Osteoblasten-Differenzierungsmedium kultiviert. Nach Fixierung wurden die Zellen 30 Minuten bei Raumtemperatur mit der Alkalische-Phosphatase-Lösung inkubiert und mehrmals gewaschen. Die Auszählung der angefärbten Kolonie-bildenden Einheiten erfolgte auf einer Unterlage mit Raster. Um eine Aussage über die Relation der auf diese Weise angefärbten Kolonien zu den gesamten Kolonien der jeweiligen Schale treffen zu können, wurden die Kulturen anschließend einer 10-minütigen Hämatoxylin-Färbung unterzogen und die so angefärbten Kolonien erneut gezählt.

2.2.9.5 Bromdesoxyuridin Test

Um die Proliferation transgener Osteoblasten in vitro zu untersuchen, wurden Zellkulturen mit Bromdesoxyuridin (BrdU) inkubiert. Dieses wird während der

Zellteilung in das Zellgenom eingebaut, was es erlaubt, die sich teilenden Zellen mit einem Antikörper sichtbar zu machen. Die nach 2.2.9.1 präparierten Schädeldach-Osteoblasten wurden in 96 Well Mikrotiter-Platten in einer Dichte von 2000 Zellen pro Well für insgesamt 5 Tage in Osteoblastenmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % rH kultiviert. 24 Stunden vor Analyse wurde dem Medium das BrdU Reagenz zugesetzt. Zur Analyse wurde das Cell Proliferation Biotrack Elisa System (GE Healthcare) verwendet. Alle folgenden Versuchsteile wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation mit dem BrdU-Antikörper kommt es durch Zugabe von Tetramethylbenzidin zu einer spezifischen Substratreaktion, deren Produkt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden kann. Die Höhe der Extinktion ist hierbei proportional zur Menge neu synthetisierter DNA und somit zur Proliferation der Zellen.

2.2.9.6 Isolation von Proteinen

Zur Isolation von Protein aus kultivierten Zellen wurden diese mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl RIPA-Puffer (inklusive Protease- und Phosphataseinhibitor) versetzt. Nach 15 min Inkubieren auf Eis wurde die Zellen mithilfe eines Zellschabers von den Kulturschalen gelöst und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.2.9.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mittels Bradford-Assay. Hierzu wurde eine BSA-Eichreihe mit Konzentrationen der Standards von 1,25 – 50 µg/ml H₂O erstellt. Daraufhin wurden jeweils 50µl einer Probe bzw. des Standards mit 50µl Bradford-Reagenz vermischt und in Küvetten überführt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen und über die Eichkurve die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.10 Statistische Analyse

Zur Statistischen Analyse wurde die Software Graphpad Prism der Firma Graphpad Software Inc. verwendet. Dargestellt wurden die Ergebnisse als

arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (standard deviation, SD) wobei in den Balkendiagrammen zur Übersichtlichkeit nur der positive Wert der SD abgebildet wurde. Die Anzahl der Elemente in der Stichprobe wurde mit „n“ angegeben. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der t-Test verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Knochenhistologie nach Überexpression von Wnt1

3.1.1 Strukturparameter des trabekulären Knochens nach unterschiedlichen Induktionszeiträumen

Um die Auswirkung der Osteoblasten-spezifischen Wnt1-Überexpression auf den Knochen zu untersuchen wurde das in der Einleitung beschriebene Tet-off System verwendet. Somit konnten Mäuse in unterschiedlichen Wachstumsstadien induziert werden und die Auswirkungen auf den Knochen bei variablen Induktionsperioden, wie in Abbildung 5 beschrieben, untersucht werden.

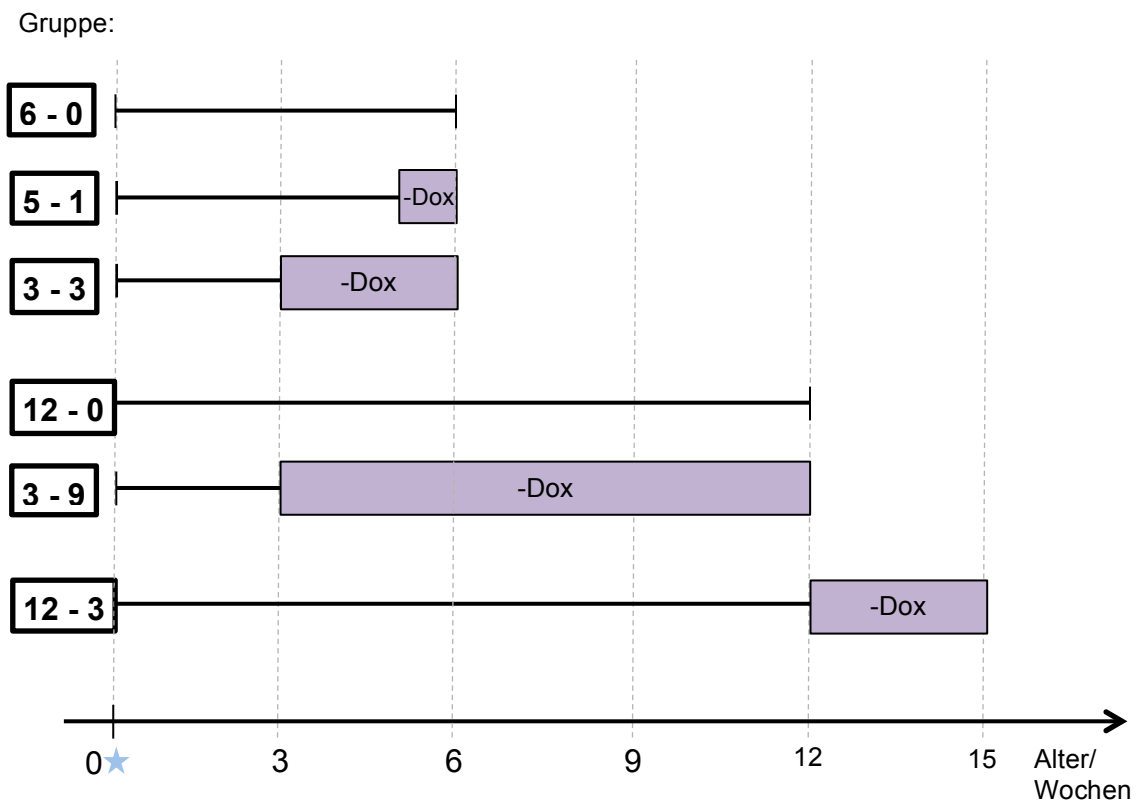


Abbildung 5: Mausgruppen mit schematischer Darstellung der Wnt1-Überexpression: Analysiert wurden Tiere im Alter von 6, 12 und 15 Wochen. Die erste Ziffer in der Gruppenbezeichnung gibt den Wochenzeitraum an, in dem die Wnt1-Überexpression durch Doxycyclin inhibiert wurde. Die zweite Ziffer beschreibt den Wochenzeitraum der Wnt-1 Überexpression durch die Gabe einer Doxycyclin-freien Diät, im Schema verdeutlicht durch den „-Dox“ Balken.

Die histomorphometrische Auswertung bestätigte diese rasche osteoanabole Wirkung der Wnt1-Überexpression (Abbildung 7). Die Quantifizierung ergab bereits nach einer Woche Induktion eine signifikante Erhöhung der trabekulären Knochendichte in den transgenen Tieren, welche sich aus einer erhöhten Dicke und Anzahl der Trabekel zusammensetzte. Der Abstand zwischen den Trabekeln nahm folglich ab. Die transgene Kontrollgruppe mit durchgehend unterbundener Induktion (6 - 0) zeigte dagegen in keinem der untersuchten Parameter einen Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle, sodass von einer vollständigen Inhibierung und präzisen Aktivierbarkeit der Wnt1-Expression im verwendeten Mausmodell ausgegangen werden kann.

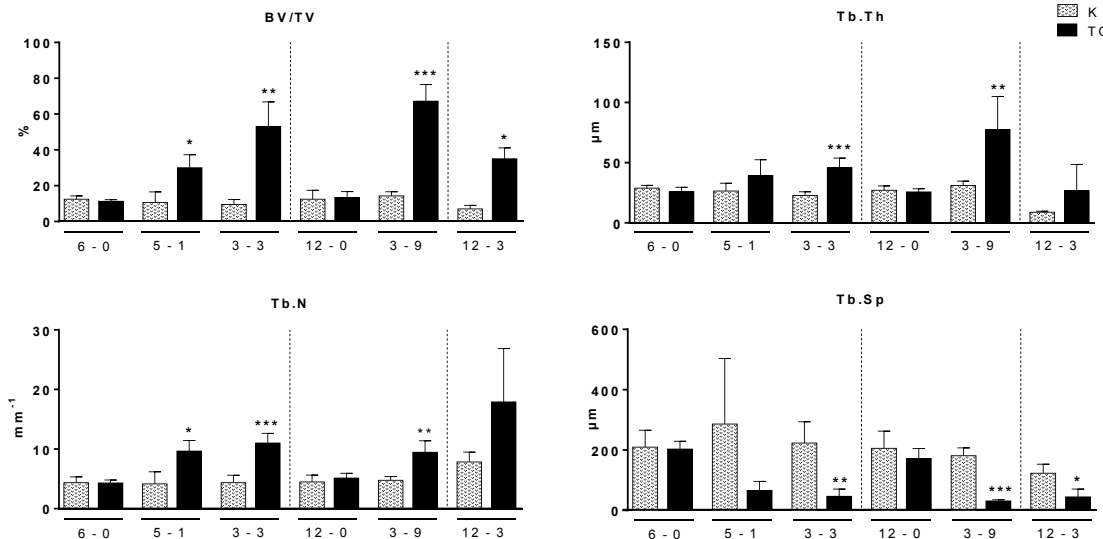


Abbildung 7: Histomorphometrische Analyse der trabekulären Knochenanteile des Wirbelkörpers. Untersucht wurden *Wnt1*-transgene Tiere und Wildtypen im Alter von 6, 12 und 15 Wochen, wobei die Induktion der Wnt1-Expression in den jeweils angegebenen Zeiträumen nach Abb. 5 erfolgte. Quantifiziert wurde der Anteil des Knochenvolumens am Gewebenvolumen (BV/TV), die Dicke der Trabekel (Tb.Th), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und der Trabekel-Abstand (Tb.Sp). n≥3 Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Die Ausweitung der Induktion in heranwachsenden Tieren auf drei Wochen (3 - 3) resultierte in einer Zunahme der Knochendichte auf das mehr als Dreifache der Kontrollgruppe. Auch der deutliche Phänotyp nach neunwöchiger Induktion der 12 Wochen alten Tiere (3 - 9) konnte hier durch eine erheblich erhöhte trabekuläre Knochendichte bestätigt werden, welche sich insbesondere

aus der Zunahme der Trabekeldicke auf in etwa das Doppelte der Kontrollgruppe ergab. Fand eine dreiwöchige Induktion erst bei ausgewachsenen Mäusen von der zwölften bis zur fünfzehnten Lebenswoche statt (Gruppe 12 - 3), ergab sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Knochendichte. Dies deutet an, dass sich der Effekt der *Wnt1*-Induktion unabhängig von der Wachstumsphase beobachten lässt.

3.1.2 Analyse weiblicher Tiere bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede von *Wnt1* auf den Knochen

Um mögliche, geschlechtsspezifische Effekte von *Wnt1* offenzulegen, wurden zunächst alle histomorphometrischen Untersuchungen auch mit weiblichen Tieren durchgeführt. Die von Kossa/ van Giesson gefärbten Schnitte von Lendenwirbelsäule und Tibia bildeten die zuvor bei den männlichen Tieren beobachtete, rapide Zunahme des mineralisierten Knochenanteils gegenüber der Wildtyp-Kontrolle ab, welche sich durch Ausweitung des Induktionszeitraums steigern ließ (Abbildung 8). Auch die Quantifizierung der

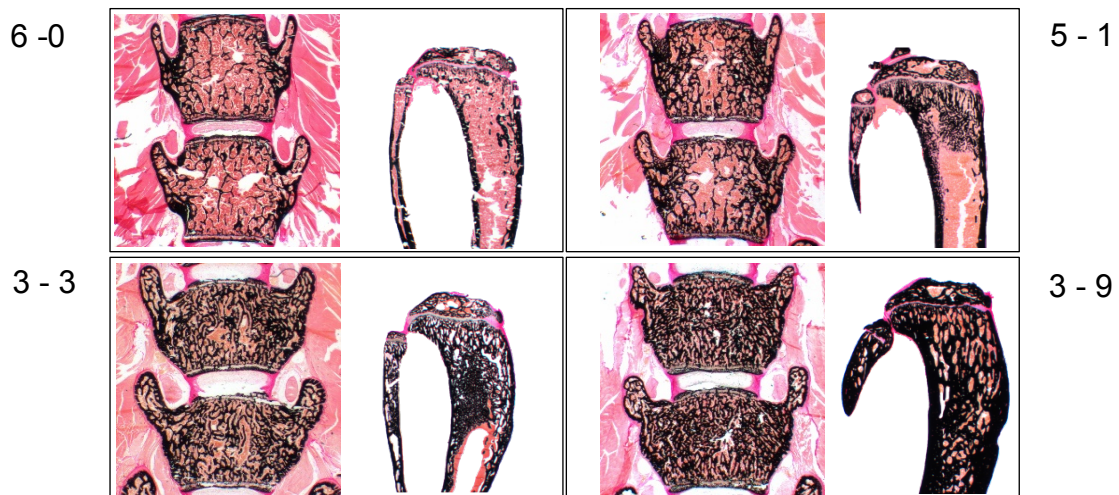


Abbildung 8: Histologische Analyse der Wirbelsäule und Tibia weiblicher Tiere. Repräsentative Schnitte der Wirbelkörper L3 und L4 und der Tibia von weiblichen Tieren im Alter von sechs und 12 Wochen zu den jeweils angegebenen Induktionszeiträumen der *Wnt1*-Expression nach Abb. 5. Die mineralisierte Knochenmatrix ist mittels von Kossa/van Gieson-Färbung schwarz gefärbt.

trabekulären Knochendichte, aufgeschlüsselt in Anzahl und Dicke der Trabekel und den zugehörigen Abstand förderte einen identisch osteoanabolen Effekt von *Wnt1* wie bei den männlichen Tieren zutage (Abbildung 9). Basierend auf diesen Beobachtungen war anzunehmen, dass der durch die *Wnt1*-

Überexpression ausgelöste Mechanismus unabhängig vom Geschlecht der Tiere agiert. Im Folgenden wurde deshalb der Fokus auf männliche Tiere gelegt.

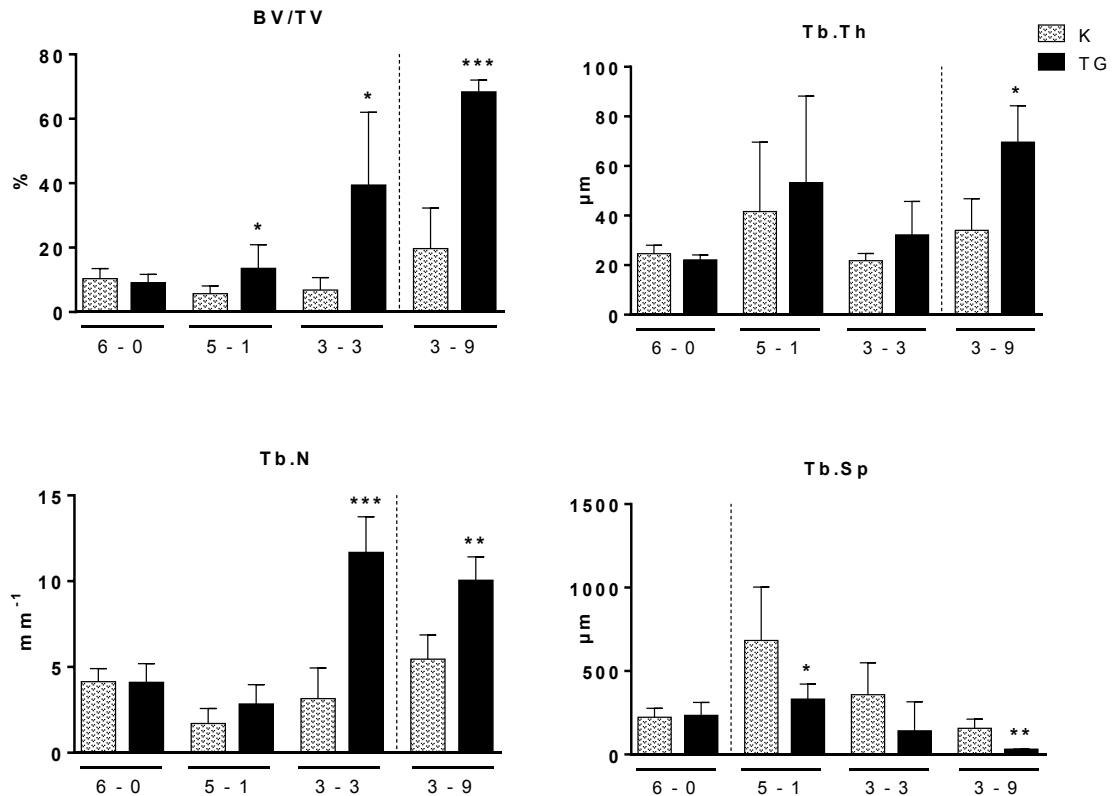


Abbildung 9: Histomorphometrische Analyse weiblicher Tiere. Untersucht wurden *Wnt1*-transgene Tiere im Alter von sechs und zwölf Wochen, wobei die *Wnt1*-Expression in den angegebenen Zeiträumen nach Abb. 5 erfolgte. Quantifiziert wurde der Anteil des Knochenvolumens am Gewebivolumen (BV/TV), die Dicke der Trabekel (Tb.Th), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und der Trabekel-Abstand (Tb.Sp). $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.3 Untersuchung der Knochenstruktur im µCT

Um zu ermitteln, ob der Effekt von *Wnt1* auch die kortikalen Anteile des Knochens betrifft, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen aus µCT-Schnitten des Femurs der Mäuse erstellt. Die Zunahme der Kortikalis-Dicke, welche bereits in den exemplarischen Rekonstruktionen von Abbildung 10 A visuell zu erkennen ist, wurde durch die quantitative Auswertung für die Gruppen verschiedenen Alters bestätigt. Hier zeigte sich nach einer Woche *Wnt1*-Induktion (5 - 1) eine tendenzielle Zunahme der Dicke. Bereits nach drei Wochen Induktion (3 - 3) konnte ein signifikanter Zuwachs gegenüber der

Wildtyp-Kontrolle verzeichnet werden (Abbildung 10 B). Bei neunwöchiger Induktion (3 - 9) war die Dicke in Relation zur Kontrollgruppe bereits verdoppelt. Außerdem konnte die rapide Zunahme der trabekulären Knochendichte durch Wnt1 diesem Verfahren auch für den Femurknochen bestätigt werden.

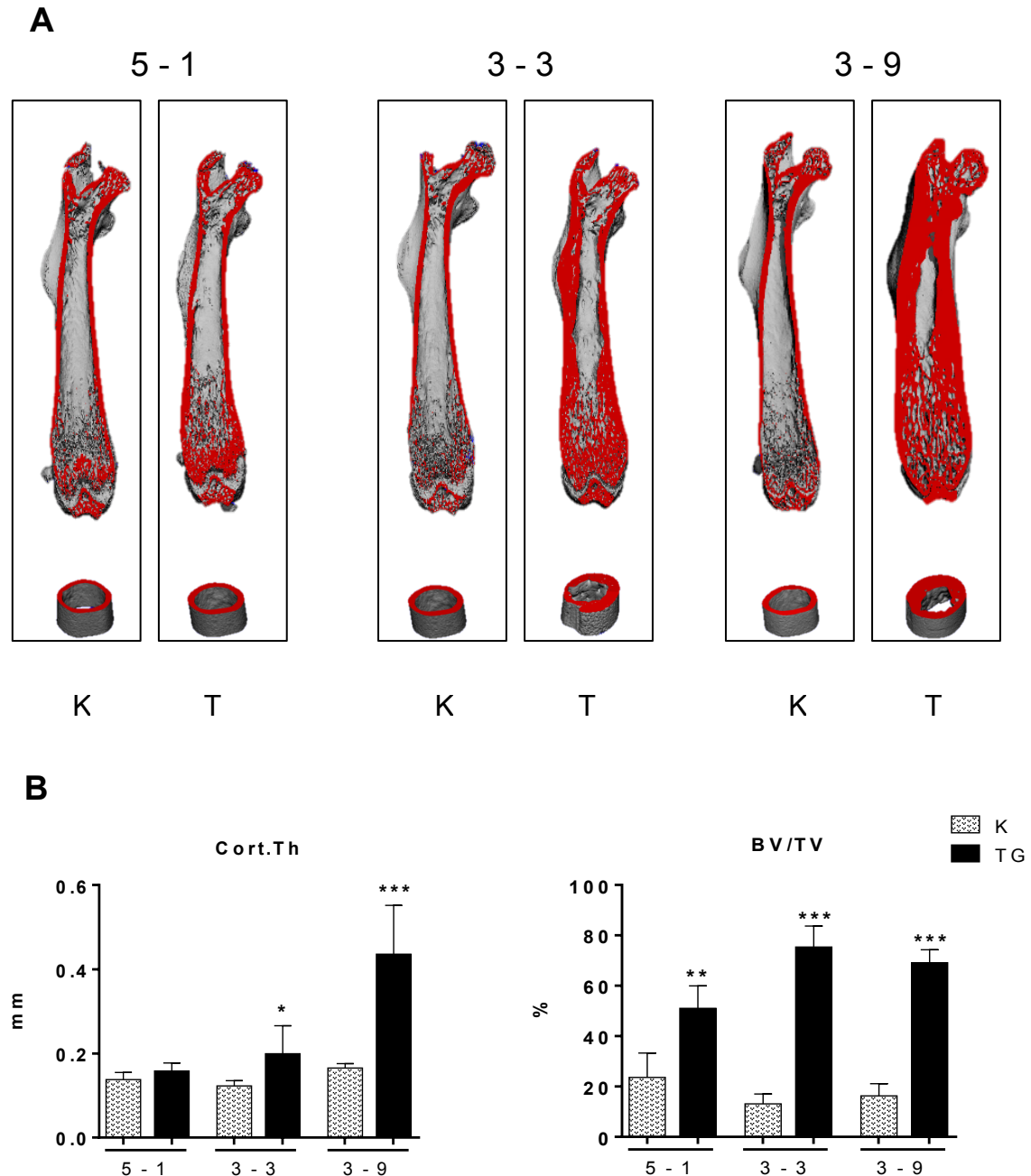


Abbildung 10: μ CT-Untersuchungen der Femora. (A) Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktionen der Femora im Längsschnitt und Querschnitt von männlichen Tieren der Gruppen 5 - 1, 3 - 3 und 3 - 9 nach Abb. 5 sowie der Wildtyp Kontrollen. (B) Histomorphometrische Auswertung mit Quantifizierung der Dicke der Corticalis (Cort.Th) sowie des Anteils des Knochenvolumens am Gewebenvolumen (BV/TV). $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.1.4 Zelluläre Histomorphometrie nach Überexpression von *Wnt1*

Um den für die gesteigerte Knochendichte verantwortlichen zellulären Mechanismus zu ergründen, wurden zunächst in Toluidinblau-gefärbten Schnitten der Wirbelkörper Osteoblasten und Osteoklasten quantifiziert. Schon nach einer Woche *Wnt1*-Induktion in heranwachsenden Tieren (5 - 1) zeichnete sich hier eine klare Zunahme der Osteoblastenanzahl (in Relation zum Perimeter der angeschnittenen Knochenoberfläche, N.Ob/B.Pm) gegenüber der Kontrollgruppe ab, die bei Ausweitung der Induktionsperiode auf drei Wochen (3 - 3) weitgehend unverändert blieb (Abbildung 11). Bei den ausgewachsenen,

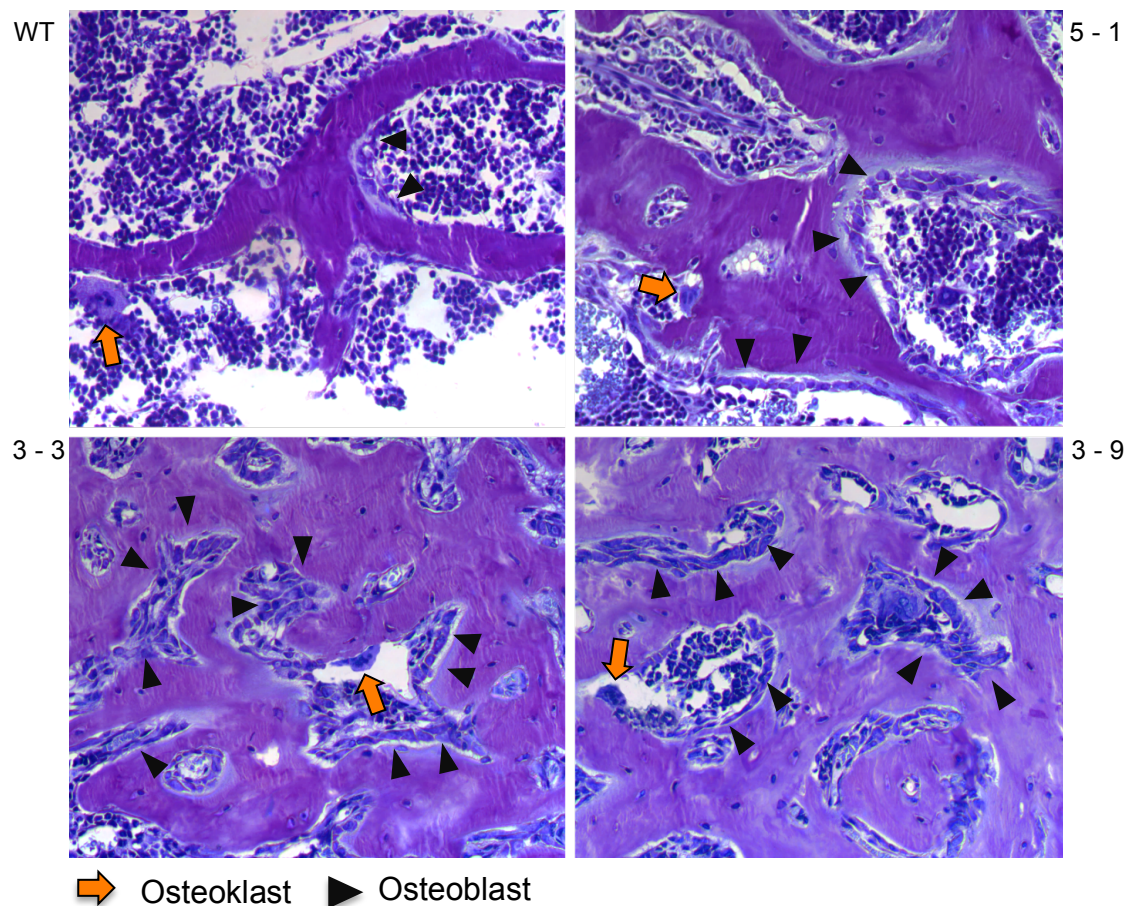


Abbildung 11: Analyse der Knochenzellen. Toluidinblau-Färbung histologischer Schnitte der Lendenwirbelkörper von Wildtyp-Mäusen und Tieren der Gruppen 5 – 1, 3 – 3 und 3 – 9 zur Darstellung der Knochenzellen. Exemplarische Kennzeichnung von Osteoblasten und Osteoklasten.

drei und neun Wochen induzierten Tieren (12 - 3 und 3 - 9) war die Steigerung leicht rückläufig, aber dennoch signifikant. Die Anzahl der Osteoklasten (in Relation zum Perimeter der angeschnittenen Knochenoberfläche, N.Oc/B.Pm) blieb dagegen in allen untersuchten Konstellationen ohne signifikante

Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abbildung 12). Das Gleichgewicht der Gegenspieler im Knochenauf- und Umbau verschiebt sich durch die Induktion somit auf die Seite der Osteoblasten, was als grundlegender Mechanismus des beobachteten osteoanabolen Effekts von Wnt1 betrachtet werden kann.

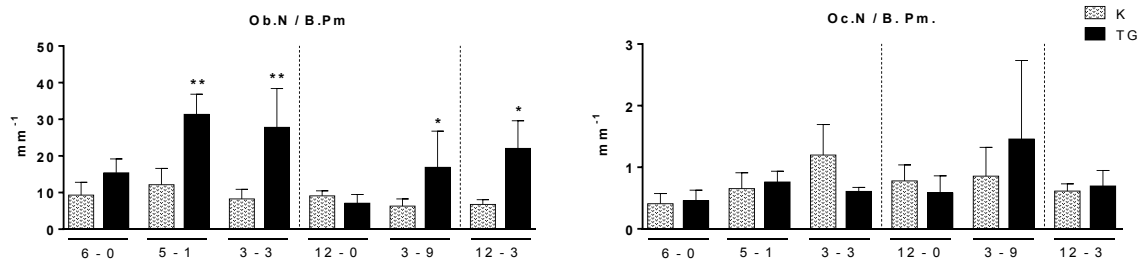


Abbildung 12: Histomorphometrische Auswertung des Einflusses von Wnt1 auf die Zellzahlen. Untersucht wurden die Lendenwirbelkörper *Wnt1*-transgener Tiere im Alter von 6, 12 und 15 Wochen, wobei die *Wnt1*-Expression in den angegebenen Zeiträumen nach Abb. 5 erfolgte. Quantifiziert wurden die Zellzahlen pro Perimeter (Umfang der angeschnittenen Knochenoberfläche, *bone perimeter*, B.Pm), aufgeschlüsselt in Osteoblasten (Ob.N / B.Pm) und Osteoklasten (Oc.N / B.Pm). $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.5 Analyse der Knochenneubildung

Neben der rein quantitativen Zunahme der knochenbildenden Zellen durch Wnt1 kann die Aktivität der Osteoblasten in einem festgelegten Intervall durch Injektion von Calcein, einer fluoreszierenden Substanz die sich in den Knochen einlagert, untersucht werden. Schon nach einer Woche Induktion (5 - 1) ließ sich visuell eine gesteigerte Knochenbildung im Zuwachs der fluoreszierenden Banden erkennen (Abbildung 13). Quantifiziert werden konnte dies durch Bestimmung des Anteils neu gebildeter und damit fluoreszierender Knochenoberfläche zur gesamten Knochenoberfläche (MS/BS = mineralised surface/bone surface). Auch hier konnte nach einer Woche Induktion (5 - 1) ein tendenzieller Zuwachs und nach drei Wochen Induktion (3 - 3) ein signifikante Zunahme der MS/BS gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet werden, was das Ergebnis der zuvor dargestellten, gesteigerten Osteoblastenanzahl durch die *Wnt1*-Induktion untermauert. Weiter konnte hier der Zuwachs an mineralisierter Matrix (MAR = mineral apposition rate) innerhalb eines Intervalls von sieben Tagen verglichen werden. Auch die MAR war in den induzierten Gruppen erhöht, was anzeigt, dass die Osteoblasten-spezifische Überexpression von Wnt1 auch die Aktivität der Osteoblasten steigert. Die aus

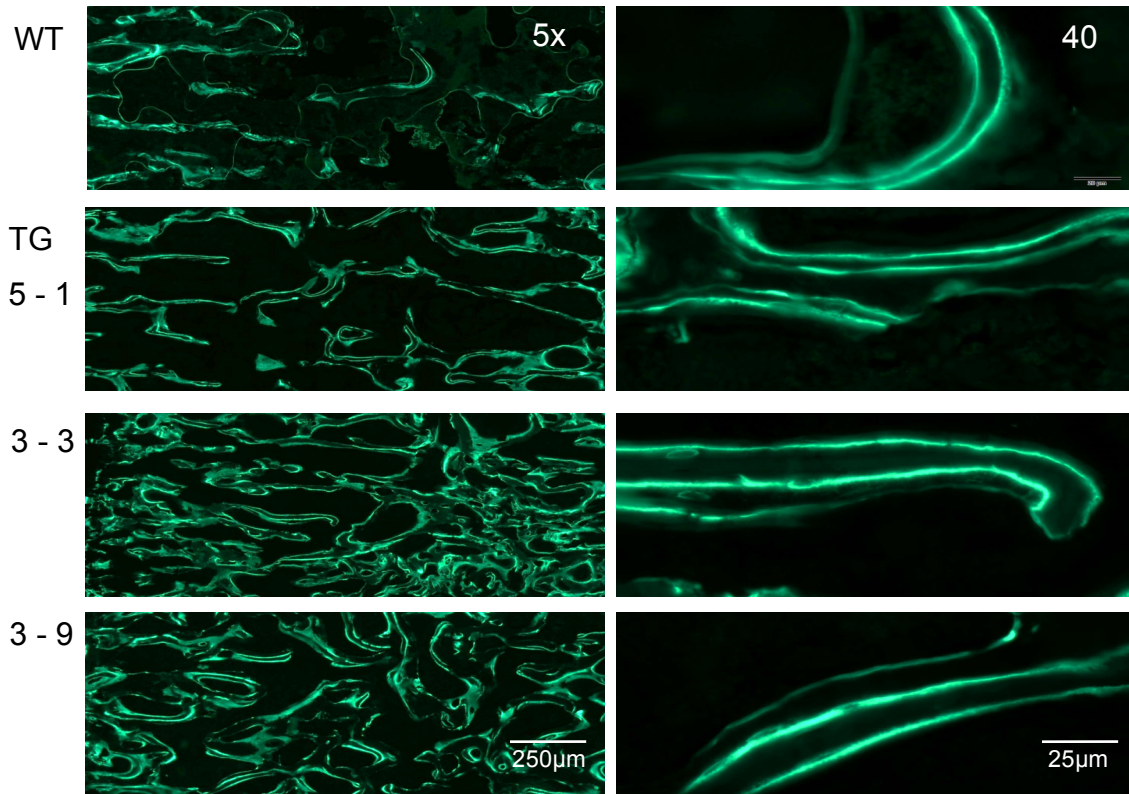


Abbildung 13: Calceinfärbung der Mineralisierten Matrix. Histologische Schnitte der Wirbelkörper von Mäusen nach zwei Calceininjektionen im Abstand von 5 bzw. 7 Tagen. Die frisch mineralisierte Knochenmatrix stellt sich als floureszierende Bande dar. Anhand des Abstandes der Doppelbänder kann somit der Knochenzuwachs zwischen den Injektionen bestimmt werden. Exemplarische Schnitte von Wildtyp-Mäusen und Tieren der Gruppen 5 – 1, 3 – 3 und 3 – 9 in fünffacher und vierzigfacher Vergrößerung.

diesen Parametern errechnete Knochenformationsrate ($BFR/BS = \text{bone formation rate/bone surface}$), welche die Gesamtaktivität der Osteoblasten widerspiegelt, war schon nach einer Woche *Wnt1*-Induktion (5 - 1) signifikant gesteigert. Bei längeren Induktionszeiträumen stieg der Zuwachs gegenüber der Kontrollgruppe weiter an. Die stimulierende Wirkung auf Anzahl und Aktivität der Osteoblasten zeigt, dass die hohe Knochendichte bei Überexpression von *Wnt1* aus der Steigerung der Knochenneubildung und nicht aus der Hemmung der Resorption zustande kommt (Abbildung 14).

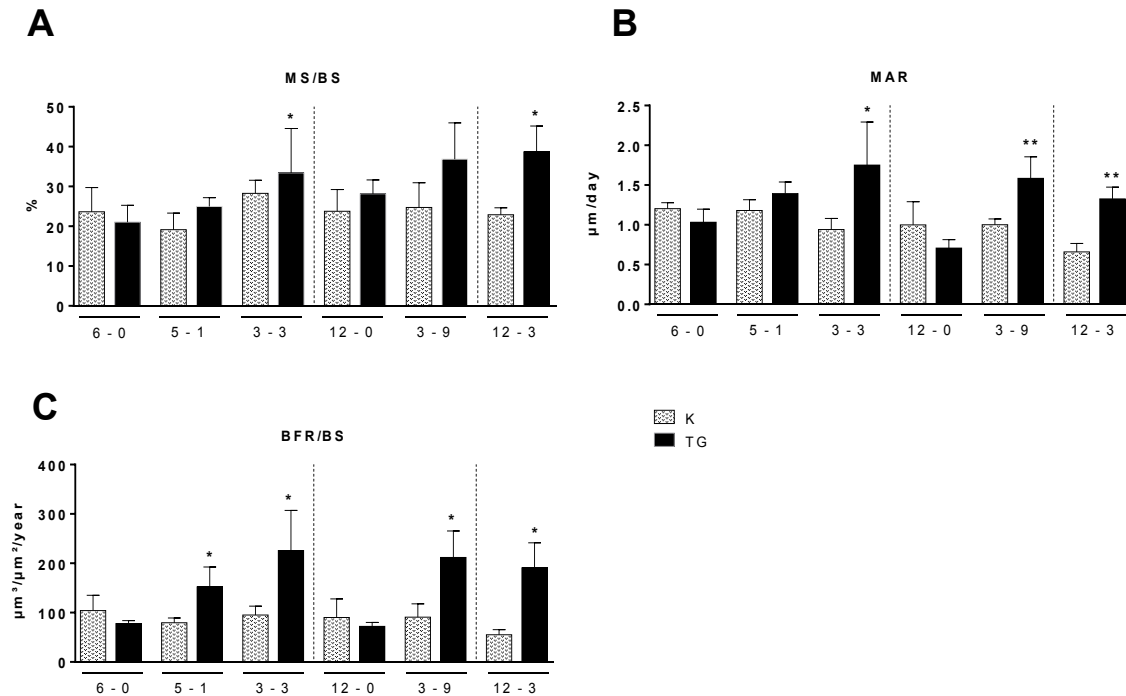


Abbildung 14: Knochenzuwachs nach Wnt1 Induktion. Dargestellt ist (A) die Oberfläche der mineralisierten Matrix pro Knochenoberfläche (MS/BS) und (B) der Dicken-Zuwachs des Knochens (mineral apposition rate, MAR). Aus diesen Parameter errechnet sich (C) die Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche (BFR/BS). Untersucht wurden *Wnt1*-transgene Tiere und Wildtypen im Alter von 6, 12 und 15 Wochen, wobei die Induktion der *Wnt1* Expression in den jeweils angegebenen Zeiträumen nach Abb. 5 erfolgte. $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2 Expressionsprofil von Wnt1 in unterschiedlichen Gewebearten

Die speziesübergreifende Relevanz des Wnt-Signalweges für Entwicklung und Funktion unterschiedlichster Organsysteme gab Anstoß, die gewebsspezifische *Wnt1*-Expression der Mäuse mittels qRT-PCR zu quantifizieren (Nusse, 2005). Dazu wurden verschiedene Gewebeproben von Wildtyp-Mäusen sowie transgenen Mäusen nach einer Woche *Wnt1*-Induktion entnommen. Während die Wildtyp-Proben eine leicht erhöhte *Wnt1*-Expression in Darm, Pankreas, gespültem Röhrenknochen und Schädelkalotte zeigten, konnte bei den transgenen Tieren neben einer erhöhten Expression in Milz, Magen und Pankreas insbesondere in gespültem Knochen, Knochenmark und Schädelkalotte eine deutlich gesteigerte Expression gegenüber den Wildtypen detektiert werden (Abbildung 15).

Dies zeigt an, dass auch in Wildtyp-Mäusen *Wnt1* im Knochen exprimiert wird, was die Annahme einer essentiellen Rolle des Liganden für einen

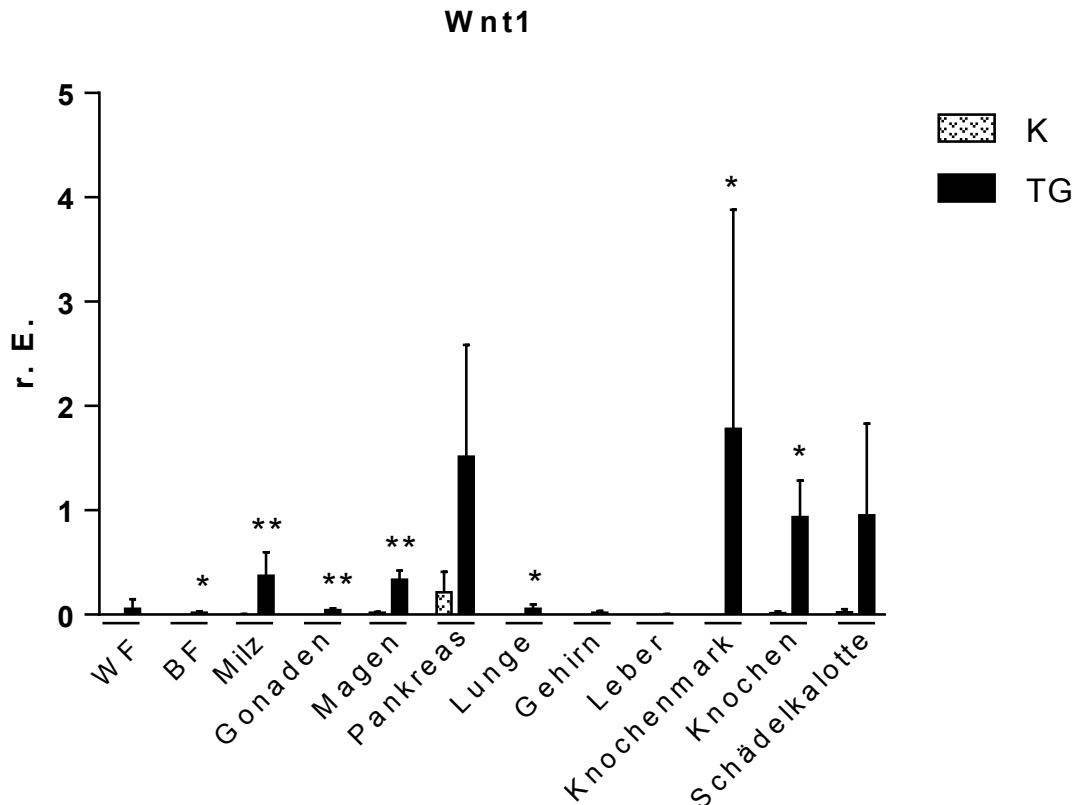


Abbildung 15: Gewebsspezifische Expression von Wnt1. Analyse von Gewebeproben der angegebenen Organe *Wnt1*-transgener Tiere und Wildtyp-Kontrollen mittels quantitative-realttime PCR. Es wird die relative Expression von *Wnt1* gegenüber *Gapdh* gezeigt. WF = weißes Fettgewebe, BF = braunes Fettgewebe. $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

gesunden Knochenstoffwechsel unterstützt. Weiter bestätigen die gegenüber den Wildtyp-Kontrollen noch stärker erhöhten Expressionswerte der transgenen Tiere in den untersuchten Knochengeweben die Osteoblasten-spezifisch gesteigerte Wnt1-Expression des Modells.

3.3 Untersuchungen des Wnt1 Signalweges in vitro

3.3.1 Proliferation transgener Osteoblasten

Etwas weniger deutliche Resultate brachte die Analyse der Wachstumsverläufe primärer Osteoblasten hervor (Abbildung 16 B). Hier konnten bei den transgenen Zellen ab dem zweiten Tag in Kultur in geringem Maße schneller steigende Zellzahlen und somit eine tendenziell gesteigerte Proliferationsrate verglichen mit Wildtyp-Zellen beobachtet werden. Im Gesamten betrachtet

bestätigen diese Befunde den Verdacht auf eine auto- oder parakrine Wirkungsweise des Wnt Signalweges zwischen Osteoblasten.

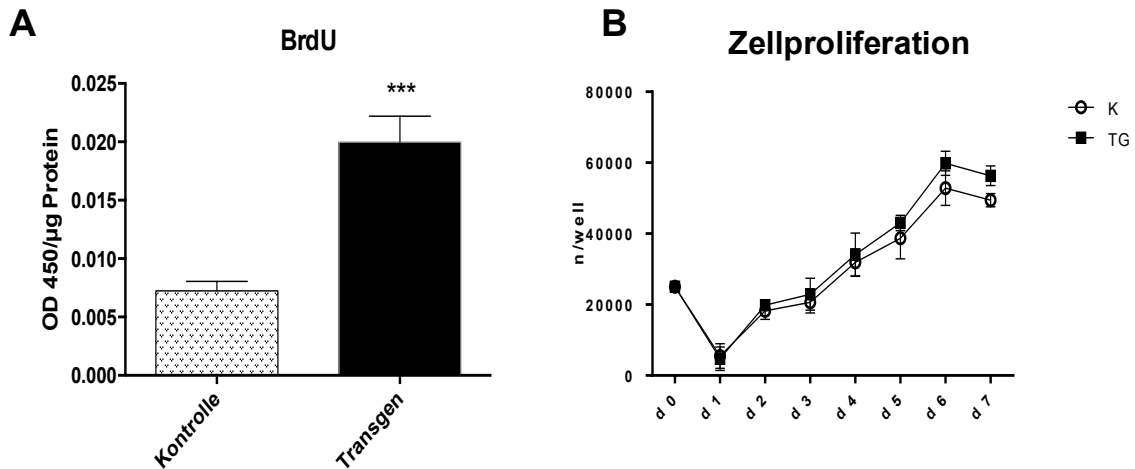


Abbildung 16: Analyse der Zellproliferation in vitro. **A:** Proliferation von primären Osteoblasten aus der Schädelkalotte transgener Tiere gegenüber der Wildtyp-Kontrolle mittels BrdU-Einlagerung. Quantifizierung durch Spektral-Photometrie einer Reaktion des eingesetzten Antikörpers bei einer Wellenlänge von 450nm (Höhe der Extinktion proportional zur Proliferation der Zellen) $n=3$ Experimente pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen *** $p<0,001$ **B:** Zellproliferation anhand täglicher Auszählung von *Wnt1*-transgenen Osteoblasten sowie Wildtyp-Osteoblasten aus dem Schädeldach über ein Intervall von insgesamt sieben Tagen. n (y-Achse) = Mittelwert der Zellzahlen/well (tägliche Zählung von $n = 3$ Kulturen pro Zelllinie). Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen.

3.3.2 Kolonie-bildende Einheiten

Neben der reinen Proliferationsrate primärer Osteoblasten wurde auch die Anzahl mesenchymaler Osteoblasten-Vorläuferzellen bestimmt. Dazu wurden, um die Anzahl der Osteoblastenkolonien zu bestimmen, primäre Knochenmarkszellen nach sieben Tagen in Kultur einer Färbung mit alkalischer Phosphatase unterzogen. Schon im optischen Vergleich zeichnete sich hier bei den transgenen Kulturen ohne Doxycyclin-Inhibition ein Zuwachs an angefärbten Kolonien im Vergleich zu Wildtyp-Osteoblasten und transgenen Zellen unter Doxycyclin ab (Abbildung 17 A). Nach deren Zählung sowie Färbung aller Zellen mittels Hämatoxylin-Eosin, konnte der Quotient von knochenbildenden Kolonien zur Gesamtzahl ermittelt werden (Abbildung 17 B). Hier zeigte sich nur in den Kulturen ohne Doxycyclin-Inhibition ein signifikant erhöhtes Verhältnis der knochenbildenden Kolonien. Dies deutet darauf hin,

dass die erhöhte Anzahl der Osteoblasten möglicherweise durch eine vermehrte Anzahl von Osteoblasten-Vorläufern verursacht wird.

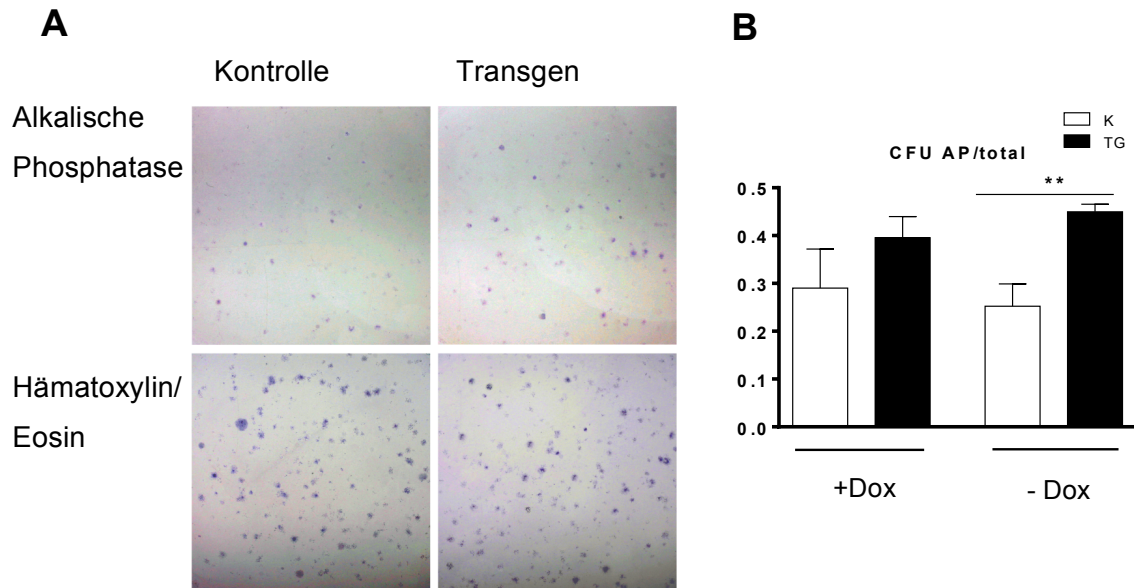
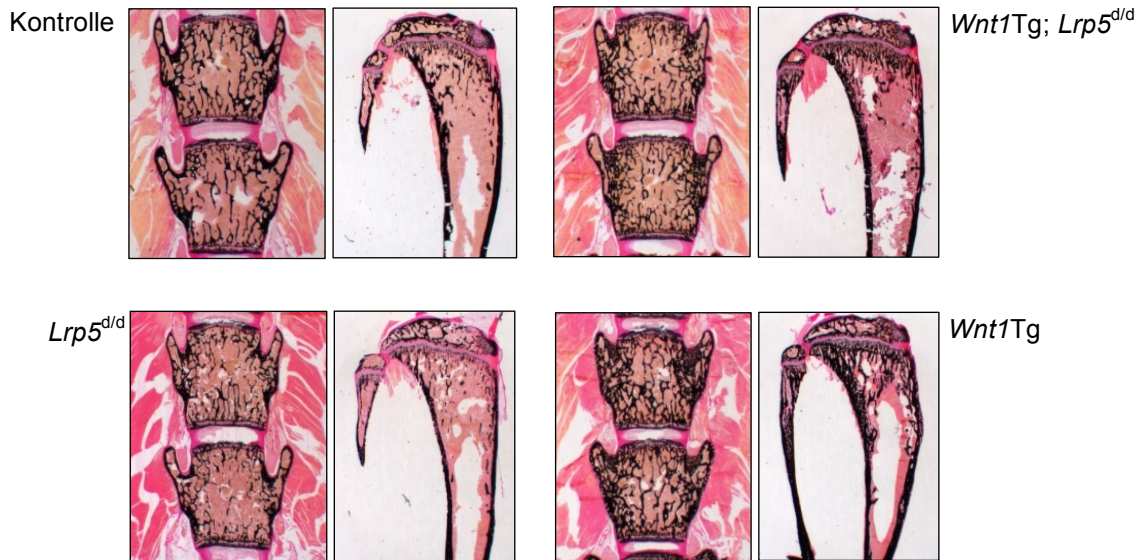


Abbildung 17: Kolonie-bildende Einheiten: (A) Mesenchymale Osteoblasten-Vorläuferzellen transgener Tiere ohne Doxycyclin-Inhibitor im Kulturmedium und Wildtyp-Kontrollen, angefärbt mit alkalischer Phosphatase. Anschließend Färbung aller Zellkolonien mit Hämatoxylin-Eosin (B) Quotient von knochenbildenden Kolonien (colony forming units, CFU) zur Gesamtzahl der Zellkolonien. Auswertung von Zellen transgener Tiere und Wildtyp-Kontrollen in Triplikaten, jeweils mit und ohne Doxycyclin-Inhibitor im Kulturmedium. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: ** $p < 0,01$.

3.4 Auswirkungen einer *Lrp5*-Defizienz auf den Effekt von *Wnt1*

Das untersuchte Modell sollte im Folgenden mit einem globalen *Lrp5*-defizientem Mausmodell kombiniert werden, um die Bedeutung dieses Rezeptors für den *Wnt1*-Signalweg im Knochen abzubilden. Der Vergleich dieser modifizierten Gruppe ist insbesondere zu den beschriebenen transgenen Tieren zu ziehen, sodass hier wiederum 6 Wochen alte Tiere nach einer Woche *Wnt1*-Induktion untersucht wurden (5 - 1). Daneben wurden als Referenz für den Effekt der globalen *Lrp5*-Defizienz *Lrp5*^{dl/d} Tiere im gleichen Alter analysiert. Auch in der modifizierten Mauslinie konnte bei transgenen Tieren ohne *Lrp5*-Defizienz nach einwöchiger Induktion der zuvor beschriebene Phänotyp mit Steigerung der trabekulären Knochendichte durch eine Kombination aus gesteigerter Trabekeldicke und -Anzahl beobachtet werden (Abbildung 18). Eine reine *Lrp5*-Defizienz hingegen bewirkte einen konträren Phänotypen mit dezenter Verminderung der trabekulären Knochendichte. Dies steht in Einklang

A



B

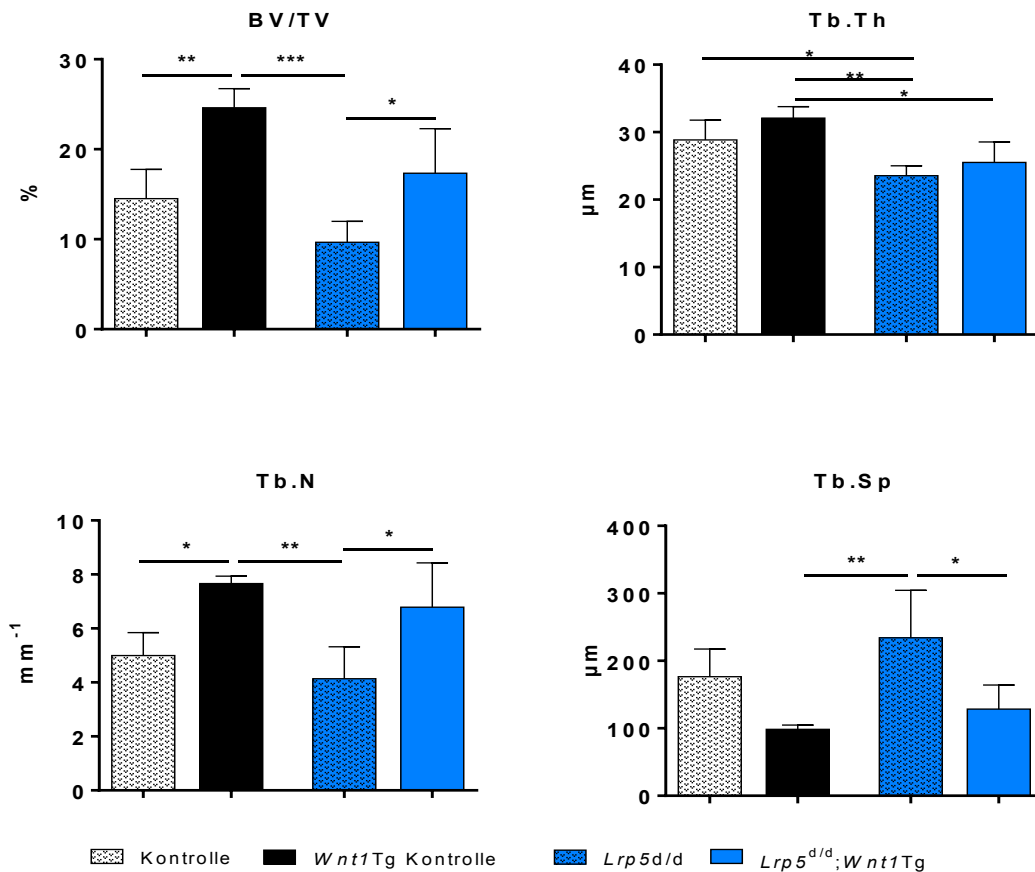


Abbildung 18: Histologische und histomorphometrische Untersuchung von Wirbelsäule und Tibia. (A) Repräsentative Schnitte der Wirbelkörper L3 und L4 und der Tibia von männlichen Tieren im Alter von sechs Wochen. Analysiert wurden Wildtyp-Kontrollen, Mäuse mit alleiniger *Lrp5*-Defizienz (*Lrp5^{d/d}*), Mäuse mit *Wnt1*-Überexpression (*Wnt1Tg*) und Mäuse mit kombinierter *Lrp5*-Defizienz und *Wnt1*-Überexpression (*Wnt1Tg; Lrp5^{d/d}*). Die mineralisierte Knochenmatrix ist mittels von Kossa/van Gieson-Färbung schwarz gefärbt. (B) Quantifiziert wurde der Anteil des Knochenvolumens am Gewebenvolumen (BV/TV), die Dicke der Trabekel (Tb.Th), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und der Trabekel-Abstand (Tb.Sp). $n \geq 3$ Tiere pro Gruppe. Signifikanz mittels t-Test gegenüber dem Wildtypen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

mit der inaktivierenden beschriebenen *LRP5*-Mutation im Menschen (Gong et al., 2001) und in der Maus (Kato et al., 2002). In Mäusen, die sowohl eine *Lrp5*-Defizienz als auch eine gesteigerte *Wnt1*-Expression aufweisen, war nach einwöchiger Induktion die Knochendichte gegenüber der Wildtyp-Kontrolle weiterhin erhöht. Die verminderte Steigerung der Knochendichte im Vergleich zu den *Wnt1*-transgenen Tieren konnte hierbei dem isolierten Effekt der *Lrp5*-Defizienz zugeschrieben werden, sodass sich zusammenfassend sagen lässt, dass der Phänotyp der *Wnt1*-transgenen Mäuse durch die Defizienz von *Lrp5* nicht vollständig revidiert werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Wnt1-Mutationen im Knochenstoffwechsel

Der Wnt Signalweg ist sowohl an der embryonalen Entwicklung als auch an physiologischen Funktion unterschiedlicher Organsysteme beteiligt, wobei er auf die Differenzierung, Proliferation, Migration und die Genexpression der Zellen Einfluss nimmt (Wodarz und Nusse, 1998). An der Signalübermittlung im Knochen ist die Beteiligung mehrerer Wnt-Liganden nachgewiesen, unter denen WNT1 durch die Entdeckung mehrerer Gendefekte und die damit assoziierten Folgen das Interesse auf sich gezogen hat. So wurde die dominante Vererbung einer Missense-Mutation identifiziert, welche zum Austausch einer Aminosäure im WNT1-Genprodukt und so zu einem Funktionsverlust von WNT1 führt. Bei Analyse einer Familie mit dieser Veränderung der Proteinstruktur wies die Mehrzahl der Familienmitglieder eine früh einsetzende Form der Osteoporose mit gehäuftem Auftreten von Spontanfrakturen und erniedrigter Knochendichte bei erniedrigtem Knochenumbau auf (Laine et al., 2013).

Eine weitere Verknüpfung konnte zwischen Mutationen von *WNT1* und Osteogenesis imperfecta gezogen werden. Bei dieser genetisch vererbaren Erkrankung kommt es neben vermindertem Längenwachstum und Knochendeformationen zur Abnahme der Knochendichte und Strukturdefiziten, was zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt. Auch nicht skelettbezogene Manifestationen wie Zahndefekte, blaue Skleren und Muskelschwäche können beobachtet werden (Rauch und Glorieux, 2004, Forlino et al., 2011). Während die bekannten Formen bisher mit Defekten des Kollagens Typ I assoziiert wurden (Steiner et al., 1993, Forlino und Marini, 2016), konnten kürzlich rezessiv vererbte *WNT1*-Mutationen, welche zu einer unvollständigen Expression des Signalmoleküls führen, als Ursache für die Erkrankung mit teils schweren Verläufen ausgemacht werden (Keupp et al., 2013, Laine et al., 2013).

Nach diesen Entdeckungen wurden Mausversuche durchgeführt, um die Signalübertragung und die Wirkungswiese von Wnt1 auf den Knochen genauer zu untersuchen.

Beim sogenannten *swaying* Modell ($Wnt1^{sw/sw}$) sorgt eine Frameshift-Mutation für das Fehlen der carboxy-terminalen Hälfte des Wnt1-Proteins (Thomas et al., 1991). Während homozygote *Wnt1*-Nullallele aufgrund der essentiellen Rolle des Liganden in der Entwicklung des zentralen Nervensystems meist zu embryonaler Letalität führten (McMahon und Bradley, 1990), zeigten die homozygoten $Wnt1^{sw/sw}$ -Mäuse eine Ein-Monats-Mortalität von ca. 30%. So bot sich die Möglichkeit, die Folgen eines dysfunktionalen Wnt1 Liganden auf den Knochenstoffwechsel ausgewachsener Tiere zu analysieren. Dies war von besonderem Interesse, nachdem die *swaying* Mutation als Auslöser einer Variante der Osteogenesis imperfecta in der Maus identifiziert wurde. Die untersuchten Mäuse zeigten Wachstumsdefizite, eine verminderte Dichte des trabekulären Knochenanteils, eine Minderung der Kortikalis-Dicke und ein gehäuftes Auftreten von Spontanfrakturen. Außer Kleinhirndefekten, wie sie auch bei der humanen OI durch die *WNT1*-Mutation zu beobachten sind, konnten bei den $Wnt1^{sw/sw}$ -Mäusen keine extraossären OI Manifestationen beobachtet werden (Joeng et al., 2014). Wie in der humanen Form ist auch in den $Wnt1^{sw/sw}$ -Mäusen die Expressivität der OI unterschiedlich und reicht von einem leichten Anstieg in der Frakturanfälligkeit bis hin zu bereits pränatal auftretenden, teils letalen Frakturen (van Dijk et al., 2011).

Die zelluläre und molekulare Analyse legte darüber hinaus offen, dass die Beeinträchtigung der Knochenstruktur im *swaying* Modell einer verminderten Aktivität der Osteoblasten geschuldet ist, wohingegen die Anzahl dieser sowie die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten identisch zum Wildtypen bleibt. Die Ergebnisse bestätigen somit den hier beobachteten Ansatzpunkt von Wnt1 im Knochenstoffwechsel, abstrahiert als Förderung des Aufbaus von Knochensubstanz bei gleichbleibender Resorptionslage. Während im $Wnt1^{sw/sw}$ -Modell lediglich die verminderte Aktivität der Osteoblasten für die reduzierte Knochenbildung identifiziert werden kann, ist der osteoanabole Effekt im hier analysierten Modell neben der Aktivitätssteigerung auch auf eine vermehrte

Anzahl der Osteoblasten, möglicherweise verursacht durch Steigerung der Zellproliferation durch Wnt1 zurückzuführen.

Die globale Deletion der *Wnt1^{sw/sw}*-Mäuse lässt keine Rückschlüsse darauf zu, ob die Signalwirkung von Wnt1 lokal oder systemisch vermittelt wird. Zu diesem Zwecke wurde 2017 ein Mausmodell mit spezifischer Deletion von *Wnt1* (*Wnt1^{fl/fl} Dmp1-Cre*) in Osteoblasten eines späten Differenzierungsstadiums und in Osteozyten etabliert (Joeng et al., 2017). Die Tiere zeigten eine herabgesetzte trabekuläre Knochendichte und eine verminderte Dicke der Kortikalis mit folglich erhöhter Frakturanfälligkeit. Auch hier wurde als zelluläre Ursache die erniedrigte Aktivität der Osteoblasten ermittelt, während deren Anzahl, sowie Anzahl und Aktivität der Osteoklasten identisch blieb, sodass die Hypothese einer lokal vermittelten Wirkung von Wnt1 und der osteoblastischen Zelllinie als physiologische Quelle von Wnt1 gestützt wird. Um das osteoanabole Potential von Wnt1 zu evaluieren, entwickelten Joeng et al. darüberhinaus ein Modell, welches Wnt1 in Osteoblasten später Differenzierungsstadien, sowie in Osteozyten überexprimiert (*Dmp1-Cre Rosa26W^{wnt1/+}*) und so dem vorgestellten Modell ähnelt. Die Analyse ergab auch hier eine deutliche Steigerung der trabekulären Knochendichte sowie eine Steigerung der Kortikalis-Dicke. Diese wird erreicht durch eine Steigerung der Osteoblasten-Aktivität und -Anzahl bei unveränderter Anzahl und Aktivität der Osteoklasten, was dem hier beobachteten Mechanismus entspricht. Warum bei den vorgestellten loss-of-function Modellen *Wnt1^{sw/sw}* und *Wnt1^{fl/fl} Dmp1-Cre* hingegen nur auf die Aktivität der Osteoblasten Einfluss genommen wird, bleibt unklar. Die starke osteoanabole Wirkung von Wnt1 im analysierten Modell ist unabhängig vom Alter der Mäuse und nimmt mit Verlängerung des Induktionszeitraums weiter zu. In den zum Analysezeitpunkt zwei Monate alten *Dmp1-Cre Rosa26W^{wnt1/+}* Mäusen wurde kontinuierlich *Wnt1* überexprimiert, weshalb das hohe Ausmaß des Effektes, beispielsweise eine gegenüber der Wildtyp-Kontrolle ca. fünffach erhöhte Knochendichte, mit dem analysierten Modell zu vergleichen ist. Eine Abhängigkeit des Effektes von der Expressionsdauer ist in beiden Modellen denkbar. Ob der Wnt1-Effekt auch bei Langzeitexposition erhalten bleibt und sich bei normalisierter Wnt1-Expression reversibel zeigt ist insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung

medikamentöser Wirkstoffe zu analysieren. Dies wäre beispielsweise mit dem verwendeten Doxycyclin-abhängigen Promotor möglich.

Auch wenn der deutliche Effekt bei knochenzell-spezifischer Expression im *Dmp1-Cre Rosa26W^{wnt1/+}* und im hier untersuchten Modell auf eine para- oder juxtakrine Signalübermittlung hindeutet, wäre eine systemische Wirkung beispielsweise mit Ausübung des osteoanabolen Effektes über die Sekretion eines weiteren Hormons möglich. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise bei dem Rezeptor Lrp5 kontrovers diskutiert, nachdem eine Studie darauf hinwies, dass die osteoanabole Wirkung des Rezeptors über die Serotoninsekretion im Duodenum vermittelt wird (Yadav et al., 2008, Cui et al., 2014). Zur Untersuchung einer systemischen Wirkung von Wnt1 wäre es denkbar, ein Mausmodell mit Überexpression von Wnt1 in Zellen eines endokrinen Organs, wie dem Pankreas zu entwickeln und den Effekt auf den Knochen mit der hier untersuchten knochenspezifischen Überexpression zu vergleichen.

4.2 Wnt1-Signalübermittlung

Der Wnt-Signalweg geriet erstmals in den Fokus osteologischer Untersuchungen, als Mutationen des Wnt-Co-Rezeptor LRP5 in den Zusammenhang mit schweren Erkrankungen des Knochenstoffwechsels gebracht werden konnten. So wurden rezessiv vererbte, inaktivierende *LRP5*-Mutationen als Ursache des Osteoporose-Pseudoglioma-Syndroms identifiziert, welches sich neben Fehlentwicklungen des Auges durch bereits im Kindesalter auftretende, schwere Osteoporose mit Spontanfrakturen charakterisiert (Gong et al., 2001, Streeten et al., 2008). Dagegen wurden in unterschiedlichen Familien mit dominant vererbten, aktivierenden Mutationen des LRP5-Rezeptors eine abnorm gesteigerte Knochendichte beobachtet (Johnson et al., 1997, Boyden et al., 2002). Die Wirkung inaktivierender und aktivierender Mutationen des Rezeptors auf den Knochenstoffwechsel konnte auch in entsprechend veränderten Mausmodellen reproduziert werden (Kato et al., 2002, Niziolek et al., 2011). Darüberhinaus ist die Beteiligung von LRP5 an der *Mechanotransduktion*, der Überleitung mechanischer Reize in biochemische

Signale im Knochen nachgewiesen, die über den WNT-Signalweg vermittelt wird (Sawakami et al., 2006, Saxon et al., 2011), was den LRP5-Rezeptor als wichtige Stellschraube im Knochenstoffwechsel etabliert. Da in vorangegangenen Studien bereits gezeigt wurde, dass WNT1 in vitro in der Lage ist, mit LRP5 zu interagieren und die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges zu erhöhen (Keupp et al., 2013), lag die Übertragung des WNT1-Signals durch LRP5 nahe. Wie in dieser Arbeit demonstriert, kann der Phänotyp der *Wnt1*-transgenen Mäuse durch die globale Defizienz des Lrp5-Rezeptors jedoch nicht vollständig revidiert werden, was den Lrp5-Rezeptor als Übermittler des osteoanabolen Wnt1-Effektes infrage stellt.

Die fehlende Abschwächung des Wnt1- Effektes durch die Deletion von Lrp5 im Mausmodell schließt eine Beteiligung von Lrp5 an der Signalübermittlung von Wnt1 nicht aus. Um das volle Potential des Wnt1-Signalweges auszuschöpfen, ist es dennoch ratsam, potentielle Mechanismen zu diskutieren und gegebenenfalls zum Lrp5-Rezeptor alternative therapeutische Ansatzpunkte offenzulegen. Neben Lrp5 gilt auch der in seiner extrazellulären Bindungsdomäne strukturell weitgehend identische Rezeptor Lrp6 als potentieller Co-Rezeptor für eine kanonische Wnt1-Signalübertragung (Williams und Insogna, 2009). In Bindungsassays wurde die Interaktion von Lrp6 mit Wnt1 nachgewiesen (Tamai et al., 2000, Ettenberg et al., 2010). Es wurde zudem gezeigt, dass LRP6 - im Gegensatz zu LRP5 – für Wirkung der Parathormon-Therapie unerlässlich ist, was die Vermittlung einer osteoanabolen Wirkung nahe legt (Sawakami et al., 2006, Wan et al., 2008).

Möglich wäre eine redundante Beteiligung der beiden Rezeptoren LRP5 und LRP6 an der WNT1-Signalübermittlung, sodass der Effekt im Normalfall über beide Rezeptoren vermittelt wird und bei Ausfall eines Rezeptors eine kompensatorische Übernahme der Funktion durch den jeweils anderen Rezeptor stattfinden kann. Gestützt wird diese Vermutung durch den Nachweis einer redundanten Funktion von Lrp5 und Lrp6 bei der Zelldifferenzierung des Darmepithels der Maus (Zhong et al., 2012). Ein weiteres Indiz für eine redundante Funktion von Lrp5 und Lrp6 liefert eine Studie, welche das Signalverhalten des WNT-Signalinhibitors Sclerostin, kodiert durch das Gen *SOST* untersucht. Sclerostin unterbindet physiologischerweise die

osteoanabole Wirkung von WNT über die Blockade des LRP5-Rezeptors. Eine Defizienz von *SOST* hat demnach eine aufbauende Wirkung auf den Knochen. Bei Mäusen mit einer Defizienz von *Sost* und *Lrp5* war die Knochendichte ähnlich erhöht wie bei alleiniger *Sost*-Defizienz. Wurde jedoch zusätzlich die Wnt-Bindungsstelle an Lrp6 durch einen spezifischen Antikörper blockiert, so zeigte sich die Knochendichte von *Lrp5^{-/-}Sost^{-/-}* Mäusen normalisiert (Chang et al., 2014). Neben der Erklärung des fehlenden Effektes der *Wnt1*-Deletion auf die *Wnt1*-Überexpression würde eine redundante Funktion zugleich die Chance zweier therapeutischer Ansatzpunkte für Osteoporose über LRP5 und LRP6 eröffnen. Um eine kompensatorische Signalübertragung der Rezeptoren zu untersuchen, wäre ein Mausmodell mit Deletion von *Lrp5* und *Lrp6* wie bei der vorgestellten Studie zum Darmepithel (Zhong et al., 2012) sowie einer Überexpression von *Wnt1* geeignet.

Neben dem an der Übertragung des Wnt-Signals beteiligten Co-Rezeptor ist auch der Haupt-Rezeptor vom Frizzled-Typ für ein besseres Verständnis des Signalweges und die Entwicklung osteoanaboler Wirkstoffe von Interesse. Von den zehn bekannten Subtypen war bisher insbesondere Frizzled-9 im Fokus osteologischer Studien, da er während der frühen Osteoblasten-Differenzierung in Mäusen vermehrt exprimiert wird und inaktivierende Mutationen des Rezeptors die Knochenbildung hemmen (Albers et al., 2011). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor an der Frakturheilung beteiligt ist (Albers et al., 2011, Heilmann et al., 2013). Aufgrund der vorgestellten Knochenphänotypen bei Mäusen mit *Lrp5*-Mutationen und dem Einfluss von β -Catenin, dem zentralen Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges beispielweise auf die Osteoblasten-Differenzierung (Day et al., 2005) galt der kanonische Wnt-Signalweg lange als maßgeblich im Knochenstoffwechsel. Der nicht-kanonisch agierende Rezeptor *Fzd9* ist dagegen ein Indikator für die Beteiligung nicht-kanonischer Wnt-Signalübertragung am Knochenstoffwechsel. Als aussichtsreich gilt hier der mTOR-Signalweg. Eine osteoanabole Wirkung mittels mTORC1 konnte bereits für *Wnt7b* durch Steigerung der Osteoblasten-Anzahl und -Aktivität (Chen et al., 2014) sowie für *Wnt3a* durch Förderung der Osteoblasten-Differenzierung (Esen et al., 2013) nachgewiesen werden. Eine aktuelle Studie beobachtete zudem die Steigerung der Differenzierung und

Mineralisierungsaktivität von Osteoblasten durch Wnt1 über mTORC1 in vitro und legt somit eine Beteiligung von mTOR an der Übertragung eines osteoanabolen Wnt1-Signals nahe (Joeng et al., 2017).

4.3 Wnt1 als Ansatzpunkt einer osteoanabolen Therapie

Mit rund 200 Millionen betroffenen Patienten weltweit stellt die Osteoporose einen wesentlichen Kostenfaktor für die Gesundheitssysteme dar (Sozen et al., 2017). Insbesondere bei älteren Patienten ziehen Frakturen durch Krankenhausaufenthalte und Bewegungseinschränkung eine erhebliche Verschlechterung der gesamten körperlichen Konstitution nach sich. Die mit osteoporotischen Frakturen verbundenen Folgekosten sind schwer messbar, wurden jedoch im Jahr 2010 alleine in der EU auf fast 40 Milliarden Euro jährlich geschätzt und sollen bis zum Jahr 2025 um 25 % steigen (Hernlund et al., 2013). Die durch ein Ungleichgewicht aus Knochenresorption und Knochenformation hervorgerufene Osteoporose wird überwiegend durch Medikamente behandelt, welche die Resorption hemmen (Tu et al., 2018).

Am häufigsten eingesetzt wird die Gruppe der Bisphosphonate. Durch Bindung an das Hydroxylapatit des Knochens und Inkorporation durch die Osteoklasten hemmen sie deren Funktion und wirken somit antiresorptiv (Drake et al., 2008). Dadurch kann initial die Knochendichte erhöht und die Frakturrate vermindert werden. Bei der Langzeitbehandlung mit Bisphosphonaten wurden jedoch steigende Zahlen von atypischen Femurfrakturen und Kiefernekrosen beobachtet, weshalb derzeit eine Beschränkung der Behandlungsdauer auf drei bis fünf Jahre empfohlen wird (Adler et al., 2016).

Auch der kürzlich zur Behandlung der Osteoporose zugelassene Antikörper Denosumab hemmt die Resorption, indem er wie OPG den pro-resorptiven Liganden RANKL bindet (Narayanan, 2013). Zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose werden daneben die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) eingesetzt, welche als Agonisten an spezifischen Östrogenrezeptoren die Wirkung des Östrogens auf den Knochenstoffwechsel imitieren und somit ebenfalls antiresorptiv wirken (Rey et al., 2009, Narayanan, 2013).

Es liegt nahe, dass die Hemmung der Knochenresorption und die damit einhergehende Einschränkung der Knochenreparatur langfristig zu einer Verminderung der Knochenstabilität führt. So beschreiben Studien beispielsweise die Anhäufung von stabilitätsgefährdenden Mikrofrakturen bei Bisphosphonat-Gebrauch von über fünf Jahren (Ma et al., 2017). Eine vergleichbare Pathogenese kann auch bei dem Krankheitsbild der Osteopetrose beobachtet werden, bei welchem die Dysfunktion der Osteoklasten eine pathologische Anhäufung von Knochengewebe hervorruft. Infolge der gestörten Mikroarchitektur besteht hier trotz erhöhter Knochendichte eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit für Frakturen (Stark und Savarirayan, 2009).

Folglich ist es für die langfristige Therapie der Osteoporose von größtem Interesse, Wirkstoffe, welche die osteoanabole Seite des Knochenumbaus steigern, zu entwickeln. Hier ist bisher nur das PTH-Analogon Teriparatid für den klinischen Gebrauch zugelassen, welches aufgrund der täglich notwendigen subkutanen Injektion eher als Reservetherapie der Osteoporose gilt und erst nach mehreren Monaten Anwendung die gewünschte Kräftigung des Knochens erreicht (Uusi-Rasi et al., 2005, Nickolaus, 2010). Des Weiteren wird insbesondere in der Anfangsphase der Teriparatid-Therapie neben dem Knochenaufbau auch die Knochenresorption gesteigert (Neer et al., 2001), was die Häufung von Fällen einer potentiell lebensbedrohlichen Hyperkalzämie erklärt (Karatoprak et al., 2012, Hajime et al., 2014).

Der kürzlich entwickelte Wirkstoff Abaloparatid ist ein Analogon des *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP). Trotz Bindung an den selben Rezeptor wie Teriparatid, den *parathyroid hormone receptor 1*, übt Abaloparatid wie auch PTHrP aufgrund selektiver Bindungseigenschaften einen geringeren Einfluss auf die Knochenresorption aus (Dean et al., 2008). So zeigte sich in ersten klinischen Studien ein signifikant vermindertes Auftreten von Hyperkalzämien gegenüber Teriparatid bei zugleich effizienterer Steigerung der Knochendichte unter vergleichbarer Dosierung (Leder et al., 2015).

Einen weiteren osteoanabolen Therapieansatz bietet die Hemmung des vorgestellten LRP5/6-Rezeptorblockers Sclerostin. Klinische Studien mit dem Sclerostin-Antikörper Romosozumab wiesen den osteoprotektiven Effekt durch

Minderung der Inhibition des WNT-Signalweges nach. So konnte bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose die Inzidenz von Wirbelkörperfrakturen signifikant gesenkt werden (McClung und Grauer, 2014, Cosman et al., 2016). Aufgrund der in einer weiteren klinischen Studie beobachteten steigenden Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse wurde die Zulassung des Medikaments jedoch vorerst zurückgestellt (Saag et al., 2017).

Ein weiteres Potential für Wnt1-vermittelte Therapieansätze bietet die Osteogenesis Imperfecta. Bei der verhältnismäßig seltenen Erbkrankheit haben sich bisher fast ausschließlich Bisphosphonate als Therapie etabliert (Sakkers et al., 2004, Ward et al., 2011, Barros et al., 2012, Saag et al., 2017). Obwohl durch die Bisphosphonat-Therapie eine Steigerung der Knochendichte beobachtet werden kann, finden sich bezüglich der dauerhaften Verringerung der Frakturrate widersprüchliche Studienergebnisse (Dwan et al., 2016). Auch wenn durch die Kollagendefekte hervorgerufene, extraossäre Manifestationen, wie Muskelschwäche durch die osteoanabole Therapie nicht erfasst werden, könnten die Betroffenen von einer Wnt1-vermittelten Stärkung der Knochenstruktur und einer Verringerung der Frakturrate profitieren. Eine Besondere Relevanz hätte die Wnt1-basierte Therapie für die durch Wnt1-Gendefekte induzierte OI, da Bisphosphonate hier nur eine abgeschwächte Wirkung zeigen (Palomo et al., 2014).

Wie aufgeführt, können selbst geringfügige Manipulationen des Wnt-Signalweges schwerwiegende Erkrankungen nach sich ziehen (Gong et al., 2001, Kato et al., 2002, Nusse, 2005, Laine et al., 2013). Insbesondere hinsichtlich der Entdeckung von Wnt1 als Proto-Onkogen für Brustkrebs (Nusse und Varmus, 1982) wäre der nächste Schritt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe die Analyse von Langzeitnebenwirkungen einer Wnt1-Überexpression. Die in dieser Arbeit untersuchte Überexpression von Wnt1 ist durch ihren altersunabhängig starken Effekt und dessen schnellen Eintritt von großem Interesse für die Entwicklung neuer Wirkstoffgruppen. Für effektive und zugleich nebenwirkungsarme Medikamente wäre die Identifizierung der beteiligten und bestenfalls knochenspezifischen Rezeptoren von Vorteil und sollte in künftigen Studien weiter untersucht werden. Durch die Erkenntnis, dass die Wnt1-Signalübermittlung unabhängig vom Rezeptor Lrp5 stattfinden kann

ist die Entwicklung neuer, Lrp5-unabhängiger, osteoanaboler Medikamente über Wnt1 denkbar. Durch ein intermittierendes Therapieregime eines Wnt1-vermittelten Wirkstoffes beispielsweise im Wechsel mit einem Sclerostin-Antikörper, Abaloparatid und Bisphosphonaten könnten Langzeitnebenwirkungen der einzelnen Wirkstoffe minimiert werden.

5 Zusammenfassung

Seitdem Mutationen von *Wnt1* mit schweren Erkrankungen des Skelettsystems in Verbindung gebracht werden konnten, gilt der Wnt-Signalweg und insbesondere der Ligand Wnt1 als wichtiger Regulator des Knochenstoffwechsels. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen von Knochenmasseverlustsyndromen wie der Osteoporose sollte der Wirkungsmechanismus von Wnt1 in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Dazu wurde ein Mausmodell mit Osteoblasten-spezifischer Wnt1-Überexpression eingesetzt. Schon nach einwöchiger Induktion konnte ein deutlicher Zuwachs der Knochensubstanz beobachtet werden, welcher sich durch längere Induktionsperioden weiter steigern ließ und keine Abhängigkeit vom Alter oder vom Geschlecht der Tiere zeigte. Auf zellulärer Ebene konnte als Ursache eine Steigerung der Osteoblastenanzahl und –Aktivität bei konstanter Anzahl der Osteoklasten identifiziert werden. Durch in vitro Untersuchungen konnte eine gesteigerte Proliferation transgener Osteoblasten in Doxycyclin-freiem Zellkultur-Medium nachgewiesen werden. Eine Expressionsanalyse unterschiedlicher Gewebe der Mäuse zeigte eine erhöhte Expression von *Wnt1* in verschiedenen Knochenanteilen der transgenen Tiere, was auf einen parakrinen Signalmechanismus hindeutet.

Wegen seiner Mutationen, die den Knochenstoffwechsel beeinträchtigen und seiner Funktion als Co-Rezeptor des Wnt-Signalweges lag eine Beteiligung von Lrp5 bei der Übermittlung des osteoanabolen Wnt1-Signals nahe. Auch im Hinblick auf Ansatzpunkte der osteoanabolen Therapie sollte die Relevanz von Lrp5 bei der Wnt1-Signalübertragung evaluiert werden. Dazu wurde das transgene Wnt1-Modell mit einem Lrp5-defizienten Mausmodell kombiniert. Die histologische Auswertung ergab hierbei, dass der Wnt1-Effekt unabhängig von Lrp5 vermittelt wird.

Der Nachweis der schnellen und stark ausgeprägten Steigerung des Knochenaufbaus etabliert Wnt1 als aussichtsreichen Ansatzpunkt für die Therapie von Osteoporose und weiteren Knochenerkrankungen.

Since mutations of Wnt1 have been associated with severe diseases of the skeletal system, the Wnt signalling pathway and in particular the Wnt1 ligand have been regarded as important regulators of bone metabolism. With respect to the development of new therapeutic options for bone loss syndromes, such as osteoporosis, the mechanism of action of Wnt1 should be investigated in more detail in this project. A mouse model with osteoblast-specific Wnt1 overexpression was used. After one week of induction already, a significant increase in bone mass was observed, which could be further increased by longer induction periods and did not show dependence on age or sex of the animals. At the cellular level, an increase in number and activity of osteoblasts with a constant number of osteoclasts could be identified as the cause. In vitro investigations showed an increased proliferation of transgenic osteoblasts in doxycycline-free cell culture medium. An expression analysis of different tissues of mice showed an increased expression of Wnt1 in different bone parts of the transgenic animals, suggesting a paracrine signalling mechanism.

Due to its mutations affecting bone metabolism and its function as a Wnt co-receptor of the Wnt pathway, involvement of the Lrp5 receptor in the transmission of an osteoanabolic Wnt1 signal was suggested. The relevance of Lrp5 in Wnt1 signal transduction should also be evaluated with regard to the starting points of osteoanabolic therapy. Therefore, the Wnt1 transgenic model was combined with a Lrp5 deficient mouse model. Histological evaluation showed that the Wnt1 effect is mediated independently of Lrp5.

The detection of the rapid and powerful increase in bone formation established Wnt1 as a promising target for the treatment of osteoporosis and other bone diseases.

6 Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro Computertomographie
ATF4	Activating transcription factor 4
BF	Braunes Fettgewebe
BFR/BS	Bone formation rate per bone surface (Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche)
BMU	Basic multicellular unit
BrdU	Bromdesoxyuridin
BV/TV	Bone volume per tissue volume = Knochenvolumen pro Gewebevolumen
C.Th	Cortical Thickness (kortikale Dicke)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CFU	Colony forming units (Kolonie-bildenden Einheiten)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dvl	Dishevelled
Fzd	Frizzled
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
KO	Knock-out
Lrp	Low density lipoprotein receptor-related protein
N.Ob/B.Pm	Number of osteoblasts per bone perimeter (Osteoblastenanzahl pro Knochenperimeter)
N.Oc/B.Pm	Number of osteoclasts per bone perimeter (Osteoklastenanzahl pro Knochenperimeter)
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MT1-MMP	Membrane-type 1 matrix metalloprotease
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
Ob.S/BS	Osteoblast surface per bone surface (Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche)
Oc.S/BS	Osteoclast surface per bone surface

Abkürzungsverzeichnis

	(Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche)
Opg	Osteoprotegerin
PCP	Planar cell polarity (planare Zellpolarität)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTH	Parathormon
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
r.E.	Relative Expression
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleic acid
ROCK	Rho Kinase
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
rpm	Rounds per minute
RUNX 2	Runt-related transcription factor 2
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SOST	Sclerostin
T.N	Trabecular number (Trabekelanzahl)
T.Sp	Trabecular Spacing (Trabekelabstand)
T.Th	Trabecular thickness (Trabekeldicke)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Weißes Fettgewebe
WT	Wildtyp

7 Quellennachweis

1993. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94, 646-50.
- ABERLE, H., BAUER, A., STAPPERT, J., KISPERT, A. & KEMLER, R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16, 3797-804.
- ADLER, R. A., EL-HAJJ FULEIHAN, G., BAUER, D. C., CAMACHO, P. M., CLARKE, B. L., CLINES, G. A., COMPSTON, J. E., DRAKE, M. T., EDWARDS, B. J., FAVUS, M. J., GREENSPAN, S. L., MCKINNEY, R., JR., PIGNOLO, R. J. & SELLMEYER, D. E. 2016. Managing Osteoporosis in Patients on Long-Term Bisphosphonate Treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*, 31, 1910.
- AESCHLIMANN, D. & EVANS, B. A. 2004. The vital osteoclast: how is it regulated? *Cell Death Differ*, 11 Suppl 1, S5-7.
- ALBERS, J., SCHULZE, J., BEIL, F. T., GEBAUER, M., BARANOWSKY, A., KELLER, J., MARSHALL, R. P., WINTGES, K., FRIEDRICH, F. W., PRIEMEL, M., SCHILLING, A. F., RUEGER, J. M., CORNILS, K., FEHSE, B., STREICHERT, T., SAUTER, G., JAKOB, F., INSOGNA, K. L., POBER, B., KNOBELOCH, K. P., FRANCKE, U., AMLING, M. & SCHINKE, T. 2011. Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol*, 192, 1057-72.
- BARON, R. & KNEISSEL, M. 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 19, 179-92.
- BARROS, E. R., SARAIVA, G. L., DE OLIVEIRA, T. P. & LAZARETTI-CASTRO, M. 2012. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 25, 485-91.
- BASSETT, C. A. & HERRMANN, I. 1961. Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature*, 190, 460-1.
- BAUMAN, W. A., SPUNGEN, A. M., WANG, J., PIERSON, R. N., JR. & SCHWARTZ, E. 1999. Continuous loss of bone during chronic immobilization: a monozygotic twin study. *Osteoporos Int*, 10, 123-7.
- BEHRENS, J., VON KRIES, J. P., KUHLE, M., BRUHN, L., WEDLICH, D., GROSSCHEDL, R. & BIRCHMEIER, W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382, 638-42.
- BILEZIKIAN, J., RAISZ, L. & RODAN, G. 2002. *Principles of Bone Biology*, San Diego, Academic Press.
- BIRBRAIR, A. & FRENETTE, P. S. 2016. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*, 1370, 82-96.
- BLAIR, H. C., LARROUTURE, Q. C., LI, Y., LIN, H., BEER-STOLTZ, D., LIU, L., TUAN, R. S., ROBINSON, L. J., SCHLESINGER, P. H. & NELSON, D. J. 2017. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*, 23, 268-280.
- BLAKE, G. M. & FOGELMAN, I. 2007. The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J*, 83, 509-17.
- BODY, J. J., BERGMANN, P., BOONEN, S., BOUTSEN, Y., BRUYERE, O., DEVOGELAER, J. P., GOEMAERE, S., HOLLEVOET, N., KAUFMAN, J. M., MILISEN, K., ROZENBERG, S. & REGINSTER, J. Y. 2011. Non-pharmacological management of osteoporosis: a consensus of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*, 22, 2769-88.
- BONEWALD, L. F. 2011. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26, 229-38.
- BOUTROS, M., PARICIO, N., STRUTT, D. I. & MLODZIK, M. 1998. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*, 94, 109-18.
- BOYDEN, L. M., MAO, J., BELSKY, J., MITZNER, L., FARHI, A., MITNICK, M. A., WU, D., INSOGNA, K. & LIFTON, R. P. 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, 346, 1513-21.
- BRUNKOW, M. E., GARDNER, J. C., VAN NESS, J., PAEPER, B. W., KOVACEVICH, B. R., PROLL, S., SKONIER, J. E., ZHAO, L., SABO, P. J., FU, Y., ALISCH, R. S., GILLET, T.

- L., COLBERT, T., TACCONI, P., GALAS, D., HAMERSMA, H., BEIGHTON, P. & MULLIGAN, J. 2001. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet*, 68, 577-89.
- BURGER, E. H. & KLEIN-NULEND, J. 1998. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone*, 22, 127S-130S.
- CADIGAN, K. M. & NUSSE, R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 11, 3286-305.
- CARDOSO, L., HERMAN, B. C., VERBORGT, O., LAUDIER, D., MAJESKA, R. J. & SCHAFFLER, M. B. 2009. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res*, 24, 597-605.
- CASTILHO, R. M., SQUARIZE, C. H., CHODOSH, L. A., WILLIAMS, B. O. & GUTKIND, J. S. 2009. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell*, 5, 279-89.
- CHANG, M. K., KRAMER, I., KELLER, H., GOOI, J. H., COLLETT, C., JENKINS, D., ETTEMBERG, S. A., CONG, F., HALLEUX, C. & KNEISSEL, M. 2014. Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity. *J Bone Miner Res*, 29, 29-42.
- CHEN, J., TU, X., ESEN, E., JOENG, K. S., LIN, C., ARBEIT, J. M., RUEGG, M. A., HALL, M. N., MA, L. & LONG, F. 2014. WNT7B promotes bone formation in part through mTORC1. *PLoS Genet*, 10, e1004145.
- CHRISTODOULIDES, C., SCARDA, A., GRANZOTTO, M., MILAN, G., DALLA NORA, E., KEOGH, J., DE PERGOLA, G., STIRLING, H., PANNACCIULLI, N., SETHI, J. K., FEDERSPIEL, G., VIDAL-PUIG, A., FAROOQI, I. S., O'RAHILLY, S. & VETTOR, R. 2006. WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia*, 49, 678-84.
- CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-9.
- CLEVERS, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127, 469-80.
- COLNOT, C., LU, C., HU, D. & HELMS, J. A. 2004. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol*, 269, 55-69.
- COSMAN, F., CRITTENDEN, D. B., ADACHI, J. D., BINKLEY, N., CZERWINSKI, E., FERRARI, S., HOFBAUER, L. C., LAU, E., LEWIECKI, E. M., MIYAUCHI, A., ZERBINI, C. A., MILMONT, C. E., CHEN, L., MADDOX, J., MEISNER, P. D., LIBANATI, C. & GRAUER, A. 2016. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*, 375, 1532-1543.
- CUI, Y., NIZIOLEK, P. J., MACDONALD, B. T., ALENINA, N., MATTHES, S., JACOBSEN, C. M., CONLON, R. A., BROMMAGE, R., POWELL, D. R., HE, X., BADER, M., WILLIAMS, B. O., WARMAN, M. L. & ROBLING, A. G. 2014. Reply to Lrp5 regulation of bone mass and gut serotonin synthesis. *Nat Med*, 20, 1229-30.
- CUMMINGS, S. R. & MELTON, L. J. 2002. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*, 359, 1761-7.
- DAVIDSON, G., WU, W., SHEN, J., BILIC, J., FENGER, U., STANNEK, P., GLINKA, A. & NIEHRS, C. 2005. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 438, 867-72.
- DAY, T. F., GUO, X., GARRETT-BEAL, L. & YANG, Y. 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 8, 739-50.
- DE, A. 2011. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 745-56.
- DEAN, T., VILARDAGA, J. P., POTTS, J. T., JR. & GARDELLA, T. J. 2008. Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol*, 22, 156-66.
- DEL FATTORE, A., CAPPARIELLO, A. & TETI, A. 2008. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*, 42, 19-29.
- DOBBS, M. B., BUCKWALTER, J. & SALTZMAN, C. 1999. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. *Iowa Orthop J*, 19, 43-52.
- DRAKE, M. T., CLARKE, B. L. & KHOSLA, S. 2008. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*, 83, 1032-45.

- DRAKE, M. T., SRINIVASAN, B., MODDER, U. I., PETERSON, J. M., MCCREADY, L. K., RIGGS, B. L., DWYER, D., STOLINA, M., KOSTENUK, P. & KHOSLA, S. 2010. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 5056-62.
- DWAN, K., PHILLIPI, C. A., STEINER, R. D. & BASEL, D. 2016. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD005088.
- EASTELL, R., O'NEILL, T. W., HOFBAUER, L. C., LANGDAHL, B., REID, I. R., GOLD, D. T. & CUMMINGS, S. R. 2016. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16069.
- ESEN, E., CHEN, J., KARNER, C. M., OKUNADE, A. L., PATTERSON, B. W. & LONG, F. 2013. WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell Metab*, 17, 745-55.
- ETTENBERG, S. A., CHARLAT, O., DALEY, M. P., LIU, S., VINCENT, K. J., STUART, D. D., SCHULLER, A. G., YUAN, J., OSPINA, B., GREEN, J., YU, Q., WALSH, R., LI, S., SCHMITZ, R., HEINE, H., BILIC, S., OSTROM, L., MOSHER, R., HARTLEPP, K. F., ZHU, Z., FAWELL, S., YAO, Y. M., STOVER, D., FINAN, P. M., PORTER, J. A., SELLERS, W. R., KLAGGE, I. M. & CONG, F. 2010. Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15473-8.
- FORLINO, A., CABRAL, W. A., BARNES, A. M. & MARINI, J. C. 2011. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 540-57.
- FORLINO, A. & MARINI, J. C. 2016. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 387, 1657-71.
- GOLDSTEIN, B., TAKESHITA, H., MIZUMOTO, K. & SAWA, H. 2006. Wnt signals can function as positional cues in establishing cell polarity. *Dev Cell*, 10, 391-6.
- GONG, Y., SLEE, R. B., FUKAI, N., RAWADI, G., ROMAN-ROMAN, S., REGINATO, A. M., WANG, H., CUNDY, T., GLORIEUX, F. H., LEV, D., ZACHARIN, M., OEXLE, K., MARCELINO, J., SUWAI, W., HEEGER, S., SABATAKOS, G., APTE, S., ADKINS, W. N., ALLGROVE, J., ARSLAN-KIRCHNER, M., BATCH, J. A., BEIGHTON, P., BLACK, G. C., BOLES, R. G., BOON, L. M., BORRONE, C., BRUNNER, H. G., CARLE, G. F., DALLAPICCOLA, B., DE PAEPE, A., FLOEGE, B., HALFHIDE, M. L., HALL, B., HENNEKAM, R. C., HIROSE, T., JANS, A., JUPPNER, H., KIM, C. A., KEPPLER-NOREUIL, K., KOHLSCHUETTER, A., LACOMBE, D., LAMBERT, M., LEMYRE, E., LETTEBOER, T., PELTONEN, L., RAMESAR, R. S., ROMANENGO, M., SOMER, H., STEICHEN-GERSDORF, E., STEINMANN, B., SULLIVAN, B., SUPERTIFURGA, A., SWOBODA, W., VAN DEN BOOGAARD, M. J., VAN HUL, W., VIKKULA, M., VOTRUBA, M., ZABEL, B., GARCIA, T., BARON, R., OLSEN, B. R., WARMAN, M. L. & OSTEOPOROSIS-PSEUDOGLOIOMA SYNDROME COLLABORATIVE, G. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107, 513-23.
- GREEN, J., NUSSE, R. & VAN AMERONGEN, R. 2014. The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- HAJIME, M., OKADA, Y., MORI, H. & TANAKA, Y. 2014. A case of teriparatide-induced severe hypophosphatemia and hypercalcemia. *J Bone Miner Metab*, 32, 601-4.
- HEILMANN, A., SCHINKE, T., BINDL, R., WEHNER, T., RAPP, A., HAFFNER-LUNTZER, M., NEMITZ, C., LIEDERT, A., AMLING, M. & IGNATIUS, A. 2013. The Wnt serpentine receptor Frizzled-9 regulates new bone formation in fracture healing. *PLoS One*, 8, e84232.
- HERNLUND, E., SVEDBOM, A., IVERGARD, M., COMPSTON, J., COOPER, C., STENMARK, J., MCCLOSKEY, E. V., JONSSON, B. & KANIS, J. A. 2013. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, 8, 136.
- HOLMBECK, K., BIANCO, P., PIDOUX, I., INOUE, S., BILLINGHURST, R. C., WU, W., CHRYSOVERGIS, K., YAMADA, S., BIRKEDAL-HANSEN, H. & POOLE, A. R. 2005. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci*, 118, 147-56.
- HUANG, Y. L. & NIEHRS, C. 2014. Polarized Wnt signaling regulates ectodermal cell fate in *Xenopus*. *Dev Cell*, 29, 250-7.

- HUTCHINS, B. I., LI, L. & KALIL, K. 2011. Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Dev Neurobiol*, 71, 269-83.
- IKEYA, M., LEE, S. M., JOHNSON, J. E., MCMAHON, A. P. & TAKADA, S. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*, 389, 966-70.
- INOKI, K., OUYANG, H., ZHU, T., LINDVALL, C., WANG, Y., ZHANG, X., YANG, Q., BENNETT, C., HARADA, Y., STANKUNAS, K., WANG, C. Y., HE, X., MACDOUGALD, O. A., YOU, M., WILLIAMS, B. O. & GUAN, K. L. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126, 955-68.
- INZERILLO, A. M., ZAIDI, M. & HUANG, C. L. 2004. Calcitonin: physiological actions and clinical applications. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 17, 931-40.
- JOENG, K. S., LEE, Y. C., JIANG, M. M., BERTIN, T. K., CHEN, Y., ABRAHAM, A. M., DING, H., BI, X., AMBROSE, C. G. & LEE, B. H. 2014. The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Hum Mol Genet*, 23, 4035-42.
- JOENG, K. S., LEE, Y. C., LIM, J., CHEN, Y., JIANG, M. M., MUNIVEZ, E., AMBROSE, C. & LEE, B. H. 2017. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis. *J Clin Invest*, 127, 2678-2688.
- JOHNSON, M. L., GONG, G., KIMBERLING, W., RECKER, S. M., KIMMEL, D. B. & RECKER, R. B. 1997. Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet*, 60, 1326-32.
- KANAZAWA, A., TSUKADA, S., SEKINE, A., TSUNODA, T., TAKAHASHI, A., KASHIWAGI, A., TANAKA, Y., BABAZONO, T., MATSUDA, M., KAKU, K., IWAMOTO, Y., KAWAMORI, R., KIKKAWA, R., NAKAMURA, Y. & MAEDA, S. 2004. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet*, 75, 832-43.
- KANNUS, P., HAAPASALO, H., SANKALO, M., SIEVANEN, H., PASANEN, M., HEINONEN, A., OJA, P. & VUORI, I. 1995. Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med*, 123, 27-31.
- KARATOPRAK, C., KAYATAS, K., KILICASLAN, H., YOLBAS, S., YAZIMCI, N. A., GUMUSKEMER, T. & DEMIRTUNC, R. 2012. Severe hypercalcemia due to teriparatide. *Indian J Pharmacol*, 44, 270-1.
- KARSENTY, G., KRONENBERG, H. M. & SETTEMBRE, C. 2009. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 629-48.
- 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., LANG, R. A., KARSENTY, G. & CHAN, L. 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*, 157, 303-14.
- KELLER, H. & KNEISSEL, M. 2005. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*, 37, 148-58.
- KELLER, J., CATALA-LEHNEN, P., HUEBNER, A. K., JESCHKE, A., HECKT, T., LUETH, A., KRAUSE, M., KOEHNE, T., ALBERS, J., SCHULZE, J., SCHILLING, S., HABERLAND, M., DENNINGER, H., NEVEN, M., HERMANS-BORGMAYER, I., STREICHERT, T., BREER, S., BARVENCIK, F., LEVKAU, B., RATHKOLB, B., WOLF, E., CALZADA-WACK, J., NEFF, F., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., DE ANGELIS, M. H., KLUTMANN, S., TSOURDI, E., HOFBAUER, L. C., KLEUSER, B., CHUN, J., SCHINKE, T. & AMLING, M. 2014. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun*, 5, 5215.
- KEUPP, K., BELEGGIA, F., KAYSERILI, H., BARNES, A. M., STEINER, M., SEMLER, O., FISCHER, B., YIGIT, G., JANDA, C. Y., BECKER, J., BREER, S., ALTUNOGLU, U., GRUNHAGEN, J., KRAWITZ, P., HECHT, J., SCHINKE, T., MAKAREEVA, E., LAUSCH, E., CANKAYA, T., CAPARROS-MARTIN, J. A., LAPUNZINA, P., TEMTAMY, S., AGLAN, M., ZABEL, B., EYSEL, P., KOERBER, F., LEIKIN, S., GARCIA, K. C., NETZER, C., SCHONAU, E., RUIZ-PEREZ, V. L., MUNDLOS, S., AMLING, M., KORNAK, U., MARINI, J. & WOLLNIK, B. 2013. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*, 92, 565-74.
- KOMEKADO, H., YAMAMOTO, H., CHIBA, T. & KIKUCHI, A. 2007. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells*, 12, 521-34.

- KOMORI, T. 2013. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*, 352, 191-8.
- KONG, Y. Y., YOSHIDA, H., SAROSI, I., TAN, H. L., TIMMS, E., CAPPARELLI, C., MORONY, S., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J., VAN, G., ITIE, A., KHOO, W., WAKEHAM, A., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., MAK, T. W., BOYLE, W. J. & PENNINGER, J. M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397, 315-23.
- KONTULAINEN, S., SIEVANEN, H., KANNUS, P., PASANEN, M. & VUORI, I. 2003. Effect of long-term impact-loading on mass, size, and estimated strength of humerus and radius of female racquet-sports players: a peripheral quantitative computed tomography study between young and old starters and controls. *J Bone Miner Res*, 18, 352-9.
- LAINE, C. M., JOENG, K. S., CAMPEAU, P. M., KIVIRANTA, R., TARKKONEN, K., GROVER, M., LU, J. T., PEKKINEN, M., WESSMAN, M., HEINO, T. J., NIEMINEN-PIHALA, V., ARONEN, M., LAINE, T., KROGER, H., COLE, W. G., LEHESJOKI, A. E., NEVAREZ, L., KRAKOW, D., CURRY, C. J., COHN, D. H., GIBBS, R. A., LEE, B. H. & MAKITIE, O. 2013. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med*, 368, 1809-16.
- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- LARROUTURE, Q. C., NELSON, D. J., ROBINSON, L. J., LIU, L., TOURKOVA, I., SCHLESINGER, P. H. & BLAIR, H. C. 2015. Chloride-hydrogen antiporters CIC-3 and CIC-5 drive osteoblast mineralization and regulate fine-structure bone patterning in vitro. *Physiol Rep*, 3.
- LEBLANC, A. D., SCHNEIDER, V. S., EVANS, H. J., ENGELBRETSON, D. A. & KREBS, J. M. 1990. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res*, 5, 843-50.
- LEDER, B. Z., O'DEA, L. S., ZANCHETTA, J. R., KUMAR, P., BANKS, K., MCKAY, K., LYTTLE, C. R. & HATTERSLEY, G. 2015. Effects of abaloparatide, a human parathyroid hormone-related peptide analog, on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 100, 697-706.
- LEKVEN, A. C., BUCKLES, G. R., KOSTAKIS, N. & MOON, R. T. 2003. Wnt1 and wnt10b function redundantly at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary. *Dev Biol*, 254, 172-87.
- LIN, J. T. & LANE, J. M. 2004. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res*, 126-34.
- LOH, K. M., VAN AMERONGEN, R. & NUSSE, R. 2016. Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Dev Cell*, 38, 643-55.
- LUXENBURG, C., GEBLINGER, D., KLEIN, E., ANDERSON, K., HANEIN, D., GEIGER, B. & ADDADI, L. 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*, 2, e179.
- MA, S., GOH, E. L., JIN, A., BHATTACHARYA, R., BOUGHTON, O. R., PATEL, B., KARUNARATNE, A., VO, N. T., ATWOOD, R., COBB, J. P., HANSEN, U. & ABEL, R. L. 2017. Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties. *Sci Rep*, 7, 43399.
- MACKIE, E. J., AHMED, Y. A., TATARCZUCH, L., CHEN, K. S. & MIRAMS, M. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 46-62.
- MACKIE, E. J., TATARCZUCH, L. & MIRAMS, M. 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*, 211, 109-21.
- MANDEL, H., SHEMER, R., BOROCHOWITZ, Z. U., OKOPNIK, M., KNOFF, C., INDELMAN, M., DRUGAN, A., TIOSANO, D., GERSHONI-BARUCH, R., CHODER, M. & SPRECHER, E. 2008. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet*, 82, 39-47.
- MAROTTI, G., FERRETTI, M., REMAGGI, F. & PALUMBO, C. 1995. Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone*, 16, 125-8.
- MARTIN, R. B. 1994. On the histologic measurement of osteonal BMU activation frequency. *Bone*, 15, 547-9.

- MATIC, I., MATTHEWS, B. G., WANG, X., DYMENT, N. A., WORTHLEY, D. L., ROWE, D. W., GRCEVIC, D. & KALAJZIC, I. 2016. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*, 34, 2930-2942.
- MCCLUNG, M. R. & GRAUER, A. 2014. Romosozumab in postmenopausal women with osteopenia. *N Engl J Med*, 370, 1664-5.
- MCMAHON, A. P. & BRADLEY, A. 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62, 1073-85.
- MCMAHON, A. P., JOYNER, A. L., BRADLEY, A. & MCMAHON, J. A. 1992. The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*, 69, 581-95.
- MESHCHERYAKOVA, A., MECHTCHERIAKOVA, D. & PIETSCHMANN, P. 2017. Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets*, 21, 725-737.
- MILLER, S. C., DE SAINT-GEORGES, L., BOWMAN, B. M. & JEE, W. S. 1989. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*, 3, 953-60; discussion 960-1.
- NAKASHIMA, K. & DE CROMBRUGGHE, B. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*, 19, 458-66.
- NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R. & DE CROMBRUGGHE, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
- NAKASHIMA, T., HAYASHI, M., FUKUNAGA, T., KURATA, K., OH-HORA, M., FENG, J. Q., BONEWALD, L. F., KODAMA, T., WUTZ, A., WAGNER, E. F., PENNINGER, J. M. & TAKAYANAGI, H. 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, 17, 1231-4.
- NARAYANAN, P. 2013. Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*, 2, 272-7.
- NEER, R. M., ARNAUD, C. D., ZANCHETTA, J. R., PRINCE, R., GAICH, G. A., REGINSTER, J. Y., HODSMAN, A. B., ERIKSEN, E. F., ISH-SHALOM, S., GENANT, H. K., WANG, O. & MITLAK, B. H. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 344, 1434-41.
- NESBITT, S. A. & HORTON, M. A. 1997. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science*, 276, 266-9.
- NICKOLAUS, B. 2010. Osteoporose: Teriparatid bei hohem Frakturrisiko. *Dtsch Arztebl International*, 107.
- NIEMANN, S., ZHAO, C., PASCU, F., STAHL, U., AULEPP, U., NISWANDER, L., WEBER, J. L. & MULLER, U. 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet*, 74, 558-63.
- NIZIOLEK, P. J., FARMER, T. L., CUI, Y., TURNER, C. H., WARMAN, M. L. & ROBLING, A. G. 2011. High-bone-mass-producing mutations in the Wnt signaling pathway result in distinct skeletal phenotypes. *Bone*, 49, 1010-9.
- NUSSE, R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, 15, 28-32.
- NUSSE, R., BROWN, A., PAPKOFF, J., SCAMBLER, P., SHACKLEFORD, G., MCMAHON, A., MOON, R. & VARMUS, H. 1991. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, 64, 231.
- NUSSE, R. & VARMUS, H. E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.
- ORWOLL, E. S., ADLER, R. A., AMIN, S., BINKLEY, N., LEWIECKI, E. M., PETAK, S. M., SHAPSES, S. A., SINAKI, M., WATTS, N. B. & SIBONGA, J. D. 2013. Skeletal health in long-duration astronauts: nature, assessment, and management recommendations from the NASA Bone Summit. *J Bone Miner Res*, 28, 1243-55.
- PACIFICI, R. 1996. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 11, 1043-51.
- PALOMO, T., AL-JALLAD, H., MOFFATT, P., GLORIEUX, F. H., LENTLE, B., ROSCHGER, P., KLAUSHOFER, K. & RAUCH, F. 2014. Skeletal characteristics associated with homozygous and heterozygous WNT1 mutations. *Bone*, 67, 63-70.
- PEDERSON, L., RUAN, M., WESTENDORF, J. J., KHOSLA, S. & OURSLER, M. J. 2008. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20764-9.

- PERSON, A. D., BEIRAGHI, S., SIEBEN, C. M., HERMANSON, S., NEUMANN, A. N., ROBU, M. E., SCHLEIFFARTH, J. R., BILLINGTON, C. J., JR., VAN BOKHOVEN, H., HOOGEBOOM, J. M., MAZZEU, J. F., PETRYK, A., SCHIMMENTI, L. A., BRUNNER, H. G., EKKER, S. C. & LOHR, J. L. 2010. WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn*, 239, 327-37.
- PISANI, P., RENNA, M. D., CONVERSANO, F., CASCIARO, E., MURATORE, M., QUARTA, E., PAOLA, M. D. & CASCIARO, S. 2013. Screening and early diagnosis of osteoporosis through X-ray and ultrasound based techniques. *World J Radiol*, 5, 398-410.
- POGODA, P., PRIEMEL, M., RUEGER, J. M. & AMLING, M. 2005. Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporos Int*, 16 Suppl 2, S18-24.
- PROFFITT, K. D. & VIRSHUP, D. M. 2012. Precise regulation of porcupine activity is required for physiological Wnt signaling. *J Biol Chem*, 287, 34167-78.
- QING, H., ARDESHIRPOUR, L., PAJEVIC, P. D., DUSEVICH, V., JAHN, K., KATO, S., WYSOLMERSKI, J. & BONEWALD, L. F. 2012. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*, 27, 1018-29.
- RAUCH, F. & GLORIEUX, F. H. 2004. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 363, 1377-85.
- REY, J. R., CERVINO, E. V., RENTERO, M. L., CRESPO, E. C., ALVARO, A. O. & CASILLAS, M. 2009. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. *Open Orthop J*, 3, 14-21.
- REZNIKOV, N., SHAHAR, R. & WEINER, S. 2014. Three-dimensional structure of human lamellar bone: the presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. *Bone*, 59, 93-104.
- RIGGS, B. L. 2000. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest*, 106, 1203-4.
- RIJSEWIJK, F., SCHUERMANN, M., WAGENAAR, E., PARREN, P., WEIGEL, D. & NUSSE, R. 1987. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50, 649-57.
- ROBIN, M., ALMEIDA, C., AZAIS, T., HAYE, B., ILLOUL, C., LESIEUR, J., GIRAUD-GUILLE, M. M., NASSIF, N. & HELARY, C. 2016. Involvement of 3D osteoblast migration and bone apatite during in vitro early osteocytogenesis. *Bone*, 88, 146-156.
- ROBLING, A. G., NIZIOLEK, P. J., BALDRIDGE, L. A., CONDON, K. W., ALLEN, M. R., ALAM, I., MANTILA, S. M., GLUHAK-HEINRICH, J., BELLIDO, T. M., HARRIS, S. E. & TURNER, C. H. 2008. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*, 283, 5866-75.
- ROLVIEN, T., KRAUSE, M., JESCHKE, A., YORGAN, T., PUSCHEL, K., SCHINKE, T., BUSSE, B., DEMAY, M. B. & AMLING, M. 2017. Vitamin D regulates osteocyte survival and perilacunar remodeling in human and murine bone. *Bone*, 103, 78-87.
- ROSS, S. E., HEMATI, N., LONGO, K. A., BENNETT, C. N., LUCAS, P. C., ERICKSON, R. L. & MACDOUGALD, O. A. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289, 950-3.
- SAAG, K. G., PETERSEN, J., BRANDI, M. L., KARAPLIS, A. C., LORENTZON, M., THOMAS, T., MADDOX, J., FAN, M., MEISNER, P. D. & GRAUER, A. 2017. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*, 377, 1417-1427.
- SAKKERS, R., KOK, D., ENGELBERT, R., VAN DONGEN, A., JANSEN, M., PRUIJS, H., VERBOUT, A., SCHWEITZER, D. & UITERWAAL, C. 2004. Skeletal effects and functional outcome with olpadronate in children with osteogenesis imperfecta: a 2-year randomised placebo-controlled study. *Lancet*, 363, 1427-31.
- SAWA, H. 2012. Control of cell polarity and asymmetric division in *C. elegans*. *Curr Top Dev Biol*, 101, 55-76.
- SAWAKAMI, K., ROBLING, A. G., AI, M., PITNER, N. D., LIU, D., WARDEN, S. J., LI, J., MAYE, P., ROWE, D. W., DUNCAN, R. L., WARMAN, M. L. & TURNER, C. H. 2006. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem*, 281, 23698-711.

- SAXON, L. K., JACKSON, B. F., SUGIYAMA, T., LANYON, L. E. & PRICE, J. S. 2011. Analysis of multiple bone responses to graded strains above functional levels, and to disuse, in mice in vivo show that the human Lrp5 G171V High Bone Mass mutation increases the osteogenic response to loading but that lack of Lrp5 activity reduces it. *Bone*, 49, 184-93.
- SEIFERT, J. R. & MLODZIK, M. 2007. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet*, 8, 126-38.
- SEMENOV, M. V., HABAS, R., MACDONALD, B. T. & HE, X. 2007. SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell*, 131, 1378.
- SHANG, Y. C., CHONG, Z. Z., WANG, S. & MAIESE, K. 2012. Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging (Albany NY)*, 4, 187-201.
- SHELD AHL, L. C., PARK, M., MALBON, C. C. & MOON, R. T. 1999. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol*, 9, 695-8.
- SHIN, S., WOLGAMOTT, L., YU, Y., BLENIS, J. & YOON, S. O. 2011. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, E1204-13.
- SMITH, S. P. & YEE, G. C. 1992. Hematopoiesis. *Pharmacotherapy*, 12, 11S-19S.
- SOMMERFELDT, D. W. & RUBIN, C. T. 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10 Suppl 2, S86-95.
- SOZEN, T., OZISIK, L. & BASARAN, N. C. 2017. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*, 4, 46-56.
- STARK, Z. & SAVARIRAYAN, R. 2009. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 5.
- STEINER, R. D., ADSIT, J. & BASEL, D. 1993. COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta. In: PAGON, R. A., ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., WALLACE, S. E., AMEMIYA, A., BEAN, L. J. H., BIRD, T. D., LEDBETTER, N., MEFFORD, H. C., SMITH, R. J. H. & STEPHENS, K. (eds.) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- STREETEN, E. A., MCBRIDE, D., PUFFENBERGER, E., HOFFMAN, M. E., POLLIN, T. I., DONNELLY, P., SACK, P. & MORTON, H. 2008. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: description of 9 new cases and beneficial response to bisphosphonates. *Bone*, 43, 584-90.
- TAMAI, K., SEMENOV, M., KATO, Y., SPOKONY, R., LIU, C., KATSUYAMA, Y., HESS, F., SAINT-JEANNET, J. P. & HE, X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 530-5.
- TAMAMURA, Y. & YAMAGUCHI, A. 2012. [Bone and tooth in calcium and phosphate metabolism]. *Clin Calcium*, 22, 11-7.
- TEITELBAUM, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289, 1504-8.
- THOMAS, K. R., MUSCI, T. S., NEUMANN, P. E. & CAPECCHI, M. R. 1991. Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell*, 67, 969-76.
- TU, K. N., LIE, J. D., WAN, C. K. V., CAMERON, M., AUSTEL, A. G., NGUYEN, J. K., VAN, K. & HYUN, D. 2018. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *P T*, 43, 92-104.
- 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. & BELLIDO, T. 2012. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*, 50, 209-17.
- UNNANUNTANA, A., GLADNICK, B. P., DONNELLY, E. & LANE, J. M. 2010. The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am*, 92, 743-53.
- UUSI-RASI, K., SEMANICK, L. M., ZANCHETTA, J. R., BOGADO, C. E., ERIKSEN, E. F., SATO, M. & BECK, T. J. 2005. Effects of teriparatide [rhPTH (1-34)] treatment on structural geometry of the proximal femur in elderly osteoporotic women. *Bone*, 36, 948-58.
- VAANANEN, H. K., ZHAO, H., MULARI, M. & HALLEEN, J. M. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, 113 (Pt 3), 377-81.
- VAN DIJK, F. S., COBBEN, J. M., KARIMINEJAD, A., MAUGERI, A., NIKKELS, P. G., VAN RIJN, R. R. & PALS, G. 2011. Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. *Mol Syndromol*, 2, 1-20.

- VERBORGT, O., GIBSON, G. J. & SCHAFFLER, M. B. 2000. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res*, 15, 60-7.
- WAN, M., YANG, C., LI, J., WU, X., YUAN, H., MA, H., HE, X., NIE, S., CHANG, C. & CAO, X. 2008. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev*, 22, 2968-79.
- WARD, L. M., RAUCH, F., WHYTE, M. P., D'ASTOUS, J., GATES, P. E., GROGAN, D., LESTER, E. L., MCCALL, R. E., PRESSLY, T. A., SANDERS, J. O., SMITH, P. A., STEINER, R. D., SULLIVAN, E., TYERMAN, G., SMITH-WRIGHT, D. L., VERBRUGGEN, N., HEYDEN, N., LOMBARDI, A. & GLORIEUX, F. H. 2011. Alendronate for the treatment of pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, 355-64.
- WIJENAYAKA, A. R., PRIDEAUX, M., YANG, D., MORRIS, H. A., FINDLAY, D. M., ANDERSON, P. H. & ATKINS, G. J. 2016. Early response of the human SOST gene to stimulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 164, 369-373.
- WILLERT, K. & NUSSE, R. 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a007864.
- WILLIAMS, B. O. & INSOGNA, K. L. 2009. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res*, 24, 171-8.
- WODARZ, A. & NUSSE, R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 59-88.
- XIAO, Z. & QUARLES, L. D. 2015. Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing. *Rev Endocr Metab Disord*, 16, 115-29.
- XIONG, J., PIEMONTESE, M., ONAL, M., CAMPBELL, J., GOELLNER, J. J., DUSEVICH, V., BONEWALD, L., MANOLAGAS, S. C. & O'BRIEN, C. A. 2015. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One*, 10, e0138189.
- YADAV, V. K., RYU, J. H., SUDA, N., TANAKA, K. F., GINGRICH, J. A., SCHUTZ, G., GLORIEUX, F. H., CHIANG, C. Y., ZAJAC, J. D., INSOGNA, K. L., MANN, J. J., HEN, R., DUCY, P. & KARSENTY, G. 2008. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, 135, 825-37.
- YANG, X., MATSUDA, K., BIALEK, P., JACQUOT, S., MASUOKA, H. C., SCHINKE, T., LI, L., BRANCORSINI, S., SASSONE-CORSI, P., TOWNES, T. M., HANAUER, A. & KARSENTY, G. 2004. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, 117, 387-98.
- YOSHIDA, H., HAYASHI, S., KUNISADA, T., OGAWA, M., NISHIKAWA, S., OKAMURA, H., SUDO, T., SHULTZ, L. D. & NISHIKAWA, S. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345, 442-4.
- YOUNG, M. F., KERR, J. M., IBARAKI, K., HEEGAARD, A. M. & ROBEY, P. G. 1992. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*, 275-94.
- YU, S., ZHU, K., LAI, Y., ZHAO, Z., FAN, J., IM, H. J., CHEN, D. & XIAO, G. 2013. atf4 promotes beta-catenin expression and osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci*, 9, 256-66.
- ZAMBONIN ZALLONE, A., TETI, A., PRIMAVERA, M. V. & PACE, G. 1983. Mature osteocytes behaviour in a repletion period: the occurrence of osteoplastic activity. *Basic Appl Histochem*, 27, 191-204.
- ZENG, L., WEI, J., ZHAO, N., SUN, S., WANG, Y. & FENG, H. 2017. A novel 18-bp in-frame deletion mutation in RUNX2 causes cleidocranial dysplasia. *Arch Oral Biol*.
- ZHENG, H. F., TOBIAS, J. H., DUNCAN, E., EVANS, D. M., ERIKSSON, J., PATERNOSTER, L., YERGES-ARMSTRONG, L. M., LEHTIMAKI, T., BERGSTROM, U., KAHONEN, M., LEO, P. J., RAITAKARI, O., LAAKSONEN, M., NICHOLSON, G. C., VIIKARI, J., LADOUCEUR, M., LYYTIKAINEN, L. P., MEDINA-GOMEZ, C., RIVADENEIRA, F., PRINCE, R. L., SIEVANEN, H., LESLIE, W. D., MELLSTROM, D., EISMAN, J. A., MOVERARE-SKRTIC, S., GOLTZMAN, D., HANLEY, D. A., JONES, G., ST POURCAIN, B., XIAO, Y., TIMPSON, N. J., SMITH, G. D., REID, I. R., RING, S. M., SAMBROOK, P. N., KARLSSON, M., DENNISON, E. M., KEMP, J. P., DANOY, P., SAYERS, A., WILSON, S. G., NETHANDER, M., MCCLOSKEY, E., VANDENPUT, L.,

- EASTELL, R., LIU, J., SPECTOR, T., MITCHELL, B. D., STREETEN, E. A., BROMMAGE, R., PETTERSSON-KYMMER, U., BROWN, M. A., OHLSSON, C., RICHARDS, J. B. & LORENTZON, M. 2012. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet*, 8, e1002745.
- ZHONG, Z., BAKER, J. J., ZYLSTRA-DIEGEL, C. R. & WILLIAMS, B. O. 2012. Lrp5 and Lrp6 play compensatory roles in mouse intestinal development. *J Cell Biochem*, 113, 31-8.

8 Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Thorsten Schinke für die exzellente Betreuung, die Geduld und die permanente Unterstützung danken. Weiter möchte ich mich bei Dr. Jean-Pierre David für die vielen Ideen und die Möglichkeit zur Mitarbeit an diesem großartigen Thema bedanken. Ein weiterer großer Dank gilt Prof. Michael Amling für das Vertrauen, die Motivation und das Ermöglichen der Arbeit am IOBM.

Daneben möchte ich den Kollegen aus dem IOBM für die außergewöhnlich gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Ein besonderer Dank gebührt hier Dr. Julia Luther, die mich in vielen Problemstellungen beraten hat und deren freundschaftliche Unterstützung die Arbeit wesentlich erleichtert hat. Ein weiterer großer Dank gilt Mona Neven und Stephanie Peters für die Mithilfe bei dem Projekt.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Freundin und meiner Familie für die Motivation und den Rückhalt danken.

Herzlichen Dank euch allen!

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: