

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie

Institutsdirektor: **Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse**

Stellv. des Direktors: **Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren**

Der Einfluss von LRP4 auf den murinen Knochenstoffwechsel

Dissertation

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

vorgelegt von:

Florian Scheuerecker-Yıldırım

aus Arusha

Hamburg 2015

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.08.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Andreas Niemeier

Prüfungsausschuss, Gutachterin: Prof. Dr. Pia Pogoda

Prüfungsausschuss, Prüfer: Prof. Dr. Jörg Heeren

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenstoffwechsel	1
1.1.1	Funktion der Knochen.....	1
1.1.2	Aufbau der Knochenmatrix.....	2
1.1.3	Spezifische Zellen des Knochens.....	3
1.1.3.1	Osteoblasten und Osteozyten	3
1.1.3.2	Osteoklasten	5
1.1.4	Knochenentwicklung	7
1.1.4.1	Desmale Ossifikation	7
1.1.4.2	Enchondrale Ossifikation	7
1.1.4.3	Wachstumsfuge	8
1.2	Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg.....	9
1.2.1	Inaktivierter Zustand	10
1.2.2	Aktivierter Zustand	11
1.2.3	Die LDL-Rezeptor-Familie und die Wnt-Co-Rezeptoren LRP5/6 als Teil davon	11
1.2.3.1	LRP5.....	12
1.2.3.2	LRP6.....	12
1.2.4	Die Wnt-Signaling Inhibitoren Dickkopf, Sclerostin und Wise	12
1.3	LRP4	14
1.3.1	Funktionen von LRP4	15
1.3.1.1	LRP4 in der Zahnentwicklung und im Knochenstoffwechsel.....	15
1.3.1.2	Die Rolle von LRP4 in der neuro-muskulären Koppelung	17
1.3.1.3	Die Rolle von LRP4 in der Nierenentwicklung	17
1.3.1.4	LRP4 im Wnt-Signaling.....	17
1.4	Ziel der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Tiermodell	19
2.2	Genotypisierung.....	19
2.2.1	DNA-Isolierung	19

2.2.2	PCR	20
2.3	Präparation und Differenzierung primärer muriner Zellen	20
2.3.1	Chondrozyten	21
2.3.2	Osteoblasten	21
2.3.3	Osteoklasten	22
2.4	Färbetechniken	22
2.4.1	Von Kossa-Färbung	22
2.4.2	Alzianblau/Alizarinrot-Färbung	22
2.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
2.5	Serum-Analyse	23
2.5.1	FPLC (Fast protein liquid chromatography)	24
2.6	RNA-Isolierung und quantitative Real-time-PCR	24
2.6.1	RNA-Isolierung	24
2.6.2	Quantitative Real-time-PCR	24
2.7	Statistik	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Körpergewicht Wildtyp und transgener Mäuse	27
3.2	Lipoproteinprofil	28
3.3	Serumanalyse 4, 12 und 26 Wochen alter Tiere	29
3.3.1	Parameter des Fettstoffwechsels	29
3.3.2	Parameter des Knochenstoffwechsels	30
3.4	Makroskopische und mikroskopische Skelettanalyse	32
3.4.1	Röntgenbilder 4, 12 und 26 Wochen alter Mäuse	32
3.4.2	Wachstumsfugenfärbung und Alzianblau/Alizarinrot-Färbung des Skeletts	34
3.5	Genexpressionsanalyse des Röhrenknochens, Schädeldaches und Kontrollorganen	35
3.5.1	Genexpressionsraten von LRP4, LRP5 und LRP6 in verschiedenen Geweben	35
3.5.2	Genexpressionsraten von Knochenstoffwechselmarkern	37
3.5.3	Genexpressionsraten von Parametern des Wnt-Signalwegs	38
3.6	Differenzierungsverhalten primärer Knochenzellen <i>ex-vivo</i>	39

3.6.1 LRP4-Expression	39
3.6.2 Messung von Differenzierungsmarkern und Mineralisierungsverhalten primärer Osteoblasten	40
3.6.3 Messung von Differenzierungsmarkern primärer Osteoklasten	42
3.6.4 Messung von Differenzierungsmarkern primärer Chondrozyten	43
4 Diskussion.....	44
4.1 Die Rolle von LRP4 im Knochenstoffwechsel.....	44
4.2 Einfluss von Lrp4 auf den Lipoproteinstoffwechsel.....	48
4.3 Reduziertes Gesamtkörpergewicht in LRP4 EC_STOP-Mäusen.....	48
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis	53
7 Anhang.....	63
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	63
7.2 Danksagung.....	66
7.3 Lebenslauf.....	67
7.4 Eidesstattliche Versicherung.....	68

1 Einleitung

1.1 Knochenstoffwechsel

1.1.1 Funktion der Knochen

Das Knochengewebe erfüllt im Körper unterschiedliche Funktionen: Zum einen bildet es zusammen mit dem Knorpelgewebe das stützende Gerüst des Körpers, zum anderen formt es gemeinsam mit Gelenken und Bändern den passiven Bewegungsapparat. Neben dieser der Bewegung dienlichen Eigenschaft stellen Knochen schützende Strukturen für Organe wie z. B. das Gehirn und die Brust- und Beckeneingeweide dar. Im intraossären Raum reifen zudem die Zellen der erythrozytären, leukozytären und thrombozytären Zelllinie heran. Während beim Neugeborenen noch fast alle Knochen blutbildendes (rotes) Knochenmark besitzen, sind es beim Erwachsenen nur noch wenige, wie z.B. das Brustbein (*sternum*), die Schlüsselbeine (*claviculae*) und die Wirbelkörper (*corporae vertebrae*).

Neben diesen mechanischen und blutbildenden Funktionen ist der Knochen auch für den Metabolismus des Körpers bedeutend. Als Speicherorgan für Kalzium (ca. 99 % des Körperkalziumgehalts) und Phosphat (ca. 80 % des Phosphats) ist der Knochen ein wichtiger Regulator der Kalziumhomöostase. Wichtige Hormone, die hieran beteiligt sind, sind das Parathormon (PTH), das Calcitonin und das Calcitriol (1,25-Dihydro-Vitamin-D3). Das von den Nebenschilddrüsen ausgeschüttete Peptidhormon Parathormon sorgt bei einem erniedrigten Kalziumserumspiegel für eine Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen aus dem Knochen, sowie für eine gesteigerte Kalziumresorption in der Niere. Hier bewirkt es gleichzeitig eine erhöhte Phosphatausscheidung, um einer Verkalkung des Nierenparenchyms sowie der Nierengefäße durch Kalzium/Phosphatverbindungen zu verhindern. Calcitonin wird von den C-Zellen der Schilddrüse produziert und ist ein funktioneller Antagonist des Parathormons. Es ist ebenfalls ein Peptidhormon, das jedoch einen verstärkten Einbau von Kalzium in den Knochen verursacht und bei erhöhtem Kalziumserumspiegel ausgeschüttet wird.

Das Hormon Calcitriol entsteht durch zwei Hydroxylierungen aus dem fettlöslichen Prohormon Vitamin D₃, welches der menschliche Körper mit Hilfe von ultraviolettem Licht in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol bilden kann. Die erste Hydroxylierung findet in der Niere und die zweite Hydroxylierung in der Leber statt. Die Ausschüttung von Calcitriol wird durch Parathormon oder durch einen erniedrigten Kalzium- bzw. Phosphatgehalt im Serum ausgelöst. Calcitriol sorgt über eine verstärkte Aufnahme der Kalzium-/Phosphationen im Dünndarm für eine Steigerung derer Serumspiegel, was zu einer Verbesserung der Knochenmineralisierung führt.

1.1.2 Aufbau der Knochenmatrix

Die Knochenmatrix besteht zu 70 % aus anorganischen, zu 22 % aus organischen Substanzen und zu 8 % aus Wasser (Augat und Schorlemmer, 2006). Der anorganische Teil besteht dabei hauptsächlich aus Hydroxylapatit-Kristallen ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). Die organische Knochenmatrix besteht zu ca. 90 % aus Kollagen Typ 1 (Henrikson, Mazurkiewicz, 1997). Dieses bildet Fibrillen und sorgt durch sein trajektorieell ausgerichtetes System für Elastizität und Zugfestigkeit im Knochengewebe. Zu den nichtkollagenen Proteinen des organischen Knochenteils zählen unter anderem die Alkalische Phosphatase (ALP), *Bone Sialoprotein* (BSP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN) und Metalloproteinasen. Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das in der Lage ist, andere Moleküle zu dephosphorylieren. Es existieren verschiedene Isoformen: die der Nieren, des Intestinums, der Plazenta, der Leber und des Knochens. Die Aktivität der knochenspezifischen Isoform der Alkalischen Phosphatase ist ein Marker für die Osteoblastenaktivität und spielt so eine Rolle bei der Knochenbildung. So finden sich erhöhte Blutwerte der Alkalischen Phosphatase bei Krankheitsbildern wie der Rachitis, aber auch in physiologischen Zuständen, die mit einem erhöhten Knochenumbau einhergehen, wie während des Wachstums. Das phosphatreiche Glykoprotein Bone Sialoprotein kommt in kalzifizierenden Geweben wie den Zähnen, dem Knochen und dem verkalkenden Knorpel vor. Dort vermittelt es die Zelladhäsion an Hydroxylapatit und fördert die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen. Das saure Glykoprotein Osteopontin gehört, wie auch das *Bone Sialoprotein*, zur Familie der SIBLING (*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*) Proteine. Es besteht aus ca. 300 Aminosäuren kommt ebenfalls im Knochengewebe, aber auch in Niere und Plazenta vor.

Im Gegensatz zu BSP hemmt es die Bildung von Hydroxylapatit. Osteoklasten aus Osteopontin defizienten Mäusen zeigen *in-vitro* eine gestörte Differenzierung (Rittling et al., 1998). Osteocalcin (*bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*) besteht aus 49 Aminosäuren und wird von Osteoblasten und Odontoblasten produziert. Es gilt als Inhibitor der Knochenmineralisierung. Osteocalcin defiziente Mäuse sind aufgrund gesteigerter Osteoblastenaktivität durch eine erhöhte Knochenmasse charakterisiert (Ducy et al., 1996). Osteocalcin enthält 3 Glutamylreste, die Vitamin K und γ -Glutamylcarboxylase abhängig carboxyliert werden können. So erhält es die Fähigkeit an Kalzium zu binden (Hauschka et al., 1989). In der systemischen Zirkulation existieren eine vollständig carboxylierte und eine untercarboxylierte Form. Neben der Funktion im Knochenstoffwechsel scheint die untercarboxylierte Form auch eine Rolle im Glukosestoffwechsel zu spielen. Sie induziert, zumindest in Mäusen, eine Steigerung der β -Zell-Proliferation in der Bauchspeicheldrüse, sowie zu einer erhöhten Insulinsekretion und Sensitivität (Lee et al., 2007, Lee und Karsenty, 2008).

1.1.3 Spezifische Zellen des Knochens

Das Skelett ist kein statischer Gewebeverband, sondern ist einem ständigen Umbauprozess unterworfen. So wird es in einem Zeitraum von 10 Jahren komplett erneuert. Dieser ständige Umbau der Knochenmatrix wird durch zwei hoch-spezialisierte knochenspezifische Zellarten gewährleistet: Matrix synthetisierende Osteoblasten (anabol) und Matrix resorbierende Osteoklasten (katabol).

1.1.3.1 Osteoblasten und Osteozyten

Osteoblasten sind einkernige, annähernd kubische Zellen mit einem Durchmesser von 15-30 μm . Sie synthetisieren die organischen Knochenmatrixkomponenten (Osteoid) (Young et al., 1992, Robey et al., 1993). Im Rahmen der Knochenmineralisierung werden manche Osteoblasten in die Matrix eingemauert und werden dann als Osteozyten bezeichnet. Osteozyten fungieren als mechanischer Sensor, da sie über Zellfortsätze miteinander verbunden sind und so sensorische Signale weiterleiten können (Young et al., 1992, Robey et al., 1993, Aarden et al., 1994). Manche Osteoblasten siedeln sich auf den Knochenbälkchen (Trabekeln) der inneren Oberfläche der Kortikalis (äußere Knochenschicht) und an den Wänden der Haver'schen Kanäle (gefäßführender Kanal im Knochen) an. Dort bilden sie die sogenannten endostalen Saumzellen (*lining cells*).

Diese Zellen stellen ruhende Osteoblasten dar, die wieder zur Knochenbildung angeregt werden können (Leaffer et al., 1995). Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, aus denen auch Adipozyten, Myozyten oder Chondrozyten entstehen (Aubin, 1998, Ducy et al., 2000). An der Entwicklung von reifen Osteoblasten aus Präosteoblasten sind verschiedene Differenzierungsfaktoren beteiligt (Abb. 1). Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren ist Runx2 (*runt related transcription factor 2*, synonym CBFA1 (*core binding factor a1*)). Er gehört zur evolutionär alten Familie der *Runt-containing transcription factors* und wird bereits sehr früh in der Osteoblastendifferenzierung exprimiert. Runx2 spielt auch bei der Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten eine Rolle (Ducy et al., 1997, Komori et al., 1997, Karsenty, 1999). Die Runx2-Haploinsuffizienz ist ursächlich für das Krankheitsbild der Cleidocranialen Dysplasie, das sich durch nichtgeschlossene Fontanellen, vollständige oder partielle Aplasien der Schlüsselbeine, Zahnfehlbildungen und Kleinwuchs auszeichnet. Mäuse, denen ein Runx2-Allel fehlt, zeigen den gleichen Phänotyp (Lee et al., 1997, Mundlos et al., 1997).

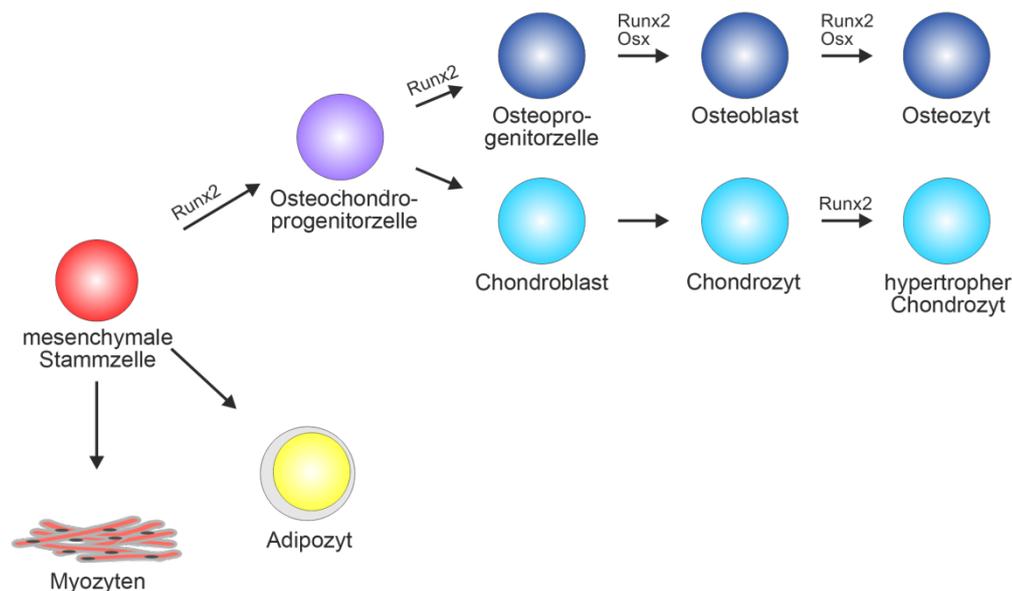


Abb. 1: Osteoblastengenesis. Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, aus denen auch Adipozyten, Myozyten oder Chondrozyten entstehen können. An dieser Entwicklung von reifen Osteoblasten aus Präosteoblasten sind verschiedene Differenzierungsfaktoren wie Runx2 und Osterix (Osx) beteiligt. (modifiziert nach Harada und Rodan, 2003, Franceschi et al., 2007)

Ein weiteres wichtiges Protein, das mit Runx2 zusammenwirkt, ist Osterix (Osx). Dieser Transkriptionsfaktor besitzt eine C-terminale Zink-Finger-Domäne, mit der er an die DNA bindet. Osx bewirkt die Entwicklung von Osteoprogenitorzellen aus Osteo-Chondroprogenitorzellen. In der Differenzierungskette der Osteoblasten ist Osx Runx2 nachgeschaltet. Osx wird in Runx2-defizienten Mäuseembryos nicht exprimiert, Runx2 dagegen aber in Osx-defizienten Tieren (Nakashima et al., 2002, Baek et al., 2009).

1.1.3.2 Osteoklasten

Während Osteoblasten die Knochenmatrix synthetisieren, bauen Osteoklasten diese ab. Ausdifferenzierte Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen mit einem Durchmesser von 30-100 μm (Suda et al., 1996). Im Rahmen der Knochenresorption befestigen sich die Osteoklasten an der Knochenoberfläche und erfahren eine Polarisierung. Man kann jetzt eine apikale und eine basolaterale Membranoberfläche unterscheiden. Die apikale Membran besitzt einen Faltsaum (*ruffled border*), in den viele H^+ -ATPasen eingelagert sind. Durch diese werden H^+ -Ionen in die nun zwischen Knochenoberfläche und Osteoklastenmembran entstehende Resorptionslakune gepumpt (Blair et al., 1989, Mattsson et al., 1994). Zudem folgen Chloridionen, sodass in den Lakunen Salzsäure entsteht und so ein pH-Wert von 4-5 erreicht wird (Schlesinger et al., 1997). Mutationen, die defekte Chloridkanäle verursachen, sind ursächlich für die Krankheit Osteopetrose (Kornak et al., 2001), bei der, durch die daraus resultierende Minderfunktion der Osteoklasten, eine unorganisierte Vermehrung des Knochengewebes und dadurch eine geringere Knochenstabilität einhergehend mit gehäuften Knochenbrüchen entstehen. In der abgeschlossenen Resorptionslakune wird nun zuerst das Hydroxylapatit aufgelöst. Matrixmetalloproteinasen bauen dort dann zusammen mit lysosomalen Proteinasen, wie z. B. Cathepsin K, die entmineralisierte Matrix ab (Delaisse et al., 2003). Dysfunktionelles Cathepsin K führt zum autosomal rezessiven Krankheitsbild der Pycnodysostosis, die sich durch Osteopetrose und Kleinwuchs auszeichnet (Gelb et al., 1996).

Bei der Differenzierung von Osteoklasten spielen Osteoblasten eine entscheidende Rolle (Rodan und Martin, 1981). Osteoklastenvorläuferzellen entstammen, anders als Osteoprogenitorzellen, dem monozytären Phagozytensystems des Knochenmarks (Udagawa et al., 1990). Ein wichtiges parakrines Zytokin, das die Osteoklastenproliferation beeinflusst, ist der *Macrophage colony stimulating factor* (M-CSF).

Er wird von Osteoblasten sezerniert und bindet an den Rezeptor c-fms auf Osteoklastenvorläuferzellen (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Der Rezeptor c-fms ist eine Tyrosin-Kinase, die bei Aktivierung eine Signalkaskade auslöst, die zur Osteoklastenproliferation führt, und das Überleben bereits differenzierter Osteoklasten sichert (Faccio et al., 2003).

Ein anderes für die Osteoklastendifferenzierung elementares Protein ist RankL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*), ein Mitglied der Familie der Tumornekrosefaktoren. Es ist ein Homotrimer und unterscheidet sich von den anderen Tumornekrosefaktoren durch vier charakteristische Oberflächenschleifen (Lam et al., 2001). RankL wird v. a. von Osteoblasten exprimiert. Es ist hauptsächlich membranständig, wird aber auch sezerniert. Durch die Bindung an seinen Rezeptor RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*) auf der Oberfläche der Osteoklastenvorläuferzellen löst er deren Differenzierung aus (Lacey et al., 1998, Suda et al., 1999, Xiong et al., 2011).

Einen negativen Regulator der Osteoklastengese stellt Osteoprotegerin (OPG, oder *osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF)) dar. Auch dieses Glykoprotein ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktorenfamilie und wird von Osteoblasten sezerniert (Thomas et al., 2001).

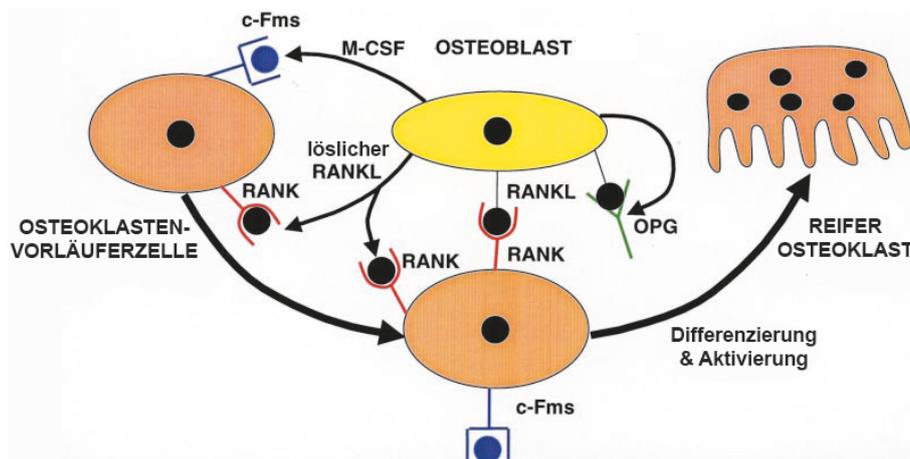


Abb. 2: Darstellung der Osteoklastenregulation durch Osteoblasten. Osteoklastenvorläuferzellen werden durch die von Osteoblasten sezernierten Proteine M-CSF (stimulating factor) und RankL (receptor activator of NF- κ B Ligand) zur Proliferation und Ausdifferenzierung angeregt. OPG (Osteoprotegerin) ist ein negativer Regulator der Osteoklastengese. Es wird auch von Osteoblasten sezerniert und bindet an RankL, sodass dieser nicht mehr in der Lage ist an seinen Rezeptor RANK zu binden. (modifiziert nach Khosla, 2001).

Es verhindert die Aktivität von RANKL, indem es ihn bindet und so die Aktivierung von RANK verhindert (Simonet et al., 1997). Homozygote Deletionsmutationen in *OPG* führen zum juvenilen Morbus Paget (Whyte et al., 2002). Die stetige Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, auch *coupling* genannt, ist essentiell für einen gesunden Knochenstoffwechsel. Bei einem Überwiegen von entweder Knochenabbau oder Knochenaufbau kommt es zu pathologischen Erscheinungen (Osteoporose bzw. Osteopetrose).

1.1.4 Knochenentwicklung

Die Entstehung der mehr als 200 Knochen des menschlichen Skeletts geschieht auf zwei unterschiedlichen Wegen. Einige wenige Knochen entstehen durch direkte Verknöcherung von osteogenen Mesenchymzellen (desmale Ossifikation), alle anderen entwickeln sich aus einem Knorpelmodell, das dann im nächsten Schritt durch Knochengewebe ersetzt wird (enchondrale Ossifikation).

1.1.4.1 Desmale Ossifikation

Bei der desmalen Ossifikation wandeln sich die Zellen der Mesenchymverdichtungen am Ort des späteren Knochens in aktive Osteoblasten um, die dann mit der Osteoidsynthese beginnen. Das Osteoid stellt die noch nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz dar. Das Schlüsselbein, die Knochen des Schädeldaches und die des Gesichtschädels entwickeln sich auf diese Weise. Der so entstandene Knochen heißt Bindegewebe-, Deck- oder Belegknochen.

1.1.4.2 Enchondrale Ossifikation

Das übrige Skelett entsteht durch die enchondrale Ossifikation. Hier bilden die sich verdichtenden Mesenchymzellen eine Schablone für den späteren Knochen. Sie differenzieren zu Chondrozyten, die eine extrazelluläre Matrix bestehend aus Kollagen Typ 2 und Aggrecan, einem Proteoglycan, produzieren. Chondrozyten im Zentrum der Knorpelanlage wandeln sich in hypertrophe Chondrozyten um, die nun für sie charakteristisches Kollagen Typ 10 sezernieren. Hypertrophe Chondrozyten geben auch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) ab, der nun ein Einwachsen von Blutgefäßen in das Knorpelmodell stimuliert.

Die hypertrophen Chondrozyten gehen in Apoptose und mit dem Blutstrom eingewanderte Mesenchymzellen wandeln sich in Osteoblasten um, die dann die primäre spongiöse Knochenmatrix sezernieren. Aus dieser entsteht der trabekuläre Knochen. Osteoblasten am Rande der Knorpelschablone formen eine perichondrale Knochenmanschette, aus der dann die Kortikalis (*substantia compacta*), die äußere feste Schicht des Knochens, hervorgeht (Karsenty et al., 2009).

1.1.4.3 Wachstumsfuge

Das Längenwachstum der Röhrenknochen findet in der Wachstumsfuge (Epiphysenfuge) statt. Sie befindet sich zwischen Metaphyse und Epiphyse und verknöchert vollständig erst gegen Ende der Pubertät. In ihr werden von epiphysär nach metaphysär verschiedene Zonen unterschieden: die Reservezone, die Proliferationszone, die Hypertrophiezone, die Resorptionszone und die Ossifikationszone. In der Proliferationszone besitzen die Chondrozyten noch eine starke Mitoseaktivität. Durch die hohe Teilungsrate der Zellen bilden sich Kolumnen (Säulenknorpel). Die hypertrophen Chondrozyten der nachfolgenden Zone bilden eine Knorpelmatrix und gehen auch hier in die Apoptose über. In der Resorptionszone findet eine Verkalkung der longitudinalen Knorpelwände statt und Osteoblasten füllen die zurückgelassenen Räume in der Ossifikationszone mit Knochenmatrix auf (Benninghoff, Drenckhahn, 2008). Verschiedene Signalwege wie z. B. das *Indian hedgehog* (Ihh)/ *Parathyroid hormone related protein* (PTHrP) signaling, das *Fibroblast growth factor signaling*, Zytokine wie BMPs (*bone morphogenetic proteins*), TGF- β (*Transforming growth factor β*) und der canonische Wnt-Signalweg sind bei der Regulation der Wachstumsfuge von Bedeutung (Karsenty und Wagner, 2002, Kronenberg, 2003, Karsenty et al., 2009). Das Protein *Indian hedgehog* (Ihh) wird als einziges der Hedgehogfamilie von prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten synthetisiert. Wenn Ihh an den Rezeptor patched-1 (Ptch-1) bindet, wird ein G-Protein gekoppelter Rezeptor namens *smoothened* (smo) aktiviert. Aktiviertes smo löst dann eine Signalkaskade aus, an deren Ende die Transkription verschiedener Gene steht, unter anderem auch das codierende Gen für Ptch1 (Ingham und McMahon, 2001). Ihh Knock-out Mäuse zeigen eine verringerte Rate an proliferierenden Chondrozyten (St-Jacques et al., 1999). Das *Parathyroid hormone related protein* wird von proliferierenden Chondrozyten an den Enden des Röhrenknochens sezerniert und wirkt auf den gleichen Rezeptor wie das Parathormon.

PTHrP sorgt vornehmlich dafür, dass die proliferierenden Chondrozyten nicht hypertrophieren. Seine Ausschüttung kann auch durch Ihh stimuliert werden. Eine Überexpression von PTHrP in Chondrozyten führt im Mausmodell zu einer Verzögerung der Genese hypertropher Chondrozyten (Weir et al., 1996). Ihh und PTHrP regulieren das Wachstum der proliferierenden Chondrozyten in den Knorpelkolumnen durch eine Feedbackschleife. Bei fortschreitendem Längenwachstums des Röhrenknochens entfernen sich die Zonen der Wachstumsfuge, in denen Ihh und PTHrP sezerniert werden, voneinander. Durch diese gesteigerte Distanz verringert sich die Möglichkeit für Ihh die Ausschüttung von PTHrP zu fördern, und die Chondrozyten hypertrophieren (Vortkamp et al., 1996). Während der enchondralen Ossifikation werden auch verschiedene Fibroblast Growth factors und deren Rezeptoren exprimiert.

Proliferierende Chondrozyten exprimieren z. B. den *FGF receptor 3*, prähypertrophe/hypertrophe Chondrozyten den *FGF receptor 1* und perichondrale Zellen den *FGF receptor 2*. Aktivierung des FGFR3 inhibiert die Chondrozytenproliferation (Sahni et al., 1999) und ein FGFR3 Knock-out führt zu einer gesteigerten Rate an proliferierenden Chondrozyten, sowie zu einer Verlängerung der Knorpelkolumnen (Deng et al., 1996, Colvin et al., 1996). Wnt-Proteine, die über den im folgenden Abschnitt näher beschriebenen Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg wirken, scheinen einen negativ regulierenden Einfluss auf die Chondrozytendifferenzierung zu nehmen. Die Wnt-Proteine Wnt 1, 3a, 4, 7a, 9a und 11 hemmen die Chondrozytendifferenzierung *in-vitro* (Hartmann, 2007). Inaktivierung von β -Catenin in Mesenchymzellen der Extremitäten zogen eine verringerte Chondrozytendifferenzierung nach sich (Hill et al., 2005, Day et al., 2005). In einem anderen Experiment jedoch, in dem eine Chondrozyten-spezifische Deletion von β -Catenin untersucht wurde, zeigte sich ebenfalls eine verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten (Akiyama et al., 2004).

1.2 Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg

Das Wnt/ β -Catenin-Signaling spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese, der Organentwicklung und bei der Tumorentstehung (Logan und Nusse, 2004, Wodarz und Nusse, 1998). Bei Säugern sind 19 Wnt-Proteine bekannt, die in 12 Untergruppen eingeteilt werden (Clevers und Nusse, 2012). Der sogenannte kanonische Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg nimmt elementaren Einfluss auf die Knochenentwicklung (Krishnan et al., 2006, Westendorf et al., 2004).

Im Folgenden werden idealisiert ein inaktivierter Zustand (OFF) und ein aktivierter (ON) dargestellt. *In-vivo* handelt es sich nicht um ein striktes „ON“ versus „OFF“, sondern immer um eine Art Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen, so dass der Signalweg mehr oder weniger stark aktiviert und Zielgene transkribiert werden.

1.2.1 Inaktivierter Zustand

Werden keine Wnt-Proteine exprimiert (Abb. 3C) oder sind ihre Rezeptoren durch Proteine wie Dickkopf (Dkk) oder Sclerostin (Sost) blockiert (Abb. 3A, B), ist ein β -Catenin-Abbaukomplex aktiv.

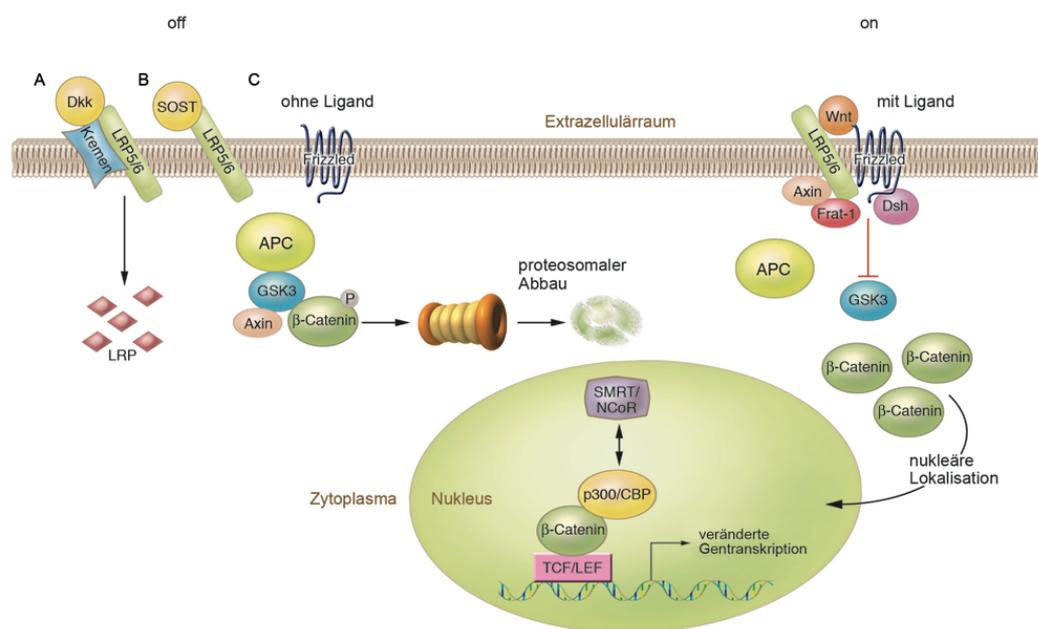


Abb.3: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges.

OFF-Zustand: In Abwesenheit von Wnt-Molekülen ist ein β -Catenin-Abbaukomplex bestehend aus dem Tumorsuppressorprotein Adenomatosis Polyposis Coli (APC), dem Protein Axin und der Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) aktiv. β -Catenin wird phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (C). Blockieren Wnt-Antagonisten wie Sclerostin (SOST) oder die Wnt-Rezeptoren durch Dickkopf (Dkk), LRP5/6 und Kremen, wird der Rezeptorkomplex internalisiert und abgebaut. So stehen weniger Co-Rezeptoren für den Wnt-Signalweg zur Verfügung (A).

ON-Zustand: Interagieren die Wnt-Moleküle mit dem Frizzled (Fz)/LRP5/6 Co-Rezeptor-Komplex bewirken die Proteine Dishevelled (Dsh), Axin und Frat 1 eine Auflösung des β -Catenin-Degradierungskomplexes. β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert, akkumuliert im Zytoplasma und dringt in den Nucleus ein. Dort bindet es an den Transkriptionsfaktor *T cell factor/lymphoid enhancer binding factor* (TCF/LEF), verdrängt die Repressorproteine und rekrutiert Transkriptions-Cofaktoren wie p300 und *cAMP response element-binding protein* (p300/CBP). (modifiziert nach Krishnan et al., 2006)

Dieser besteht aus dem Tumorsuppressorprotein Adenomatosis Polyposis Coli (APC), dem Protein Axin und der Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β). APC und Axin bilden ein Gerüst für die GSK-3 β , die β -Catenin phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung markiert, wird β -Catenin ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Aberle et al., 1997). In Abwesenheit von β -Catenin im Nukleus verhindern Repressorproteine wie z. B. der *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors* (SMRT) die Transkription von Wnt-Zielgenen.

1.2.2 Aktivierter Zustand

Aktiviert wird der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg durch Binden der Wnt-Proteine an ihren Frizzled (Fz)/LRP5/6/Co-Rezeptor-Komplex. Die Proteine *Dishevelled* (Dsh), Axin und Frat 1 bewirken nun die Auflösung des β -Catenin-Degradierungskomplexes. Es findet keine Phosphorylierung von β -Catenin mehr statt und neu synthetisiertes β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma. Es kann nun in den Zellkern gelangen und dort an den Transkriptionsfaktor *T cell factor/lymphoid enhancer binding factor* (TCF/LEF) binden. Im Rahmen dieser Bindung verdrängt β -Catenin die Repressorproteine und rekrutiert Transkriptions-Cofaktoren wie p300 und *cAMP response element-binding protein* (p300/CBP). Nun ist die Transkription Lef/TCF-abhängiger Gene möglich.

1.2.3 Die LDL-Rezeptor-Familie und die Wnt-Co-Rezeptoren LRP5/6 als Teil davon

Low density lipoprotein receptor-related protein 5 und 6 (LRP5, LRP6) sind Co-Rezeptoren des 7-Transmembran-Rezeptors *Frizzled* (Fz) im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (He et al., 2004). Sie sind Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie. Bei dieser handelt es sich um eine evolutionär alte Gruppe von Transmembranrezeptoren, deren namensgebender der *Low-density* Lipoproteinrezeptor (LDLR) ist (Brown und Goldstein, 1986). Auch der *very low-density* Lipoproteinrezeptor (VLDLR), die *LDL receptor related proteins* 1 (LRP1), 2 (LRP2/Megalin), 4 (LRP4/Megf7) und der ApoE-Rezeptor 2 (ApoER2) gehören zu dieser Gruppe (Krieger und Herz, 1994, Hussain et al., 1999). Neben ihrer Rolle bei der Endozytose von Makromolekülen wirken diese Rezeptoren in verschiedenen Signalwegen mit (Nykjaer und Willnow, 2002).

Sie können dort entweder direkt als Signalüberträger, oder als modulierendes Element der Signalkaskade, wie z. B. LRP5 und LRP6 im schon erwähnten Wnt/ β -Catenin-Signalweg dienen (Tamai et al., 2000, Pinson et al., 2000, Wehrli et al., 2000). Der LDL-Rezeptor scheint der einzige zu sein, der alleinig die Aufnahme von Lipoproteinen zur Aufgabe hat.

1.2.3.1 LRP5

Der Einfluss von LRP5 auf den Knochenstoffwechsel wurde bei Untersuchungen zum Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom, einer autosomal-rezessiv vererbten Krankheit, die sich durch Blindheit und in der Jugend beginnender Osteoporose mit Spontanfrakturen auszeichnet, deutlich. Hier finden sich *Loss-of-function*-Mutationen im *LRP5* Gen (Gong et al., 2001). Heterozygote *Missense*-Mutationen in *LRP5* wurden bei Kindern mit juveniler Osteoporose entdeckt (Hartikka et al., 2005). *Gain-of-function*-Mutationen des *Lrp5* führen zu einer erhöhten Knochendichte (Little et al., 2002, Boyden et al., 2002). Ein *Lrp5*-Knock-Out im Mausmodell zog bei den Tieren eine verringerte Knochendichte nach sich (Kato et al., 2002). Transgene Mäuse, die das LRP5 überexprimieren, besitzen eine verstärkte Osteoblastenaktivität und eine damit einhergehende erhöhte Knochenmasse (Babij et al., 2003).

1.2.3.2 LRP6

Auch LRP6 beeinflusst den Knochenstoffwechsel. In einer Familie, deren Mitglieder unter anderem an Osteoporose und geschädigten Herzkranzgefäßen leiden, wurde eine *Loss-of-function*-Mutation des *LRP6* nachgewiesen (Mani et al., 2007). Eine spontane *Missense*-Mutation des *Lrp6* bei Mäusen führte zu Skelettdysmorphologien (Kokubu et al., 2004). Mausexperimente nach einer Inaktivierung des LRP6-Rezeptors liefern Daten für die Annahme, dass LRP6 an der Regulation der Knochenresorption beteiligt ist (Kubota et al., 2008).

1.2.4 Die Wnt-Signaling Inhibitoren Dickkopf, Sclerostin und Wise

Verschiedene Proteine können das Wnt-Signaling inhibitorisch modulieren. Zum Beispiel unterdrückt Dickkopf 1 (DKK1), ein Mitglied der Dickkopf-Proteinfamilie, das Wnt-Signaling, indem es einen dreiteiligen Komplex mit den Lrp5/6 und dem Transmembranprotein Kremen bildet.

Diese Konstellation sorgt dafür, dass der Rezeptorkomplex internalisiert und im Zytoplasma abgebaut wird, und so nichtmehr in der Wnt-Signalkaskade mitwirken kann (Abb.3 A) (Mao et al., 2002). *Missense*-Mutationen in *Lrp5*, die eine verringerte Affinität von Dkk1 zu LRP5/6 verursachten, wirkten sich in einer erhöhten Knochenmasse aus (Ai et al., 2005, Balemans et al., 2007). Überexpression von DKK1 in transgenen Mäusen führten zu einer Verringerung der Osteoblasten und zu Osteopenie (Li et al., 2006). Auf der anderen Seite führte die Deletion eines *Dkk1*-Allels im Mausmodell zu einer erhöhten Knochenmasse (Morvan et al., 2006).

Das Protein Sclerostin ist das Produkt des *SOST* Gens. Im menschlichen Knochen wird es ausschließlich von Osteozyten exprimiert (van Bezooijen et al., 2004). Auch Sclerostin fungiert als Inhibitor des Wnt-Signaling, indem es LRP5/6 bindet (Abb.3 B) (Li et al., 2005, Semenov et al., 2005, Ellies et al., 2006). *Loss-of-function*-Mutationen von *SOST* führen zur autosomal rezessiv vererbten Krankheit Sclerosteosis, deren Charakteristikum progressives überschießendes Knochenwachstum ist (Balemans et al., 2001, Brunkow et al., 2001). Ursächlich für das van Buchem-Syndrom, das ebenfalls mit erhöhtem Knochenüberwachstum einhergeht, ist eine homozygote Deletion eines *SOST enhancer*-Elements (Loots et al., 2005, Balemans et al., 2002). Auch *Sost*-Knock-out Mäuse haben eine erhöhte Knochenmasse (Li et al., 2008). Aus einer Überexpression von SOST in transgenen Mäusen resultierten eine geringe Knochenmasse und eine verringerte Knochenstärke der Tiere (Winkler et al., 2003).

Das Protein Wise (synonym USAG-1, Sosdc 1 und Ectodin) besitzt eine starke Homologie zu Sclerostin. Es wird im Oberflächenektoderm exprimiert. Auch Wise kann extrazellulär kompetitiv an die Wnt-Co-Rezeptoren Lrp5/6 binden (Itasaki et al., 2003). Durch diese Hemmung der Rezeptoren verhindert Wise die Weiterleitung des Wnt-Signals. Zusätzlich besitzt Wise die Möglichkeit das *Bone morphogenetic protein* (BMP)-Signaling zu blockieren. Wise antagonisiert diesen für die Embryogenese wichtigen Signalweg indem es aktivierende Liganden bindet, so dass diese der Signalkaskade nicht mehr zu Verfügung stehen (Laurikkala et al., 2003, Yanagita et al., 2004).

1.3 LRP4

Ein weiteres Mitglied der LDL-Rezeptor Familie ist das LRP4 (oder *multiple epidermal growth factor-like domain 7* (MEGF7)). Es wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Dazu gehören das Gehirn, die postsynaptische Region der motorischen Endplatte, Anlagen der Nierenentwicklung und der Knochen. LRP4 findet sich, Größe und Komplexität seines Aufbaus betreffend, zwischen den kleineren LDL-, VLDL-Rezeptoren und größeren, wie z. B. dem LRP1 wieder (Abb. 4) (Herz und Bock, 2002, Herz et al., 2009). LRP4 wurde im Rahmen eines Screenings auf Gene, die Proteine mit multiplen EGF-Domänen codieren, entdeckt (Nakayama et al., 1998). Es besitzt eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle mit EGF-Domänen und ist in der Zellmembran verankert (Abb. 4).

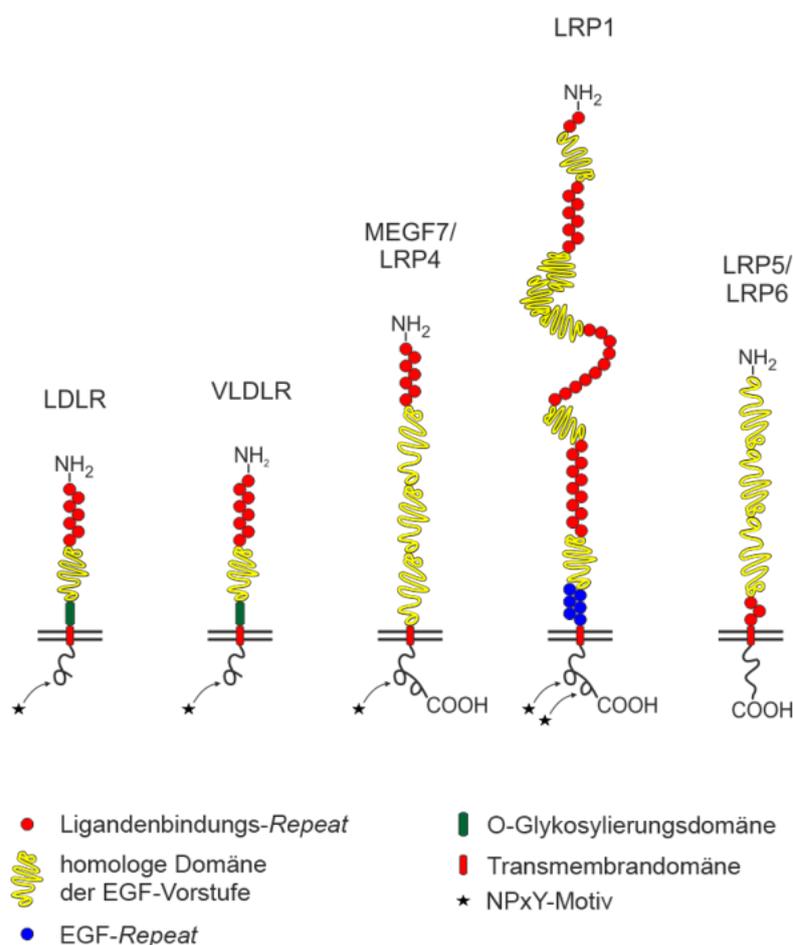


Abb. 4: LRP4 in der LDL-Rezeptor-Familie. LRP4 befindet sich, Größe und Komplexität seines Aufbaus betreffend, zwischen den kleineren LDL- und VLDL-Rezeptoren und größeren, wie z.B. dem LRP1. (modifiziert nach Dieckmann et al., 2010)

Intrazellulär endet es mit einer C-terminalen Region, die ein NPxY-Motiv enthält. Über dieses Tetraaminomotiv wird bei der LDL-Rezeptor-Familie die Rezeptoraktivierung nach intrazellulär vermittelt (Nykjaer und Willnow, 2002).

1.3.1 Funktionen von LRP4

Um einen Einblick in die biologische Funktion von LRP4 zu bekommen, wurde von der Arbeitsgruppe um Eric B. Johnson eine *Lrp4*-Knock-out Maus untersucht. Da ein kompletter *Lrp4* Knock-out letal ist, wurden hier Mäuse verwendet, bei denen ein Stop-Codon vor dem den Membrananker codierenden Genabschnitt inseriert wurde. So verliert LRP4 seine Membranverankerung und wird dysfunktional. Die so entstandenen Tiere waren überlebensfähig und zeigten phänotypisch überzählige und fusionierte Glieder an Vorder- und Hinterbeinen (Polysyndaktylien). Auch haben sie ein reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Johnson et al., 2005).

1.3.1.1 LRP4 in der Zahnentwicklung und im Knochenstoffwechsel

Transgene Mäuse, deren *Lrp4* wie oben beschrieben verändert wurde, weisen Störungen in der Zahnentwicklung auf. Sie besitzen überzählige Schneidezähne bzw. vergrößerte Backenzähne, die sich aus verschmolzenen Zahnanlagen entwickelten (Johnson et al., 2005, Ohazama et al., 2008). Da das oben beschriebene Wnt/ β -Catenin-Signal Einfluss auf die Zahnentwicklung nimmt (Pispa und Thesleff, 2003), liefert dieser Zahnphänotyp Hinweise darauf, dass LRP4 Teil dieses Signalweges ist. Der eindrucklichste Phänotyp der *Lrp4*-Insuffizienz ist jedoch die auftretende Polysyndaktylie an den Vorder- und Hinterbeinen (Johnson et al., 2005). Diese wurde auch bei Mäusen, deren *Lrp4* auf andere Weise als die von Johnson et al. generierte verändert war, gefunden. Bei der einen Mauslinie entstand die Mutation im *Lrp4* durch ein eingebautes Provirus im ersten Intron, bei der Anderen spontan bei der Zucht im Jackson Laboratorium (Johnson et al., 2005, Simon-Chazottes et al., 2006). Auch Rinder, bei denen Mutationen im *Lrp4* gefunden wurden, zeigen den Phänotyp einer Polysyndaktylie (Johnson et al., 2006, Duchesne et al., 2006, Drogemuller et al., 2007). Außerdem wurden bei der Genanalyse vom Cenani-Lenz-Syndrom betroffener Patienten *LRP4*-Mutationen gefunden (Li et al., 2010). Das Cenani-Lenz-Syndrom ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die durch Polysyndaktylien und Synostosen charakterisiert ist (Cenani und Lenz, 1967, Elcioglu et al., 1997).

Diese Entdeckungen legen die Vermutung nahe, das LRP4 evolutionär konserviert Spezies-übergreifend einen bedeutenden Einfluss auf die Extremitätenentwicklung nimmt. Durch *in-situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass *Lrp4* in der apikalen ektodermalen Leiste (*apical ectodermal ridge* (AER)) exprimiert wird. Die AER ist eine wichtige Struktur in der Gliedmassenentwicklung. Sie sezerniert u. a. *Sonic hedgehog*- und Wnt-Proteine und wird für das Wachstum sowie die Ausformung v. a. der distalen Extremitätenanlage benötigt (Capdevila und Izpisua Belmonte, 2001). Bei *Lrp4*-defizienten Mäusen ist die AER vergrößert und zeigt ein gestörtes Sekretionsverhalten (Johnson et al., 2005). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Polysyndaktylien aus einer durch die *Lrp4*-Insuffizienz verursachten Störung der apikalen ektodermalen Leiste resultieren.

Dass LRP4 von Osteoblasten exprimiert wird, wurde von Choi et al. gezeigt. Die Tiere des LRP4 EC_STOP-Mausmodells weisen einen klaren Knochenphänotyp auf. Die *Lrp4*-defizienten Mäuse haben verkürzte Femora mit verringerter Knochendichte. Ebenfalls sind bei den transgenen Tieren Knochenbauparameter erhöht (Serumspiegel von Osteocalcin und Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum als Marker der Osteoblastenaktivität, der Gehalt von Desoxypyridinolin im Urin als Knochenabbaumarker) (Choi et al., 2009).

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden Assoziationen von *LRP4*-SNPs (single nucleotide polymorphisms) mit Veränderungen des Knochenstoffwechsels indirekt nachgewiesen. Stykarsdottir et al. fanden SNPs bei 11p11.2 in *LRP4*, die sie mit der Knochendichte der Hüftknochen und der Wirbelkörper assoziieren konnten (Stykarsdottir et al., 2009). Die Knochendichte (*bone mineral density* (BMD)) gibt Auskunft über den Mineralisierungsgrad des Knochens und somit über seine Festigkeit. Die Messung der Knochendichte findet in der Osteoporosedagnostik Anwendung. Eine Metaanalyse zeigte Assoziationen von *LRP4*-SNPs mit der Knochendichte von Oberschenkelhals und der lumbalen Wirbelsäule (Richards et al., 2009). In einer von Kumar et al. durchgeführten Studie konnten in einer Kohorte von Frauen im Alter von 25 Jahren bei denjenigen, die *LRP4*-Polymorphismen besaßen, eine gesteigerte Gesamtknochendichte beobachtet werden. In einer anderen von ihnen untersuchten Kohorte, die Frauen im Alter von 75 Jahren umfasste, waren Trägerinnen von *LRP4* Varianten weniger von Knochenbrüchen betroffen (Stykarsdottir et al., 2009, Richards et al., 2009, Kumar et al., 2011).

1.3.1.2 Die Rolle von LRP4 in der neuro-muskulären Koppelung

Der Grund für die perinatale Letalität des globalen *Lrp4*-Knock-outs ist eine Störung in der Ausbildung von neuromuskulären Synapsen. Die Tiere sind paralytisch, atmen nicht und sterben perinatal (Weatherbee et al., 2006). Experimente liefern Hinweise darauf, dass die extrazelluläre Region des LRP4 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser neuromuskulären Kontakte spielt (Gomez und Burden, 2011, Kim et al., 2008). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bei Menschen, die unter der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis leiden, Autoantikörper gegen LRP4 gefunden wurden (Higuchi et al., 2011, Pevzner et al., 2012). Die Krankheit zeichnet sich durch eine gestörte Signalübertragung zwischen Nerv und Muskel aus (Kim et al., 2008, Vincent und Drachman, 2002).

1.3.1.3 Die Rolle von LRP4 in der Nierenentwicklung

LRP4 wirkt zudem bei der Nierenentwicklung mit. Die endgültige Niere entsteht über die verschiedenen Stadien der Vor-, Ur- und Nachniere. Die Nachniere entwickelt sich als metanephrogenes Blastem. Ihr wächst die sog. Ureterknospe entgegen. Aus diesen beiden Strukturen bildet sich dann die jeweilige Niere. Patienten mit Cenani-Lenz-Syndrom, bei denen *LRP4*-Mutationen gefunden wurden, waren auch von Nierenanomalien betroffen (Li et al., 2010). In *Lrp4* Knock-Out-Mäusen wurde eine verzögerte Bildung der Ureterknospe, sowie Nierenagnesien, d. h. ausbleibende Entwicklung einer oder beider Nieren, beobachtet (Karner et al., 2010).

1.3.1.4 LRP4 im Wnt-Signaling

Auf welche Weise LRP4 das Wnt-Signaling beeinflusst, ist noch nicht vollständig verstanden. Mit ihren *in-vitro*-Experimenten konnten Eric B. Johnson et al. zeigen, dass LRP4 das Wnt-Signal inhibieren kann (Johnson et al., 2005). An anderer Stelle konnte zudem *in-vitro* die Bindungsfähigkeit von LRP4 an das oben erwähnte Protein Wise nachgewiesen werden. LRP4 teilt mit LRP5/6 die Domäne, über welche Wise mit LRP5/6 interagiert (Ohazama et al., 2008). Es wird angenommen, dass die Bindung von Wise an LRP4 dazu führt, dass der LRP5/6-Co-Rezeptor des Wnt-Pfades verdrängt wird, und so eine Hemmung des Wnt-Signalings resultiert.

In anderen *in-vitro*-Studien stellte sich heraus, dass LRP4 auch an die beiden Inhibitoren des Wnt/ β -catenin Signalwegs Sclerostin und Dickkopf1 binden kann (Choi et al., 2009). Es wird diskutiert, dass LRP4 die hemmende Wirkung von Sclerostin und Dkk1 auf das Wnt-Signal vermitteln könnte, indem es zusammen mit ihnen den Co-Rezeptor LRP5/6 blockiert. Ebenfalls diskutiert wird, dass LRP4 mit LRP5/6 um die beiden Wnt-Inhibitoren konkurriert. So stünden diese nicht mehr für Inhibition des Wnt-Signals zur Verfügung, was dann insgesamt ein gesteigertes Wnt-Signal nach sich ziehen könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Einfluss von LRP4 auf den Knochenstoffwechsel weiter charakterisiert werden. Unter Verwendung des LRP4 EC_STOP-Mausmodells, bei dem LRP4 durch die Entfernung seiner Membranverankerung dysfunktional ist, soll erarbeitet werden, welche Zelltypen im Knochen LRP4 exprimieren und ob die Einschränkung der LRP4-Funktion pathophysiologische Veränderungen nach sich zieht. Zur Charakterisierung *in-vivo* werden Wachstumsfugen histologisch analysiert, quantitative RNA-Analysen der Femur Epi- und Diaphyse durchgeführt, sowie in Serumproben Knochenumbauparameter gemessen. Die nach etablierten Standardmethoden isolierten und kultivierten primären Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten werden mittels quantitativer RNA-Analysen hinsichtlich ihres Differenzierungsverhaltens *ex-vivo* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Die Organentnahmen wurden mit Genehmigung der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg und des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt (ORG Nr.: ORG_538_LRP4). Da der vollständige Knock-out des *Lrp4* Gens letal ist, wurden transgene Mäuse verwendet, bei denen ein Stop-Codon im Exon 36 von *Lrp4* eingebaut wurde, so dass der Transmembrananker und der intrazelluläre Teil des Rezeptors verloren gingen. Die so entstandenen Tiere (LRP4 EC_STOP) sind überlebensfähig (Johnson et al., 2005). Es wurden heterozygote Zuchtkästen angesetzt (129SvEv x C57BL/6 Hintergrund) und für die Versuche ausschließlich Wurfgeschwister verwendet. Die Tiere wurden unter einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Sie erhielten Wasser und herkömmliche Nagernahrung („chow diet“, LASQCdietRod16-R von LASvendi) ad libitum.

2.2 Genotypisierung

Es wurde nur eine Genotypisierung der Wildtypen und der heterozygot transgenen Mäuse vorgenommen, da die homozygot transgenen Mäuse aufgrund der Polysyndaktylie ihrem Genotyp zuzuordnen waren (Abb.11 B).

2.2.1 DNA-Isolierung

Neugeborenen Mäusen wurde eine Schwanzbiopsie entnommen und diese in 200 µl DirectPCR[®] Lysis Reagent (*Viagen*) und 10 µl Proteinase K (*Invitrogen*) für 4 h bei 55 °C und 500 rpm im Thermomixer (*Eppendorf*) lysiert. Nach einer Inaktivierung der Proteinase K über 45 Minuten bei 86°C konnte die Lösung weiter für die PCR verwendet werden.

2.2.2 PCR

Für die PCR, die das mutierte *Lrp4*-Allel amplifiziert, wurden folgende Primersequenzen verwendet:

LRP4 mut 5'-CTCGAAAGGGATGCCAGCTGGGCCTCTG-3'
5'-CGATGGCATAGCTGACTTA-3'

Tabelle 1: verwendete Reaktionslösung pro zu bestimmende DNA-Probe:

Menge (µl)	Reagenz	Hersteller
2,5	Dream Taq green buffer 10-fach	<i>Fermentas</i>
1,25	DMSO	<i>Sigma</i>
17	Aqua ad injectionem	<i>Braun</i>
0,5	dNTPs	<i>Fermentas</i>
0,5	MgCl ₂	<i>Fermentas</i>
0,5	je Primer	<i>Fermentas</i>
0,25	Taq-Polymerase	<i>Fermentas</i>

Ein Ansatz bestand aus 23 µl Reaktionslösung und 2 µl aufgereinigter DNA-Lösung. Es wurde folgendes Thermocyclerprotokoll gewählt:

Tabelle 2: Schritte der LRP4 mut-PCR (35 Zyklen)

Vorgang	Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)
Initiale Denaturierung	95	240
Denaturierung	95	40
Annealing	60	30
Elongation	72	120
Finale Elongation	72	420

2.3 Präparation und Differenzierung primärer muriner Zellen

Bei allen Präparationen wurden Zellen aus Wildtyp und homozygot transgenen Mäusen isoliert. Vor der Präparation erfolgte die Tötung der Mäuse gemäß Tierschutzgesetz. Im Folgenden wurden alle Zellen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Sättigung steril im Inkubator (*Binder*) kultiviert.

2.3.1 Chondrozyten

Zur Gewinnung primärer Chondrozyten wurden aus 7 Tage alten Mäusen beidseits das Caput femoris, das distale Femur, sowie die proximale Tibia freipräpariert. Das Gewebe wurde in ein Digestionsmedium (bestehend aus je 5 ml DMEM/F12 Medium (*Gibco*), versetzt mit 15 mg Collagenase D (*Roche*) pro Tier) gegeben, und für 2 Stunden im Orbitalshaker (*Infors*) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb (*Falcon*) gefiltert und die Zellen bei 1200 rpm für 3 Minuten herunter zentrifugiert. Hiernach wurde das Zellpellet in Nährmedium (DMEM/F12 Medium (*Gibco*) zzgl. 10% FCS (*Gibco*), 2 % Anti-Anti und 1% PenStrep) aufgenommen und 250000 Zellen/ml auf eine 12 well Platte (*Nunc*) ausgesät. Die Zellen wurden für 2 Tage im Medium inkubiert, welches danach täglich bis zur Zellernte gewechselt wurde. Für die Zellernte wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet für 10 Minuten in 1 ml Trizol (*Invitrogen*) aufgenommen. Anschließend wurde es in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Osteoblasten

Zur Isolation primärer Osteoblasten wurden die Calvarien 3 Tage alter Mäuse präpariert. Die Calvarien wurden unter der Sicherheitswerkbank (*Heraeus*) freipräpariert und in eiskaltem PBS gesammelt. Für den enzymatischen Aufschluss wurde das Gewebe fünfmal je 10 Minuten im Orbitalshaker bei 37°C und 180 rpm in Digestionsmedium (bestehend aus 50 ml alpha-MEM (*Sigma*), 0,05 g Kollagenase Typ Ia (*Sigma*), 0,1 g Dispase grade 2 (*Roche*)) inkubiert. Nach jedem Verdauschritt erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Die Überstände der letzten drei Durchgänge wurden gesammelt, durch ein 40 µm Zellsieb (*Falcon*) filtriert und bei 1.300 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde im Nährmedium (alpha-MEM (*Sigma*), 10% HyClone FBS (*Hyclone*), 1 % Penicillin/Streptomycin (*Gibco*)) resuspendiert und 30.000 Zellen/ml auf eine 12 well Platte (*Nunc*) ausplattiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte innerhalb der nächsten 24 Stunden. Die Stimulation der osteoblastären Differenzierung mittels Induktionsmedium (Nährmedium zzgl. β -Glycerophosphat (50 µg/ml) und Ascorbat (10 mM) (beides *Sigma*)) begann bei Subkonfluenz der Zellen (80 %) und fand alle 3 Tage statt. Zellen wurden an Tag 6, 12 und 18 wie unter 2.3.1 beschrieben geerntet.

2.3.3 Osteoklasten

Primäre Osteoklasten wurden aus 10-12 Wochen alten Mäusen isoliert. Dafür wurden beide Femora heraus präpariert. Aus diesen gewann man mittels Zentrifugation (10 Sekunden bei 8000 rpm) das Knochenmark, welches in Nährmedium (alpha-MEM (*Sigma*), 10% HyClone FBS (*Hyclone*), 1 % Penicillin/Streptomycin (*Gibco*), Vitamin D3 (*Sigma*, 100 nM)) resuspendiert wurde. Anschließend wurden 5×10^6 Zellen/ml auf eine 12 well Platte (*Nunc*) ausplattiert. Nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Induktion begann bei 80 % Konfluenz durch Zugabe des Nährmediums zzgl. mRANKL (40 ng/ml) und mM-CSF (20 ng/ml) (beides *Peprotech*). Dieser Vorgang wurde bis zum Zellerntezeitpunkt alle 3 Tage wiederholt.

2.4 Färbetechniken

2.4.1 Von Kossa-Färbung

Nach Absaugen des Mediums, folgte eine dreimalige Waschung mit PBS (*Gibco*). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 3,7 % Formalin (*Merck*) fixiert und dreimalig mit PBS gewaschen. Dem schlossen sich eine Zellfärbung mit Silbernitratlösung (5%) und ein dreimaliges Waschen mit Aqua dest. an. Es folgte eine Fixierung der Zellen zur Aufbewahrung mit Natriumthiosulfatlösung (5 %).

2.4.2 Alzianblau/Alizarinrot-Färbung

Es wurden Skelette von 8 Tage und 4 Wochen alten Mäusen eingefärbt. Nach Fixierung der Skelette in 95 % Ethanol (*Merck*) wurde das Knorpelgewebe 48 Stunden bei Raumtemperatur mit Alzianblau-Färbelösung (0,0015 % Alzianblau 8GX (*Sigma*), 20 % Essigsäure, 75 % Ethanol (beides *Merck*)) gefärbt. Nach dreistündiger Waschung mit 95 % Ethanol (*Merck*) wurden die Skelette zur Auflösung des restlichen Weichteilgewebes 48 (Skelette der 8 Tage alten Tiere) bzw. 72 (die der 4 Wochen alten) Stunden in 2 % KOH (*Merck*) inkubiert. Es folgte die Färbung des mineralisierten Knochengewebes durch Alizarinrot-Färbelösung (0.005 % Alizarinrot-Natriumsulfat (*Sigma*) in 1 % KOH (*Merck*) gelöst). Hier schloss sich eine 24 stündige Inkubation in einer 1 % KOH (*Merck*) und 20 % Glycerol Lösung an. Gelagert wurden die Skelette in einem 1:1 Gemisch aus Glycerol und 95 % Ethanol.

2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die lumbale Wirbelsäule und die Kniegelenke (inkl. proximaler Tibia und distalem Femur) wurden isoliert, über Nacht in 3.5 % Formalin (*Merck*) fixiert und eine Woche in 10% EDTA (*Sigma*) entkalkifiziert. Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Schnittpräparate mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung eingefärbt, um die Wachstumfuge darzustellen.

2.5 Serum-Analyse

Die Tiere wurden grundsätzlich 4 h vor der Serumgewinnung gefastet und durch eine intraperitoneale Injektion von 200 µl Narkoselösung, bestehend aus einer Stocklösung aus 2,3 ml Ketamin (10 mg/ml, *Albrecht*), 1 ml 2 % Rompun (*Bayer*) und 6,7 ml 0,9 % NaCl (*Braun*) anästhesiert. Das Blut wurde aus dem rechten Herzventrikel entnommen. Das Serum erhielt man, indem man dann das gewonnene Blut 10 Minuten bei Raumtemperatur gerinnen ließ, und dann eine 10-minütige Abzentrifugation bei 5000 rpm anschloss und den Überstand abpipettierte. Das so gewonnene Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3: Untersuchte Serumparameter und verwendeter Kits

Target im Serum	Hersteller des Kits	Kommentar
TAG	<i>Roche</i>	
Cholesterol	<i>Roche</i>	
Kalzium	<i>BioAssaySystems</i>	Kalorimetrische Messung
Phosphat	<i>BioAssaySystems</i>	Kalorimetrische Messung
mOPG	<i>R&D Systems</i>	ELISA
mRankl	<i>R&D Systems</i>	ELISA
Aktivität der alkalischen Phosphatase	<i>Sigma</i>	Aktivitätsbestimmung erfolgte durch Umsatz von para-Nitrophenol-Phosphat zu para-Nitrophenol
CTX	<i>Immunodiagnostic Systems</i>	ELISA
Osteocalcin	<i>Immunotopics</i>	immunoradiometrischer Test (IRMA)

2.5.1 FPLC (Fast protein liquid chromatography)

Zur Darstellung des Lipoproteinprofils wurde das gepoolte Serum durch FPLC aufgetrennt. Es kamen S6-superose Säulen (*GE Healthcare*) zum Einsatz. Anschließend wurde der Lipidgehalt der einzelnen Fraktionen analysiert.

2.6 RNA-Isolierung und quantitative Real-time-PCR

2.6.1 RNA-Isolierung

Um die RNA aus den gefrorenen Gewebeproben (Gehirn, Niere, Calvarien, Epi- und Diaphyse des Femurs) zu isolieren, mussten diese zunächst mit Hilfe eines TissueLyzers (*Qiagen*) und zweier Metallkugeln in einem 2 ml Eppendorfgefäß zerkleinert werden (vier Durchgänge à drei Minuten mit einer Frequenz von 20 Hz). Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden pro 1 ml Trizol (*Invitrogen*) 250 µl Chloroform (*Merck*) hinzugegeben. Nach 10 s Vortexen und einer anschließenden 10 minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der obere klare Überstand mit den enthaltenen Ribonukleinsäuren in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde dann noch im Verhältnis 1:1 70 % Ethanol zugefügt und dieses Gemisch den Herstellerangaben entsprechend mit dem NucleoSpin RNA II-Kit (*Machery-Nagel*) weiterverarbeitet. Nachdem die RNA mit 40 µl Aqua ad injectionem (*Braun*) von der Säule eluiert wurde, folgte die Konzentrationsmessung mit Hilfe eines NanoDrop (*Peqlab*). Mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*) wurde dann 1 µg RNA in 50 µL Reaktionsvolumen bei 37 °C für 120 min in cDNA umgeschrieben.

2.6.2 Quantitative Real-time-PCR

Für die zu messenden Gene wurde pro Probe je ein Reaktionsgemisch hergestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung Reaktionsgemisch der quantitativen Real-time PCR

Menge (µl)	Reagenz	Hersteller
15	TaqMan Universal Master Mix	<i>Applied Biosystems</i>
1,5	entsprechender Assay-on-Demand primer	<i>Applied Biosystems</i>
8,5	Aqua ad injectabilia	<i>Braun</i>
5	Proben-cDNA (1:5 verdünnt)	

Pro Proben-cDNA wurden 4-fach-Werte gemessen. Die quantitative Real-time-PCR wurde wie von (Zitzer et al., 2006) beschrieben durchgeführt. Die jeweilige relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) unter Bezugnahme auf die Expression des Referenzgens Tbp (*TATA box binding protein*) errechnet.

Tabelle 5: untersuchte Gene und dazugehörige Primer

AoD	Gen	Assay ID	Sequenz
mTbp	TATA box binding protein	Mm00446973_m1	ATCCCAAGCGATT TGCTGCAGTCAT
mLrp4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	Mm00554341_m1	CGCCTGTGCCAG AGTCTTGACAAG
mLrp5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	Mm00493179_m1	CCCCGCCGCGGCC TCACCGCTCCTG
mLrp6	low density lipoprotein receptor-related protein 6	Mm00521783_m1	GATGGAACAAACC GGCAGGCAGTGG
mCol10a1	collagen, type X, alpha 1	Mm00487041_m1	CCATACGCCATAA AGAGTAAAGGGA
mCol1a1	collagen, type I, alpha 1	Mm00801666_g1	CGATGGATTCCCG TTCGAGTACGGA
mMmp13	matrix metalloproteinase 13	Mm00439491_m1	GCAGTTCCAAAGG CTACAACCTTGTT
mOsteocalcin	bone gamma carboxyglutamate protein	Mm03413826_mH	ACAAAGCCTTCAT GTCCAAGCAGGA
mOpg	osteoprotegerin	Mm00435452_m1	TGGTGCAAGCTGG AACCCAGAGCG
mRankl	receptor activator of NF- κ B ligand	Mm01313943_m1	TCCTGTACTTTCGA GCGCAGATGGA
mAcp5	acid phosphatase 5	Mm00475698_m1	TAAGATCTCCAAG CGCTGGAAGTTC
mCalcr	calcitonin receptor	Mm00432271_m1	GCTCCTAGTGAGC CCAACCTCCAGTT
mClcn7	chloride channel 7	Mm00442400_m1	ACAGGGGCAGCGA TCTGGGCAGATC
mCtsk	cathepsin K	Mm00484039_m1	TTAAAAACAGCTG GGGAGAGAGCTG

2.7 Statistik

Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Test* überprüft. Bei $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

3 Ergebnisse

Zunächst wurden LRP4 EC_STOP-Mäuse hinsichtlich möglicher Phänotypen mit Wildtyp-Tieren verglichen. Hierfür wurde das Gewicht, der Lipoproteinstatus und das Skelett untersucht, sowie eine Serumanalyse bezüglich verschiedener Knochenstoffwechselparameter bei 4, 12 und 26 Wochen alten Tieren durchgeführt. Zusätzlich wurden die Auswirkung des LRP4 EC_STOP organspezifisch für Epi-/Meta-/Diaphyse und Calvarien betrachtet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine *in-vitro*-Charakterisierung primärer Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten vorgenommen, die aus transgenen und Wildtyp-Mäusen isoliert wurden.

3.1 Körpergewicht Wildtyp und transgener Mäuse

Da das LRP4 EC_STOP-Modell einen Einfluss auf Körpergewicht und Knochenmasse haben könnte, wurde zunächst das Körpergewicht von 4, 12 und 26 Wochen alten Mäusen erfasst (Abb. 1). Alle Tiere erhielten Wasser und herkömmliche Nagernahrung („chow diet“) *ad libitum*. Die Wildtyp-Mäuse legten mit zunehmendem Alter stärker an Gewicht zu, als die LRP4 EC_STOP-Mäuse.

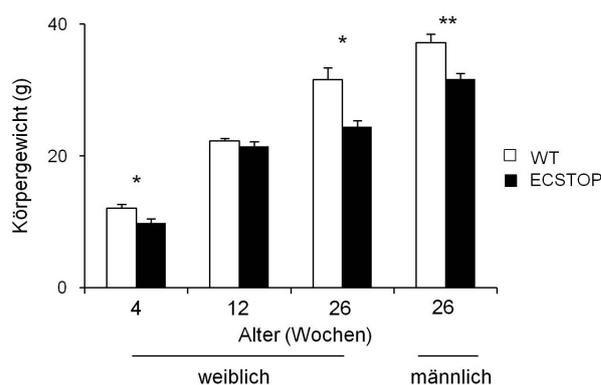


Abb. 5: Körpergewichte von weiblichen und männlichen Tieren nach Woche 4, 12, 26 bei ad libitum chow diet in Gruppenkäfigen.

Die 4 und 26 Wochen alten transgenen Mäuse haben ein reduziertes Körpergewicht ($n = 16$, außer bei 26 Wochen female $n = 12$; $p < 0,05$; * $p < 0,01$; **).

Zu allen drei Zeitpunkten zeigte sich ein niedrigeres Gewicht bei den transgenen Mäusen. Am deutlichsten ist der Unterschied bei den 26 Wochen alten Männchen (14,8 % niedriger, $p < 0,01$: **).

3.2 Lipoproteinprofil

Da LRP4 ein Teil der LDL-Rezeptorfamilie ist, deren Mitglieder Einfluss auf den Lipoproteinstoffwechsel nehmen können (z. B. die durch den LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL in die Zellen (Brown und Goldstein, 1986)), wurde eine FPLC der Serumproben von 12 bzw. 26 Wochen alten Tieren durchgeführt.

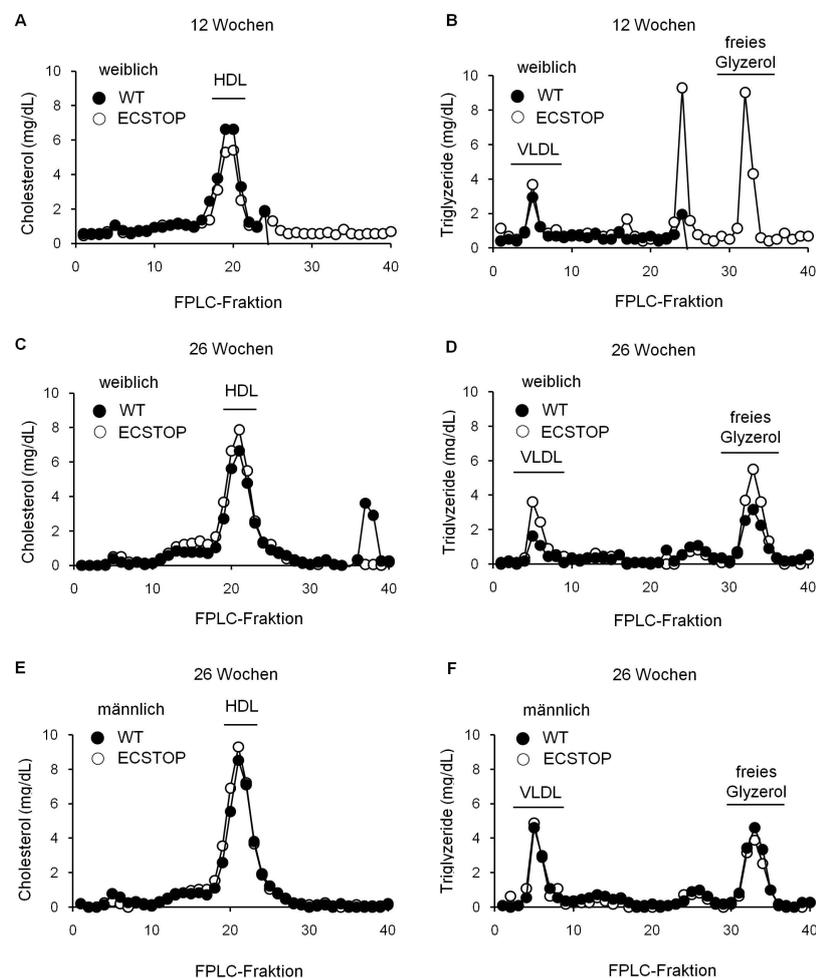


Abb. 6: FPLC von 12 und 26 Wochen alten Wildtyp und LRP4 defizienten Tieren. Die HDL-Fraktion der 12 Wochen alten LRP4 EC_STOP Weibchen ist leicht erniedrigt, während sich die TRL-Fraktion nicht unterscheidet. HDL-, TRL- und Fraktion des freien Glycerols sind niedriger bei den 26 Wochen alten weiblichen Mäusen (n = 12). Bei den Böcken zeigt sich dieser Unterschied nicht.

Abbildung 6 A zeigt im Fraktionsbereich, in dem sich das HDL darstellt (Peak ungefähr bei Fraktionen 19 und 20), eine leichte Erniedrigung im Serum der Wildtyp-Weibchen. In der TRL-Fraktion (Abb. 6 B) ist kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Aufgrund fehlender Messungen konnten die Fraktionen 25-40 für die transgenen Tiere der 12 Wochen Gruppen nicht dargestellt werden. Die HDL- und TRL-Fraktionen, sowie die des freien Glycerols der 26 Wochen alten LRP4 EC_STOP-Weibchen sind leicht erniedrigt (Abb. 6 C und D). Diese Unterschiede sind bei den männlichen 26 Wochen alten Tieren nicht zu sehen (Abb. 6 E und F).

3.3 Serumanalyse 4, 12 und 26 Wochen alter Tiere

3.3.1 Parameter des Fettstoffwechsels

In den gewonnenen Seren der 4, 12 bzw. 26 Wochen alten Tieren wurde jeweils der Cholesterol- und Triglyzeridspiegel gemessen. Die Serummessung zeigte keinen Unterschied im Cholesterolspiegel. Bei den Triglyzeriden zeigt sich ein erhöhter Spiegel bei den transgenen Tieren (4 Wochen: $p = 0,30$; 12 Wochen: $p = 0,07$), mit Ausnahme der Gruppe der 26 Wochen alten Weibchen, in welcher sich tendenziell ein erniedrigter Triglyzeridspiegel darstellt.

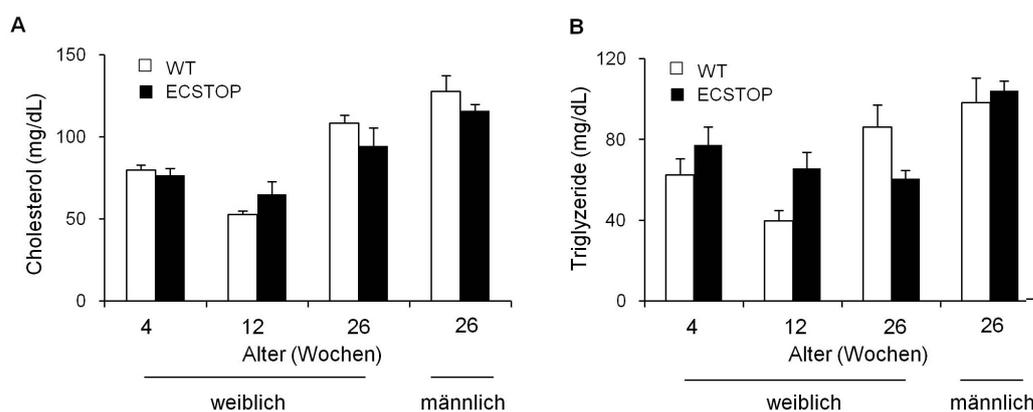


Abb. 7: Cholesterol- und Triglyzeridmessung im Serum 4, 12 und 26 Wochen alter Tiere. A) Im Cholesterolgehalt der Seren zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen, aber zwischen den verschiedenen Zeitpunkten.

B) Der Triglyzeridspiegel ist, außer bei den 26 Wochen alten Weibchen, in den Seren der transgenen Tiere erhöht im Vergleich zu denen der Wildtypen. Die Seren der 26 Wochen alten LRP4 EC_STOP-Weibchen haben einen niedrigeren Triglyzeridgehalt als die Vergleichsgruppe ($p = 0,11$). (n = 16, 26 Wochen weiblich n = 12)

3.3.2 Parameter des Knochenstoffwechsels

Um Einflüsse von LRP4 auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen, wurde der Gehalt verschiedener spezifischer Marker in den Seren der Mäuse gemessen. Als Knochenaufbaumarker wurden die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) im Serum und der Osteocalcinspiegel des Serums verwendet. Der Serumgehalt des C-Peptids des Typ 1 Kollagens (CTX) wurde als Marker des Knochenabbaus genutzt. Osteoprotegerin- und RankLigand (RankL)-Spiegel wurden im Serum gemessen. In Bezug auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum zeigt sich bei den 4 Wochen alten Tieren eine doppelt so hohe Aktivität wie bei 12 und 26 Wochen alten Tieren, ohne dass es signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen gibt (Abb. 8A). Auch im Osteocalcinserumspiegel beider Genotypen findet man diese deutliche Erhöhung bei den 4 Wochen alten Mäusen verglichen mit denen der anderen Altersstufen. Während sich bei den LRP4 EC_STOP 4 Wochen alten Weibchen ein signifikant erniedrigter Osteocalcinspiegel verglichen mit den Wildtyp-Mäusen finden lässt ($p < 0,05$: *), zeigt sich insbesondere bei den 26 Wochen alten Tieren ein erhöhter Osteocalcingehalt im Serum der transgenen Tiere (12 Wochen: keine statistische Signifikanz, 26 Wochen alte Weibchen: $p < 0,05$: *, 26 Wochen alte Männchen: $p < 0,01$: **) (Abb. 8B). Der C-Peptid-Spiegel des Typ 1 Kollagens im Serum ist bei beiden Geschlechtern der 26 Wochen alten Tieren nicht statistisch signifikant verändert (Abb. 8C). Während der Osteoprotegerinserumspiegel der 26 Wochen alten LRP4 EC_STOP Weibchen um 18,1 % des Spiegels der Wildtyp Tiere verringert ist ($p < 0,05$), zeigt sich bei den Böcken eine Erhöhung ($p = 0,32$). Der Osteoprotegeringehalt ist im Serum der Böcke beider Genotypen höher als der Wert der gleichaltrigen Weibchen (Abb. 8D). Bei der Betrachtung des RankL-Serumgehaltes lässt sich eine Tendenz zur Erhöhung bei den Böcken beider Genotypen im Vergleich zu den Weibchen erkennen ($p = 0,12$) (Abb. 8E). In der absoluten Menge an Kalzium oder Phosphat im Serum zeigt sich zwischen den Genotypen kein Unterschied (Abb. 8F, G). Bei den 26 Wochen alten Männchen beider Genotypen ist der Phosphatspiegel höher als der der gleichaltrigen Weibchen.

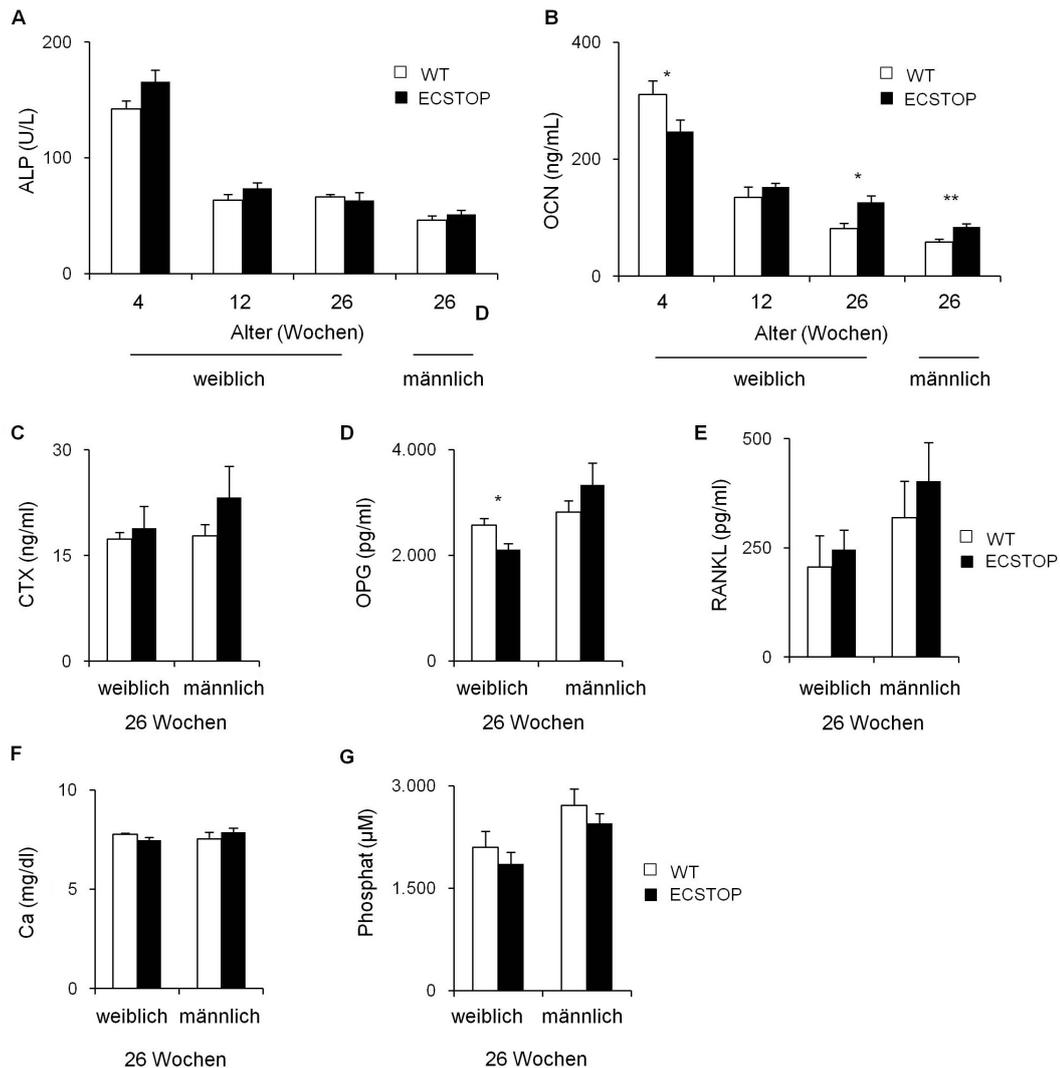


Abb. 8: Knochenstoffwechselformparametermessung in Seren von 4, 12 und 26 Wochen alter Tiere.

A) In der Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die 4 Wochen alten Tiere zeigen bei beiden Genotypen eine doppelt so hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase wie die der anderen Altersgruppen.

B) Bei den 4 Wochen alten transgenen Weibchen zeigt sich ein signifikant erniedrigter Osteocalcinspiegel im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe ($p < 0,05$: *). Bei den anderen Altersstufen findet sich ein Trend zur Erhöhung des Osteocalcins im Serum (12 Wochen: $p = 0,33$, 26 Wochen alte Weibchen: $p < 0,05$: *, 26 Wochen alte Männchen: $p < 0,01$: **).

C) Der Gehalt am C-Peptid des Typ 1 Kollagens im Serum ist bei beiden Geschlechtern der 26 Wochen alten Tieren nicht statistisch signifikant verändert.

D) Die 26 Wochen alten transgenen Weibchen haben einen erniedrigten Osteoprotegerinserumspiegel ($p < 0,05$: *). Bei den Böcken ist er im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhöht ($p = 0,32$).

E) Beim RankLigandserumgehalt lässt sich eine Tendenz zur Erhöhung bei den LRP4 EC_STOP-Mäusen beider Geschlechter erkennen.

F, G) Kalzium- und Phosphatspiegel unterscheiden sich nicht zwischen den Genotypen. (n = 8, bei 26 Wochen alten Weibchen n = 6)

3.4 Makroskopische und mikroskopische Skelettanalyse

3.4.1 Röntgenbilder 4, 12 und 26 Wochen alter Mäuse

Um makroskopisch erkennbare Unterschiede im Skelettbau der LRP4 EC_STOP-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen detektieren zu können, wurden Röntgenbilder von Skeletten 4, 12 und 26 Wochen alter Mäuse aufgenommen (Abb. 9).

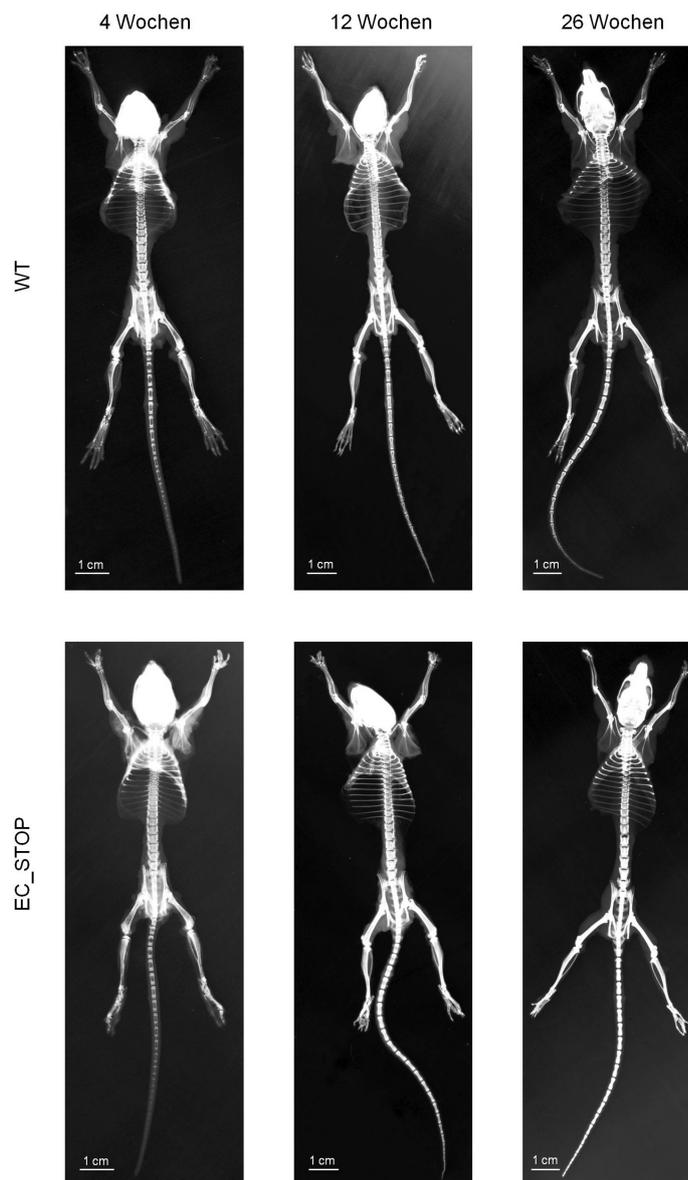


Abb. 9: Repräsentative Röntgenaufnahmen von Skeletten 4, 12 und 26 Wochen alter Mäuse

Auf den Röntgenbildern lassen sich makroskopisch Polysyndaktylien, d.h. Fusion von mehreren Gliedern der Finger oder Zehen, nachweisen.

Anschließend wurden die Wirbelsäule (hier Abstand *dens axis* zu *tuber ischiadicum*), der Abstand zwischen Wirbelkörper 2 und 4 (Wirbelunterkante zu Wirbeloberkante), femur und tibia mit einer Messgenauigkeit von einem Millimeter vermessen. Hier gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen der jeweiligen Altersgruppe. Die Längenzunahme in Bezug auf das vorherige Alter ist in jedem Abschnitt zu erkennen (Abb. 10). Der LRP4 EC_STOP hatte eine Polysyndaktylie zur Folge (beschrieben in Johnson et al., 2005).

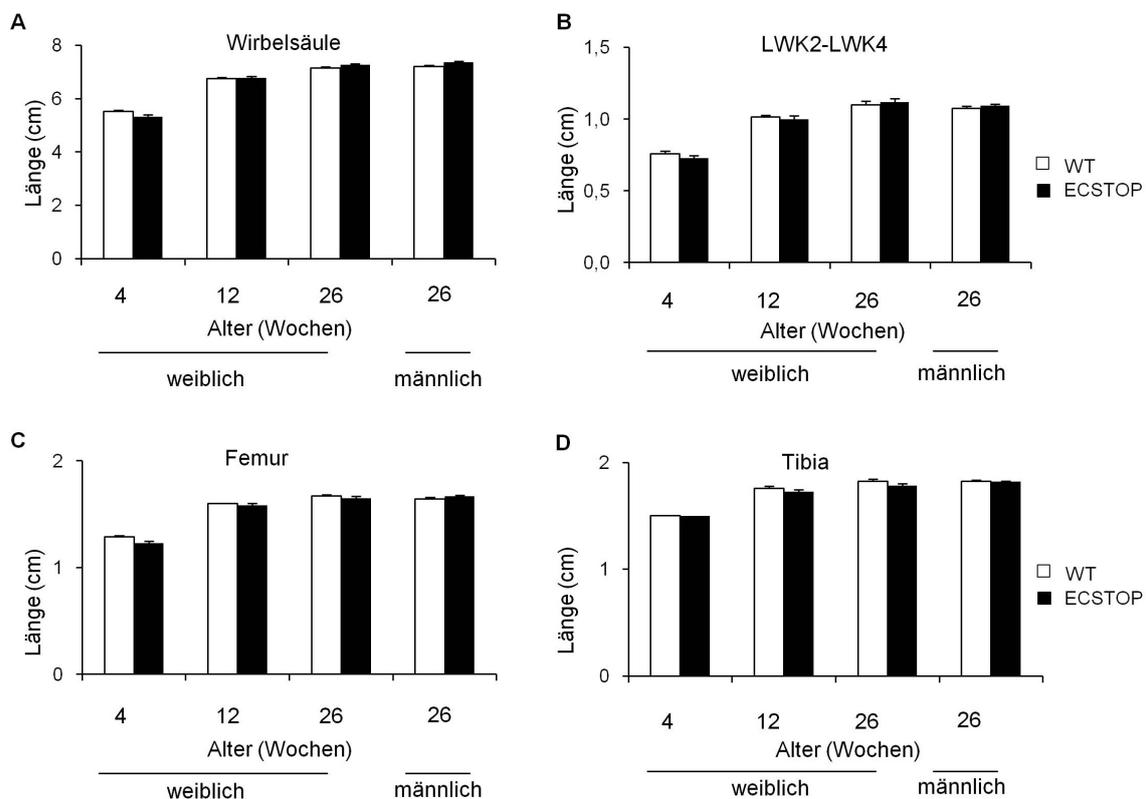


Abb. 10: Längenmessung der Skelette 4, 12 und 26 Wochen alter Mäuse

Bei den gemessenen Skelettabschnitten gibt es keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in den jeweiligen Altersstufen. In jedem Abschnitt ist die Längenzunahme in Bezug auf das vorherige Alter zu sehen. (4 und 12 Wochen alten Weibchen n = 7, bei 26 Wochen alten Tieren n = 8, Messgenauigkeit 1 mm)

3.4.2 Wachstumsfugenfärbung und Alzianblau/Alizarinrot-Färbung des Skeletts

Zur Untersuchung der Wachstumsfuge wurden die Schnittpräparate von 3 Wochen alten Mäusen mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung eingefärbt. Zwischen den beiden Genotypen zeigt sich kein Unterschied in der Breite und Organisation der einzelnen Zonen der Wachstumsfuge (Abb. 11A).

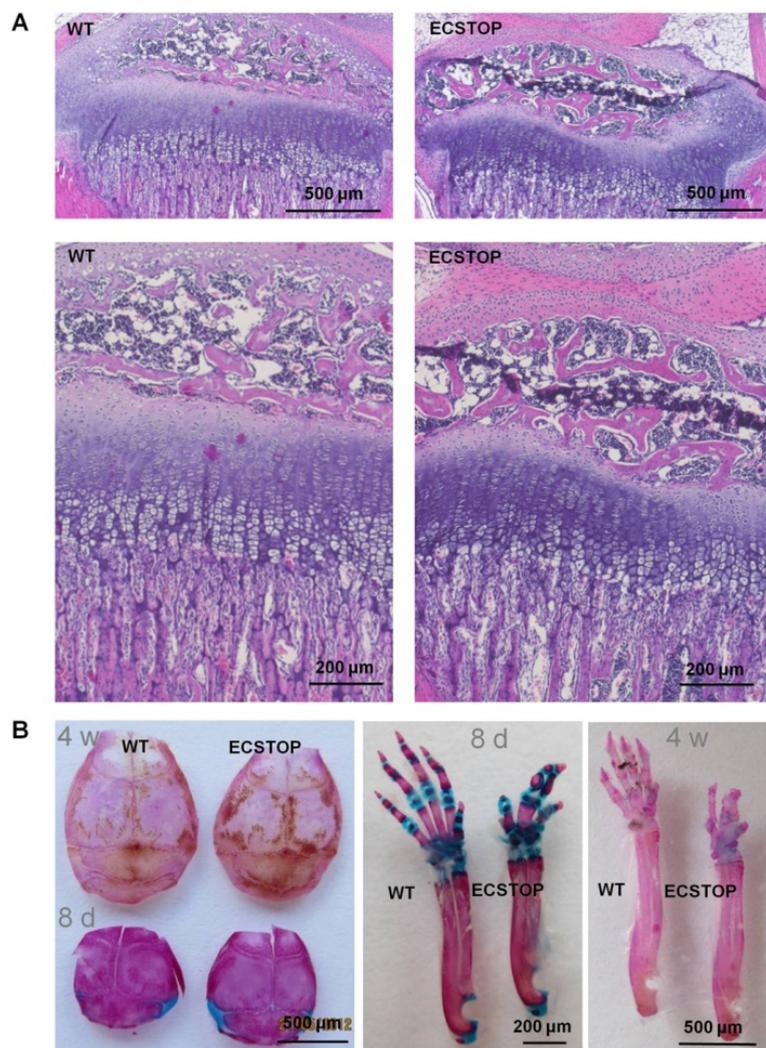


Abb. 11: Repräsentative Wachstumsfugen- und Alzianblau/Alizarinrot-Färbung

A) In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Skelette von 3 Wochen alten Mäusen zeigt sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (repräsentative Auswahl aus 6 Schnitten, obere Aufnahmen 5x vergrößert, untere 10x).

B) In der Alzianblau/Alizarinrot-Färbung der Skelette von 8 Tagen bzw. 4 Wochen alten Tieren ist bis auf die Polysyndaktylie der transgenen Tiere keine Abweichung auszumachen (Knorpel → Blau, Knochen → Rot).

Quantitative Messungen wurden nicht durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Alzianblau-Färbung für die Darstellung des Knorpelgewebes und eine Alizarinrot-Färbung für die Darstellung des Knochengewebes der Skelette von 8 Tagen bzw. 4 Wochen alten Tieren durchgeführt. Bei den transgenen Tieren wurden, verglichen mit den Wildtypen keine Abweichungen im Aufbau der Calvarien und der Röhrenknochen entdeckt (Abb. 11B).

3.5 Genexpressionsanalyse des Röhrenknochens, Schädeldaches und Kontrollorganen

Um den Einfluss des LRP4 EC_STOP auf das Skelettsystem zu untersuchen, wurden aus den Femora und Calvarien 12 Wochen alter Tiere beider Genotypen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe von TaqMan™-Analysen die Expression relevanter Gene untersucht. Das Gehirn und die Niere dienten hierbei als Kontrollgewebe.

3.5.1 Genexpressionsraten von LRP4, LRP5 und LRP6 in verschiedenen Geweben

In Abb. 12 A ist die LRP4-Genexpression der transgenen Mäuse auf mRNA-Ebene dargestellt. In den verschiedenen Knochengeweben ist sie im Vergleich zu den Kontrollorganen Hirn und Niere deutlich höher (bis zu 8 fach beim Vergleich Hirn und Calvaria). In Epi-/Meta- und Diaphyse des Röhrenknochens ist die LRP4 Expression stärker als in den Calvarien (6- bzw. 7-fache Steigerung verglichen mit 4-facher Steigerung in den Calvarien). Bei den Wildtyp-Mäusen finden sich keine großen Schwankungen in der LRP4-Expression innerhalb der untersuchten Gewebe. Betrachtet man die Expressionsrate von LRP5, fällt eine deutliche Erhöhung der Genexpression in der Diaphyse der transgenen Mäuse auf (Steigerung um 39 % des Wertes der Wildtyp Gruppe, $p = 0,03$). Es sind hier die Expressionsraten in beiden Genotypen um die Hälfte niedriger als in Epi- und Metaphyse, sowie im Schädeldach. Bezüglich der LRP6-Genexpression lassen sich keine Unterschiede bei den untersuchten Geweben darstellen. Ebenfalls ist hier in der Diaphyse die Expressionsrate in beiden Genotypen im Vergleich zu den Calvarien und Epi- und Metaphysen erniedrigt.

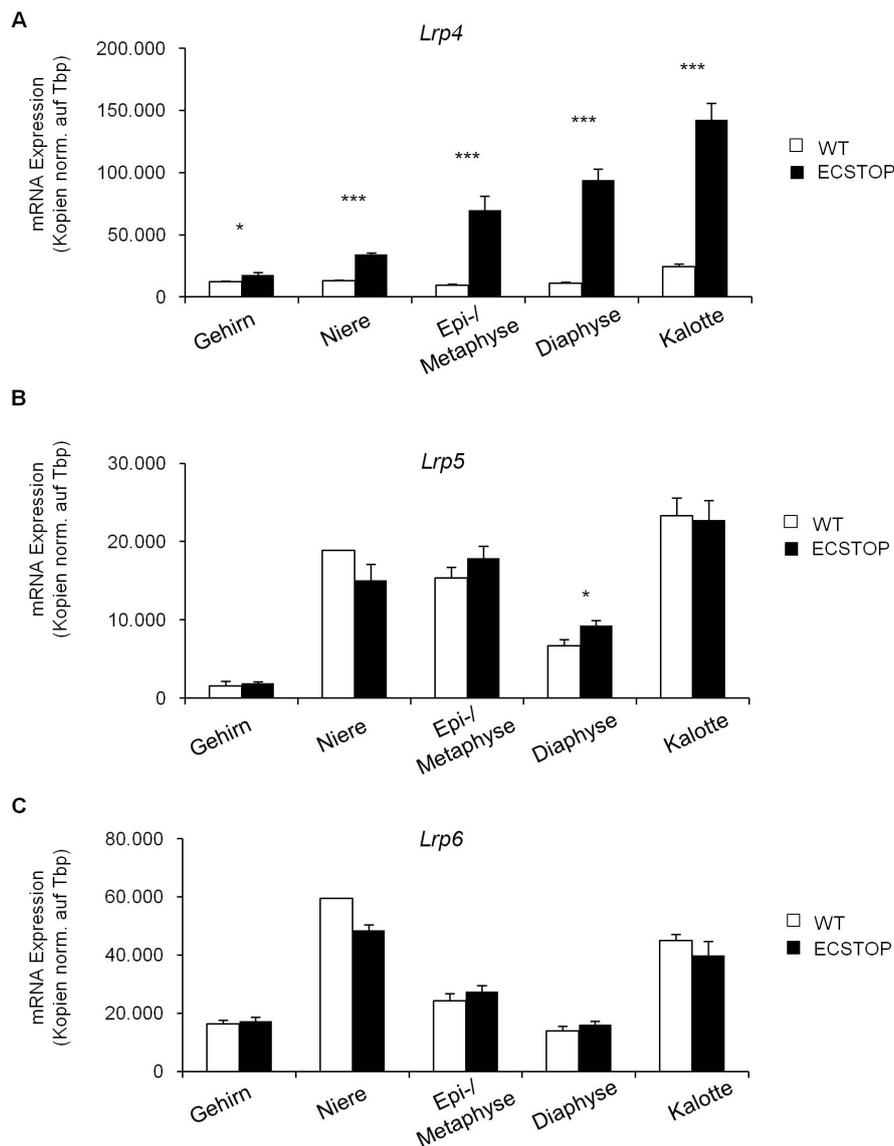


Abb. 12: Genexpressionsraten von LRP4, LRP5 und LRP6

A) Die LRP4-Expression ist bei den transgenen Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,001$: ***, bis auf Hirnproben, hier $p < 0,05$: *) . In den Knochengeweben ist die Expression deutlich höher als in Hirn und Niere.

B) In der Diaphyse findet sich eine signifikant erhöhte LRP5-Expression ($p < 0,05$: *) bei den LRP4 EC_STOP Mäusen, während bei den anderen Geweben kein Unterschied zwischen den Genotypen zu sehen ist.

C) Bezüglich der LRP6 Genexpression lassen sich keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten Geweben erkennen.

(n = 10, Hirn: n = 3, Niere: n = 2)

3.5.2 Genexpressionsraten von Knochenstoffwechselmarkern

Um einen Einblick in die Regulation der Osteoblasten und Osteoklasten der LRP4 EC_STOP-Mäuse zu bekommen, wurde die Expression von charakteristischen Genen in den Röhrenknochen- und Calvarienproben untersucht. Osteocalcin wird in Epi-/Metaphyse sowie Diaphyse der transgenen Tiere signifikant höher exprimiert als beim Wildtyp ($p < 0,05$; * bzw. $p < 0,001$: ***).

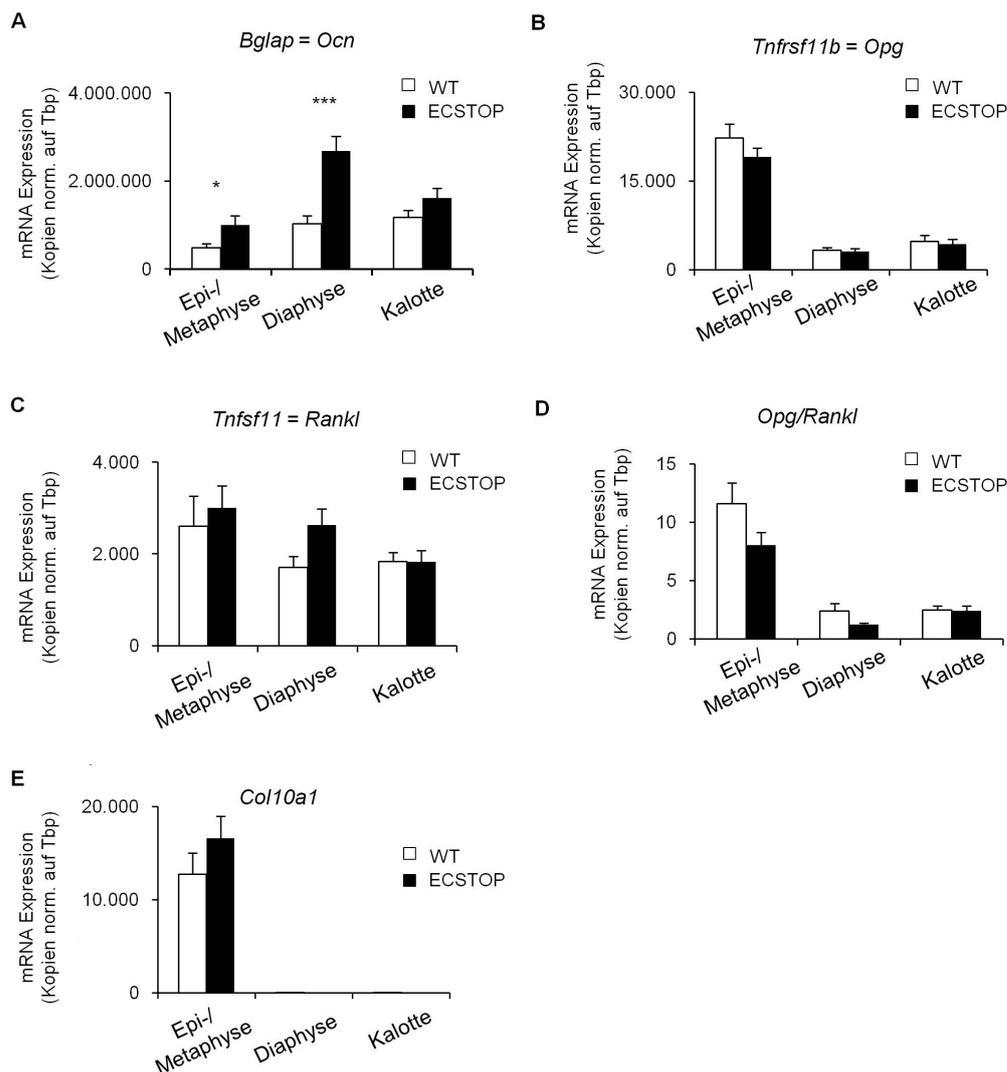


Abb. 13: Genexpressionsraten von Knochenstoffwechselmarkern

A) Die Expression von Osteocalcin ist in Epi-/Metaphyse sowie Diaphyse der transgenen Tiere signifikant erhöht ($p < 0,05$: * bzw. $p < 0,001$: ***).

B, C, D) Osteoprotegerin und RankLigand zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression und in ihrem Verhältnis beim Vergleich der beiden Genotypen.

E) In Epi-/Metaphyse wird Col10a1 nicht unterschiedlich exprimiert. In Diaphyse und Calvarien ist Col10a1 nicht in relevanter Kopienanzahl nachzuweisen.

(n = 10)

In den Calvarien ist die entsprechende Erhöhung weniger ausgeprägt, aber auch hier zeigt der Mittelwert eine Erhöhung ($p = 0,15$). In der Diaphyse beider Genotypen wird Osteocalcin doppelt so hoch exprimiert wie in der Epi-/Metaphyse (Abb. 13 A). Bei der Betrachtung der Genexpression von Osteoprotegerin und RankLigand als wichtige Elemente der Osteoblasten-Osteoklasteninteraktion lassen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Knochenteilen feststellen. So wird OPG in der Epi-/Metaphyse ca. 4,5 fach so stark wie in den beiden anderen Knochenproben exprimiert (Abb. 13 B, C, D). Col 10a1, ein Marker für die Aktivität vor allem von hypertrophen Chondrozyten, wird in der Epi-/Metaphysenregion in keinem unterschiedlichen Ausmaß exprimiert. In der Diaphyse und in den Calvarien ist keine Expression von Col 10a1 zu sehen (Abb. 13 E).

3.5.3 Genexpressionsraten von Parametern des Wnt-Signalwegs

Da der sogenannte kanonische wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg in der Regulation von Knochenneubildung und -erhaltung eine wichtige Rolle spielt und gezeigt wurde, dass LRP4 die Proteine Sclerostin und Dickkopf 1 (Dkk1) binden kann (Choi et al., 2009), wurde auch deren Genexpression in den entnommenen Knochenproben gemessen. Ergänzend wurde das Wnt-Targetgen DMP1 (codiert für das Protein Dentin matrix acidic phosphoprotein 1) untersucht. Während die Expression von SOST, dem codierenden Gen von Sclerostin, in den Calvarien der transgenen Mäuse doppelt so hoch ist wie in den Wildtyp Tieren ($p < 0,05$: *), zeigt sich dieses Phänomen im Röhrenknochen nicht. Die Genexpression ist bei beiden Genotypen sowohl in Epi-/Metaphyse als auch in der Diaphyse höher als im Schädeldach (Abb. 14 A). Sowohl bei der Expression von Dkk1 als auch von Dmp1 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den LRP4 EC_STOP und den Wildtyp-Tieren und den untersuchten Knochengewebe (Abb. 14 B, C).

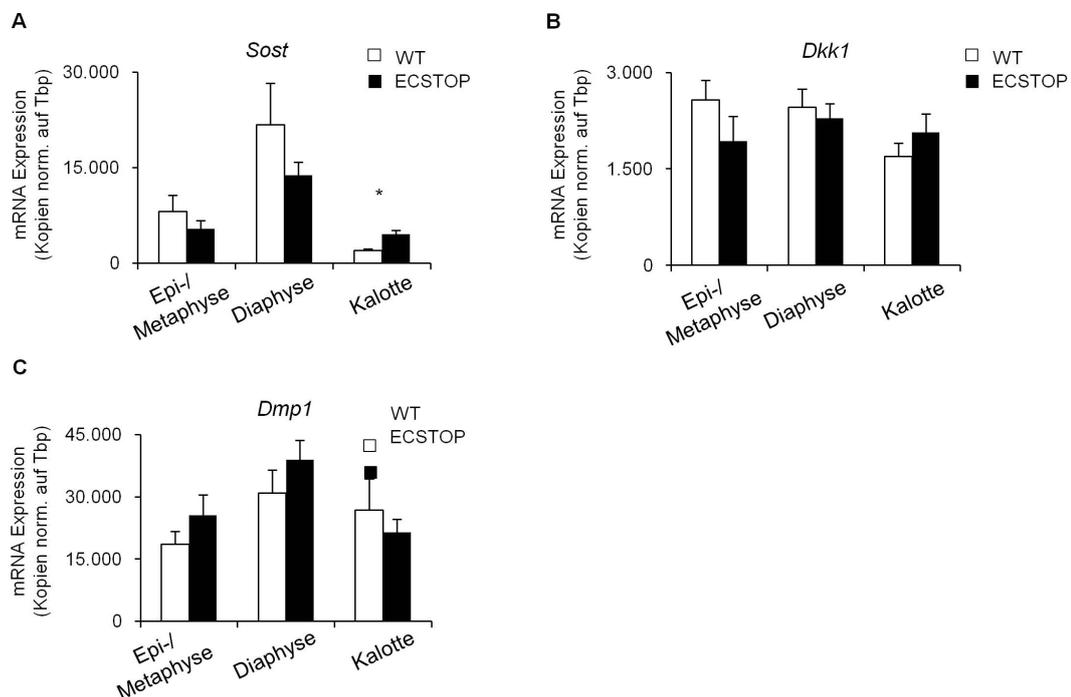


Abb. 14: Genexpressionsraten von Parametern des Wnt-Signalwegs

A) Die Expression von SOST, dem codierenden Gen von Sclerostin, ist in den Calvarien der transgenen Mäuse erhöht ($p < 0,05$; *). Im Röhrenknochen ist die Expression in beiden Genotypen höher als in den Calvarien.

B, C) Sowohl bei der Expression von Dkk1 als auch bei der von Dmp1 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den LRP4 EC_STOP und den Wildtyp Tieren und den untersuchten Knochengeweben.

(n = 10)

3.6 Differenzierungsverhalten primärer Knochenzellen *ex-vivo*

Um den Einfluss des LRP4 EC_STOP-Modells auf primäre Knochenstoffwechselzellen zu untersuchen, wurden Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten isoliert und kultiviert. Zum jeweils passenden Differenzierungszeitpunkt wurden die Zellen gerntet, sowie die Expression charakteristischer Gene gemessen.

3.6.1 LRP4-Expression

In Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten ist die signifikante Erhöhung der LRP4 Expression in den transgenen Zellen zu sehen (Abb. 15 A, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***). Diese ist in den Osteoblasten doppelt so hoch wie in den Osteoklasten bzw. Chondrozyten.

Misst man die LRP4-Expression der primären Osteoblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung (hier an den Tagen 6, 12 und 18), stellt sich eine Regulation des LRP4 Gens sowohl an Tag 6, als auch an Tag 18 dar, 4 bzw. 3 fach höher als in den Zellen aus den Wildtyp-Mäusen, $p < 0,01$: **, Abb. 15 B).

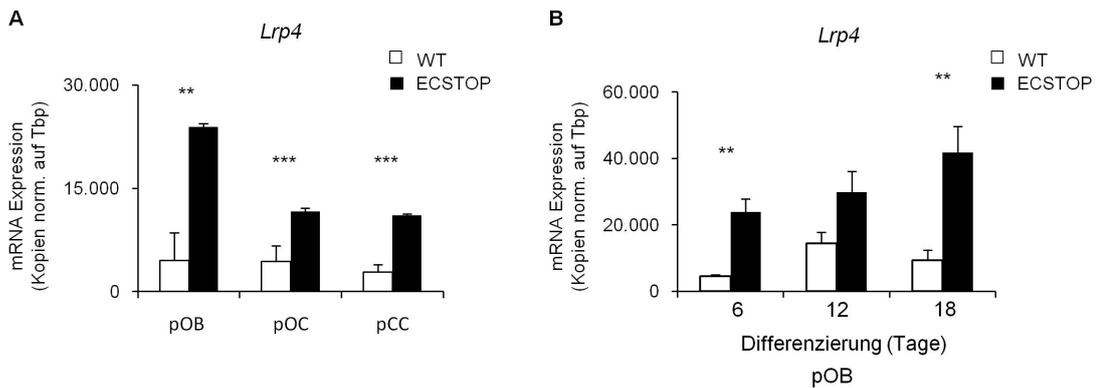


Abb. 15: LRP4 Expression in primären Knochen-/Knorpelzellen

A) In allen drei primären Knochen-/Knorpelzellarten ist eine signifikante Erhöhung der LRP4 Expression bei den transgenen Mäusen zu finden ($p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***). Die Expression der primären Osteoblasten ist doppelt so hoch wie in den Osteoklasten bzw. Chondrozyten des transgenen Genotyps (pOB vs. pOC, pCC).

B) Zu den Differenzierungszeitpunkten d6 und d18 findet man eine signifikant gesteigerte LRP4 Expression bei den transgenen Tieren ($p < 0,01$: **). Die Steigerung bei d12 setzt sich als Trend fort ($p = 0,065$).

(Anzahl der verglichenen Experimente: primäre Osteoblasten (pOB): 3, primäre Osteoklasten (pOC): 4, primäre Chondrozyten (pCC): 5)

3.6.2 Messung von Differenzierungsmarkern und Mineralisierungsverhalten primärer Osteoblasten

Von den aus den Calvarien gewonnenen Osteoblasten 3 Tage alter Mäuse wurden 30.000 Zellen pro Platte ausplattiert. Die Zugabe des Induktionsmediums (Nährmedium zzgl. β -Glycerophosphat und Ascorbat) begann bei Subkonfluenz der Zellen (80%) und fand alle 3 Tage statt. An Tag 6, 12 und 18 wurden die Zellen geerntet und die Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker mittels TaqMan™ Analyse durchgeführt. Das Mineralisierungsverhalten wurde an Tag 18 durch eine Von Kossa Färbung des Zellrasens verglichen. In Abbildung 16 A sind die Genexpressionsraten der Differenzierungsmarker Osteocalcin, Kollagen IaI, Osteoprotegerin und RankLigand dargestellt. Die hier gezeigten Schwankungen zwischen den beiden Genotypen erreichen keine statistische Signifikanz.

Bei Osteocalcin zeigt sich eine initiale Erhöhung bei den Zellen der transgenen Tiere an Tag 6 und Tag 12 (d6: $p = 0,21$, d 12: $p = 0,07$). Währenddessen ist bei den Wildtyp-Osteoblasten erst an Tag 18 eine deutliche Steigerung der Osteocalcinexpression darstellbar (d12 vs d18: $p = 0,002$). Das Verhältnis von Osteoprotegerin zu RankLigand ist an Tag 6 und Tag 12 bei den primären Osteoblasten der LRP4 EC-STOP-Mäusen verringert im Vergleich zu den Wildtypzellen (d12: $p = 0,06$). In der repräsentativen Auswahl der an Tag 18 der Differenzierung ausgeführten Von Kossa-Färbung des Zellpellets zeigt sich kein Unterschied im Mineralisierungsverhalten bezüglich Lokalisation und Stärkegrad zwischen primären Osteoblasten aus LRP4 EC_STOP-Mäusen und denen aus Wildtyp-Tieren (Abb. 16 B).

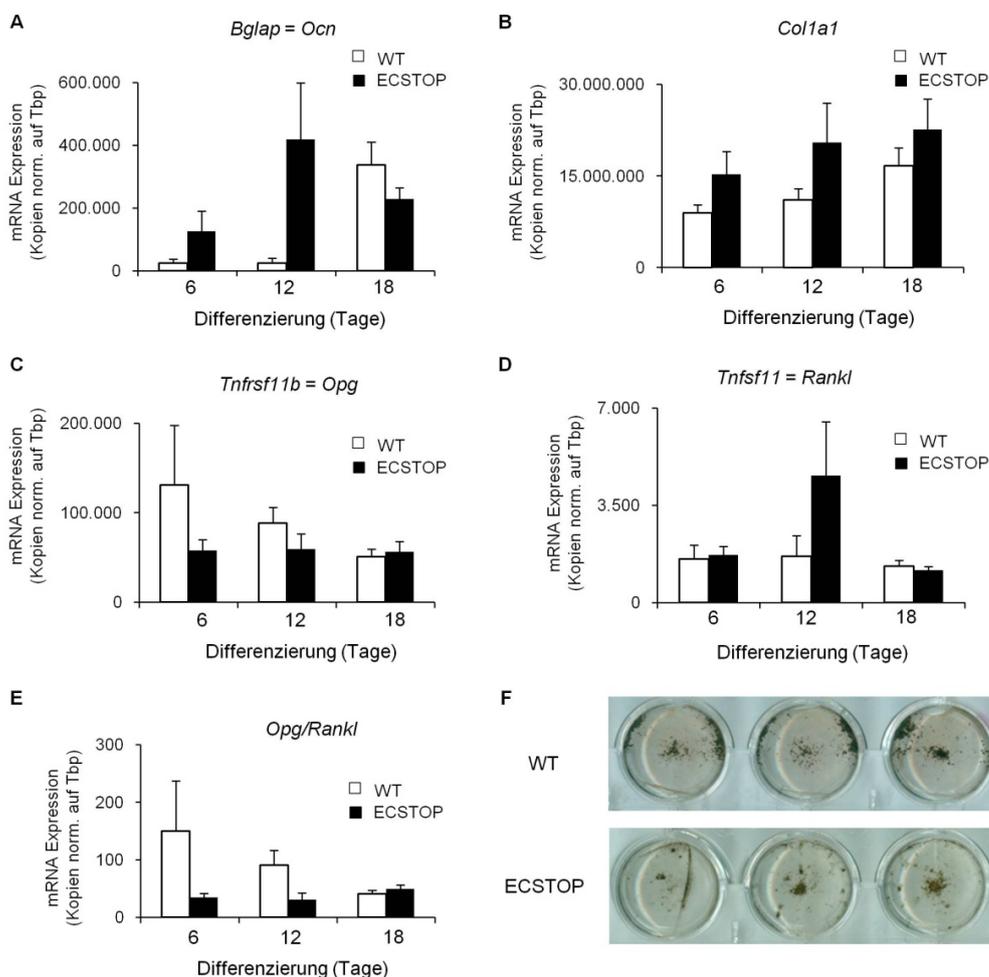


Abb. 16: Differenzierungsmarker und Von Kossa Färbung primärer Osteoblasten

A-E) Die Schwankungen zwischen den beiden Genotypen bezüglich der Expression der Markergene Osteocalcin, Kollagen IaI, Osteoprotegerin und RankLigand erreichen keine statistische Signifikanz.

F) Hinsichtlich des Mineralisierungsverhaltens lassen sich durch Von Kossa-Färbung der Zellpellets an Tag 18 der Differenzierung keine Unterschiede zeigen.

(Anzahl der verglichenen Experimente: 3)

3.6.3 Messung von Differenzierungsmarkern primärer Osteoklasten

Primäre Osteoklasten wurden aus 10-12 Wochen alten Mäusen isoliert. Hier wurden 5×10^6 Zellen pro Well ausgesät. Die Induktion begann an Tag 5 durch Zugabe des Nährmediums zzgl. RANKL und M-CSF. Am fünften Tag der Differenzierung wurden die Zellen für die Analyse der Differenzierungsmarker geerntet. In diesen Experimenten zeigen sich bei der Analyse der Genexpression der Zielgene von Cathepsin K, dem Calcitonin Rezeptor, dem Chlorid Kanal 7 und Acp5 keine Unterschiede (Abb. 17).

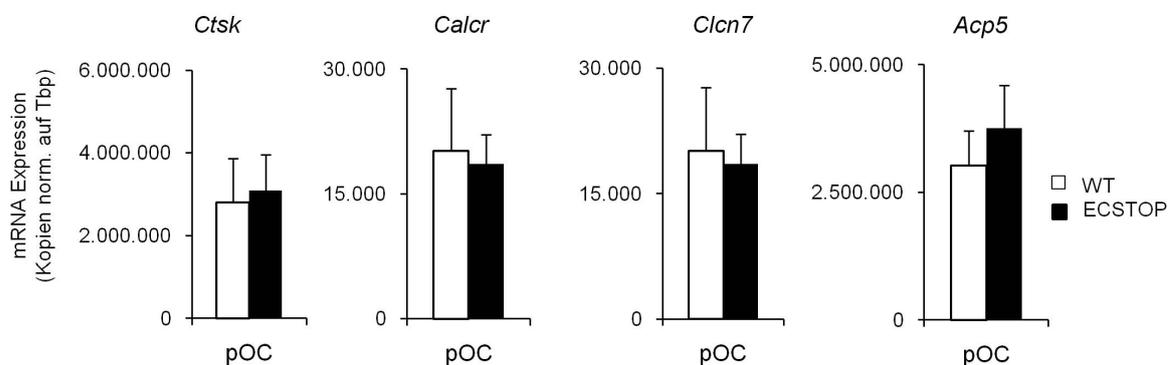


Abb. 17: Differenzierungsmarker primärer Osteoklasten

Die Schwankungen der Expressionsrate der Markergene Cathepsin K, dem Calcitonin Rezeptor, dem Chlorid Kanal 7 und der Acid Phosphatase 5 zwischen Osteoklasten aus LRP4 defizienten und aus Wildtyp-Mäusen zeigen keine veränderte Regulation. (Tag 5 der Differenzierung durch Rankl, Anzahl der verglichenen Experimente: 4)

3.6.4 Messung von Differenzierungsmarkern primärer Chondrozyten

Von den isolierten primären Chondrozyten wurden 250.000 Zellen pro Well ausgesät und an Tag 3 der Zelldifferenzierung die Genexpression der Chondrozytenmarkergene gemessen. In Abbildung 18 ist die um die Hälfte verringerte Expression des Kollagen, Typ X, Alpha 1-Gens (*Col10a1*) der primären Chondrozyten der LRP4 EC_STOP Mäuse dargestellt ($p < 0,05$: *). Die anderen Markergene Matrix Metalloproteinase 13, Osteoprotegerin, RankLigand, sowie das Verhältnis Osteoprotegerin/RankLigand zueinander, zeigen keine signifikante Veränderung (Abb. 18).

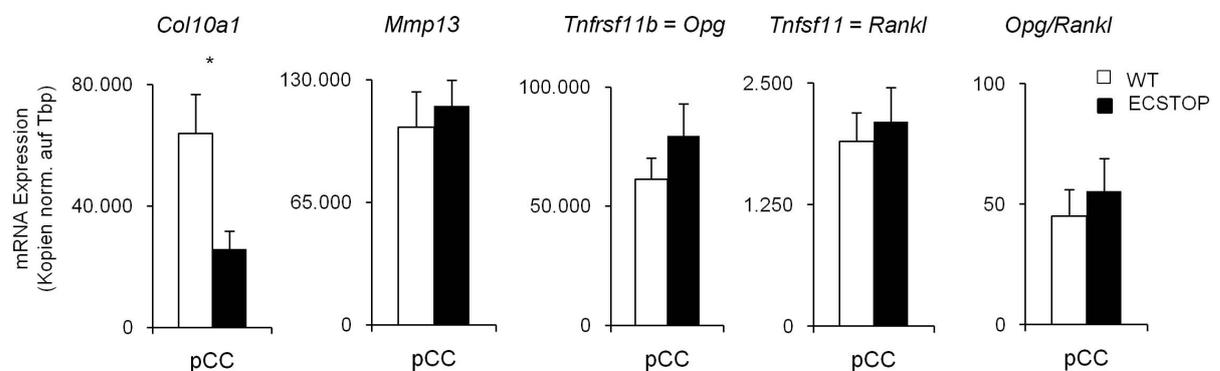


Abb. 18: Differenzierungsmarker primärer Chondrozyten

Während sich bei den Chondrozyten der transgenen Mäuse eine statistisch signifikante Verringerung der *Col10a1* Expression zeigt ($p < 0,05$: *), ist die Expressionrate der anderen Markergene, sowie das Verhältnis von Osteoprotegerin und RankLigand zueinander, zwischen beiden Genotypen nicht unterschiedlich. (Tag 3 der Differenzierung, Anzahl der verglichenen Experimente: 5)

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Skelettphänotyp des LRP4 EC_STOP-Mausmodells, bei dem LRP4 durch die Entfernung seiner Membranverankerung dysfunktional ist, weiter charakterisiert. *In-vitro*-Analysen der für den Knochen relevanten Zelltypen Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten, sowie *in-vivo*-Untersuchungen bezüglich des Serumgehaltes verschiedener Knochenstoffwechsel-parameter, Skelett- und Wachstums-fugenfärbungen und quantitative RNA-Analysen der Femur Epi- und Diaphyse wurden durchgeführt.

4.1 Die Rolle von LRP4 im Knochenstoffwechsel

Der eindrücklichste Phänotyp, der auf eine Rolle des LRP4 im Knochenstoffwechsel hindeutet, ist die auftretende Polysyndaktylie an den Vorder- und Hinterbeinen der Tiere mit *Lrp4*-Modifikationen (Johnson et al., 2005, Simon-Chazottes et al., 2006, Choi et al., 2009). Auch bei vom Cenani-Lenz Syndrom betroffenen Patienten, die charakteristischerweise Polysyndaktylien aufweisen, wurden LRP4 Mutationen gefunden (Li et al., 2010). Alle in dieser Arbeit untersuchten LRP4 EC_STOP Tiere waren von Polysyndaktylien betroffen (Abb. 9 und 11 B). Dieser Fehler in der Extremitäten-entwicklung wird vermutlich durch eine Störung in der Entwicklung der apikalen ektodermalen Leiste (*apical ectodermal ridge* (AER)) verursacht, in der auch LRP4 exprimiert wird. Die AER wird für das Wachstum sowie die Ausformung vor allem der distalen Extremitätenanlage benötigt (Capdevila und Izpisua Belmonte, 2001). Sie ist in LRP4 EC_STOP-Mäusen vergrößert und zeigt ein gestörtes Sekretionsverhalten (Johnson et al., 2005), was die Ursache für die Polysyndaktylie darstellen könnte. Choi et al. fanden in ihrer Analyse von Knochenumbaumarkern im Serum 10 Wochen alter LRP4 EC_STOP-Mäuse sowohl gesteigerte Marker der Osteoblasten-, als auch der Osteoklastenaktivität. Um diesen Einfluss von LRP4 auf den Knochenumbau weiter zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Seren von 4, 12 und 26 Wochen alten Mäusen untersucht. Es wurden die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der Osteocalcinspiegel stellvertretend für den Knochenaufbau, und der Gehalt des C-Peptids des Typ 1 Kollagens (CTX) als Knochenabbaumarker gemessen. Bei den 4 und 12 Wochen alten transgenen Tieren zeigt sich eine Tendenz zur Aktivitätssteigerung der ALP (Abb. 8 A). Hier wären Messungen mit einer höheren Tieranzahl notwendig, um diesen Trend statistisch signifikant zu belegen.

Der Osteocalcingehalt im Serum sinkt mit zunehmendem Alter bei den LRP4 EC_STOP-Tieren langsamer als bei den Wildtypen. Es bildet sich im Verlauf der Entwicklung ein signifikant erhöhter Spiegel bei 10 Wochen alten transgenen Mäusen (Choi et al.), bzw. 26 Wochen (Abb. 8 B). Beim Knochenabbaumarker CTX lässt sich keine Tendenz zur Erhöhung bei den LRP4 EC_STOP Mäusen ausmachen (Abb. 8 C). Ein anderer Marker, der als Maß für die Osteoklastenaktivität und somit für die Knochenabbaurate verwendet werden kann, ist der Gehalt an Desoxypyridinolin im Urin. Choi et al. konnten in ihren Versuchen eine erhöhte Konzentration dieses Kollagenabbauproduktes bei LRP4 EC_STOP-Mäusen nachweisen. Dies könnte man zusammen mit den ebenfalls erhöhten Knochenaufbaumarkern im Serum der transgenen Tiere als Zeichen für einen gesteigerten Knochenumbau werten.

Betrachtet man den Serumgehalt der Proteine OPG und RANKL, die, da sie bei der Regulation der Osteoklastenaktivität durch Osteoblasten eine entscheidende Rolle spielen, hier auch als Marker für Knochenumbauvorgänge benutzt wurden, lässt sich kein klarer Hinweis auf eine Störung in deren Verhältnis ausmachen. Beim Vergleich der mRNA Expressionrate in den Femurabschnitten Epi- und Diaphyse zeichnet sich eine Tendenz zur erniedrigten OPG-Expression in der Epiphyse ab (Abb. 13 B). Bei den 26 Wochen alten transgenen Weibchen findet sich ein signifikant erniedrigter Gehalt an OPG im Serum (Abb. 8 D). Sollte sich bei ihnen ein sich ebenfalls andeutender Trend zur Erhöhung des RANKL-Spiegels in einer größeren Versuchsgruppe bestätigen, wäre ein nächster Schritt, zusätzlich den Östrogenspiegel der Tiere zu untersuchen. Dieses Sexualhormon greift auch in den Knochenstoffwechsel ein, indem es die OPG-Ausschüttung fördert bzw. die von RANKL hemmt (Bord et al., 2003). So führt ein erniedrigter Östrogenspiegel zu einem erhöhten Knochenabbau, was auch eine häufige Ursache für die postmenopausale Osteoporose ist.

In den gemessenen Kalzium- und Phosphatmengen im Serum, die als Marker des Mineralisierungsgrades dienen, lassen sich zwischen 26 Wochen alten Böcken und Weibchen beider Genotypen keine Unterschiede finden.

Beim Vergleich der Knochenmorphologie der LRP4 EC_STOP und Wildtyp-Mäusen mittels Röntgenaufnahmen der Tierskelette wurde bis auf die Polysyndaktylie kein Unterschied gefunden (Abb. 9). In von Choi et al. ausgewerteten μ CT-Aufnahmen stellten sich bei LRP4 EC_STOP Tieren um 1 mm verkürzte Femora dar (Choi et al., 2009).

Diese Längendifferenz wurde bei den in dieser Arbeit vermessenen Femora nicht ermittelt. Auch bei den anderen untersuchten Knochenabschnitten Wirbelsäule und Tibia ergaben sich keine Abweichungen zwischen den beiden Genotypen (Abb. 10). Für eine bessere Vergleichbarkeit könnten noch Vermessungen von μ CT-Aufnahmen folgen.

Die aus LRP4 EC_STOP-Mäusen gewonnenen primären Chondrozyten haben ein signifikant erniedrigtes mRNA-Expressionslevel an Col10a1, einem Markergen hypertropher Chondrozyten, die einen wichtigen Zelltypen innerhalb der Wachstumsfuge darstellen (Abb. 18). Dieses Verhältnis ist jedoch im systemischen Verband in der Epi-/Metaphyse, wo sich die Wachstumsfuge des Röhrenknochens befindet, nicht mehr nachzuweisen (Abb. 13 E). Auch bei der quantitativen Betrachtung mikroskopischer Schnitte der Wachstumsfugen von LRP4 EC_STOP und Wildtyp-Mäusen lassen sich keine Unterschiede erkennen (Abb. 11 A). Da das Längenwachstum der Röhrenknochen durch die Wachstumsfuge bestimmt wird, ist der von Choi et al. beschriebene Längenunterschied der Femora möglicherweise nicht auf eine Störung dieser zurückzuführen. Um die Vermutung zu erhärten, wäre jedoch eine genauere Ausmessung der einzelnen Zonen einer größeren Anzahl an Wachstumsfugen notwendig. Außerdem wäre es interessant, immunhistologisch im Vergleich bei Wildtyp- und LRP4 EC_STOP-Modellmäusen zu untersuchen, wo und wie stark Col10a1 in der Wachstumsfuge exprimiert wird.

LRP4 scheint auch Teil eines Signalwegs zu sein, der die Gelenkknorpelhomöostase beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass LRP4 in Verbindung mit α -Dystroglycan einen Rezeptor für das Proteoglykan Agrin darstellt und so eine Signalkette modulieren könnte, an deren Ende die Expression von SOX9, einem für die Chondrozytendifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor, steht (Eldridge et al., submitted, bisher unveröffentlichte Daten). Die Expression von Agrin ist im durch Osteoarthritis veränderten Gelenkknorpel verringert (Dell'Accio et al., 2008, Eldridge et al. unveröffentlichte Daten). Mausstudien weisen zudem auf eine elementare Rolle von Agrin in der enchondralen Ossifikation hin (Hausser et al., 2007). Vergleichende Versuche mit einem Arthrosemodell der LRP4 EC_STOP-Mäuse werden in Zukunft helfen, die Rolle von LRP4 im Gelenkknorpel besser zu verstehen.

Ein Hinweis auf die Wichtigkeit von LRP4 im Knochengewebe könnte die starke Überexpression von LRP4 mRNA in den betrachteten Knochenabschnitten Epi-, Diaphyse und Calvarien der LRP4 EC_STOP-Mäuse sein (Abb. 12).

Die aus den LRP4 EC_STOP-Tieren isolierten primären Knochen- bzw. Knorpelzellen zeigen ebenfalls dieses Phänomen (Abb. 15 A). Möglicherweise stellt dies einen Versuch der Kompensation der fehlerhaften Funktion des modifizierten LRP4 dar. In den Kontrollgeweben Gehirn und Niere wird LRP4 auf mRNA-Ebene zwar auch signifikant höher exprimiert, dies geschieht aber in einem deutlich geringeren Ausmaß als im Knochen. Findet man in den Knochengeweben eine bis zu siebenfache Expressionssteigerung von LRP4, ist diese in der Niere verdoppelt und im Gehirn um 50 % gesteigert. Sollte die LRP4-Expression

durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert sein, wäre diese Überexpression ein Zeichen für die Unfähigkeit des modifizierten LRP4 dieses Signal nach intrazellulär weiter zu leiten. Bei der Betrachtung der mRNA Expression der beiden Rezeptoren *Lrp5* und *Lrp6* lässt sich, bis auf eine Steigerung bei *Lrp5* in den transgenen Mäusen, keine Abweichung zwischen den beiden Genotypen ausmachen. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass diese beiden Rezeptoren die Funktion von LRP4 nicht ausgleichen, da sie sonst wahrscheinlich in allen Gewebeproben eine erhöhte Expression zeigen würden. Diese Beobachtungen müssten jedoch auf Proteinebene verifiziert werden.

Unterschiedliche Forschungsgruppen postulieren eine mögliche Rolle von LRP4 im Wnt/ β -Catenin-Signaling. In *in-vitro*-Experimenten hemmte LRP4 das Wnt-Signal (Johnson et al., 2005) und es konnte gezeigt werden, dass es auch an die beiden Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs Sclerostin und Dickkopf1 binden kann (Choi et al., 2009). Um diesen potentiellen Einfluss von LRP4 auf das Wnt-Signal zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene die Expression der Wnt-Signaling-Inhibitoren Sclerostin und Dickkopf1 in Femur Epi-, und Diaphyse und in Calvarien untersucht. In den Calvarien der LRP4 EC_STOP-Mäuse findet sich eine signifikant erhöhte Expression von *Sost*, dem codierenden Gen von Sclerostin (Abb. 14 A). Sclerostin hemmt das Wnt-Signal und aus einer Überexpression von *Sost* im Mausmodell resultieren eine geringe Knochenmasse und eine verringerte Knochenstärke (Winkler et al., 2003). Ein Indiz dafür wäre zum Beispiel eine verzögerte Verknöcherung des Schädeldaches der transgenen Tiere.

Dies war makroskopisch an Calvarien, die mit Alzian-Blau und Alizarin-Rot gefärbt wurden, nicht zu entdecken (Abb. 11 B), jedoch könnten hier genauere Untersuchungen der Knochenbeschaffenheit zur Klärung beitragen. In der Expression des anderen analysierten Inhibitors des Wnt-Signalings, Dickkopf 1, zeichnet sich kein Trend zur Erhöhung in den Calvarien der LRP4 EC_STOP-Mäuse ab (Abb. 14 B).

In den anderen Knochenabschnitten Epi- bzw. Diaphyse scheint sich ein gegensätzliches Bild bezüglich der Expression von *Sost* bei den transgenen Tieren zu ergeben (Abb. 14 A, B). Größere Versuchstierzahlen könnten möglicherweise eine mathematische Signifikanz in diesen Tendenzen erkennen lassen. In den Wnt-Targetgenen DMP1, OPG und RANKL zeigen sich keine Abweichungen bezüglich der Expressionsraten zwischen den Genotypen (Abb. 13 B, C, Abb. 14 C). Da die Frage, ob und welche Rolle LRP4 im Wnt-Signalweg spielt, immer noch diskutiert wird, sich aber im LRP4 EC_STOP-Mausmodell Veränderungen in Bezug auf Einflussfaktoren der Wnt-Signalkaskade, wie z. B. der Inhibitoren dieser, zeigen, sollten weitere Analysen auf diesem Gebiet erfolgen.

4.2 Einfluss von *Lrp4* auf den Lipoproteinstoffwechsel

LRP4 ist ein Teil der LDL-Rezeptorfamilie. Mitglieder dieser evolutionär alten Gruppe von Transmembranrezeptoren wirken bei der Endozytose von Makromolekülen mit, spielen aber auch eine Rolle in verschiedenen Signalwegen wie z.B. dem kanonischen Wnt-Signalweg (Nykjaer und Willnow, 2002). Der namensgebende LDL-Rezeptor ist durch die von ihm vermittelte Aufnahme von LDL in die Zelle ein regulierendes Element des Cholesterinstoffwechsels (Brown und Goldstein, 1986). In einer Metaanalyse von 46 genomweiten Assoziationsstudien, die Korrelationen von Gen SNPs und Veränderungen des Lipidstoffwechsels untersuchten, konnte eine Assoziation von LRP4-Variationen mit einem erhöhten HDL-Spiegel im Blut gefunden werden (Teslovich et al., 2010). Um einen möglichen Einfluss von *Lrp4* auf den Lipoproteinstoffwechsel analysieren zu können, wurden Lipoproteinprofile von 12 und 26 Wochen alten Tieren mit Hilfe einer FPLC erstellt (Abb. 6). Eine potentielle Steigerung innerhalb der HDL-Fraktion bei den LRP4 EC_STOP Mäusen wurde im murinen Modell nicht deutlich. Es zeigten sich in beiden Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen und Geschlechtern. Zusätzlich wurden in gewonnenen Seren von 4, 12 bzw. 26 Wochen alten Tieren der Gesamt-Cholesterol- und Triglyzeridspiegel gemessen (Abb. 7). Auch hier fanden sich keine signifikant veränderten Plasmaspiegel.

Dieses Ergebnis wird gestützt durch das einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls keine Unterschiede im Plasmacholesterol messen konnte (Simon-Chazottes et al., 2006). Diese Daten lassen vermuten, dass LRP4 im Mausmodell wahrscheinlich eine geringere Rolle im Aufnahmeprozess der Lipoproteine spielt, wohingegen LRP4 in humanen Analysen eine Rolle im HDL-Stoffwechsel spielen könnte.

4.3 Reduziertes Gesamtkörpergewicht in LRP4 EC_STOP-Mäusen

Analog zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Johnson et al., 2005, Choi et al., 2009) konnte im Rahmen dieser Arbeit ein signifikant reduziertes Gesamtkörpergewicht der LRP4 EC_STOP-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gemessen werden (Abb. 5). Dieser Gewichtsunterschied wird mit zunehmendem Alter immer größer. *Lrp4* scheint also Einfluss auf das Gesamtkörpergewicht zu nehmen. Die transgenen Mäuse erschienen auch makroskopisch deutlich dünner als ihre Wurfgeschwister. Weitere systematische Studien das Fettgewebe betreffend, insbesondere dem Gewicht der einzelnen Fettpads, wären interessant, um eine mögliche Rolle von *Lrp4* in Bezug auf Fetteinlagerungen und die Aufnahme von

Nahrungsfetten oder den Einfluss von Adipokinen der LRP4 EC_STOP-Mäuse auf den Glucosestoffwechsel zu untersuchen. Es ist denkbar, dass bei den LRP4 EC_STOP-Tieren eine Veränderung des Glukosestoffwechsels durch eine gewandelte Ausschüttung des Proteins Osteocalcin (oder *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*) stattfindet. Osteocalcin wird von Osteoblasten und Odontoblasten produziert und nimmt Einfluss auf den Knochen- und Glukosestoffwechsel. Osteocalcin Knock-Out-Mäuse sind adipös und von Störungen der Glukosehomöostase, wie einer verminderten Insulinausschüttung bzw. -sensitivität und verringerter Proliferation der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, betroffen (Lee et al., 2007). In der systemischen Zirkulation existieren eine vollständig carboxylierte und eine biologisch aktive untercarboxylierte Form des Osteocalcins. Die untercarboxylierte Variante führt wahrscheinlich zur Steigerung der β -Zell Proliferation in der Bauchspeicheldrüse, sowie zu einer gesteigerten Insulinsekretion und Insulinsensitivität, welche sich in einem erhöhten Adiponectinspiegel begründet (Lee et al., 2007, Lee und Karsenty, 2008). Ergebnisse aus humanen Studien unterstützen diese These. So wurde in einer Studie bei Männern mittleren Alters untercarboxyliertes Osteocalcin mit verbesserter β -Zell-Funktion, in einer anderen bei gesunden Kindern mit einer gestiegenen Insulinsekretion assoziiert (Prats-Puig et al., 2010, Hwang et al., 2009).

Abbildung 8 zeigt, dass bei 4 Wochen alten LRP4 EC_STOP-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen die Serumkonzentration von Osteocalcin noch signifikant erniedrigt ist, sich jedoch bei den 12 Wochen alten Tieren schon die Tendenz zum umgekehrten Verhältnis erkennen lässt. Bei den 26 Wochen alten Mäusen finden sich dann signifikant erhöhte Osteocalcinwerte bei den transgenen Mäusen. Der Osteocalcinspiegel im Serum scheint also bei den LRP4 EC_STOP-Mäusen im Laufe der Zeit langsamer abzufallen. Bei ihrer Untersuchung von 10 Wochen alten transgenen Mäusen wurden von Choi et al. ebenfalls signifikant erhöhte Osteocalcinsерum-konzentrationen gemessen (2009). Bei der Analyse der Osteocalcinexpression auf mRNA-Basis lässt sich in den Knochenabschnitten Epi- und Diaphyse eine signifikante Steigerung bei den LRP4 EC_STOP-Tieren nachweisen. In den Calvarien zeigt sich ebenfalls eine Tendenz dieses Expressionsanstiegs (Abb. 13 A). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte ein gestörter negativer *feedback loop* der Osteocalcinexpression in transgenen Mäusen sein. Es wäre denkbar, das LRP4 hier einen Modulator darstellt, der möglicherweise seine Wirkung aufgrund der Modifikation im LRP4 EC_STOP-Modell nicht mehr entfalten kann. So würde LRP4 ein *feedback*-Signal zur Expression von Osteocalcin in die Zelle leiten, sodass die Expression von Osteocalcin bei fehlender Transmembrandomäne von Lrp4 in exzessiver Form messbar wird.

Die Osteocalcinexpression könnte ebenfalls kompensatorisch erhöht sein, um eine denkbare Störung innerhalb des Osteoblastenstoffwechsels auszugleichen, da Osteoblasten zusammen mit Odontoblasten exklusiv Osteocalcin produzieren. Aus transgenen Mäusen isolierte Osteoblasten haben an Tag 6 und 12 der Differenzierung ebenfalls diesen Trend der erhöhten Osteocalcinexpression. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dieser Anstieg jedoch nicht signifikant (Abb. 16 A). Hier könnte eine größere Anzahl an Präparationen den Trend bestätigen.

Osteoblasten exprimieren zudem das Gen ESP, welches die Tyrosin-Phosphatase OST-PTP (*osteotesticular protein-tyrosine phosphatase*) codiert. OST-PTP soll die Carboxylierung von Osteocalcin, d. h. die Menge an Osteocalcin in seiner inaktiven Form, fördern, und würde so einen negativen Regulator von Osteocalcin darstellen. So wäre es denkbar, dass die Ausschüttung von aktivem untercarboxyliertem Osteocalcin, wie auch dessen Inaktivierung über Osteoblasten beeinflussbar sein könnte, und somit Osteoblasten eine steuernde Kraft innerhalb des Glucosestoffwechsels darstellen würden.

Bei ESP Knock-Out-Mäusen wurde eine erhöhte Konzentration an untercarboxyliertem Osteocalcin, ein erhöhter Insulinspiegel im Blut, eine gesteigerte Insulinsensitivität aufgrund erhöhter Ausschüttung von Adiponectin und ein niedrigeres Gesamtkörpergewicht infolge reduzierter Fettmasse gemessen (Lee et al., 2007). Sollte die Regulation der ESP-Expression in den Osteoblasten LRP4-vermittelt sein und wäre diese durch die fehlende Membranverankerung des LRP4 unterbrochen, könnte dies eine mögliche Erklärung für den gegebenenfalls ähnlichen Phänotyp der beiden modifizierten Mauslinien LRP4 EC_STOP und ESP KO darstellen, sollte sich in anderen Experimenten bei den LRP4 EC_STOP-Mäusen ebenso eine erhöhte Insulinsensitivität sowie eine Hyperinsulinämie feststellen lassen. Um dies näher zu untersuchen, könnte ein zusätzlicher Osteoblastenspezifischer ESP KO in der LRP4 EC_STOP-Mauslinie hilfreich sein. Auch müssten in folgenden Experimenten der Carboxylierungsgrad des Osteocalcins der transgenen bzw. der Wildtyp-Mäuse gemessen werden, um eine Aussage über den Anteil des biologisch aktiven Osteocalcins im Serum der Mäuse machen zu können um herauszufinden, ob ein etwaiger metabolischer Phänotyp auf ein verändertes Verhältnis der beiden Osteocalcinformen zurückzuführen ist.

Weiterhin könnte im Rahmen einer *High fat diet* Studie untersucht werden, wie sich der erhöhte Osteocalcinspiegel in den LRP4 EC_STOP-Tieren auf den Glucosestoffwechsel bzw. die Insulinsensitivität auswirkt und ob sich eine Resistenz gegen Übergewicht ausbildet.

Zu diesem Zweck könnte man die Gewichte der einzelnen Fettgewebe im Vergleich mit Wildtypen analysieren. Ebenfalls könnte eine Erforschung des Expressions- und Differenzierungsverhaltens aus LRP4 EC_STOP-Mäusen isolierter primärer Adipozyten erfolgen um untersuchen zu können, ob beispielsweise Unterschiede in der Ausschüttung von Adipokinen messbar sind. Beispielsweise soll Adiponectin die Insulinsensitivität in Leber und Skelettmuskel verbessern (Yamauchi et al., 2001). Osteocalcin fördert die Expression des für Adiponectin codierenden Gens *ADIPOQ* (Ferron et al., 2008), und so könnte sich eine verstärkte Expression, die möglicherweise durch den erhöhten Osteocalcinspiegel der LRP4 EC_STOP-Mäuse ausgelöst wird, messen lassen.

Eine mögliche Relevanz des etwaigen Einflusses von LRP4 auf Osteocalcin für die medizinische Forschung zeigt sich darin, dass in humanen Studien inverse Korrelationen zwischen dem Plasmaosteocalcinspiegel und Stoffwechselfparametern wie *Body mass index*, Plasmaglucolevel und Körperfettmasse aufgezeigt wurden (Kindblom et al., 2009, Pittas et al., 2009). Störungen innerhalb des Glucosestoffwechsels, wie etwa im Rahmen eines manifesten Diabetes mellitus, könnten durch sich dieser Arbeit anschließende Experimente genauer verstanden werden.

Ein anderer Ansatz zur Erklärung des verminderten Körpergewichts der transgenen Tiere könnte über folgenden Mechanismus gefunden werden. LRP4 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuromuskulärer Kontakte. Es kann über die Bindung an das Protein Agrin die Proteintyrosinkinase MuSK (*muscle-specific kinase*) aktivieren und somit eine Signalkaskade starten, die eine postsynaptische Differenzierung auslöst (Gomez und Burden, 2011, Kim et al., 2008). Auch konnte die Arbeitsgruppe um Yumoto et al. zeigen, dass LRP4 ebenfalls bei der Differenzierung der präsynaptischen Region neuromuskulärer Kontakte eine Rolle spielt, indem es als retrogrades von Muskelzellen ausgesendetes Signal fungiert (Yumoto et al., 2012). Unter LRP4 EC_STOP-Mäusen wurden in Experimenten auch Tiere mit Darmparalysen entdeckt (Joachim Herz, unveröffentlichte Daten). Eventuell wird diese Störung der Darmmotorik durch eine mangelhafte neuromuskuläre Koppelung innerhalb der Darmmuskulatur aufgrund des fehlerhaften LRP4 ausgelöst. So könnte es zu einer verminderten Nährstoffaufnahme infolge der aus der Insuffizienz der Darmmuskulatur resultierenden reduzierten Darmpassage kommen, was sich dann im beobachteten geringeren Gesamtgewicht der transgenen Mäuse niederschlagen könnte.

5 Zusammenfassung

Der Transmembranrezeptor *Low density lipoprotein receptor-related protein 4* (LRP4) wird im humanen und murinen Organismus in distinkten Geweben, wie z. B. der motorischen Endplatte, Anlagen der Nierenentwicklung und dem Knochen exprimiert. Natürlich vorkommende Mutationen des *LRP4*-Gens führen zu seltenen Syndromen mit Myasthenie (CMS17), Sclerosteose oder Wachstumsstörungen der Extremitäten und Polysyndaktylie (Cenani-Lenz Syndrom). Globale murine *Lrp4* Defizienz geht einher mit neonataler Letalität, weshalb in dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell mit einer dysfunktionalen LRP4 Variante mit defekter Transmembrandomäne verwendet wurde (LRP4 EC_STOP). Vor Beginn der Arbeit war bekannt, dass diese Tiere ebenfalls phänotypisch durch Polysyndaktylie, sowie verkürzte Femora mit verringerter Knochendichte charakterisiert sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die LRP4 EC_STOP-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen detaillierter zu phänotypisieren. Es zeigte sich für alle Vergleichsgruppen eine Reduktion des Körpergewichts der transgenen Mäuse verglichen mit den Wildtypen. In den Lipoproteinprofilen sowie den Serumlipidkonzentrationen (Cholesterin, Triglyzerid) und biochemischen Knochenbauparametern im Serum (OCN, ALP, CTX, OPG, RANKL) bestanden keine konsistenten signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Bis auf die Polysyndaktylie wiesen die transgenen Mäuse makroskopisch und radiologisch keine Fehlbildungen des Skeletts auf. Die mRNA-Expression von LRP4 war in verschiedenen skelettalen und extra-skelettalen Geweben sowie in primären Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten in den transgenen Tieren gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht, während die *Lrp4*-Mutation keinen Einfluss auf das chondrogene, osteogene und osteoklastäre Differenzierungsverhalten primärer Zellen *in-vitro* hatte. Interessanterweise war jedoch die Expression von Kollagen Xa, einem Marker hypertropher Chondrozyten, welche in der enchondralen Ossifikation sowie der Pathogenese der Arthrose eine entscheidende Rolle spielen, in den primären Chondrozyten der Tiere mit defektem LRP4 signifikant reduziert. Basierend auf den Daten dieser Arbeit erscheint es primär lohnend, die Funktion von LRP4 in der enchondralen Ossifikation sowie der Pathogenese der Arthrose auf zellulärer und molekularer Ebene weiter zu untersuchen und das therapeutische Potential von LRP4-Inhibitoren im Rahmen der Arthroseentwicklung zu analysieren.

6 Literaturverzeichnis

- AARDEN, E. M., BURGER, E. H. & NIJWEIDE, P. J. 1994. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*, 55, 287-99.
- ABERLE, H., BAUER, A., STAPPERT, J., KISPERS, A. & KEMLER, R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16, 3797-804.
- AI, M., HOLMEN, S. L., VAN HUL, W., WILLIAMS, B. O. & WARMAN, M. L. 2005. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, 25, 4946-55.
- AKIYAMA, H., LYONS, J. P., MORI-AKIYAMA, Y., YANG, X., ZHANG, R., ZHANG, Z., DENG, J. M., TAKETO, M. M., NAKAMURA, T., BEHRINGER, R. R., MCCREA, P. D. & DE CROMBRUGGHE, B. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, 18, 1072-87.
- AUBIN, J. E. 1998. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31, 73-82.
- AUGAT, P. & SCHORLEMMER, S. 2006. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing*, 35 Suppl 2, ii27-ii31.
- BABIJ, P., ZHAO, W., SMALL, C., KHARODE, Y., YAWORSKY, P. J., BOUXSEIN, M. L., REDDY, P. S., BODINE, P. V., ROBINSON, J. A., BHAT, B., MARZOLF, J., MORAN, R. A. & BEX, F. 2003. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*, 18, 960-74.
- BAEK, W. Y., LEE, M. A., JUNG, J. W., KIM, S. Y., AKIYAMA, H., DE CROMBRUGGHE, B. & KIM, J. E. 2009. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res*, 24, 1055-65.
- BALEMANS, W., DEVOGELAER, J. P., CLEIREN, E., PITERS, E., CAUSSIN, E. & VAN HUL, W. 2007. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res*, 22, 708-16.
- BALEMANS, W., EBELING, M., PATEL, N., VAN HUL, E., OLSON, P., DIOSZEGI, M., LACZA, C., WUYTS, W., VAN DEN ENDE, J., WILLEMS, P., PAES-ALVES, A. F., HILL, S., BUENO, M., RAMOS, F. J., TACCONI, P., DIKKERS, F. G., STRATAKIS, C., LINDPAINNER, K., VICKERY, B., FOERNZLER, D. & VAN HUL, W. 2001. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*, 10, 537-43.
- BALEMANS, W., PATEL, N., EBELING, M., VAN HUL, E., WUYTS, W., LACZA, C., DIOSZEGI, M., DIKKERS, F. G., HILDERING, P., WILLEMS, P. J., VERHEIJ, J. B., LINDPAINNER, K., VICKERY, B., FOERNZLER, D. & VAN HUL, W. 2002. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*, 39, 91-7.
- BENNINGHOFF, DRENCKHAN, ET AL. 2008. Anatomie 1. *Urban & Fischer*, 133-145.
- BLAIR, H. C., TEITELBAUM, S. L., GHISELLI, R. & GLUCK, S. 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245, 855-7.
- BORD, S., IRELAND, D. C., BEAVAN, S. R. & COMPSTON, J. E. 2003. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 32, 136-41.
- 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.

- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232, 34-47.
- 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, 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.
- CAPDEVILA, J. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 87-132.
- CENANI, A. & LENZ, W. 1967. [Total syndactylia and total radioulnar synostosis in 2 brothers. A contribution on the genetics of syndactylia]. *Z Kinderheilkd*, 101, 181-90.
- CHOI, H. Y., DIECKMANN, M., HERZ, J. & NIEMEIER, A. 2009. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One*, 4, e7930.
- CLEVERS, H. & NUSSE, R. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, 149, 1192-205.
- COLVIN, J. S., BOHNE, B. A., HARDING, G. W., MCEWEN, D. G. & ORNITZ, D. M. 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*, 12, 390-7.
- 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.
- DELL'ACCIO, F., DE BARI, C., ELTAWIL, N. M., VANHUMMELEN, P. & PITZALIS, C. 2008. Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58, 1410-21.
- DELAISSE, J. M., ANDERSEN, T. L., ENGSIG, M. T., HENRIKSEN, K., TROEN, T. & BLAVIER, L. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*, 61, 504-13.
- DENG, C., WYNshaw-BORIS, A., ZHOU, F., KUO, A. & LEDER, P. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*, 84, 911-21.
- DIECKMANN, M., DIETRICH, M. F. & HERZ, J. 2010. Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem*, 391, 1341-63.
- DROGEMULLER, C., LEEB, T., HARLIZIUS, B., TAMMEN, I., DISTL, O., HOLTERSHINKEN, M., GENTILE, A., DUCHESNE, A. & EGGEN, A. 2007. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genet*, 8, 5.
- DUCHESNE, A., GAUTIER, M., CHADI, S., GROHS, C., FLORIOT, S., GALLARD, Y., CASTE, G., DUCOS, A. & EGGEN, A. 2006. Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics*, 88, 610-21.
- DUCY, P., DESBOIS, C., BOYCE, B., PINERO, G., STORY, B., DUNSTAN, C., SMITH, E., BONADIO, J., GOLDSTEIN, S., GUNDBERG, C., BRADLEY, A. & KARSENTY, G. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382, 448-52.
- DUCY, P., SCHINKE, T. & KARSENTY, G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289, 1501-4.
- DUCY, P., ZHANG, R., GEOFFROY, V., RIDALL, A. L. & KARSENTY, G. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.

- ELCIOGLU, N., ATASU, M. & CENANI, A. 1997. Dermatoglyphics in patients with Cenani-Lenz type syndactyly: studies in a new case. *Am J Med Genet*, 70, 341-5.
- ELDRIDGE, S., ET AL. 2015. Agrin mediates chondrocyte homeostasis and requires both LRP4 and α -dystroglycan to enhance cartilage formation in vitro and in vivo. (submitted).
- ELLIES, D. L., VIVIANO, B., MCCARTHY, J., REY, J. P., ITASAKI, N., SAUNDERS, S. & KRUMLAUF, R. 2006. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res*, 21, 1738-49.
- FACCIO, R., TAKESHITA, S., ZALLONE, A., ROSS, F. P. & TEITELBAUM, S. L. 2003. c-Fms and the α v β 3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, 111, 749-58.
- FERRON, M., HINOI, E., KARSENTY, G. & DUCY, P. 2008. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5266-70.
- FRANCESCHI, R. T., GE, C., XIAO, G., ROCA, H. & JIANG, D. 2007. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1116, 196-207.
- GELB, B. D., SHI, G. P., CHAPMAN, H. A. & DESNICK, R. J. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273, 1236-8.
- GOMEZ, A. M. & BURDEN, S. J. 2011. The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation. *Dev Dyn*, 240, 2626-33.
- 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., SUPERTI-FURGA, 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. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107, 513-23.
- HARADA, S. & RODAN, G. A. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-55.
- HARTIKKA, H., MAKITIE, O., MANNIKKO, M., DORIA, A. S., DANEMAN, A., COLE, W. G., ALA-KOKKO, L. & SOCHETT, E. B. 2005. Heterozygous mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. *J Bone Miner Res*, 20, 783-9.
- HARTMANN, C. 2007. Skeletal development--Wnts are in control. *Mol Cells*, 24, 177-84.
- HAUSCHKA, P. V., LIAN, J. B., COLE, D. E. & GUNDBERG, C. M. 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69, 990-1047.
- HAUSER, H. J., RUEGG, M. A., BRENNER, R. E. & KSIAZEK, I. 2007. Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth. *Histochem. Cell Biol.*, 127, 363-74.
- HE, X., SEMENOV, M., TAMAI, K. & ZENG, X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131, 1663-77.

- HENRIKSON, RAY C., MAZURKIEWICZ, JOSEPH E. 1997. Histology. *National Medical series for independent study*, Lippincott Williams & Wilkins, S129
- HERZ, J. & BOCK, H. H. 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem*, 71, 405-34.
- HERZ, J., CHEN, Y., MASIULIS, I. & ZHOU, L. 2009. Expanding functions of lipoprotein receptors. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S287-92.
- HIGUCHI, O., HAMURO, J., MOTOMURA, M. & YAMANASHI, Y. 2011. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 69, 418-22.
- HILL, T. P., SPATER, D., TAKETO, M. M., BIRCHMEIER, W. & HARTMANN, C. 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, 8, 727-38.
- HUSSAIN, M. M., STRICKLAND, D. K. & BAKILLAH, A. 1999. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*, 19, 141-72.
- HWANG, Y. C., JEONG, I. K., AHN, K. J. & CHUNG, H. Y. 2009. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev*, 25, 768-72.
- INGHAM, P. W. & MCMAHON, A. P. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15, 3059-87.
- ITASAKI, N., JONES, C. M., MERCURIO, S., ROWE, A., DOMINGOS, P. M., SMITH, J. C. & KRUMLAUF, R. 2003. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development*, 130, 4295-305.
- JOHNSON, E. B., HAMMER, R. E. & HERZ, J. 2005. Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum Mol Genet*, 14, 3523-38.
- JOHNSON, E. B., STEFFEN, D. J., LYNCH, K. W. & HERZ, J. 2006. Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics*, 88, 600-9.
- KARNER, C. M., DIETRICH, M. F., JOHNSON, E. B., KAPPESSER, N., TENNERT, C., PERCIN, F., WOLLNIK, B., CARROLL, T. J. & HERZ, J. 2010. *Lrp4* regulates initiation of ureteric budding and is crucial for kidney formation--a mouse model for Cenani-Lenz syndrome. *PLoS One*, 5, e10418.
- KARSENTY, G. 1999. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, 13, 3037-51.
- KARSENTY, G., KRONENBERG, H. M. & SETTEMBRE, C. 2009. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 629-48.
- KARSENTY, G. & WAGNER, E. F. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2, 389-406.
- 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.
- KHOSLA, S. 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142, 5050-5.
- KIM, N., STIEGLER, A. L., CAMERON, T. O., HALLOCK, P. T., GOMEZ, A. M., HUANG, J. H., HUBBARD, S. R., DUSTIN, M. L. & BURDEN, S. J. 2008. *Lrp4* is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 135, 334-42.
- KINDBLOM, J. M., OHLSSON, C., LJUNGGREN, O., KARLSSON, M. K., TIVESTEN, A., SMITH, U. & MELLSTROM, D. 2009. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res*, 24, 785-91.

- KOKUBU, C., HEINZMANN, U., KOKUBU, T., SAKAI, N., KUBOTA, T., KAWAI, M., WAHL, M. B., GALCERAN, J., GROSSCHEDL, R., OZONO, K. & IMAI, K. 2004. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that *Lrp6* is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development*, 131, 5469-80.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R. T., GAO, Y. H., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.
- KORNAK, U., KASPER, D., BOSL, M. R., KAISER, E., SCHWEIZER, M., SCHULZ, A., FRIEDRICH, W., DELLING, G. & JENTSCH, T. J. 2001. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104, 205-15.
- KRIEGER, M. & HERZ, J. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, 63, 601-37.
- KRISHNAN, V., BRYANT, H. U. & MACDOUGALD, O. A. 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*, 116, 1202-9.
- KRONENBERG, H. M. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423, 332-6.
- KUBOTA, T., MICHIGAMI, T., SAKAGUCHI, N., KOKUBU, C., SUZUKI, A., NAMBA, N., SAKAI, N., NAKAJIMA, S., IMAI, K. & OZONO, K. 2008. *Lrp6* hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with *Mesd*. *J Bone Miner Res*, 23, 1661-71.
- KUMAR, J., SWANBERG, M., MCGUIGAN, F., CALLREUS, M., GERDHEM, P. & AKESSON, K. 2011. LRP4 association to bone properties and fracture and interaction with genes in the Wnt- and BMP signaling pathways. *Bone*, 49, 343-8.
- LACEY, D. L., TIMMS, E., TAN, H. L., KELLEY, M. J., DUNSTAN, C. R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y. X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J. & BOYLE, W. J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-76.
- LAM, J., NELSON, C. A., ROSS, F. P., TEITELBAUM, S. L. & FREMONT, D. H. 2001. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest*, 108, 971-9.
- LAURIKKALA, J., KASSAI, Y., PAKKASJARVI, L., THESLEFF, I. & ITOH, N. 2003. Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol*, 264, 91-105.
- LEAFFER, D., SWEENEY, M., KELLERMAN, L. A., AVNUR, Z., KRSTENANSKY, J. L., VICKERY, B. H. & CAULFIELD, J. P. 1995. Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology*, 136, 3624-31.
- LEE, B., THIRUNAVUKKARASU, K., ZHOU, L., PASTORE, L., BALDINI, A., HECHT, J., GEOFFROY, V., DUCY, P. & KARSENTY, G. 1997. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet*, 16, 307-10.
- LEE, N. K. & KARSENTY, G. 2008. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 161-6.
- LEE, N. K., SOWA, H., HINOI, E., FERRON, M., AHN, J. D., CONFAYREUX, C., DACQUIN, R., MEE, P. J., MCKEE, M. D., JUNG, D. Y., ZHANG, Z., KIM, J. K.,

- MAUVAIS-JARVIS, F., DUCY, P. & KARSENTY, G. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130, 456-69.
- LI, J., SAROSI, I., CATTLEY, R. C., PRETORIUS, J., ASUNCION, F., GRISANTI, M., MORONY, S., ADAMU, S., GENG, Z., QIU, W., KOSTENUK, P., LACEY, D. L., SIMONET, W. S., BOLON, B., QIAN, X., SHALHOUB, V., OMINSKY, M. S., ZHU KE, H., LI, X. & RICHARDS, W. G. 2006. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 39, 754-66.
- LI, X., OMINSKY, M. S., NIU, Q. T., SUN, N., DAUGHERTY, B., D'AGOSTIN, D., KURAHARA, C., GAO, Y., CAO, J., GONG, J., ASUNCION, F., BARRERO, M., WARMINGTON, K., DWYER, D., STOLINA, M., MORONY, S., SAROSI, I., KOSTENUK, P. J., LACEY, D. L., SIMONET, W. S., KE, H. Z. & PASZTY, C. 2008. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*, 23, 860-9.
- LI, X., ZHANG, Y., KANG, H., LIU, W., LIU, P., ZHANG, J., HARRIS, S. E. & WU, D. 2005. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*, 280, 19883-7.
- LI, Y., PAWLIK, B., ELCIOGLU, N., AGLAN, M., KAYSERILI, H., YIGIT, G., PERCIN, F., GOODMAN, F., NURNBERG, G., CENANI, A., URQUHART, J., CHUNG, B. D., ISMAIL, S., AMR, K., ASLANGER, A. D., BECKER, C., NETZER, C., SCAMBLER, P., EYALID, W., HAMAMY, H., CLAYTON-SMITH, J., HENNEKAM, R., NURNBERG, P., HERZ, J., TEMTAMY, S. A. & WOLLNIK, B. 2010. LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome. *Am J Hum Genet*, 86, 696-706.
- LITTLE, R. D., CARULLI, J. P., DEL MASTRO, R. G., DUPUIS, J., OSBORNE, M., FOLZ, C., MANNING, S. P., SWAIN, P. M., ZHAO, S. C., EUSTACE, B., LAPPE, M. M., SPITZER, L., ZWEIER, S., BRAUNSCHWEIGER, K., BENCHEKROUN, Y., HU, X., ADAIR, R., CHEE, L., FITZGERALD, M. G., TULIG, C., CARUSO, A., TZELLAS, N., BAWA, A., FRANKLIN, B., MCGUIRE, S., NOGUES, X., GONG, G., ALLEN, K. M., ANISOWICZ, A., MORALES, A. J., LOMEDICO, P. T., RECKER, S. M., VAN EERDEWEGH, P., RECKER, R. R. & JOHNSON, M. L. 2002. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 70, 11-9.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- LOOTS, G. G., KNEISSEL, M., KELLER, H., BAPTIST, M., CHANG, J., COLLETTE, N. M., OVCHARENKO, D., PLAJSER-FRICK, I. & RUBIN, E. M. 2005. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res*, 15, 928-35.
- MANI, A., RADHAKRISHNAN, J., WANG, H., MANI, M. A., NELSON-WILLIAMS, C., CAREW, K. S., MANE, S., NAJMABADI, H., WU, D. & LIFTON, R. P. 2007. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, 315, 1278-82.
- MAO, B., WU, W., DAVIDSON, G., MARHOLD, J., LI, M., MECHLER, B. M., DELIUS, H., HOPPE, D., STANNEK, P., WALTER, C., GLINKA, A. & NIEHRS, C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417, 664-7.

- MATTSSON, J. P., SCHLESINGER, P. H., KEELING, D. J., TEITELBAUM, S. L., STONE, D. K. & XIE, X. S. 1994. Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membranes. *J Biol Chem*, 269, 24979-82.
- MORVAN, F., BOULUKOS, K., CLEMENT-LACROIX, P., ROMAN ROMAN, S., SUCROYER, I., VAYSSIERE, B., AMMANN, P., MARTIN, P., PINHO, S., POGNONEC, P., MOLLAT, P., NIEHRS, C., BARON, R. & RAWADI, G. 2006. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*, 21, 934-45.
- MUNDLOS, S., OTTO, F., MUNDLOS, C., MULLIKEN, J. B., AYLSWORTH, A. S., ALBRIGHT, S., LINDHOUT, D., COLE, W. G., HENN, W., KNOLL, J. H., OWEN, M. J., MERTELSMANN, R., ZABEL, B. U. & OLSEN, B. R. 1997. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89, 773-9.
- 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.
- NAKAYAMA, M., NAKAJIMA, D., NAGASE, T., NOMURA, N., SEKI, N. & OHARA, O. 1998. Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening. *Genomics*, 51, 27-34.
- NYKJAER, A. & WILLNOW, T. E. 2002. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol*, 12, 273-80.
- OHAZAMA, A., JOHNSON, E. B., OTA, M. S., CHOI, H. Y., PORNTAVEETUS, T., OOMMEN, S., ITOH, N., ETO, K., GRITLI-LINDE, A., HERZ, J. & SHARPE, P. T. 2008. *Lrp4* modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS One*, 3, e4092.
- PEVZNER, A., SCHOSER, B., PETERS, K., COSMA, N. C., KARAKATSANI, A., SCHALKE, B., MELMS, A. & KROGER, S. 2012. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol*, 259, 427-35.
- PINSON, K. I., BRENNAN, J., MONKLEY, S., AVERY, B. J. & SKARNES, W. C. 2000. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 407, 535-8.
- PISPA, J. & THESLEFF, I. 2003. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol*, 262, 195-205.
- PITTAS, A. G., HARRIS, S. S., ELIADES, M., STARK, P. & DAWSON-HUGHES, B. 2009. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 827-32.
- PRATS-PUIG, A., MAS-PARAREDA, M., RIERA-PEREZ, E., GONZALEZ-FORCADELL, D., MIER, C., MALLOL-GUISSET, M., DIAZ, M., BASSOLS, J., DE ZEGHER, F., IBANEZ, L. & LOPEZ-BERMEJO, A. 2010. Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care*, 33, 661-3.
- RICHARDS, J. B., KAVVOURA, F. K., RIVADENEIRA, F., STYRKARSDOTTIR, U., ESTRADA, K., HALLDORSSON, B. V., HSU, Y. H., ZILLIKENS, M. C., WILSON, S. G., MULLIN, B. H., AMIN, N., AULCHENKO, Y. S., CUPPLES, L. A., DELOUKAS, P., DEMISSIE, S., HOFMAN, A., KONG, A., KARASIK, D., VAN MEURS, J. B., OOSTRA, B. A., POLS, H. A., SIGURDSSON, G., THORSTEINSDOTTIR, U., SORANZO, N., WILLIAMS, F. M., ZHOU, Y., RALSTON, S. H., THORLEIFSSON, G., VAN DUIJN, C. M., KIEL, D. P., STEFANSSON, K., UITTERLINDEN, A. G., IOANNIDIS, J. P. & SPECTOR, T. D.

2009. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med*, 151, 528-37.
- RITTLING, S. R., MATSUMOTO, H. N., MCKEE, M. D., NANCI, A., AN, X. R., NOVICK, K. E., KOWALSKI, A. J., NODA, M. & DENHARDT, D. T. 1998. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res*, 13, 1101-11.
- ROBEY, P. G., FEDARKO, N. S., HEFFERAN, T. E., BIANCO, P., VETTER, U. K., GRZESIK, W., FRIEDENSTEIN, A., VAN DER PLUIJM, G., MINTZ, K. P., YOUNG, M. F. & ET AL. 1993. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*, 8 Suppl 2, S483-7.
- RODAN, G. A. & MARTIN, T. J. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int*, 33, 349-51.
- SAHNI, M., AMBROSETTI, D. C., MANSUKHANI, A., GERTNER, R., LEVY, D. & BASILICO, C. 1999. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev*, 13, 1361-6.
- SCHLESINGER, P. H., BLAIR, H. C., TEITELBAUM, S. L. & EDWARDS, J. C. 1997. Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem*, 272, 18636-43.
- SEMENOV, M., TAMAI, K. & HE, X. 2005. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, 280, 26770-5.
- SIMON-CHAZOTTES, D., TUTOIS, S., KUEHN, M., EVANS, M., BOURGADE, F., COOK, S., DAVISSON, M. T. & GUENET, J. L. 2006. Mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor LRP4 cause abnormal limb development in the mouse. *Genomics*, 87, 673-7.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-19.
- ST-JACQUES, B., HAMMERSCHMIDT, M. & MCMAHON, A. P. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 13, 2072-86.
- STYRKARSDOTTIR, U., HALLDORSSON, B. V., GRETARSDOTTIR, S., GUDBJARTSSON, D. F., WALTERS, G. B., INGVARSSON, T., JONSDOTTIR, T., SAEMUNDSDOTTIR, J., SNORRADOTTIR, S., CENTER, J. R., NGUYEN, T. V., ALEXANDERSEN, P., GULCHER, J. R., EISMAN, J. A., CHRISTIANSEN, C., SIGURDSSON, G., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U. & STEFANSSON, K. 2009. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet*, 41, 15-7.
- SUDA, T., TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., JIMI, E., GILLESPIE, M. T. & MARTIN, T. J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20, 345-57.
- SUDA, T., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N. 1996. Cells of bone: Osteoclast generation: principles of bone biology. *Academic Press San Diego*, pp.87-102.
- 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.

- TESLOVICH, T. M., MUSUNURU, K., SMITH, A. V., EDMONDSON, A. C., STYLIANOU, I. M., KOSEKI, M., PIRRUCCELLO, J. P., RIPATTI, S., CHASMAN, D. I., WILLER, C. J., JOHANSEN, C. T., FOUCHIER, S. W., ISAACS, A., PELOSO, G. M., BARBALIC, M., RICKETTS, S. L., BIS, J. C., AULCHENKO, Y. S., THORLEIFSSON, G., FEITOSA, M. F., CHAMBERS, J., ORHOMELANDER, M., MELANDER, O., JOHNSON, T., LI, X., GUO, X., LI, M., SHIN CHO, Y., JIN GO, M., JIN KIM, Y., LEE, J. Y., PARK, T., KIM, K., SIM, X., TWEE-HEE ONG, R., CROTEAU-CHONKA, D. C., LANGE, L. A., SMITH, J. D., SONG, K., HUA ZHAO, J., YUAN, X., LUAN, J., LAMINA, C., ZIEGLER, A., ZHANG, W., ZEE, R. Y., WRIGHT, A. F., WITTEMAN, J. C., WILSON, J. F., WILLEMSSEN, G., WICHMANN, H. E., WHITFIELD, J. B., WATERWORTH, D. M., WAREHAM, N. J., WAEBER, G., VOLLENWEIDER, P., VOIGHT, B. F., VITART, V., UITTERLINDEN, A. G., UDA, M., TUOMILEHTO, J., THOMPSON, J. R., TANAKA, T., SURAKKA, I., STRINGHAM, H. M., SPECTOR, T. D., SORANZO, N., SMIT, J. H., SINISALO, J., SILANDER, K., SIJBRANDS, E. J., SCUTERI, A., SCOTT, J., SCHLESSINGER, D., SANNA, S., SALOMAA, V., SAHARINEN, J., SABATTI, C., RUOKONEN, A., RUDAN, I., ROSE, L. M., ROBERTS, R., RIEDER, M., PSATY, B. M., PRAMSTALLER, P. P., PICHLER, I., PEROLA, M., PENNINX, B. W., PEDERSEN, N. L., PATTARO, C., PARKER, A. N., PARE, G., OOSTRA, B. A., O'DONNELL, C. J., NIEMINEN, M. S., NICKERSON, D. A., MONTGOMERY, G. W., MEITINGER, T., MCPHERSON, R., MCCARTHY, M. I., et al. 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, 466, 707-13.
- THOMAS, G. P., BAKER, S. U., EISMAN, J. A. & GARDINER, E. M. 2001. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J Endocrinol*, 170, 451-60.
- UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., TANAKA, H., SASAKI, T., NISHIHARA, T., KOGA, T., MARTIN, T. J. & SUDA, T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7260-4.
- VAN BEZOOIJEN, R. L., ROELEN, B. A., VISSER, A., VAN DER WEE-PALS, L., DE WILT, E., KARPERIEN, M., HAMERSMA, H., PAPAPOULOS, S. E., TEN DIJKE, P. & LOWIK, C. W. 2004. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*, 199, 805-14.
- VINCENT, A. & DRACHMAN, D. B. 2002. Myasthenia gravis. *Adv Neurol*, 88, 159-88.
- VORTKAMP, A., LEE, K., LANSKE, B., SEGRE, G. V., KRONENBERG, H. M. & TABIN, C. J. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273, 613-22.
- WEATHERBEE, S. D., ANDERSON, K. V. & NISWANDER, L. A. 2006. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development*, 133, 4993-5000.
- WEHRLI, M., DOUGAN, S. T., CALDWELL, K., O'KEEFE, L., SCHWARTZ, S., VAIZEL-OHAYON, D., SCHEJTER, E., TOMLINSON, A. & DINARDO, S. 2000. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 407, 527-30.
- WEIR, E. C., PHILBRICK, W. M., AMLING, M., NEFF, L. A., BARON, R. & BROADUS, A. E. 1996. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10240-5.

- WESTENDORF, J. J., KAHLER, R. A. & SCHROEDER, T. M. 2004. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, 341, 19-39.
- WHYTE, M. P., OBRECHT, S. E., FINNEGAN, P. M., JONES, J. L., PODGORNIK, M. N., MCALISTER, W. H. & MUMM, S. 2002. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med*, 347, 175-84.
- WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W., BARTOCCI, A., FERRANTE, A. W., JR., AHMED-ANSARI, A., SELL, K. W., POLLARD, J. W. & STANLEY, E. R. 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4828-32.
- WINKLER, D. G., SUTHERLAND, M. K., GEOGHEGAN, J. C., YU, C., HAYES, T., SKONIER, J. E., SHPEKTOR, D., JONAS, M., KOVACEVICH, B. R., STAEHLING-HAMPTON, K., APPLEBY, M., BRUNKOW, M. E. & LATHAM, J. A. 2003. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*, 22, 6267-76.
- WODARZ, A. & NUSSE, R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 59-88.
- XIONG, J., ONAL, M., JILKA, R. L., WEINSTEIN, R. S., MANOLAGAS, S. C. & O'BRIEN, C. A. 2011. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, 17, 1235-41.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., WAKI, H., TERAUCHI, Y., KUBOTA, N., HARA, K., MORI, Y., IDE, T., MURAKAMI, K., TSUBOYAMA-KASAOKA, N., EZAKI, O., AKANUMA, Y., GAVRILOVA, O., VINSON, C., REITMAN, M. L., KAGECHIKA, H., SHUDO, K., YODA, M., NAKANO, Y., TOBE, K., NAGAI, R., KIMURA, S., TOMITA, M., FROGUEL, P. & KADOWAKI, T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*, 7, 941-6.
- YANAGITA, M., OKA, M., WATABE, T., IGUCHI, H., NIIDA, A., TAKAHASHI, S., AKIYAMA, T., MIYAZONO, K., YANAGISAWA, M. & SAKURAI, T. 2004. USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 490-500.
- 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.
- YUMOTO, N., KIM, N. & BURDEN, S. J. 2012. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*.
- ZITZER, H., WENTE, W., BRENNER, M. B., SEWING, S., BUSCHARD, K., GROMADA, J. & EFANOV, A. M. 2006. Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 147, 3898-905.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acp5	<i>acid phosphatase 5</i>
AER	<i>apical ectodermal ridge</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
alpha-MEM	<i>alpha minimum essential medium</i>
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
BMP	<i>bone morphigenetic protein</i>
BSP	<i>bone Sialoprotein</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
Calcr	<i>calcitonin receptor</i>
CBFA1	<i>Core binding factor $\alpha 1$</i>
CBP	<i>cAMP response element-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
Clcn7	<i>chloride channel 7</i>
Col10a1	<i>collagen, type X, alpha 1</i>
Col1a1	<i>collagen, type I, alpha 1</i>
Ctsk	<i>cathepsin K</i>
CTX	C-Peptid des Typ 1 Kollagens
d	<i>day</i>
d.h.	das heißt
dist.	distal
Dkk1	Dickkopf 1
DMP1	<i>dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
Dsh	<i>dishevelled</i>
EC_STOP	<i>extracellular stop</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>

FGF	<i>fibroblast Growth factor</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Fz	<i>frizzled</i>
GSK-3 β	Glycogen-Synthase-Kinase -3 β
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
h	hora
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
Ihh	<i>indian hedgehog</i>
inkl.	inklusive
IRMA	immunoradiometrischer Test
KO	<i>Knock-Out</i>
KOH	Kaliumhydroxid
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
Lrp	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
Megf7	<i>multible epidermal growth factor-like domain 7</i>
Mmp13	Matrix metallopeptidase 13
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
OCIF	<i>osteoclastogenesis inhibitory factor</i>
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OST-PTP	<i>osteotesticular protein-tyrosine phosphatase</i>
OSX	Osterix
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
prox.	proximal
Ptch-1	<i>patched-1</i>
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>parathyroid hormone related protein</i>
RANK	<i>receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

RUNX2	<i>runt related transcription factor 2</i>
Smo	<i>smoothened</i>
SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid receptors</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannt
SOST	Sclerostin
TAG	Triacylglycerol
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer binding factor</i>
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDLR	<i>very low-density lipoprotein receptor</i>
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
zzgl.	zuzüglich

7.2 Danksagung

Ich danke **Prof. Dr. med. Andreas Niemeier** für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas und für seine Unterstützung. Weiterhin und besonders danke ich **Alexander Bartelt**, **Walter Tauscher** (hier auch für die gute Musik in der Box!), **Brigitte Müller** und **Christian Schlein** für Hilfe und Zeit! Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des IBMII, v.a. bei **Jörg Heeren**, **Birgit Henkel** und **Sandra Ehret** bedanken. Die morgendlichen Gespräche mit **Christine Runge** sorgten immer für einen guten Start in den Tag. Danke dafür! Auch den Mitarbeitern des Tierstalles des UKE sei für ihre Arbeit gedankt.

Weiterer Dank gebührt **Walter Paradies** und **Sandra Pohl** und ihren Designkünsten und **Katrin Albrecht**.

Nicht zuletzt geht mein größter Respekt an meine Familie **Meral**, **Mina** und **Lian** sowie meine **Eltern**, die mich alle die ganze Zeit bestens unterstützten und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre!

7.3 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

7.4 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: