

Bilaterale Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Timo Marian Heckt

Hamburg, 2016

Tag der Disputation: 03.06.2016

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

1. Gutachter : Prof. Dr. Thorsten Schinke

2. Gutachter : Prof. Dr. Christian Lohr

*Ich widme diese Arbeit
meiner Frau Anneke,
meinem Sohn Julius
und meinen Eltern.*

1. Einleitung	1
1.1 Zellen des Knochens	1
1.1.1 Osteoklasten	2
1.1.2 Osteoblasten.....	3
1.1.3 Osteozyten und Knochenbelegzellen	4
1.2 Knochenwachstum und -umbau	5
1.3 Regulation des Knochenumbaus	7
1.3.1 Einfluss von Vitamin D, Leptin und der Sexualhormone auf den Knochenstoffwechsel.....	7
1.3.2 Regulation des Knochenumbaus über Parathormon und das Rankl- Rank-Opg-System	8
1.3.3 Regulation des Knochenumbaus über Calcitonin und Sphingosin-1- phosphat	18
2. Aufgabenstellung	29
3. Material	30
3.1 Chemikalien	30
3.2 Lösungen und Puffer	30
3.3 Zellkulturmedien	33
3.4 Verbrauchsmaterialien	34
3.5 Geräte & Software.....	35
3.6 Verwendete Fertiglösungen, Kits & ELISA.....	36
4. Methoden	37
4.1 Maushaltung.....	37
4.1.1 Maus- und Rattenmodelle	37
4.1.2 Haltung und Verpaarung	38
4.1.3 Calceinmarkierung von Mäusen	38
4.1.4 Präparation der Mäuse	38
4.2 Histologie und Morphologie.....	38
4.2.1 Kontaktradiographie.....	38
4.2.2 Mikrocomputertomographie (μ CT)	39
4.2.3 Acrylat-Histologie	39
4.2.4 Paraffin-Histologie	40
4.2.5 Von Kossa/van Gieson-Färbung.....	40
4.2.6 Toluidinblau-Färbung.....	40
4.2.7 Sirius Red-Färbung.....	41
4.2.8 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	41

4.2.9	X-Gal-Färbung	41
4.2.10	Histomorphometrie	41
4.3	Zellkultur.....	42
4.3.1	Kultivierung von primären Osteoblasten <i>ex vivo</i>	42
4.3.2	Stimulation von primären Osteoblastenkulturen	43
4.3.3	Kultivierung von Osteoklasten <i>ex vivo</i>	43
4.4	Molekularbiologische Methoden	43
4.4.1	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	43
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
4.4.3	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von Mäusen	44
4.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
4.4.5	Genotypisierung von Mäusen.....	45
4.4.6	Isolierung von RNA aus Geweben	46
4.4.7	Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	46
4.4.8	Reverse Transkription (RT)	46
4.4.9	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	46
4.4.10	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	47
4.4.11	Microarray-Genchip-Analyse	48
4.5	Biochemische Methoden.....	48
4.5.1	Affinitätschromatographie	48
4.5.2	Proteinisolation aus Zellkulturen.....	49
4.5.3	SDS-Gelelektrophorese.....	49
4.5.4	Western-Blot.....	50
4.5.5	ELISA	51
4.6	Statistische Analysen	51
5.	Ergebnisse	52
5.1	Einfluss von PTH auf die Osteoblasten-Osteoklasten-Kommunikation unter Freisetzung von Rankl.....	52
5.1.1	Die Stimulation primärer Osteoblasten mit PTH induziert neben der Genexpression auch die Freisetzung von löslichem Rankl	52
5.1.2	Die intermittierende Injektion von PTH führt in Mäusen zu einer erhöhten Konzentration von Rankl im Serum und zu einer erhöhten Knochenmasse	56
5.1.3	Bekannte Rankl-spaltende Enzyme werden nicht PTH-abhängig induziert.....	59
5.1.4	Eine Affymetrix-Genchip-Analyse identifiziert Adamts1 und Adamts16 als PTH-induzierte Metallopeptidasen	63

5.1.5	<i>Adamts16</i> -defiziente Ratten zeigen keine veränderte Knochenmasse, aber eine reduzierte Osteoklastenzahl und eine sehr geringe Rankl-Konzentration im Serum.....	66
5.1.6	Die Abspaltung der extrazellulären Rankl-Domäne in primären Osteoblasten erfolgt spezifisch nach PTH-Stimulation	68
5.2	Untersuchung der Kommunikation vom Osteoklasten zum Osteoblasten über die Calcitonin-regulierte Wirkungsweise von S1P und Pate4	71
5.2.1	<i>Sgpl1</i> -defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte embryonale Letalität und eine kurze Lebenszeit	71
5.2.2	Leber und Lunge der <i>Sgpl1</i> -defizienten Mäuse zeigen auffällige morphologische Veränderungen	73
5.2.3	<i>Sgpl1</i> -defiziente Mäuse zeigen schon im Alter von 3 Wochen eine stark erhöhte trabekuläre Knochenmasse, unabhängig vom Rezeptor S1pr3	75
5.2.4	Die Knochenzellen von <i>Sgpl1</i> -defizienten Mäuse zeigen veränderte morphologische Eigenschaften	77
5.2.5	CTX, PINP und PICP deuten auf einen hohen Knochenumsatz hin	78
5.2.6	Das Verhältnis von Rankl/Opg im Serum der <i>Sgpl1</i> -defizienten Mäuse spricht für eine reprimierte Osteoklastogenese	80
5.2.7	S1P-stimulierte primäre Osteoblasten zeigen eine starke Induktion von Genen, die die Osteoblastendifferenzierung und –formation fördern.....	81
5.2.8	<i>Pate4</i> -defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp.....	83
5.2.9	<i>Pate4</i> -defiziente Mäuse haben keinen veränderten Knochenphänotyp	84
5.2.10	<i>Pate4</i> wird spezifisch in der Prostata und Samenblase exprimiert.....	85
5.2.11	Eine Defizienz von <i>Pate4</i> beeinträchtigt nicht die männliche Fertilität	87
6.	Diskussion	89
6.1	Die Rankl-vermittelte Kommunikation von Osteoblasten zu Osteoklasten	89
6.2	Die S1P-vermittelte Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten 95	
6.3	<i>Pate4</i> -defiziente Mäuse zeigen keine phänotypischen Veränderungen bis zum Alter von 6 Monaten	100
7.	Ausblick	102
8.	Zusammenfassung.....	103
9.	Summary.....	106
10.	Sicherheit und Entsorgung.....	109
11.	Abkürzungsverzeichnis	110
12.	Literaturverzeichnis.....	116

13. Danksagung	135
14. Vorveröffentlichungen	136
14.1 Publikationen	136
14.2 Präsentationen	136
15. Eidesstaatliche Erklärung.....	137

1. Einleitung

Der Knochen von Wirbeltieren ist eine harte Form des Binde- und Stützgewebes und besitzt als Bestandteil des Skelettsystems wichtige und vielfältige Funktionen im Organismus. Er gibt dem Körper Form und Festigkeit und ist als wesentlicher Verbindungspunkt für Bänder und Muskeln des Körpers unerlässlich für den Bewegungsapparat. Er schützt die inneren Organe und ist Kalzium- und Phosphatspeicher des Organismus. Im roten Knochenmark findet die Bildung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten statt, so dass dem Knochen wichtige Funktionen bei der Blutbildung und bei der Bildung des Immunsystems zukommen. Eine Beteiligung am Energiestoffwechsel ist ebenfalls belegt.¹ Das Knochengewebe ist einem ständigem Umbau (Bone remodelling) unterworfen, welcher sich zu jeder Zeit der auf den Körper wirkenden wechselnden Beanspruchung anpassen kann. So zeigen die Knochen von Astronauten in Schwerelosigkeit innerhalb weniger Wochen einen massiven Knochenmasseverlust, während es bei Sportlern mit hoher mechanischer Beanspruchung zu einem Anstieg der Knochenmasse kommt.^{2,3} Der Umbau des Knochengewebes ist wichtig für die Festigkeit und Elastizität des Skeletts, der Mobilisation von Kalzium und der Reparatur und dem Ersatz von altem Knochengewebe.^{4,5} Es gibt zwei Prozesse, die für den Knochenumbau verantwortlich sind: Knochenneubildung bzw. Knochenformation und Knochenabbau bzw. Knochenresorption. Beide Prozesse werden durch hochspezialisierte Zellen vermittelt. In den ersten Lebensjahren überwiegt dabei die Formation, während im Alter meist die Resorption verstärkt ist. Im gesunden Organismus besteht im Allgemeinen ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Knochenformation und Knochenresorption, um die Knochenmasse konstant zu halten.

1.1 Zellen des Knochens

Am Knochenumbau sind 4 verschiedene Knochenzellen beteiligt: die knochenabbauenden Osteoklasten, die knochenaufbauenden Osteoblasten und die aus Osteoblasten differenzierten Osteozyten und Knochenbelegzellen.

1.1.1 Osteoklasten

Osteoklasten sind gegenwärtig die einzig bekannten knochenresorbierenden Zellen im Organismus.^{6,7} Sie entstehen durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen, gebildet aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks.⁸ Osteoklasten treten im Gegensatz zu Osteoblasten meist vereinzelt und in sehr viel geringerer Anzahl auf, wobei sie nur ca. 1 % der Knochenoberfläche bedecken.⁹ Ihre Formation (Osteoklastogenese) ist ein hochkomplexer Vorgang und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wobei die Osteoklastogenese v. a. durch zwei Schlüsselfaktoren, den Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (*Macrophage colony-stimulating factor*, M-Csf) und den *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (Rankl), vorangetrieben wird.¹⁰⁻¹² Beide Faktoren werden von Osteoblasten gebildet, die knochenaufbauenden Zellen besitzen also einen direkten Einfluss auf die Funktionalität der knochenabbauenden Zellen, was durch das Rankl-Rank-Opg-System erklärbar ist (1.3.3.2). Systemisch wirksame Hormone wie das Parathormon (PTH), Calcitonin und Vitamin D₃ sind ebenfalls an der Regulation der Osteoklastogenese beteiligt. Wenn die Osteoklasten ausgebildet und aktiv sind, heften sie sich zunächst mit ihrer resorptiven Seite mithilfe von Integrinen an die Oberfläche des Knochens. Sie bilden aus Aktin-Filamenten eine ringförmige Versiegelungszone (*sealing zone*) aus, und die Zytoplasmamembran des Osteoklasten wandelt sich zur Knochenseite zu einem Faltensaum (*ruffled border*) um. Das Zusammenwirken von membranständigen Protonen-ATPasen, Carboanhydrasen und dem Chlorid-Kanal Clc-7 (*chloride channel 7*) des Osteoklasten säuern den entstehenden Hohlraum unter dem Faltensaum so stark an (pH 4 – 4,5), das eine sog. Resorptionslakune (Howship-Lakune) entsteht.¹³ Der niedrige pH-Wert und lysosomale Enzyme, welche in die Lakune freigesetzt werden, lösen die Hydroxyapatitkristalle aus dem Knochen und das hierbei freigesetzte Calcium wird vom Blut abtransportiert, so dass der mineralisierte Knochen resorbiert wird. Der nicht-mineralisierte, organische Teil des Knochens, welcher zum Großteil aus Kollagenfibrillen besteht, wird Osteoid genannt und beim Knochenabbau von der sauren Protease Cathepsin K aufgelöst.¹⁴ Kleine Peptide, die β-Crosslaps (*C-telopeptides of type-1 collagen*; CTX), welche die Kollagenfibrillen miteinander verbinden, werden beim Abbau freigesetzt und können z.B. in der Osteoporose-Diagnostik in Urin und Serum nachgewiesen werden. Anhand dieser

Kollagenabbauprodukte kann relativ zuverlässig auf die Osteoklastenaktivität im Organismus geschlossen werden.¹⁵

1.1.2 Osteoblasten

Im gesunden Organismus bleibt die Knochenmasse nach Abschluss des Längenwachstums relativ gleich. Um dies zu gewährleisten, muss der von Osteoklasten resorbierte Knochen durch die knochenbildenden Osteoblasten erneuert werden. Osteoblasten stammen im Gegensatz zu den Osteoklasten von mesenchymalen Stammzellen ab. Damit die mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen und von da aus zu reifen Osteoblasten differenzieren bedarf es der Expression spezifischer Gene und der Synthese von knochenmorphogenetischen Proteinen (*bone morphogenetic proteins*, BMPs) und Proteinen, die in den *Wingless* (Wnt)-Signalweg involviert sind.¹⁶ Essentiell für die Osteoblastendifferenzierung sind v.a. die Transkriptionsfaktoren Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) und Sp7 (*Transcription factor Sp7*).¹⁷⁻¹⁹ Runx2 ist dabei der Hauptregulator, der für die Osteoblastogenese benötigten Genexpression, was auch dadurch deutlich wird, dass Runx2-defiziente Mäuse keine reifen Osteoblasten und somit keinen mineralisierten Knochen besitzen.²⁰ Bei der Reifung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten induziert Runx2 die Expression der für die Knochenmatrixproteine verantwortlichen Gene der Alkalischen Phosphatase (*Alp*), Typ-I-Kollagen (*Col1a1*), des *Bone sialoprotein* (*Bsp*) und Osteokalzin (*bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*, *Bglap*).²¹ Die Osteoblasten durchlaufen dabei morphologische Veränderungen zu größeren, kuboidal geformten Zellen, die über Cadherine mit neu synthetisiertem Osteoid verbunden sind.^{22,23} Die Knochenbildung von Osteoblasten verläuft in zwei Schritten, wobei zunächst das Osteoid, also die organische Matrix des Knochens, gebildet wird und im Anschluss die Mineralisierung der Matrix stattfindet. Im ersten Schritt werden die Bestandteile des Osteoids, also Prokollagen, spezifische Matrixproteine (Osteokalzin, Osteonektin, Bone Sialoprotein und Osteopontin) und Proteoglykane von den Osteoblasten sezerniert. Die negativ geladenen Proteoglykane immobilisieren Kalzium-Ionen, welche nach Degradation der Proteoglykane in speziellen Matrix-Vesikeln gespeichert werden.²⁴ Ein weiterer Bestandteil dieser Vesikel ist Phosphat, welches von der Alkalischen Phosphatase (AP) aus Phosphat-haltigen Komponenten abgespalten wird. Das sezernierte Prokollagen wird von den Prokollagen-Peptidasen Adamts2 (*A disintegrin and*

metalloproteinase with thrombospondin motifs 2) und *Bmp1 (bone morphogenetic protein 1)* prozessiert, wobei am N-terminalen (*Adams2*) und am C-terminalen (*Bmp1*) Ende des Prokollagens jeweils ein Peptidstück abgespalten wird.²⁵⁻²⁷ Diese zwei abgespaltenen Peptid-Enden, PINP und PICP (*N-, C-terminal propeptides of type I collagen*) können in der Diagnostik im Serum nachgewiesen werden und sind ein Maß für die Osteoblastenaktivität im Organismus. Im zweiten Schritt der Knochenbildung, welcher ca. 2 Wochen nach der Osteoidbildung stattfindet, lagert sich das Phosphat in den Vesikeln mit dem Kalzium zu Hydroxyapatit-Kristallen zusammen und lagert sich in die organische Matrix ein, so dass der Knochen mineralisiert.²⁸

1.1.3 Osteozyten und Knochenbelegzellen

Reife Osteoblasten treten ab einer gewissen Zeit entweder in die Apoptose ein oder wandeln sich zu Osteozyten oder Knochenbelegzellen um.²⁹ Werden mineralisierende Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebettet, so differenzieren sie zu Osteozyten. Osteozyten sind mit 90 - 95 % Anteil die am zahlreichsten vertretenden und auch langlebigsten Knochenzellen mit einer Lebenszeit von bis zu 25 Jahren.³⁰ In der Knochenforschung galten die Osteozyten für lange Zeit als mehr oder weniger passive Zellen, bis die Identifizierung von Osteozyten-spezifischen Markern und die Entwicklung von Techniken diese Knochenzellen zu isolieren und zu erforschen, dazu dienten, ihre wichtigen Funktionen im Knochen besser zu verstehen.^{31,32} Osteozyten sind in der mineralisierten Knochenmatrix in Lakunen lokalisiert und über ein dendritenartiges Netzwerk untereinander sowie mit Knochenzellen außerhalb der mineralisierten Matrix, verbunden. Sie produzieren Osteopontin und andere Matrixproteine und sind in der Lage über ihr Netzwerk Osteoblasten und Knochenbelegzellen mit Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Durch ihr feinverzweigtes Netzwerk sind sie in der Lage jede mechanische Belastung umgehend wahrzunehmen und sofort zu reagieren. Die Expression von Osteoblastenmarkergenen wie *Bglap*, *Col1a1* oder *Alp* ist in eingebetteten Osteozyten reprimiert, während typische Osteozytenmarkergene wie *Dmp1 (dentin matrix acidic phosphoprotein 1)* oder das Gen *Sost*, welches für den Wnt-Signalweg-Inhibitor Sclerostin codiert, in ihrer Expression induziert sind.^{33,34}

Beim vierten Zelltypen im Knochengewebe handelt es sich um Knochenbelegzellen (*bone lining cells*), welche flach auf der Knochenoberfläche aufliegen. Sie sind metabolisch inaktiv, dienen aber dem Knochen als Schutz vor Substanzen wie Pyrophosphat, welcher die Hydroxyapatit-Kristalle angreifen kann.³⁵

1.2 Knochenwachstum und -umbau

Die Bildung und Entwicklung des Knochens im Organismus kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Beim chondralen Knochenwachstum (chondrale Ossifikation) entsteht zunächst aus mesenchymalen Bindegewebe ein Modell des Knochens aus hyalinem Knorpel (Primordialskelett), welches im Anschluss kontinuierlich durch Chondroklasten resorbiert und durch, von Osteoblasten gebildetem, Knochengewebe ersetzt wird. Dies trifft v.a. auf die Bildung von Röhren-, Wirbel-, Becken- und Schädelbasisknochen zu. Eine direkte Ablagerung von Knochen aus mesenchymalem Bindegewebe nennt man desmale Ossifikation und betrifft den Knochen des Schädeldachs, die Kieferknochen, sowie die Schlüsselbeinknochen. Hierbei differenzieren sich Osteoblasten direkt aus mesenchymalen Vorläuferzellen und bilden das Osteoid, welches im Anschluss mineralisiert. Sowohl bei der chondralen, als auch bei der desmalen Knochenbildung entsteht zunächst der sog. Geflecht- bzw. Faserknochen, indem die eingelagerten Kollagenfibrillen noch ungeordnet sind und eine geringe mechanische Stabilität gegeben ist. Mit dem Wachstumsabschluss tritt der Knochen in den wiederholenden Zyklus des Knochenumbaus bzw. des *bone remodelling* ein. Hierbei erfolgt ein stetiger Wechsel zwischen Osteoklasten-vermittelter Knochenresorption, gefolgt von Osteoblasten-vermittelter Knochenformation, wobei alter Knochen durch neuen Knochen ersetzt wird. Die Kollagenfasern werden in Folge dessen schichtartig in Strängen geordnet, was dem entstehenden lamellären Knochen zur notwendigen Elastizität und Widerstandsfähigkeit verhilft. Der immer wiederkehrende Prozess von Resorption und Formation ist im gesunden Organismus genauestens aufeinander abgestimmt. Er findet gleichzeitig an bis zu 5 Millionen Stellen der Knochenoberfläche in sog. *bone multicellular units* (BMUs), bestehend aus einigen Osteoklasten und vielen Osteoblasten, statt (Abb.1).

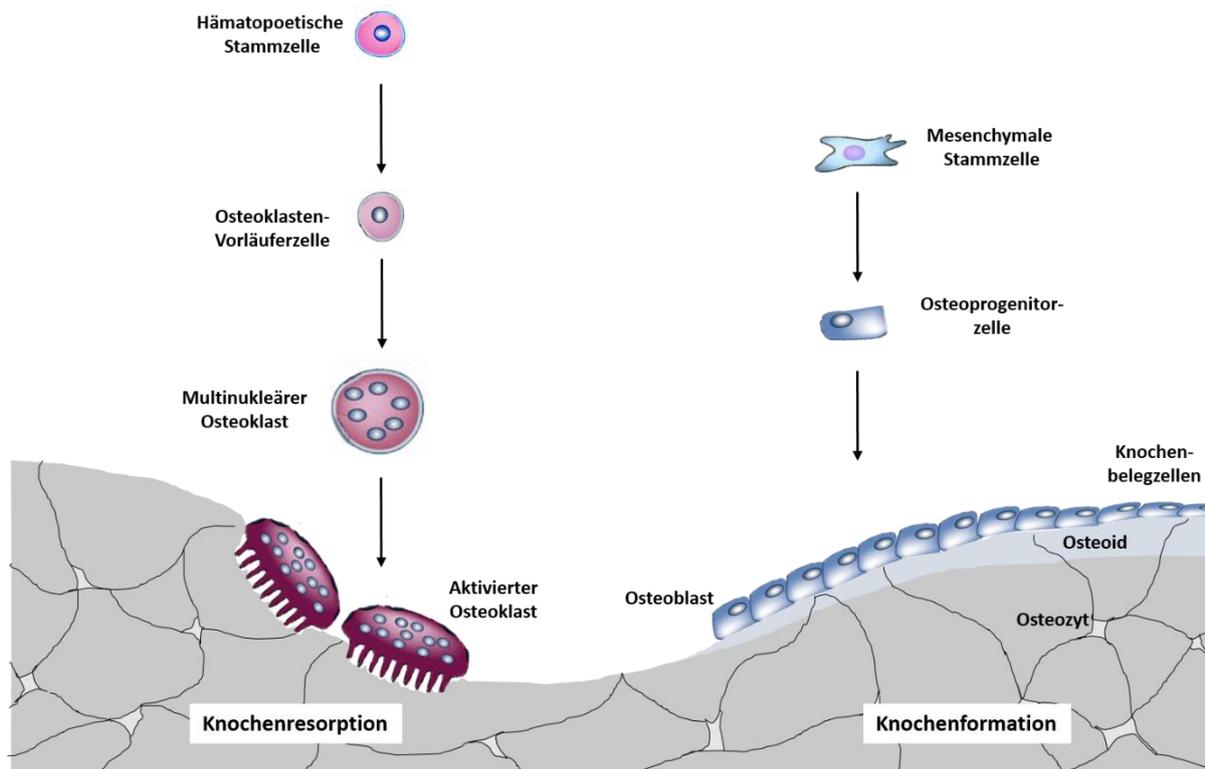


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer BMU. BMUs bestehen aus einigen Osteoklasten und vielen Osteoblasten. Die aktiven knochenresorbierenden Osteoklasten entstehen durch Verschmelzung von mehreren Osteoklasten-Vorläuferzellen, gebildet aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Knochenbildende Osteoblasten differenzieren sich im Gegensatz dazu aus Osteoprogenitorzellen, gebildet aus mesenchymalen Stammzellen. Reife Osteoblasten gehen mit der Zeit entweder in Apoptose oder bilden sich zu Knochenbelegzellen oder Osteozyten um.

Ein Umbauzyklus umfasst ca. 120 Tage mit unterschiedlichen Phasen der Aktivität der Zellen. Verschiedene Knochenerkrankungen basieren darauf, dass das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation verloren gegangen ist. Die häufigste und bekannteste Knochenerkrankung ist die Osteoporose, welche entweder durch eine erniedrigte Knochenbildung (verminderte Osteoblasten-Aktivität), eine erhöhte Knochenresorption (gesteigerte Osteoklasten-Aktivität) oder eine Kombination aus beiden hervorgerufen wird.³⁶ Osteoporose ist gekennzeichnet durch eine verminderte Knochenmasse und eine verschlechterte Knochenqualität, was eine Erhöhung des Frakturrisikos zur Folge hat. Besonders häufig betroffene Knochen sind die Wirbelkörper, der distale Radius und der proximale Femur, wobei besonders ältere Menschen und hierbei v.a. Frauen nach der Menopause (30-40% höheres Risiko) betroffen sind.³⁷ Nach Meinung der WHO zählt die

Osteoporose zu den 10 wichtigsten Erkrankungen der heutigen Zeit, weshalb es von entscheidender Bedeutung ist weitere potentielle Therapieansätze zu entwickeln.

1.3 Regulation des Knochenumbaus

Die Regulation des Knochenumbaus ist überaus komplex, und es ist von entscheidender Bedeutung für zukünftige Ansätze zur Therapieentwicklung ein möglichst genaues Verständnis der beteiligten Mechanismen zu entwickeln. Die Regulation des Knochenumbaus kann sowohl systemisch über Hormone im Blutkreislauf als auch lokal über Zytokine zwischen den verschiedenen Knochenzellen erfolgen. Die wichtigsten hormonellen Regulatoren des Knochenumbaus sind das Parathormon (PTH), Calcitonin (CT), Vitamin D₃, Leptin und die Sexualhormone. Die Regulationswege über Parathormon und Calcitonin sind Hauptbestandteil dieser Arbeit, so dass sich der Großteil dieses Kapitels mit diesen beiden Hormonen beschäftigen wird.

1.3.1 Einfluss von Vitamin D, Leptin und der Sexualhormone auf den Knochenstoffwechsel

Das Steroidhormon Vitamin D bzw. die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (auch: Calcitriol) spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Die biologisch inaktive Form, Vitamin D₃, kann entweder mit der Nahrung aufgenommen oder unter UV-Strahlung in der Haut aus dem Cholesterinderivat 7-Dehydrocholesterol gebildet werden. Im Anschluss wird Vitamin D₃ in der Leber durch die 25-Hydroxylase (Cyp2R1) zu 25-Hydroxyvitamin D₃ umgebaut, anhand dessen in der Klinik die Serumkonzentration von Vitamin D im Menschen bestimmt wird. Der Umbau zur letztendlich aktiven Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ findet durch die 1 α -Hydroxylase (Cyp27B1) in der Niere statt.³⁸⁻⁴⁰ Calcitriol wirkt auf den Knochenaufbau, indem es die Kalziumaufnahme durch die intestinalen Zellen fördert und knochenbildende Osteoblasten stimuliert.⁴¹ Ein Mangel an Vitamin D ist gekennzeichnet durch eine unzureichende Mineralisation der Knochen und Hypokalzämie im Blut, ein Krankheitsbild, welches als Osteomalazie oder auch Rachitis bezeichnet wird.⁴²

Das Peptidhormon Leptin wird zum Großteil von Adipozyten exprimiert und ist hauptsächlich im Fettstoffwechsel von Säugetieren involviert, wo es z.B. das Hungergefühl reguliert. Der

Einfluss auf den Knochenstoffwechsel wurde entdeckt, als man in Leptin-defizienten Mäusen (*ob/ob*-Mäuse) eine erhöhte Knochenmasse feststellte. Leptin kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so das vegetative Nervensystem über Bindung an Zentren im Hypothalamus beeinflussen. Über das sympathische Nervensystem werden diese Signale zum Knochen weitergeleitet, wo freigesetztes Noradrenalin über die Bindung an den β 2-adrenergen Rezeptor die Osteoblasten hemmt.⁴³⁻⁴⁵

Sexualhormone haben ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, wobei Östrogen das in diesem Zusammenhang einflussreichste Steroid darstellt. Östrogen-Rezeptoren werden von allen Knochenzellen exprimiert, und eine Bindung des Steroids bewirkt eine Förderung der Knochenformation und einen verminderten Knochenabbau.^{46,47} Eine Verminderung der Östrogenkonzentration durch eine Ovariectomie oder bei dem Erkrankungsbild der postmenopausalen Osteoporose zeigt einen erheblichen Knochenmasseverlust.⁴⁸

1.3.2 Regulation des Knochenbaus über Parathormon und das Rankl-Rank-Opg-System

1.3.2.1 Parathormon

Das Parathormon ist neben Calcitonin und Vitamin D₃ das dritte wichtige Regulationshormon der Kalziumhomöostase im Organismus. Im Gegensatz zu Vitamin D₃, welches eher für die langfristige Regulation des Kalziumspiegels verantwortlich ist, ist PTH in der Lage den Kalziumspiegel im Serum innerhalb von Minuten zu beeinflussen. PTH kann die Kalziumkonzentration im Blut erhöhen und ist damit der direkte Gegenspieler von CT. PTH wird in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse in einer 115 Aminosäuren (AS) langen Hormon-Vorstufe (Prä-Pro-PTH) synthetisiert.⁴⁹⁻⁵¹ Die 25 AS lange Prä-Signalsequenz dient dabei der Erkennung durch das Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) und dem anschließenden Transport des Proteins von den Ribosomen zum endoplasmatischen Retikulum (ER). Im ER und im Golgi-Apparat wird die Hormon-Vorstufe dann zu einem, aus 84 AS bestehenden, Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 9.4 kDa prozessiert, im Anschluss in sekretorischen Granula gespeichert und bei Bedarf sezerniert (Abb.2).⁵²

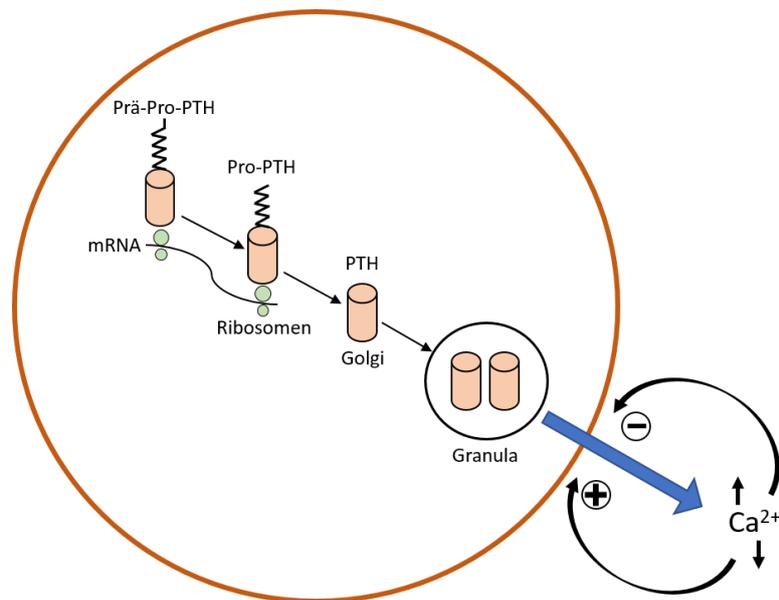


Abbildung 2: Schematische Darstellung der PTH-Synthese und Freisetzung in die extrazelluläre Matrix. In den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsenzellen wird das Prä-Pro-PTH synthetisiert, bis zur Speicherung in den sekretorischen Granula prozessiert und bei niedrigem Kalziumspiegel sezerniert. Modifiziert nach Klee et al. Hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 17, 573 (1988).

Die Sekretion von PTH ist abhängig vom extrazellulären Kalziumspiegel. Beim Menschen beträgt die Kalziumkonzentration im Blut normalerweise zwischen 2,20 und 2,65 mmol/L, wobei eine Konzentration über diesem Normalwert (Hyperkalzämie) die Sekretion von PTH hemmt und eine Konzentration unter diesem Wert (Hypokalzämie) die Sekretion von PTH steigert.⁵³ Die Detektion der Kalziumkonzentration im Blut erfolgt über den kalziumsensitiven Rezeptor (CaSR), ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), welcher auf der Oberfläche der Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse und der Nierentubuluszellen sitzt.⁵⁴ Bei einem niedrigen Kalziumspiegel im Serum wird PTH durch einen Feedback-Mechanismus synthetisiert und außerdem als direkte Antwort durch Exozytose aus den Speichergranula freigesetzt. Abhängig von der Kalziumkonzentration kommt es in den Speicherzellen schon vor der Sekretion zur proteolytischen Prozessierung des intakten PTH, wobei verschiedene Fragmente entstehen, deren Funktion im Organismus teilweise noch ungeklärt ist.^{55,56} Obwohl intaktes PTH [1-84] unter Zellkulturbedingungen stabil ist und über mindestens 72 Stunden seine Aktivität behalten kann, beträgt die Halbwertszeit von PTH [1-84] im Organismus nur einige Minuten, bevor das Peptidhormon in der Leber und der Niere schließlich proteolytisch abgebaut wird.⁵⁷⁻⁵⁹

Freigesetztes PTH vermittelt seine physiologische Funktion über den PTH-Rezeptor, welcher ebenfalls zur Familie der GPCR gehört.⁶⁰ In Säugetieren kommen zwei PTH-Rezeptoren vor (PTH1R, PTH2R), während in Knochenfischen noch ein weiterer Rezeptor (PTH3R) identifiziert wurde.⁶¹ Der primäre PTH-Rezeptor ist der PTH1R, welcher zum Großteil von Osteoblasten und Zellen der Niere exprimiert wird, aber auch zu einem geringen Anteil in der Haut, in Uterus, Ovarien und Plazenta, in den Testis, in der Leber und in Herz- und Skelettmuskel vorkommt.⁶² Die Aktivierung des PTH1R muss nicht zwingend über das intakte PTH [1-84] verlaufen, das N-terminale Fragment PTH [1-34] ist dafür ausreichend.^{52,63}

Die physiologische Funktion von PTH ist die Aufrechterhaltung der Kalzium- und Phosphathomöostase im Organismus, wobei es die Kalziumkonzentration im Blut erhöht und die Phosphatkonzentration senkt. Kalzium ist nicht nur als Knochenbaustein von elementarer Bedeutung, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle in der Blutgerinnung und bei der Funktion von Nerven und Muskeln. Phosphat ist neben der Beteiligung am Knochenaufbau ein wesentlicher Bestandteil des Energiestoffwechsels.

Um die Kalzium- und Phosphatkonzentration innerhalb kürzester Zeit zu beeinflussen, wirkt PTH vor allem über drei verschiedene Organe: die Niere, den Darm und die Knochen. Es hemmt die Phosphat-Resorption im proximalen Tubulus der Niere, indem es die Aktivität des Natrium-Phosphat-Cotransporters vermindert, so dass vermehrt Phosphat aus dem Körper ausgeschieden wird.⁶⁴ Im Gegensatz dazu steigert es die tubuläre Rückresorption von Kalzium aus dem Urin über den vermehrten Einbau von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und eine erhöhte Aktivität der basolateralen Kalziumpumpen.^{65,66} Eine weitere Wirkung von PTH auf die Niere ist die Stimulation der Vitamin D_3 -Synthese, wobei es die Expression des Enzyms 1α -Hydroxylase induziert, welches die Umwandlung von 25-Hydroxyvitamin- D_3 in die aktive Form $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 katalysiert.⁶⁷ Aktives Vitamin D_3 stimuliert die Resorption von Kalzium im Darm, so dass PTH auf diese Weise indirekt zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration im Blut beiträgt (Abb.3).

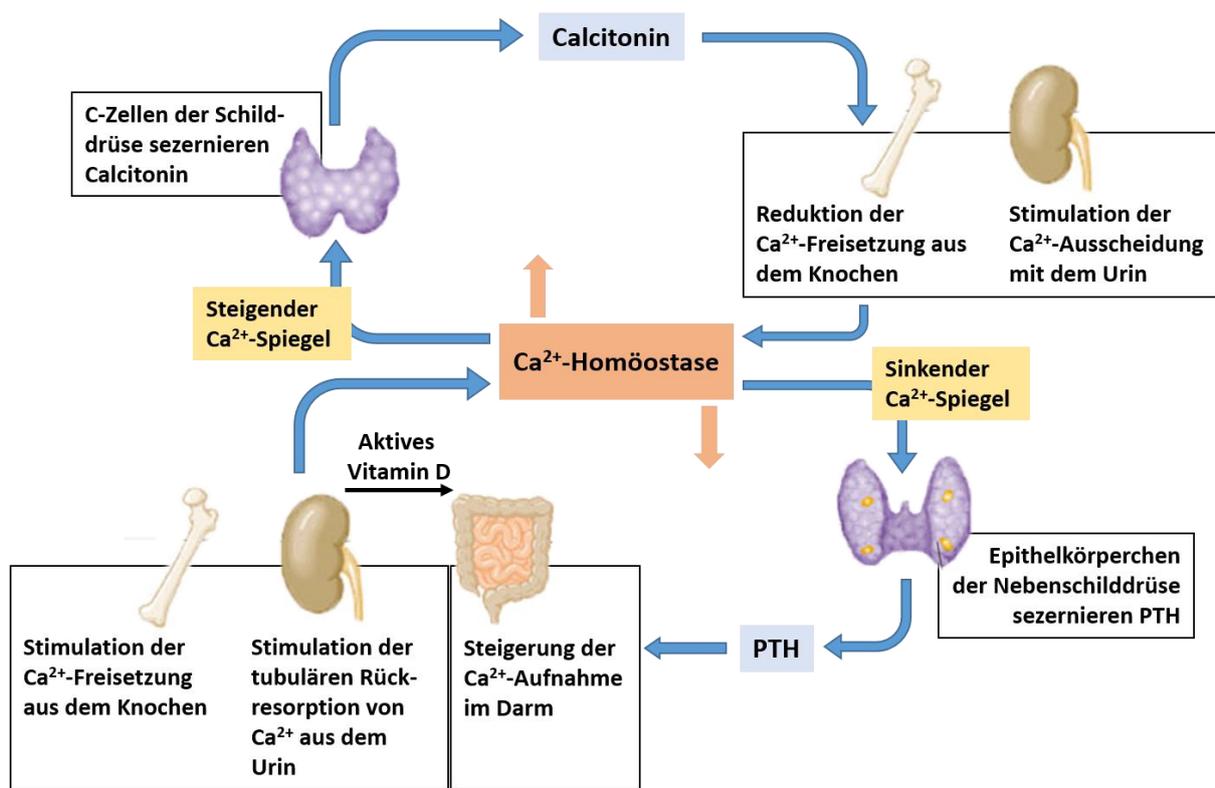


Abbildung 3: Schematischer Überblick über die Regulation der Kalziumhomöostase durch PTH und Calcitonin. Modifiziert nach Yi *et al.* *Molecular Understanding and Assessment of Hypoparathyroidism*. *Endocrinol Metab.* 26, 25-32 (2011).

Neben der Niere ist der Knochen das zweite wichtige direkte Zielorgan von PTH. Es stimuliert in hohem Maße die Knochenresorption und bewirkt so einen Anstieg der Kalziumkonzentration im Blut durch die Freisetzung des im Knochen gebundenen Kalziums. Bemerkenswerterweise wird der PTH1R nicht von den knochenresorbierenden Osteoklasten exprimiert, sondern in hohem Maße von den knochenaufbauenden Osteoblasten. Dieses molekulare Kommunikation vom Osteoblasten zum Osteoklasten ist seit Ende der 1990er Jahre zum Großteil durch das Rankl-Rank-Opg-System erklärbar (siehe 1.3.2.2). Neben diesem osteokatabolen Effekt kann PTH durch eine intermittierende Gabe des Hormonfragments PTH (1-34) auch eine osteoanabole Wirkung auf den Knochen ausüben.⁶⁸⁻⁷¹ Die Wirkungsweise dieses Effekts ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es konnte aber in Mäusen gezeigt werden, dass die intermittierende Gabe von PTH die Osteoblastendifferenzierung fördert und somit zumindest kurzfristig die Anzahl der Osteoblasten erhöht wird. Der osteokatabole Effekt wird also zugunsten eines osteoanabolen Effekts verschoben, eine Wirkung, die man sich heutzutage auch pharmakologisch zunutze macht. Da klassische Behandlungsmethoden der Osteoporose,

wie z.B. die Gabe von Vitamin D₃, Kalzium oder Bisphosphonate mehr darauf angelegt sind, den Prozess der Knochenresorption zu verlangsamen, ergab sich durch die Entdeckung der osteoanabolen Wirkung von PTH die Möglichkeit den Knochenverlust pharmakologisch umzukehren. In einer großen Studie an postmenopausalen Frauen mit manifester Osteoporose erhöhte die tägliche Gabe von 20 oder 40 µg rekombinanten PTH (1-34) die Knochendichte um ca. 14 % und reduzierte die Wahrscheinlichkeit einer Fraktur um ca. 65 %.⁷² In Deutschland ist rekombinantes humanes PTH (1-34) unter dem Namen Teriparatid seit 2003 zugelassen, wird aber, seitdem in einer Tierversuchsstudie nach 2jähriger Applikation von PTH (1-34) eine erhöhte Knochentumorrate festgestellt wurde, maximal für 18 Monate in der Therapie beim Menschen eingesetzt.⁷³

1.3.2.2 Das Rankl-Rank-Opg-System

Bis zum Ende der 1960er Jahren wurde allgemein angenommen, dass Osteoklasten aus Osteoblasten oder den Osteoprogenitorzellen entstehen würden. Erst in den 70er und 80er Jahren gab es erste Hinweise darauf, dass Osteoklasten auch einen hämatopoetischen Ursprung haben könnten und dass eine Aktivierung von Osteoklasten durch Osteoblasten über direkten Zell-Zell-Kontakt möglich ist.⁷⁴⁻⁷⁶ Osteoblasten spielten in der Osteoklastogenese also eine wesentliche Rolle. Durch weitere Experimente konnte auch gezeigt werden, dass in Co-Kultursystemen Osteoblasten die Fähigkeit besitzen, in Gegenwart von Knochenabbau-induzierenden Stimulanzen wie PTH, Vitamin D₃ oder Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Knochenresorption von differenzierten Osteoklasten zu aktivieren.⁷⁷⁻⁸¹ Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass auch lösliche Faktoren im Austausch zwischen den beiden Knochenzellen für eine Förderung der Osteoklastogenese verantwortlich sein können. Das verantwortliche Molekül war bis zum Ende der 90er Jahre nicht bekannt, man nannte es den *Osteoclast differentiation faktor* (ODF).⁸² 1997 entdeckten dann gleich zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Protein, welches das Verständnis im Zusammenwirken von Osteoblasten und Osteoklasten entscheidend beeinflussen sollte. Simonet *et al.* entdeckten während eines Screenings einer cDNA-Bibliothek nach Homologen der TNF-Rezeptor-Superfamilie ein neues Mitglied dieser Proteinfamilie und da die Überexpression dieses Faktors in Mäusen eine Osteoporose verursachte, nannten sie es Osteoprotegerin (OPG).⁸³ Kurze Zeit später identifizierten Lacey *et al.* einen löslichen Rezeptor als Liganden von OPG

(OPG-Ligand, OPGL), wobei der OGPL sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Osteoklastogenese induzierte.¹² Tsuda *et al.* entdeckten zur gleichen Zeit in Überständen von humanen Fibroblastenkulturen ein Protein, welches in der Lage war, die Osteoklastogenese zu hemmen und sie nannten es den *Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)*.⁸⁴ Yasuda *et al.* fanden nachfolgend heraus, dass der OCIF an ein Membranprotein von osteoklasteninduzierenden Zellen bindet (*OCIF binding protein*) und das dieses Membranprotein, genau wie der OPGL, die Osteoklastogenese induzieren konnte.^{11,85} Es stellte sich heraus, das ODF und OPGL identisch zu einem kurz zuvor entdeckten Zytokin namens TRANCE (*TNF-related activation induced cytokine*) bzw. RANKL (*Receptor activator for NF- κ B-ligand*) war.^{11,12} TRANCE wurde bereits im Jahr zuvor als ein von T-Zellen exprimiertes Membranprotein entdeckt, welches die Funktion und das Wachstum von dendritischen Zellen und den T-Zellen selbst fördert.⁸⁶⁻⁸⁸ Der Rezeptor für ODF auf den Osteoklastenvorläuferzellen und der zuvor entdeckte Rezeptor für TRANCE/Rankl RANK (*Receptor activator for NF- κ B*) wurden ebenfalls als ein und dasselbe Protein identifiziert.^{86,89,90}

1.3.2.2.1 Rankl

Humanes Rankl (oder auch: ODF, OPGL, TRANCE) ist ein 317 AS langes Protein, welches zu 87% identisch mit murinen Rankl ist. Es existiert in zwei verschiedenen Varianten als membrangebundene Form (ca. 45-40 kDa) oder als lösliches Protein (ca. 31 kDa).⁹¹ Das lösliche Protein (*soluble* Rankl, sRankl) entspricht dem C-terminalen Ende des membrangebundenen Rankl und entsteht entweder durch eine proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne des vollständigen Proteins oder in T-Zellen auch durch alternatives Splicing.⁹¹⁻⁹³ Welches Enzym für die proteolytische Spaltung (*Shedding*) von Rankl verantwortlich ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Hikita *et al.* untersuchten zahlreiche Mitglieder der Enzymfamilie von Adam (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) - und Mmp (*Matrix metalloproteinase*) - Proteasen aufgrund ihrer Möglichkeit, transmembranes Rankl in verschiedenen Zelllinien zu prozessieren. Hierbei identifizierten sie die Proteasen Adam10, Adam17 und Mmp14 als Rankl-Sheddasen, welche zumindest *in vitro* in der Lage sind, Rankl an zwei nahe beieinander liegenden Stellen im murinen Protein zu spalten.^{93,94}

Bemerkenswerterweise sind diese beiden Spaltstellen im humanen Rankl-Protein komplett unkonserviert (Abb.4).

Maus	MRRASRDYGKYLRSSSEEMGSGPGVPHEGPHLPAPSAPAPAPPPAASR	SMFLALLGLGLGQ	60
Mensch	MRRASRDYTKYLRGSEEMGGGPGAPHEGPHL-APPPPAPHQPPAASRSMFVALLGLGLGQ		59
	* * *	* ** ** *	
Maus	VVCSIALFLYFRAQMDPNRISEDSTHCFYRILRLHENADLQDSTLESED	-LPDSCRRM	118
Mensch	VVCSVALFFYFRAQMDPNRISEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLIPDSCRR	I	119
	* *	* * * * *	
		1 2	
Maus	KQAFQGAVQKELQHIVGPQRFSGAPAMMEGSWLDVAQRGKPEAQPF	FAHLTINAASIPSGS	178
Mensch	KQAFQGAVQKELQHIVGSQHIRAEKAMVDGSWLDLAKRSKLEAQPF	FAHLTINATDIPSGS	179
	* * * * * *	* * * *	**
Maus	HKVTLSSWYHDRGWAKISNMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHH	ETSGSVPTDYLQLM	238
Mensch	HKVSLSSWYHDRGWAKISNMTF SNGKLI VNQDGFYYLYANICFRHH	ETSGDLATEYLQLM	239
	*	* *	** * *
Maus	VYVVKTSIKIPSSHNLKGGSTKNWSGNSEFHYSINVGFFKLRAGEE	EISIQVSNPSLL	298
Mensch	VYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHYSINVGFFKLRSGEE	EISIEVSNPSLL	299
	*	* *	* *
Maus	DPDQDATYFGAFKVQDID		316
Mensch	DPDQDATYFGAFKVRDID		317
	*		

Abbildung 4: Aminosäuresequenzvergleich von murinen und humanen Rankl. Die Sequenz der Aminosäuren (AS) ist zu 87% identisch, gekennzeichnet ist die Transmembran-Domäne (blauer Bereich), die beiden postulierten Schnittstellen von murinen Rankl (1: Arg¹³⁸-Phe¹³⁹, 2: Met¹⁴⁵-Met¹⁴⁶) und die Sequenzunterschiede zwischen Maus und Mensch (*).

Mmp14 wurde in diesem Zusammenhang als verantwortliche Sheddase in der Zellkultur von primären Osteoblasten identifiziert. Die Analyse von *Mmp14*-defizienten Mäusen ergab eine leichte Osteopenie aufgrund verminderter Knochenformation und eine signifikant erhöhte Osteoklastenzahl, ein Ergebnis, welches Hikita *et al.* auf eine erhöhte Konzentration von transmembranen Rankl und nicht detektierbaren sRankl zurückführten.^{93,95} Die Annahme, dass die vollständige, transmembrane Form von Rankl im Gegensatz zur löslichen Form, die physiologisch aktivere ist, ist in der Knochenforschung allerdings sehr umstritten.

Die wichtigste Funktion von Rankl im Knochen ist die Induktion der Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung, sowie die Verhinderung der Apoptose von Osteoklasten.^{12,96} Außerdem besitzt Rankl wichtige Funktionen im Immunsystem als T-Zell-Aktivator und Reifung und Ausbildung der dendritischen Zellen, sowie der lymphatischen Gewebe.^{86,87} Bei Rankl-defizienten Mäuse fehlen, trotz normaler Osteoklasten-Vorläuferzellen, die reifen Osteoklasten komplett. Die Mäuse haben eine schwere Osteopetrose mit Defekten im Zahndurchbruch. Sie zeigen außerdem Defekte in der Brustdrüsenentwicklung und der frühen T- und B-Zelldifferenzierung und besitzen keine Lymphknoten.^{97,98} Mäuse mit einer Rankl-Überexpression zeigen dagegen das Bild einer schweren Osteoporose.⁹⁹ Die Expression des Rankl-Gens *Tnfsf11* (*Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11*) ist durch zahlreiche Faktoren induzierbar. Osteoklasten-stimulierende Faktoren wie PTH, Vitamin D₃ oder PGE₂ induzieren die Expression des Rankl-Gens in Osteoblasten genauso, wie Verbindungen, die das intrazelluläre Kalzium erhöhen (z.B. Ionomycin) oder auch hohe extrazelluläre Kalziumspiegel. Die bisher bekannten Signaltransduktionswege verlaufen dabei über den PKA/cAMP-Signalweg (PTH, PGE₂), den intrazellulären Vitamin D-Rezeptor (Vitamin D₃), die gp130/STAT3-Signalkaskade (IL-6, IL-11, Oncostatin M) oder die Aktivierung der Proteinkinase C (Ionomycin, Ca²⁺, PMA).^{78,100-102}

1.3.2.2.2 Rank

Der Rankl-Rezeptor Rank wird vom Gen *Tnfrsf11a* (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a*) kodiert und hauptsächlich von Osteoklasten-Vorläuferzellen (Monozyten/Makrophagen), reifen Osteoklasten, T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und Fibroblasten exprimiert.^{86,89,90} Er ist im Menschen 616 AS lang, wobei der Großteil (383 AS) im zytoplasmatischen Teil der Zelle liegt.⁸⁶ Die Aktivierung von Rank durch Rankl führt in der Zelle zu einer TRAF6 (*TNF-receptor associated cytoplasmic factor 6*)-vermittelten Induktion osteoklastenspezifischer Gene, die u.a. die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten fördert, als auch an der Ausbildung der *ruffled border* beteiligt sind.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Rank-defiziente Mäuse weisen, ähnlich wie Rankl-defiziente Mäuse, eine starke Osteopetrose aufgrund von vollständig fehlenden Osteoklasten auf.^{107,108}

1.3.2.2.3 Osteoprotegerin

Osteoprotegerin (oder auch: Opg, Ocif) ist ein 40 kDa schweres und 380 AS langes Protein, welches vom Gen *Tnfrsf11b* (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b*) kodiert wird.⁸³ Opg wird als lösliches Protein von zahlreichen Geweben wie Lunge, Leber, Herz, Magen, ZNS, Schilddrüse oder Knochen gebildet und liegt *in vivo* als 60 kDa schweres glykosyliertes Monomer oder Dimer (120 kDa) vor.^{83,85} Die Hauptaufgabe von Opg im Organismus ist die Hemmung der Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung über die Bindung des Osteoklastogenese-fördernden Faktors Rankl.¹⁰⁹ Diese Funktion wird sich pharmakologisch mithilfe des Medikaments Denosumab (Handelsname: Prolia®) zunutze gemacht. Denosumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, welcher hocheffizient an Rankl bindet und so dessen osteoklastogenen Effekt hemmt.¹¹⁰ Mit Ausnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken alle Rankl-Expression induzierenden Faktoren eine Repression der Opg-Expression. Opg-defiziente Mäuse zeigen eine schwere Osteoporose mit hoher Osteoklastenzahl und erhöhter Knochenresorption, sowie verkalkte Hauptarterien.¹¹¹

1.3.2.2.4 Rankl-Rank-Opg im Knochenstoffwechsel

Aufgrund der Forschungsergebnisse und der Identifikation der drei Proteine Rankl, Rank und Opg konnte Ende der 1990er Jahre ein System entwickelt werden, welches die Beeinflussung von Osteoklasten durch Osteoblasten erklären konnte (Abb.5). Das von den Osteoblasten produzierte Rankl bindet hierbei an seinen Rezeptor Rank, welcher auf den Osteoklasten-Vorläuferzellen präsentiert wird. Zusammen mit M-Csf, welches an seinen ebenfalls von den Osteoklasten-Vorläuferzellen präsentierten Rezeptor *c-Fms* (*Colony stimulating factor 1 receptor*) bindet, fördert es auf diesem Wege die Osteoklastogenese der Zellen. Dieser Prozess ist durch das, ebenfalls von Osteoblasten exprimierte, Peptid Opg antagonisierbar, indem Opg als *decoy-receptor* an Rankl bindet und somit dessen Wirkung neutralisiert.

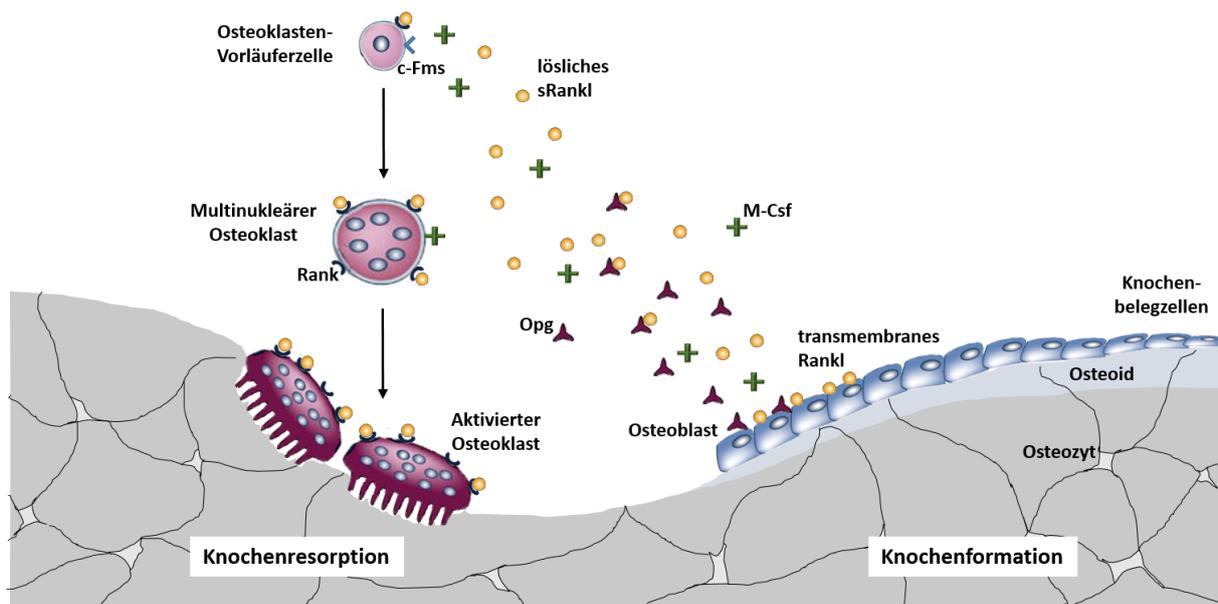


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Rankl-Rank-Opg-System. Das von Osteoblasten produzierte Rankl und M-Csf bindet an ihre Rezeptoren Rank und c-Fms, welche von Osteoklasten-Vorläuferzellen präsentiert werden und induzieren die Bildung der reifen Osteoklasten. Dieser Vorgang wird durch den Rankl-Antagonisten Opg, welcher ebenfalls von Osteoblasten synthetisiert wird, gehemmt, indem Opg als *decoy*-Rezeptor den osteoklastogenen Faktor sRankl/Rankl abfängt und neutralisiert.

Obwohl das Rankl-Rank-Opg-System in der Knochenforschung ein allgemein anerkanntes Modell für das Zusammenwirken zwischen Osteoblasten und Osteoklasten darstellt, gibt es in diesem Bereich noch offene Fragen zu klären. So ist es zurzeit noch unklar, ob die physiologische Funktion von Rankl über seine transmembrane Form, die prozessierte lösliche Form oder eine Kombination aus beiden vermittelt wird. In Zusammenhang damit ist es weiterhin fraglich, ob die Prozessierung von Rankl durch eine hauptverantwortliche Rankl-Sheddase vermittelt wird oder ob es auch in diesem Prozess ein kombiniertes Zusammenwirken verschiedener proteolytischer Enzyme gibt.

1.3.3 Regulation des Knochenbaus über Calcitonin und Sphingosin-1-phosphat

1.3.3.1 Calcitonin

Im Jahr 1961 isolierten Copp und Cameron aus dem Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsengewebe von Hunden ein Peptidhormon und gaben ihm aufgrund seiner senkenden Wirkung auf den Kalziumspiegel im Blut den Namen Calcitonin.¹¹² Ein paar Jahre später wurde zunächst die Schilddrüse als Ort der CT-Synthese entdeckt und kurze Zeit danach die parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse als exakten Syntheseort bestimmt.^{113,114} CT wird durch das Gen *Calca* kodiert, dessen Transkription in die mRNA gewebespezifisch unterschiedliche Proteine durch alternatives Spleißen hervorbringen kann. Eine Transkription in den C-Zellen der Schilddrüse und im Lungengewebe führt zur Proteinsynthese des CT-Vorläuferpeptids Präprocalcitonin, während durch die Transkription in den neuronalen Zellen des Hypothalamus das verwandte Protein *alpha calcitonin gene-related peptide* (α CGRP), mit der Funktion eines Vasodilators, synthetisiert wird.¹¹⁵ Das 141 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid Präprocalcitonin besteht aus einem Signalpeptid (AS 1-25), einer N-terminalen Region des Procalcitonins (AS 26-59), der Sequenz für Calcitonin (AS 60-91) und einer C-terminalen Region des Procalcitonins, dem Katalcalcin (AS 92-141) (Abb.6).¹¹⁶ Die Signalsequenz wird nach Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum von einer Endopeptidase abgespalten, wodurch das 116 AS lange Procalcitonin (PCT) entsteht. Die Sequenz für das Hormon CT wird durch basische Aminosäuren flankiert, welche als Signalsequenz für die Prohormonkonvertase-1 (PC-1) dienen. Die proteolytische Prozessierung von PCT durch PC-1 bildet das aktive Hormon CT mit einer Länge von 32 AS und einer Molekülmasse von 3,4 Kilodalton (kDa) beim Menschen. Während beim gesunden Menschen PCT nur noch mit einer Konzentration von weniger als 0,5 ng/ml im Serum mit speziellen Methoden nachweisbar ist, ist die Konzentration bei bestimmten Infektionserkrankungen deutlich erhöht und dient in der Klinik als Marker für bakterielle Entzündungen und Sepsis.¹¹⁷⁻¹¹⁹

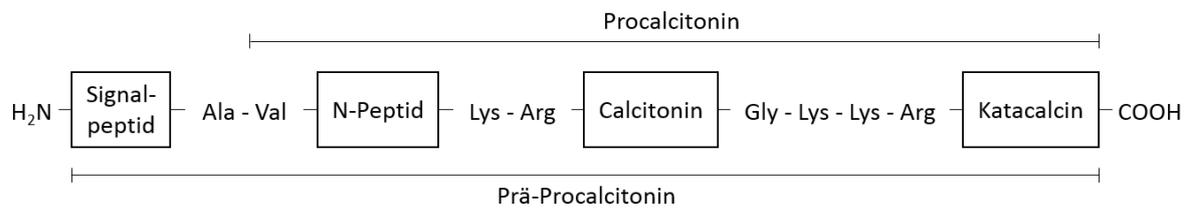


Abbildung 6: Das Vorläuferpeptid Präprocalcitonin ist 141 Aminosäuren lang. Dargestellt ist das Calcitonin-Vorläuferpeptid Präprocalcitonin mit seinem N-terminalen Signalpeptid, der N-terminalen Region des Procalcitonins, der Sequenz für Calcitonin und der C-terminalen Region des Procalcitonins, dem Katalcalcin.

Die Freisetzung von CT wird entweder durch eine hohe Kalziumkonzentration im Blut oder durch gastrointestinale Hormone, wie Gastrin, Glukagon oder Cholecystokinin, ausgelöst. CT wirkt dabei auf verschiedene Organe im Körper. In der Niere stimuliert CT die Ausscheidung von Kalzium und hemmt die Rückresorption von Phosphat aus dem Urin. Es stimuliert außerdem die Vitamin D₃-Synthese.¹²⁰ Experimente mit Lachs-Calcitonin (*salmon calcitonin*, sCT), welches eine 50-fach höhere Potenz als Säugetier-Calcitonin besitzt, haben gezeigt, dass CT auch potentielle Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem, das gastrointestinale System, das Reproduktionssystem und das Atmungssystem besitzt.¹²¹ Ob diese Effekte von CT allerdings wirklich von physiologischer Bedeutung sind, ist aufgrund der hohen Potenz des sCT umstritten. Die wichtigste Funktion von CT im Organismus ist die Senkung des Kalziumspiegels im Blut, welche neben der Wirkung auf die Nieren v.a. durch eine Hemmung der Osteoklasten hervorgerufen wird.

Das freigesetzte CT wird über das Blut zu seinen Zielorganen transportiert, wo es nach Bindung an den Calcitoninrezeptor (CTR) seine biologische Wirkung entfaltet. Der CTR ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor mit sieben, die Zellmembran durchspannenden, Helices (7-Transmembranrezeptor).^{122,123} Er vermittelt, wie viele Zellmembranrezeptoren, seine Signale über die Aktivierung von G-Proteinen. Die Aktivierung des G-Proteins G_s führt dabei zur Aktivierung der Adenylatzyklase und zur angeschlossenen Produktion von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Das gebildete cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche zu einer unmittelbaren Hemmung der Osteoklastenmotilität führt (*quiescence*, Q-Effekt) und kurze Zeit später zu einer Retraktion der Osteoklastenzelle und Rückbildung des Faltsaums (*retraction*, R-Effekt).^{124,125} Die Aktivierung des G-Proteins G_q vermittelt ebenfalls

eine Osteoklasten-hemmende Wirkung. G_q aktiviert hierbei die Phospholipase C (PLC), welche das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) spaltet. IP_3 bindet an seinen Rezeptor und stimuliert so die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER, welcher als intrazellulärer Kalziumspeicher dient. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche schließlich in Osteoklasten den R-Effekt auslöst.¹²⁴⁻¹²⁶

Dieser Osteoklasten-hemmende und anti-resorptive Effekt von CT wurde zum Großteil in Studien unter Verwendung von sCT belegt, weshalb über die physiologische Rolle in Säugetieren lange Unklarheit herrschte.¹²⁷⁻¹³⁰ So konnte bei Patienten nach einer Thyreoidektomie und folgender CT-Defizienz nicht die erwartete Osteoporose festgestellt werden, und auch ein chronisch erhöhter CT-Spiegel bei einem C-Zell-Karzinom führte nicht zu einer erwarteten Osteoporose.^{128,131} Als Hoff *et al.* im Jahre 2002 den Knochenphänotyp von *Calca*-defizienten Mäusen untersuchten, stellten sie fest, dass diese Mäuse nicht den zu erwartenden osteoporotischen Phänotypen, sondern überraschenderweise eine erhöhte Knochenmasse aufwiesen (Abb.7a).¹³² Während die Knochenresorptionsrate nicht verändert war, zeigten die Mäuse schon ab einem Alter von 3 Monaten eine mehr als doppelt so hohe Knochenformationsrate. Huebner *et al.* konnten einige Jahre später zeigen, dass erst ab einem Alter von 6 Monaten die Knochenresorptionsrate ansteigt und im Alter von 12 Monaten 4-fach gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren erhöht ist (Abb.7b).¹³³ Die erhöhte Knochenformationsrate konnte aber auch in Mäusen dieses Alters festgestellt werden.

Diese Ergebnisse revolutionierten die Sichtweise auf die Wirkung von Calcitonin auf den Knochen, zeigen sie doch, dass die primäre physiologische Funktion nicht nur in der Hemmung der Osteoklasten bestand, sondern dass die knochenbildenden Osteoblasten in ihrer Funktion reprimiert wurden. Es konnte allerdings zunächst keine Erklärung für diesen Umstand gefunden werden. Eine direkte Wirkung von CT auf Osteoblasten war äußerst unwahrscheinlich, da Osteoblasten keinen CTR exprimieren.^{134,135} Da in den *Calca*^{-/-}-Mäusen außer CT auch das verwandte Protein α CGRP nicht mehr gebildet werden kann, wurde zunächst vermutet, dass die α CGRP-Defizienz für den Knochenphänotyp verantwortlich war. Schinke *et al.* konnten allerdings durch die Analyse eines Mausmodells mit funktionierender

CT-Synthese und selektiver Blockade für α CGRP zeigen, dass diese Mäuse eine niedrige Knochenformationsrate mit der Ausbildung einer milden Osteopenie aufwiesen, was für eine knochenaufbauende Funktion von α CGRP sprechen würde (Abb.7c).¹³⁶ Die Tatsache, dass in *Calca*^{-/-}-Mäusen trotz eines Fehlens von α CGRP eine erhöhte Knochendichte und Knochenformationsrate festgestellt werden konnte, war also umso erstaunlicher.

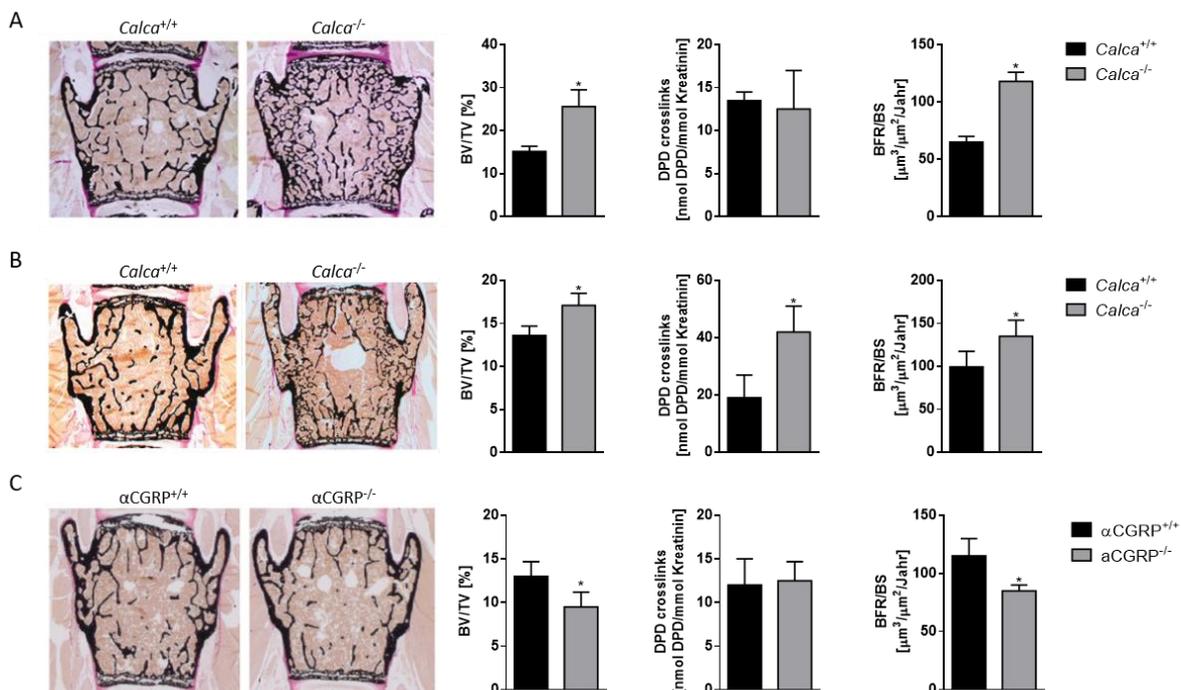


Abbildung 7: Calcitonin besitzt auf den Knochen sowohl eine anti-resorptive Wirkung durch eine Hemmung der Osteoklasten als auch eine hemmende Wirkung auf die Knochenformation durch Inhibition der Osteoblasten. (A) *Calca*-defiziente Mäuse besitzen im Alter von 3 Monaten eine erhöhte Knochenmasse (*bone volume per tissue volume*; BV/TV) mit unveränderter Knochenresorptionsrate (Desoxypyridinolin crosslinks; DPD crosslinks) und gesteigerte Knochenformation (*bone formations rate per bone surface*; BFR/BS). **(B)** Im Alter von 12 Monaten zeigen die *Calca*-defizienten Mäusen zusätzlich eine gesteigerte Knochenresorptionsrate. **(C)** Eine selektive Blockade von α CGRP in 6 Monate alten Mäusen mit funktionsfähigen Calcitonin führt zu einer Osteopenie mit verminderter Knochenformationsrate. Modifiziert nach Hoff *et al.* *Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene*, J Clin Invest 110, 1849-1857 (2002), Huebner *et al.* *Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover*, J Bone Miner Res 21, 1924-1934 (2006) und Schinke *et al.* *Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide*, J Bone Miner Res 19, 2049-2056 (2004)

Einen Durchbruch im Verständnis der Wirkungsweise von Calcitonin auf den Knochen gelang 2014 der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Amling, eine Arbeit in die auch Teilergebnisse dieser Doktorarbeit eingeflossen sind.¹³⁷ Um die Frage zu klären, über welchen Zelltyp CT seine Wirkung auf den Knochen vermittelt, wurden Mausmodelle generiert, in denen entweder ubiquitär (*Calcr^{-/-}*) oder gewebespezifisch in Osteoklasten (*LysM-Cre*) der CTR inaktiviert wurde. Hierbei wurde festgestellt, dass nicht nur Mäuse mit einer Defizienz von CT, sondern auch mit einer ubiquitären und Osteoklasten-spezifischen Defizienz des Rezeptors eine signifikant erhöhte Knochenmasse und Knochenformationsrate entwickelten. Im Gegensatz dazu führte eine Inaktivierung des Rezeptors in Osteoblasten (*Runx2-Cre*) und im Hypothalamus (*CamK2a-Cre*) zu keinem veränderten Knochenphänotyp. Dass eine Osteoklasten-spezifische CTR-Defizienz die Knochenformationsrate erhöhte, war der Beweis dafür, dass der inhibitorische Effekt von CT auf die knochenbildenden Osteoblasten indirekt über den CTR auf Osteoklasten verläuft. Da schon seit längerem bekannt war, dass Osteoblasten Zytokine wie Rankl und Opg produzieren, die eine Wirkung auf die Entstehung und Funktion von Osteoklasten ausüben, lag der Verdacht nahe, dass es auch umgekehrt einen molekularen Mechanismus geben könnte, mit dem Osteoklasten in der Lage sind, Osteoblasten in ihrem Wirken zu beeinflussen.

Mithilfe einer genomumfassenden Expressionsanalyse wurden 29 Gene identifiziert, die CT-abhängig in Osteoklasten reguliert werden (Abb.8). Während klassische Osteoklasten-markergene wie *Ctsk* (Cathepsin K) oder *Tracp5* (tartratresistente saure Phosphatase) nicht durch CT reguliert waren, wurde *Spns2* als ein spezifisch durch CT negativ reguliertes Gen identifiziert, welches potentiell die CT-vermittelte Wirkung auf den Knochen erklären konnte. *Spns2* (*Spinster homolog 2*) ist ein Sphingosin-1-phosphat (S1P) Transporter, welcher S1P aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert.^{138,139} S1P gehört zur Gruppe der Sphingolipide und ist ein wichtiger Regulator vieler zellulärer Prozesse, wie z.B. die Förderung der Zellproliferation und -migration.¹⁴⁰ Einerseits wirkt S1P hierbei intrazellulär als sekundärer Botenstoff (*second messenger*), andererseits vermittelt S1P auch zu einem großen Anteil seine Wirkung extrazellulär über die Bindung an fünf spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1pr1-5). In diesem Zusammenhang rückte S1P in den letzten Jahren sehr in den Fokus der Fibroseforschung. So wurde S1P als Fibrose-induzierender Faktor in verschiedenen Organen,

wie Leber, Lunge oder Niere identifiziert, welcher die Synthese von extrazellulärer Matrix und die Kollagenproduktion fördert.¹⁴¹⁻¹⁴³ S1P-abbauende Enzyme wie die S1P-Lyase wirken dagegen suppressiv gegen Fibrose.¹⁴⁴ Das S1P eine Wirkung auf den Knochenstoffwechsel besitzt ist schon seit längerer Zeit bekannt. So wurde von anderen Arbeitsgruppen festgestellt, dass S1P von Osteoklasten exprimiert wird und *in vitro* einen Rankl stimulierenden Effekt besitzt.^{145,146} Es wirkt somit auf Osteoblasten und kann in einer Rückkopplung (*feedback loop*) als Regulator der Osteoklastogenese auftreten. Es stimuliert außerdem die Osteoblastenmigration und übt auf diesem Wege einen osteoanabolen Effekt aus.¹⁴⁷

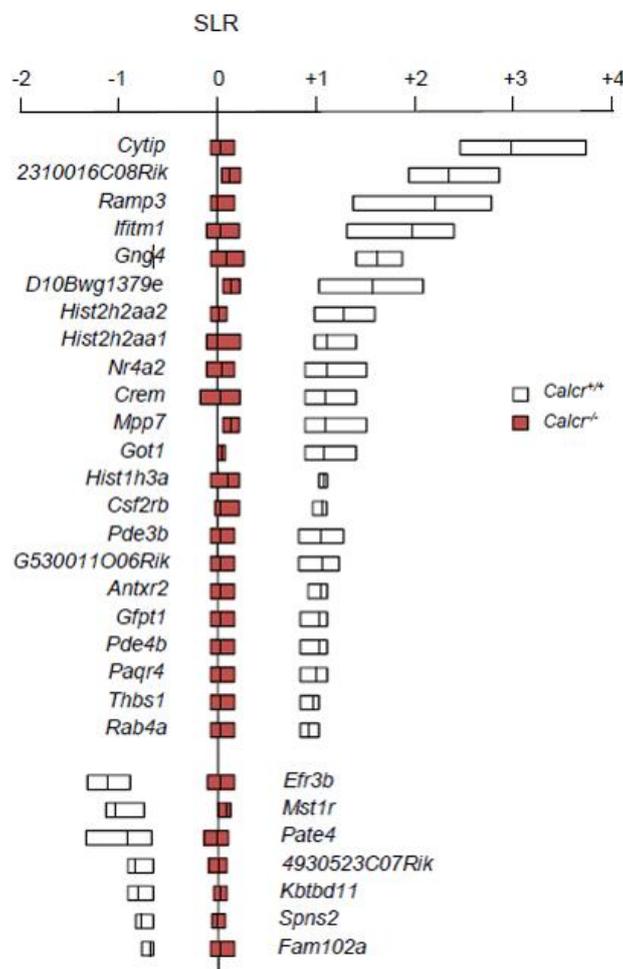


Abbildung 8: Calcitonin-regulierte Gene im Osteoklasten. Dargestellt ist das logarithmische Signalverhältnis (SLR) zwischen nicht stimulierten und 6 Stunden CT-stimulierten Osteoklasten. Gezeigt sind alle Gene, deren mittlerer SLR-Wert über 0.5 bzw. unter - 0.5 lag- Der Graph zeigt den SLR-Bereich (mit dem Median als eingefügte Linie) für alle CT-regulierten Gene in Wildtyp (weiße Balken) und CT-Rezeptor-defizienten (rote Balken) Osteoklasten. Übernommen aus Keller *et al. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts.* Nat Commun 5, 5215 (2014)

Die Experimente von Keller *et al.* legten die Basis, um S1P als Signalmolekül zwischen Osteoblasten und Osteoklasten in den Fokus zu rücken, allerdings war der genaue zelluläre Vorgang bis dato ungeklärt. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten stellten sie u.a. fest, dass CT die Genexpression des S1P-Transporters *Spns2* in Wildtyp-Mäusen, aber nicht in *Calcr*^{-/-}-Mäusen inhibierte und dasselbe Ergebnis auch für die extrazelluläre S1P-Konzentration galt.¹³⁷

Eine der wichtigsten Fragen war nun, über welchen S1P-Rezeptor in Osteoblasten die Wirkung von S1P vermittelt wird. S1P-Rezeptoren sind, genau wie der CTR, 7-Transmembranrezeptoren, welche eine ideale molekulare Zielstruktur (*drug target*) für potentielle Therapien von Knochenkrankheiten darstellen. Hierfür wurde zunächst die Expression der fünf verschiedenen S1P-Rezeptoren (S1pr1-5) in verschiedenen Differenzierungsphasen der Osteoblasten überprüft und die Rezeptoren S1pr1 und S1pr3 als differentiell exprimiert identifiziert. Da eine ubiquitäre Inaktivierung des S1pr1 embryonal letal ist,¹⁴⁸ wurden Osteoblasten-spezifisch S1pr1-defiziente und ubiquitär S1pr3-defiziente Mäuse analysiert und nur bei letzteren eine reduzierte Knochenformationsrate im Alter von 8 Monaten gefunden. Bemerkenswerterweise konnte bei *Calcr*^{-/-}-Mäusen mit zusätzlicher S1pr3-Defizienz eine Korrektur des *high bone mass*-Phänotyp festgestellt werden, ein Hinweis darauf, dass die Signalkette von S1P über den S1pr3 verläuft. Des Weiteren waren S1pr3-defiziente Mäuse gegen den Einfluss von FTY720 (Fingolimod), einem nicht-selektiven S1P-Rezeptor Agonisten, resistent und zeigten nicht, wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere, eine erhöhte Knochenmasse.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnten Keller *et al.* ein Modell erstellen, welches nicht nur den lange gesuchten zellulären und molekularen Mechanismus der Wirkung von CT auf den Knochen und von S1P als Kommunikationsmolekül zwischen Osteoblasten und Osteoklasten erklären konnte (Abb.9), sondern mit der Identifizierung eines potentiell verantwortlichen Rezeptors auch noch einen Ansatzpunkt für spätere Therapiemöglichkeiten erbrachte.

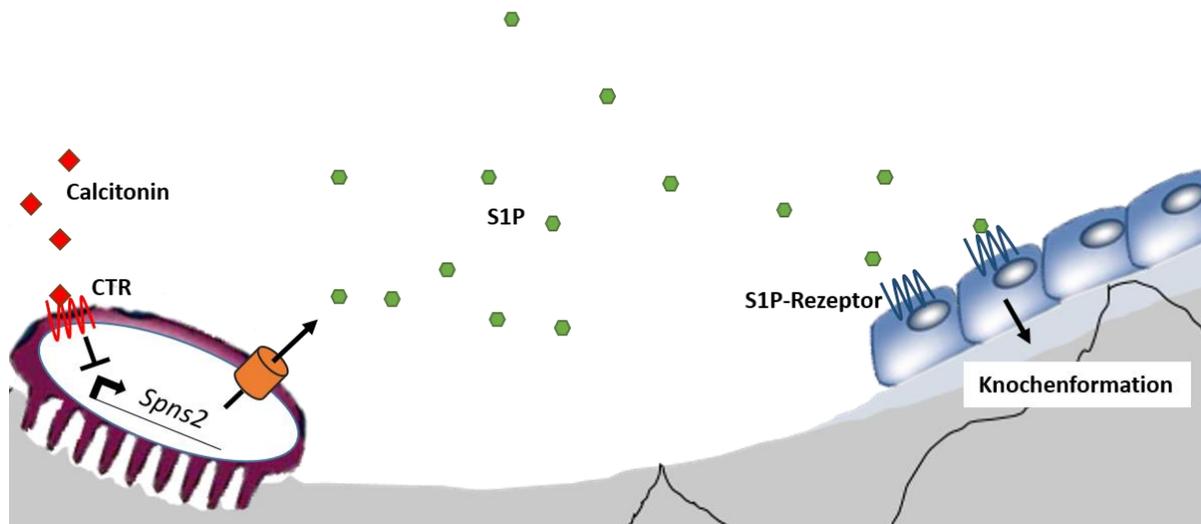


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wirkung von Calcitonin auf Osteoklasten und Osteoblasten.

Calcitonin reprimiert über die Bindung an den Calcitonin-Rezeptor (CTR) die Genexpression des S1P-Transporters Spns2 in Osteoklasten. Die S1P-Konzentration in der extrazellulären Matrix wird reduziert und die Knochenformation, welche über die Bindung von S1P an einen S1P-Rezeptor auf Osteoblasten vermittelt wird inhibiert. Modifiziert nach Keller *et al.* *Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts.* Nat Commun 5, 5215 (2014)

1.3.3.2 S1P-Lyase

Damit S1P im gesunden Organismus als Signalmolekül im richtigen Maße zur Verfügung steht, sind v.a. drei Enzym-Klassen von entscheidender Bedeutung: 1) Sphingosinkinasen (SphK), welche S1P durch die Phosphorylierung von Sphingosin bilden, 2) Phosphohydrolasen, welche durch die Dephosphorylierung von S1P zur Rückbildung von S1P zu Sphingosin führen und 3) die S1P-Lyase (S1PL), welche irreversibel S1P zu 2-Hexadecanal und Phosphoethanolamin abbaut (Abb.10).¹⁴⁹⁻¹⁵⁵ 2-Hexadecanal und Phosphoethanolamin werden für die Biosynthese von Phosphatidylethanolamin benötigt, ein Phospholipid, welches für den Membranaufbau verwendet wird. Diese unterschiedlichen Enzyme sorgen dafür, dass die intrazelluläre S1P-Konzentration im Ruhezustand niedrig gehalten wird und immer ein Gleichgewicht zwischen S1P-Bildung und –Abbau besteht.¹⁵⁶

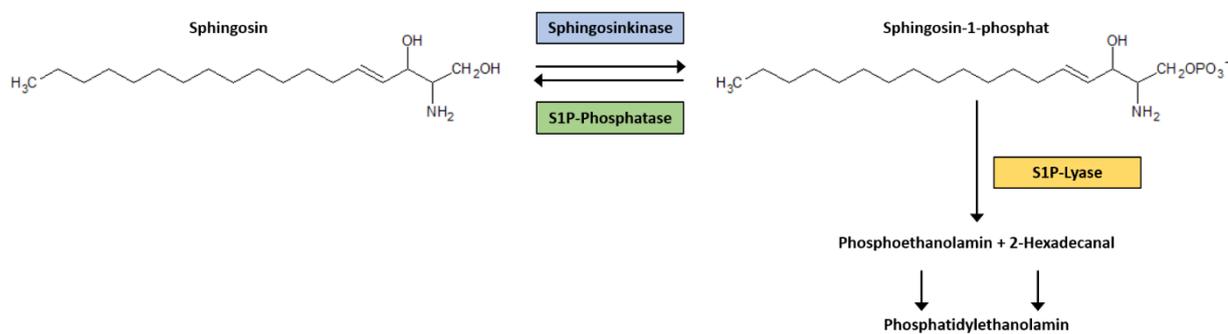


Abbildung 10: An der Synthese und dem Abbau von Sphingosin-1-phosphat sind 3 Enzymklassen beteiligt. S1P wird durch Phosphorylierung durch die Sphingosinkinase aus Sphingosin gebildet und durch die S1P-Lyase zu Phosphoethanolamin und 2-Hexadecanal abgebaut. Die Rückbildung zu Sphingosin wird durch die S1P-Phosphatase vermittelt. Modifiziert nach Spiegel & Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nature reviews, Molecular cell biology 4, 397-407 (2003).

Vogel *et al.* generierten 2009 ein Mausmodell mit einer ubiquitären Defizienz der S1P-Lyase (*Sgpl1*^{-/-}) und postulierten dort einen osteopetrotischen Knochenphänotyp aufgrund von fehlerhaften, in ihrer Funktion gestörten, Osteoklasten.¹⁵⁷ Dieses Mausmodell wurde später auch von Keller *et al.* aufgrund einer bestimmten Fragestellung untersucht.¹³⁷ Da eine S1P-Stimulation in Wildtyp-Mäusen zu einer gesteigerten Expression des pro-osteoklastogenen Rankl-Gens *Tnfsf11* führte, war es fraglich, warum *Calcr*^{-/-}-Mäuse, welche genau wie *Sgpl1*^{-/-}-defiziente Mäuse, eine erhöhte S1P-Konzentration im Blut besitzen, keine gesteigerte Osteoklastogenese zeigen. Die Analyse des Knochenphänotyps von 6 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen zeigte eine signifikant erhöhte Knochenmasse und Osteoklastenzahl. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Osteoklasten sehr wohl funktionell aktiv waren, was aus der signifikant erhöhten Konzentration von Kollagenabbaufragmenten (β -Crosslaps, CTX) geschlossen werden konnte. Der Knochenformationsmarker Prokollagen I C-terminales Propeptid (PICP) war ebenfalls signifikant erhöht, so dass gezeigt werden konnte, dass eine hohe Konzentration von S1P im murinen Organismus zu einem erhöhtem Knochenumsatz und hierüber zu einer gesteigerten Knochenbildung führt (Abb.11).¹³⁷ Dieses Ergebnis unterstreicht das osteoanabole Potential des Signalmoleküls S1P oder, auf Basis des Moleküls pharmakologisch hergestellter Faktoren, in Bezug auf potentielle therapeutische Möglichkeiten bei Knochenmasseverlustsyndromen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Knochenphänotyp von *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen auf zellulärer und molekularer Ebene

genauer zu charakterisieren und den S1P-Rezeptor, welcher die hohe extrazelluläre S1P-Konzentration in eine gesteigerte Knochenformation überführt, zu identifizieren.

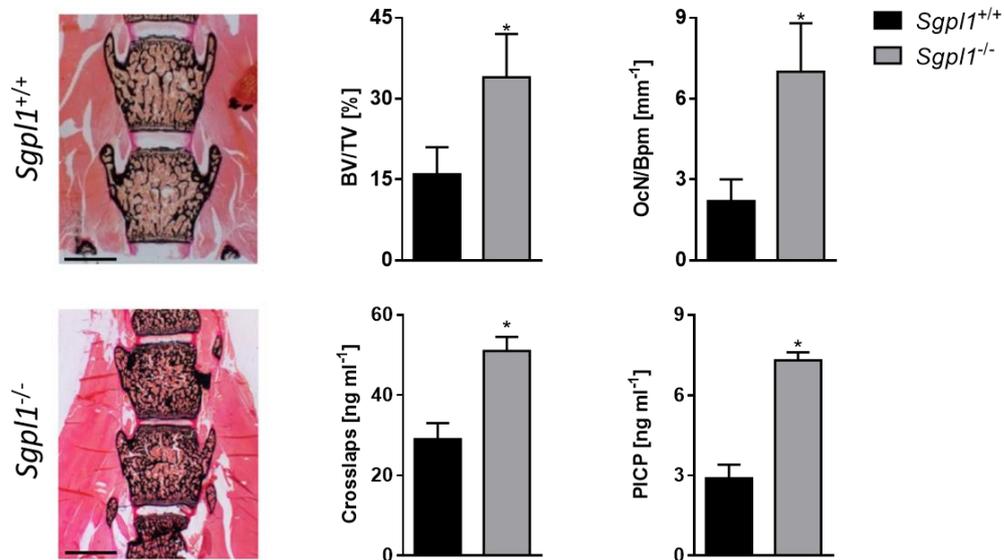


Abbildung 11: *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen im Alter von 6 Wochen einen Knochenphänotyp mit hoher Knochenmasse und hohem Knochenumsatz. Die Knochenmasse ist in den 6 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen signifikant erhöht. Eine ebenfalls signifikant erhöhte Osteoklastenzahl, die erhöhte Konzentration an Knochenabbaufragmenten und die erhöhte Konzentration an Kollagensyntheseprodukten im Serum der Tiere sprechen für einen erhöhten Knochenumsatz. Modifiziert nach Keller *et al.* *Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts.* Nat Commun 5, 5215 (2014)

1.3.3.3 Pate4

Ein weiteres Gen, welches in der durch Keller *et al.* durchgeführten Expressionsanalyse als ein durch CT negativ reguliertes Gen identifiziert wurde, war *Svs7* (*seminal vesicle secretory protein 7*, auch: *Pate4*, *prostate and testis expressed 4*) (Abb.8). Das Protein Pate4 ist ein Protein mit unbekannter physiologischer Funktion und war noch nie zuvor mit dem Knochenstoffwechsel in Verbindung gebracht worden. Im Rahmen seiner Doktorarbeit konnte Johannes Keller zeigen, dass *Pate4* ein potentielles Zielgen für Calcitonin in Osteoklasten darstellen könnte.¹⁵⁸ Obwohl es in Osteoklasten nur schwach exprimiert wurde, war es aufgrund seiner Struktur als wasserlösliches Peptid und der Sekretionsfähigkeit in den extrazellulären Raum, ein weiterer Kandidat für einen direkten parakrinen Einfluss von Osteoklasten auf Osteoblasten.¹⁵⁹ Die Aufklärung der Funktion und Wirkung von Pate4 im Knochenstoffwechsel war ebenfalls Bestandteil dieser Doktorarbeit.

2. Aufgabenstellung

Das Rankl-Rank-Opg-System ist in der Knochenforschung ein allgemein anerkanntes Modellsystem für die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Es besteht allerdings weiterhin Unklarheit darüber, ob das als Transmembranprotein von Osteoblasten synthetisierte Rankl seine Rolle im Knochenstoffwechsel in seiner membrangebundenen oder, wie häufig in Zellkulturexperimenten angewandt, in seiner prozessierten Form erfüllt. Die Aufklärung dieser Frage und der Versuch, die beteiligten Rankl-prozessierenden Enzyme zu identifizieren, war Bestandteil dieser Doktorarbeit.

Während die physiologische Rolle des pro-osteoklastogenen Faktors Rankl schon relativ lange im Fokus der Forschung steht, ist der Einfluss von Osteoklasten auf die osteoanabole Wirkung der Osteoblasten ein relativ neues Feld in der Knochenforschung. S1P-Rezeptoren sind als 7-Transmembranrezeptoren und Rezeptoren für eine niedermolekulare chemische Verbindung wie S1P, ein ideales *drug target* für osteoanabole Therapien. Wasserlösliche Peptide wie Pate4 sind im Hinblick auf medikamentöse Therapien ebenfalls ein wichtiges Forschungsfeld. Um die Rolle von Pate4 und S1P im Knochenstoffwechsel zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit der Knochenphänotyp von *Pate4*- und *Sgpl1*-defizienten Mäusen auf molekularer und zellulärer Ebene vollständig charakterisiert werden. Damit einhergehend sollte untersucht werden, ob wirklich der S1P-Rezeptor S1pr3 hauptverantwortlich dafür ist, die hohe extrazelluläre Konzentration an S1P in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen in eine erhöhte Knochenmasse zu übersetzen.

3. Material

3.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Bio-Rad (München), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Grimm Med. Logistik (Torgelow), Gibco (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und AppliChem (Darmstadt) verwendet.

3.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 1: Verwendete Lösungen und Puffer

Acrylat-Gießlösung	1000 ml Methylmethacrylat 3,3 g Benzoylperoxid 100 ml LPG (Nonyl-Phenol) direkt vor dem Gießen 500 µl N,N Dimethyl-p-Toluidin/100 ml Gießlösung hinzufügen
Acrylat-Infiltrationslösung I	1000 ml Methylmethacrylat 3,3 g Benzoylperoxid
Acrylat-Infiltrationslösung II	1000 ml Methylmethacrylat 3,3 g Benzoylperoxid 100 ml LPG (Nonyl-Phenol)
Ascorbat-Stammlösung	10 mg/mL L-Ascorbinsäure ad H ₂ O
Calcein-Injektionslösung	150 mM NaCl 238 mM NaHCO ₃ 16 mM Calcein ad H ₂ O pH7,4
DEPC-H ₂ O	1000 µl Diethylpyrokarbonat ad 500 ml H ₂ O ü.N. bei 37°C inkubieren, autoklavieren
Elutionspuffer	0.1 M Glycin pH 2.5 mit HCl einstellen
M-CSF-Stammlösung	10 µg/ml M-CSF ad H ₂ O

Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl pH 8.5
PBS-Puffer	10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM Kaliumhydrogenphosphat ad H ₂ O pH 7,4
Rankl-Stammlösung	10 µg/ml msRankl ad H ₂ O
Schwanzbiopsie-Lyse-Puffer	100 mM EDTA 50 mM Tris Base 100 mM NaCl 1 % (w/v) SDS ad H ₂ O pH 8,0
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/HCl 50 mM EDTA ad H ₂ O pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
TBS-Puffer (10x)	500 mM Tris/HCL (pH 7,4) 1500 mM NaCl
TBST Puffer	100 ml 10x TBS-Puffer 890 ml Aqua dest. 10 ml Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris Base 1 mM EDTA ad H ₂ O pH 8,0
Toluidin-Färbelösung	32,7 mM Toluidinblau O ad H ₂ O pH 4,5
TRAP-Lösung	5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 µl N,N Dimethylformamid lösen und mit 50 ml TRAP-Puffer mischen 30 mg Fast Red Violet LB Salt darin lösen und sofort für die Färbung verwenden
TRAP-Puffer	40 mM Azetat 10 mM Natriumtartrat pH 5,0

van Gieson-Lösung	4,7 mM Säurefuchsin 10 % (v/v) Glycerin 0,5 % (v/v) 65 % Salpetersäure ad gesättigte Pikrinsäure
Vitamin D ₃ -Stammlösung	10 µM Vitamin D ₃ ad Ethanol
von Kossa-Lösung	3 g Silbernitrat ad 100 ml dest. Wasser
Westernblot Laufpuffer (10x)	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS ad H ₂ O
Westernblot Probenpuffer (4x)	500 mM Tris/HCl 4 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 40 mM DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau ad H ₂ O pH 6,8
Westernblot Sammelgelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS ad H ₂ O pH 6,8
Westernblot Transferpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol ad H ₂ O pH 8,3
Westernblot Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS ad H ₂ O pH 8,8
Westernblot Blockpuffer	5% (w/v) Milchpulver ad TBST
Westernblot ECL- Chemilumineszenzlösung	0,1 M Tris Base 0,0092 % (v/v) H ₂ O ₂ 2,47 mM Luminol 396 µM p-Coumarinsäure ad H ₂ O pH 8,5

X-Gal Fertiglösung	20 µl/ml X-Gal Stocklösung ad X-Gal Verdünnungspuffer
X-Gal Stocklösung	1 g X-Gal 20 mL N,N-Dimethylformamid
X-Gal Verdünnungspuffer	2 mM MgCl ₂ 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) ad PBS
β-Glycerophosphat-Stammlösung	2 M Glycerophosphat ad H ₂ O

3.3 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien

Minimal-Medium	32,5 g/L α-MEM (Sigma-Aldrich #M0644) 2,2 g/L NaHCO ₃ ad H ₂ O pH 7,4
Verdau-Medium	50 mL Minimalmedium 50 mg Collagenase Ia 100 mg Dispase II
Osteoblasten-Medium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS/Obl) 100 U/mL Penicillin/Streptomycin ad Minimal-Medium
Osteoblasten- Differenzierungsmedium	50 µg/mL Ascorbinsäure 10 mM β-Glycerophosphat ad Osteoblasten-Medium
Osteoklasten-Medium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS/Ocl) 100 U/mL Penicillin/Streptomycin ad Minimal-Medium
Osteoklasten- Differenzierungsmedium	10 nM Vitamin-D ₃ 20 ng/mL MCSF 40 ng/mL sRankl ad Osteoklasten-Medium

3.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Verwendung	Firma
Amersham Hyperfilm™ ECL	Chemolumineszenz-Filme	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK
BD Eclipse Needle	Kanülen 0,8x40mm	Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, US
Biosphere® Filter Tips	Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell Scraper 25 cm	Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell Star Tubes 15mL/ 50mL	15/50 mL Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Falcon® 12-Well Tissue Culture Plate	Gewebekulturschale	Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, US
Falcon® Cell Strainer 70 µm Nylon	Zellsieb	Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, US
Hybond LFP-PVDF	Westernblot-Membran	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK
Injekt® 10/20 ml	Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mamoray HDR PQ	Röntgenfilme	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, BE
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	qRT-PCR Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
MicroAmp® Optical Adhesion Film	qRT-PCR Dichtfolie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Mikrotestplatte 96 Well, F	Mikrotestplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nalgene® Rapid-Flow Bottle Top Filter	Flaschenaufsatzfilter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Parafilm	Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, US
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml	PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Safe-Lock Tubes 1.5 mL/ 2mL	Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Serican® Gr.16	Kanülen 0,60x25mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Serican® Gr.20	Kanülen 0,40x20mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Syringe Filter 0.2 µm Cellulose	Spritzenvorsatzfilter	VWR International, LLC, Radnor, US

3.5 Geräte & Software

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Modell	Firma
Röntgengerät	Faxitron Xray	Faxitron Xray Corp., Wheeling, Illinois, US
Filmentwickler	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Dielheim
Autotechnikon	2050	Bavimed, Birkenau
Spektralphotometer	NanoDrop ND1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Mikrotiterplatten-Lesegerät	VersaMax	Molecular Devices, Sunnyville, US
Real-Time PCR System	StepOnePlus™	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Analysenwaage	BP 221S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	BBD 6220	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Beckman GS-6	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg
Histomorphometrie Software	Osteomeasure™	Osteometrics Inc., Atlanta, Georgia, US
Histomorphometrie Software	Bioquant Osteo	BIOQUANT Image Analysis Corp., Nashville, Tennessee, US
T25 basic Ultra-Turrax	T25 basic Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen
Mikroskopkamera	Axiocam	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
CO ₂ -Inkubator	B 6200	Heraeus, Hanau
Wasserbad	1012	GFL, Burgwedel
Elektrophorese-Gelkammer	SDS/PAGE Mini Protean	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Gelkammer	Sub-Cell	Bio-Rad, München
Blotting-Kammer	BioRad Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Vortexer	Certomat MV	Braun Biotechnologie, Melsungen
Feinwaage	CPA224S	Sartorius AG, Göttingen
Wiegeschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Magnetrührer	Komet Variomag Mono	H+P Labortechnik GmbH, Kleinmachnow
PCR-Cycler	Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Cycler	Mastercycler pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Filmentwickler	Optimax 1170-1-0000	Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Netzteil	Powerpac HC	Bio-Rad, München
Mikropipette	Research	Eppendorf AG, Hamburg
Mikropipette	Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoblock	Thermostat Plus	Eppendorf AG, Hamburg

3.6 Verwendete Fertiglösungen, Kits & ELISA

Tabelle 5: Verwendete Fertiglösungen, Kits & ELISA

Name	Verwendung	Firma
Affi-Gel Hz Immunoaffinity Kit	Affinitätschromatographie	Bio-Rad, München
cOmplete Protease Inhibitor	Protease-Inhibitoren	Roche Applied Science AG, Penzberg
DNA Loading Dye (6x)	Gel-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
dNTP Mix, 10mM Each	dNTP Mischung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
DPX Eindeckmittel	Eindeckmittel	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, US
DreamTaq Green Buffer (10x)	PCR-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Formafix 3,5 %	Fixiermittel	Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow
Gel-Loading Dye F-350	Gel-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	DNA Größenmarker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
GIBCO® Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	Genotypisierungssatz	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Mouse Opg/TNFRSF11B Quantikine ELISA Kit	Osteoprotegerin ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
Mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit	Rankl ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
RatLaps™EIA	β-Crosslaps ELISA	Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, UK
SEA570Mu	PICP ELISA	Uscn Life Science Inc., Wuhan, CN
SEA957Mu	PINP ELISA	Cloud-Clone Corp., Houston, US
TaqMan® Gene Expression Master Mix	TaqMan Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Verso cDNA Kit	cDNA Synthese-Reaktionssatz	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
DreamTaq-Polymerase	PCR-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US

4. Methoden

4.1 Maushaltung

4.1.1 Maus- und Rattenmodelle

4.1.1.1 Adam17

Das Serum und die Knochen von *Adam17*-hypomorphen Mäusen, sowie deren Wildtyp-Geschwistertieren wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Stefan Rose-John vom Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt.

4.1.1.2 Adamts16

Das Serum und die Knochen von *Adamts16*-defizienten Ratten, sowie deren Wildtyp-Geschwistertieren wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Bina Joe vom Department of Physiology and Pharmacology der Universität Toledo, USA zur Verfügung gestellt. Sie generierten dieses Rattenmodell, indem sie in salzsensitiven Dahl-S-Ratten spezifische Bereiche des *Adamts16*-Locus mit sequenzspezifischen Zinkfinger-Nukleasen deletierten.¹⁶⁰

4.1.1.3 S1P-Lyase

Sgpl1-defiziente Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Maine, US) per *gene trap*-Technik generiert und dort kommerziell erworben.¹⁵⁷

4.1.1.4 Pate4

Die Generierung der *Pate4*-defizienten Mäuse wurde im Vorwege dieser Doktorarbeit durchgeführt. Hierfür wurden von der Transgenic Mouse Facility des UKE unter der Leitung von Irm Hermanns-Borgmeyer kommerziell erhältliche *Pate4*-defiziente embryonale Stammzellklone (#CSD36005, *KnockOut Mouse Project*) in C57Bl/6J Blastozysten nach Standardprotokoll eingebracht.^{13,161} Männliche Chimären aus zwei Klonen wurden im Anschluss mit weiblichen C57Bl/6J-Mäusen gekreuzt, um heterozygote *Pate4*^{+/-}-Mäuse zu erhalten.

4.1.2 Haltung und Verpaarung

Die Haltung, Verpaarung und Pflege der Mauslinien und die Präparation der Schwanzbiopsien der Mäuse wurde von der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf übernommen.

4.1.3 Calceinmarkierung von Mäusen

Die Knochenzuwachsrate (*bone formation rate*, BFR) kann in Mäusen anhand des flourochromen Farbstoffs Calcein, welcher sich in die mineralisierende Matrix eingelagert, bestimmt werden. Hierfür wurde den Mäusen zweimal im Abstand von sieben Tagen vorgewärmtes Calcein (100µl Injektionslösung) interperitoneal injiziert.

4.1.4 Präparation der Mäuse

Die Mäuse wurden zunächst mit einem 80 % (v/v) CO₂/O₂ Gasgemisch betäubt, bevor die Tötung durch Einleitung von 100 % CO₂ erfolgte. Für die Desinfektion und um den Haarflug zu verhindern wurden die Mäuse mit 80% Ethanol besprüht. Für die Präparation von Serum wurde das Blut mit 1 ml Spritzen *post mortem* direkt aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde im Anschluss in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 6 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert, der Serumüberstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Organe wurden entnommen und ggf. weiter präpariert. Die Skelette der Tiere wurden gestreckt auf eine Korkplatte gespannt. Die Fixierung erfolgte über mindestens einen Tag in 3,5 % gepufferten Formaldehyd (Formafix, Grimm Med.Logistik), bevor die Skelette in 80 % Ethanol überführt wurden.

4.2 Histologie und Morphologie

4.2.1 Kontaktradiographie

Die fixierten Skelette wurden bei 35 kV für 2 Sekunden im Kontakt-Röntgengerät (Faxitron Xray) auf Röntgenfilme belichtet, welche danach in einem Entwicklergerät (Optimax Typ TR) entwickelt wurden.

4.2.2 Mikrocomputertomographie (μ CT)

Die Mikrocomputertomographie (μ CT) ist eine Methode, in der man schichtweise Röntgenbilder von kleinen Proben in hoher Auflösung erstellen kann, um auf diesem Wege dreidimensionale Rekonstruktionen der gescannten Proben zu erstellen und relevante Parameter zu analysieren. Für die Analyse der Knochen wurde der rechte Femur aus fixierten Mäusen präpariert und in eine Halterung platziert. Der beladene Probenhalter wurde in ein μ CT 40 (Scanco Medical AG) platziert und die Längsachse der Femora wurde orthogonal zur Röntgenquelle ausgerichtet. Der Scan der Proben erfolgte bei einer Voxelgröße von $10\mu\text{m}$. Hierzu wurden 100 Projektionen pro Schicht mit 2048 Abtastungen und 200 s Abtastungszeit bei einer Röhrenenergie von 55 kVp und einer Intensität von $145\ \mu\text{A}$ aufgenommen. Rekonstruierte Schichten wurden mittels des μ CT Evaluation Program V6.5-2 der Scanco MicroCT Software Suite untersucht. 3D Modelle der Knochen wurden bei einem Schwellenwert von 300 mit dem Hersteller-Skript 'UCT_EVALUATIONV6' erstellt. Bilder der 3D Rekonstruktionen wurden mittels des Programms μ CT Ray V3.8 aus derselben Software Suite generiert. Strukturelle Parameter der Knochen wurden automatisch für manuell bestimmte Bereiche berechnet.

4.2.3 Acrylat-Histologie

Es wurden die oberen 4 Lumbalwirbel und die rechte Tibiae aus jeder Maus präpariert und über Nacht im Autotechnikon entwässert (2 x 60 Min. 70 % Ethanol, 3 x 60 Min. 80 % Ethanol, 3 x 60 Min. 96 % Ethanol, 4 x Ethanol absolut). Es folgte eine Infiltration mit Infiltrationslösung I und II für einen Tag bei $4\ ^\circ\text{C}$. Die präparierten Knochen wurden in Glasgefäßen mit polymerisierender Gießlösung eingebettet und über Nacht bei $4\ ^\circ\text{C}$ im Wasserbad gelagert. Am Rotationsmikrotom (Microtec Cut 4060E) wurden $3\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte für die Färbungen und $12\ \mu\text{m}$ Schnitte für die Messung der Knochenformationsrate nach Markierung mit Calcein erstellt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden mit 80 % Isopropanol (inkl. Butylether) gestreckt und zum Trocknen bei $60\ ^\circ\text{C}$ über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

4.2.4 Paraffin-Histologie

Für die Paraffinhistologie der Leber und Lunge von *Sgpl1*-defizienten Mäuse, sowie deren Wildtyp-Geschwistertieren wurden zunächst die Organe der getöteten Tiere entnommen, über Nacht in 3,5 % gepufferten Formaldehyd fixiert und anschließend in 80% Ethanol gelagert. Im Anschluss wurden die Organe im Paraffin-Autotechnikon in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2x 60 Min. 70% Ethanol, 1x 60 Min. 80% Ethanol, 2x 60 Min. Ethanol absolut, 2x 60 Minuten Xylol) und mit Paraffin infiltriert (3x 60 Min. Paraffin 60°C). Die Präparate wurden bei 60-70°C bis zum Gießen warmgehalten und dann zur Einbettung in eine Metallkapsel gegossen. Das Präparat wurde dabei positioniert und auf der Kühlplatte im Paraffin fixiert. Die gehärteten Paraffinblöcke wurden aus den Metallkapseln herausgelöst und direkt mit dem Paraffinmikrotom 1-3 µm dicke Schnitte erstellt. Die Fixierung der Schnitte erfolgte für 30 Minuten im 60°C Wärmeschrank.

4.2.5 Von Kossa/van Gieson-Färbung

Bei der von Kossa/van Gieson-Färbung wird mineralisierter Knochen schwarz und Kollagen und Bindegewebe rot gefärbt. Zur Färbung der Präparate wurde der Kunststoff durch Inkubation in 2-(Methoxyethyl)-acetat (Merck, #806061) für 3 x 10 Min. gelöst. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate bewässert und in folgender Reihenfolge gefärbt: 3 % Silbernitratlösung (5 Min.), Aqua dest. (10 Min.), Sodaformollösung (5 Min.), fließendes Leitungswasser (10 Min.), 5 % Natriumthiosulfatlösung (5 Min.), fließendes Leitungswasser (10 Min.) und van Gieson-Lösung (20 Min.). In aufsteigender Alkoholreihe wurden die Präparate wieder entwässert und in Xylol (3 x 5 Min.) inkubiert. Abschließend wurden die Präparate mit Glasplättchen und DPX (Sigma-Aldrich, #44581) eingedeckt.

4.2.6 Toluidinblau-Färbung

Bei der Toluidin-Färbung werden die Zellkerne, die Osteoblasten und die Osteoklasten in unterschiedlichen Blautönen und der Knorpel in violett angefärbt. Die Behandlung der Präparate erfolgte analog zur Kossa/van Gieson Färbung. Die Färbung der Schnitte erfolgte über 30 Minuten in Toluidin-blau Lösung.

4.2.7 Sirius Red-Färbung

Für die Färbung von Kollagenfibrillen in den Paraffinschnitten von Lunge und Leber der *Sgp11*-defizienten Mäuse und deren Wildtyp-Geschwistertieren wurde eine Sirius Red-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate zunächst mit Xylol für 10 Minuten entparaffiniert und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert. Die Färbung erfolgte in folgender Reihenfolge: Weigerts Eisenhämatoxylin (8 Min.), mit Aqua dest. kurz gespült, fließendes Leitungswasser (10 Min.), mit Aqua dest. kurz gespült, Pikro-Siriusrot (1 Std.), 2x mit 30% Essigsäure für 1 Min. spülen. Anschließend wurden die Präparate wieder in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und zunächst in Isopropanol (4 Min.) und dann 2x in Xylol (10 Min.) inkubiert. Die Eindeckelung erfolgte analog zur Kossa/van Gieson Färbung.

4.2.8 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Für die histologische Darstellung der Samenblase und Prostata von *Pate4*-defizienten Mäusen wurde eine HE-Färbung vom Institut der Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.¹⁶¹

4.2.9 X-Gal-Färbung

Für die Analyse der Samenblase und Prostata von *Pate4*-defizienten Mäusen wurden die beiden Organe für 2 Stunden in 3,5 % gepufferten Formaldehyd fixiert, im Anschluss kurz mit Aqua dest. gewaschen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die X-Gal-Fertiglösung wurde aus der X-Gal Stocklösung und dem X-Gal-Verdünnungspuffer hergestellt und in das 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert, bis die Organe komplett bedeckt waren. Die Färbung erfolgte bei 37 °C im Inkubationsschrank für 24 Stunden, im Anschluss wurden die Organe in Aqua dest. gelagert und fotografiert.

4.2.10 Histomorphometrie

Die quantitative Auswertung der gefärbten Histologie-Schnitte erfolgte mittels standardisierten Protokollen an zwei verschiedenen Systemen. Knochenvolumen (*bone volume per tissue volume*, BV/TV), Anzahl der Trabekel (*trabecular number*, Tb.N), Dicke der Trabekel (*trabecular thickness*, Tb.Th) und Abstand der Trabekel (*trabecular spacing*, Tb.Sp)

wurden anhand der Kossa gefärbten Acrylatschnitte an einem Bioquant-System vermessen und bestimmt. Die Bestimmung der zellulären Parameter, wie Anzahl und Größe der Osteoblasten und Osteoklasten (*number of osteoblasts per bone parameter*, N.Ob/BPm; *osteoblast surface per bone surface*, Ob.S/BS; *number of osteoclasts per bone parameter*, N.Oc/BPm; *osteoclast surface per bone surface*, Oc.S/BS) wurden mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System (Osteometrics Inc.) an den Toluidinblau-gefärbten Acrylatschnitten bestimmt. Die Knochenzuwachsrate (*bone formation rate*, BFR), die Mineralablagerungsrate (*mineral apposition rate*, MAR), sowie der Anteil der mineralisierten Knochenoberfläche (*mineralizing surface per bone surface*, MS/BS) wurden ebenfalls mit dem Osteomeasure-System anhand der beiden Calceinbanden von ungefärbten 12 µm Schnitten bestimmt.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivierung von primären Osteoblasten *ex vivo*

Es wurden Primärzellen aus Schädeldächern von 3 bis 5 Tagen alten C57/BL6-Mäusen präpariert und in Zellkultur zu Osteoblasten differenziert. Die Calvarien wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und in einer Kollagenase (0,1 %)/Dispase (0,2 %) Lösung für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen des ersten Verdau wurden im Anschluss abgesaugt, frische 25 ml Kollagenase/Dispase-Lösung hinzugegeben und im Schüttler für 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde filtriert und zentrifugiert (5 Min., 1200 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Kulturmedium (*alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle*; α -MEM) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Thoma-Zählkammer. Es wurden ca. 25.000 Zellen pro Vertiefung einer 12-Vertiefungs-Platte bzw. 50.000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Vertiefungs-Platte unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂) in α -MEM inkl. 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FKS (α -MEM (+/+)) kultiviert. Die Differenzierung der Prä-Osteoblasten erfolgte bei einer 80-prozentigen Konfluenz der Zellen durch osteogene Stimulation mittels β -Glycerophosphat (10 mM) und Ascorbat (50 µg/ml). Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2 Tage.

4.3.2 Stimulation von primären Osteoblastenkulturen

Die generierten primären Osteoblasten wurden an Tag 9 nach Differenzierung über Nacht in serumfreien Medium gehungert und an Tag 10 für 6 und 24 Stunden in serumfreien Medium stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit IL-33 (100 ng/ml, R&D Systems), hPTH [1-34] (10 nM, Bachem Inc.), IL-1 β (100 ng/ml, Peprotech Inc.), IL-6 (100 ng/ml, Peprotech Inc.) inklusive löslichen IL-6-Rezeptor (100 ng/ml, R&D Systems), IL-17 (10 ng/ml, Peprotech Inc.), 1,25(OH)₂-Vitamin-D₃ (10 nM, Sigma-Aldrich), TNF- α (10 ng/ml, Peprotech Inc.), IFN- γ (100 IU/ml, Peprotech Inc.), all-trans-Retinsäure (1 μ M, Sigma-Aldrich), Prostaglandin E₂ (10 nM, Sigma Aldrich) und Isoprenalin (10 μ M, Sigma Aldrich). Um in weiteren Versuch den Effekt von S1P zu testen, wurden die Osteoblasten mit S1P (1 μ M, Sigma-Aldrich) stimuliert.

4.3.3 Kultivierung von Osteoklasten *ex vivo*

Es wurden Femur und Tibia aus getöteten Mäusen präpariert und unter sterilen Bedingungen die obere Epiphyse der beiden Röhrenknochen entfernt. Die Knochen wurden mit dem geöffneten Ende nach unten in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert (15 Sek., 6.000 rpm), das ausgetretene Knochenmark im Anschluss in Osteoklastenmedium aufgenommen und über ein 70 μ m Zellsieb in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen anschließend in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/cm² in 12-Vertiefungs-Zellkulturplatten ausplattiert. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, wobei folgende Osteoklasten-spezifische Differenzierungsfaktoren zur Osteoklastengenerierung hinzugefügt wurden: 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ (10 nM) ab Tag 0, rekombinantes Rankl (40ng/ml) und M-Csf (20 ng/ml) ab Tag 5.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Für die visuelle Darstellung von DNA-Fragmenten wurden, abhängig von der zu erwartenden Bandengrößen, 1 bis 2%ige Agarosegele gegossen, welche vor dem Aushärten mit dem, in die DNA interkalierenden, Farbstoff Ethidiumbromid (0,05 μ g/ml) versetzt worden waren. Die PCR-Proben wurden, zusammen mit einem 1kb-DNA-Leiter (Invitrogen, #15615-024) zur

Bestimmung der Bandengröße, in die Geltaschen pipettiert und bei 60-130 Volt in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad) in 1 x TAE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden im Anschluss mit einem UV-Transilluminator fotografiert.

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Lösungen von Nukleinsäuren wurde mit dem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 (Biotechnologie GmbH) bestimmt.

4.4.3 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von Mäusen

Um die genomische DNA aus Mausschwänzen zu isolieren, wurde zunächst ein Gemisch aus 700 µl Schwanzbiopsie-Lyse-Puffer und 50 µl Proteinase K-Lösung pipettiert, ein ca. 1-2 mm langes Stück Mausschwanz hinzugegeben und bei 55°C über Nacht im Heizblock inkubiert. Am nächsten Tag wurden 750 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl (Roth, #A156.2) hinzugegeben. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und zentrifugiert (5 Min., 13.000 rpm). 650 µl der oberen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl vermengt. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm) wurden diesmal 550 µl der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 550 µl Isopropanol vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde abermals zentrifugiert (10 Min., 13.000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 50 µl TE Puffer aufgenommen und über mehrere Stunden bei Raumtemperatur in Lösung gebracht.

4.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Doppelsträngige DNA wird dabei durch Hitzeeinwirkung in ihre komplementären Einzelstränge aufgetrennt, so dass sich definierte Oligonukleotid-Primer an ihre komplementären DNA-Sequenzen anlagern können und den zu amplifizierenden Genabschnitt flankieren. Eine hitzestabile DNA-Polymerase kann nun, von den Primern ausgehend, die komplementären DNA-Stränge synthetisieren. Die Wiederholung von Template-Denaturierung, Primerhybridisierung und nachfolgender DNA-Elongation führt zu

einer exponentiellen Amplifizierung der gewünschten Gensequenz. Für eine PCR wurde folgender Ansatz pipettiert und die DNA in 40 Zyklen in folgenden Schritten in einem PCR-Cycler amplifiziert:

Tabelle 6: PCR-Ansatz pro Reaktion und PCR-Programm

Bestandteil	Volumen [µl]	Schritt	Dauer	Temp. [°C]
PCR-Wasser	27,5	Initiale Denaturierung	3 Min.	95
Taq-Polymerase-Puffer	5	Denaturierung	30 Sek.	95
dNTPs	1	Hybridisierung	30 Sek.	58
Vorwärtsprimer	8	Elongation	1 Min.	72
Rückwärtsprimer	8	Finale Elongation	10 Min	72
DMSO	0,5			
Taq-Polymerase	0,5			
DNA-Template (ca. 100 ng)	1,5			
Gesamtansatz	52			

4.4.5 Genotypisierung von Mäusen

Die genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde wie unter 4.4.3 beschrieben isoliert und im Anschluss für die Genotypisierung mittels PCR verwendet. Alle Oligonukleotid-Primer wurden von der Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, DE) synthetisiert und als Stammlösung in einer Konzentration von 200 µM in DEPC-H₂O gelöst. Folgende Primer-Paare wurden zur Identifikation der Genotypen durch PCR verwendet:

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer inkl. Sequenzen

Name	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
S1pr3 WT	TGGTGTGCGGCTGTCTAGTCAA	CACAGCAAGCAGACCTCCAGA
S1pr3 KO	ATCGATACCGTCGATCGACCT	CACAGCAAGCAGACCTCCAGA
Sgpl1 WT	CCAAGTGACCTGCTAAGTTCCAG	CGCTCAGAAGGCTCTGAGTCATGG
Sgpl1 KO	CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG	CGCTCAGAAGGCTCTGAGTCATGG
Svs7 WT	CCTTGCACTGAGGCGAGACAATT	TCCTGCCTCTCCTGCCCTGTT
Svs7 geno	CCCGGCTGTGCCGAAATGGT	CAGCGTTCGACCCAGGCGTT

4.4.6 Isolierung von RNA aus Geweben

Die zu untersuchenden Gewebe wurden aus getöteten Mäusen präpariert, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und die Gewebeproben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Isolierung der RNA wurden die tiefgefrorenen Proben in 1 ml Trizol (Invitrogen, #15596-018) mit einem Ultra-Turrax (T25 basic) homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 300 µl Chloroform in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gut geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 Min., 13.000 rpm, 4°C). Die obere Phase wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 750 µl Isopropanol vermischt und wieder zentrifugiert (10 Min., 13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen. Das Pellet wurde zentrifugiert (7 Min., 10.000 rpm, 4°C), getrocknet und größenabhängig in 20 bis 50 µl DEPC-Wasser in Lösung gebracht. Die RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4.7 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Die RNA aus Zellkulturen wurde mittels des *NucleoSpin[®]RNAII-Systems* (Macherey-Nagel) isoliert. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zellkultur-Schaber abgekratzt, und die RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert.

4.4.8 Reverse Transkription (RT)

Die isolierte RNA wurde durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem *Cloned AMV First-Strand Synthese-System* (Invitrogen, #12328-040) nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils 0,5 µg RNA pro Ansatz verwendet.

4.4.9 Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Expressionsstärke von Wildtyp- und Mutanten-Allel in *Pate4^{+/+}*, *Pate4^{+/-}* und *Pate4^{-/-}*-Mäusen abzuschätzen zu können, wurde das Verfahren der Reversen Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) angewandt. Für die RT-PCR wurde folgender Ansatz verwendet: 2,5 µl 10x Taq-Puffer, 1 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer, 1 µl cDNA (ca. 5 ng), 0,5 µl Taq-Polymerase, auf 25 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt.

Folgende Primerpaare wurden verwendet:

Tabelle 8: RT-PCR-Primer für die Amplifikation von Pate4

Name	Vorwärtsprimer (5'→3')	Rückwärtsprimer (5'→3')
Svs7 WT	CCTTGCACTGAGGCGAGCACAATT	TCCTGCCTCTCCTGCCCTGTT
Svs7 geno	CCCGGCTGTGCCGAAATGGT	CAGCGTTCGACCCAGGCGTT

4.4.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR) basiert auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerasekettenreaktion, ermöglicht dabei aber gleichzeitig die Quantifizierung der DNA. Die Charakterisierung des PCR-Produkts erfolgt dabei in Echtzeit mittels gemessener Fluoreszenzintensität, welche von der Produktmenge abhängig ist.¹⁶² In dieser Arbeit wurde dabei das TaqMan®-System verwendet. Die cDNA wurde im Vorwege mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:5 verdünnt. Als Primer wurden folgende TaqMan®-Sonden (Life Technologies, Thermo Scientific Inc.) verwendet:

Tabelle 9: Verwendete TaqMan®-Sonden

Gen	TaqMan®-Sonde	Gen	TaqMan®-Sonde
<i>Adam10</i>	Mm00545742_m1	<i>Pate4</i>	Mm00491010_m1
<i>Adam17</i>	Mm00456428_m1	<i>Ptprz1</i>	Mm00478484_m1
<i>Adamts1</i>	Mm00477355_m1	<i>Ramp3</i>	Mm00840142_m1
<i>Adamts16</i>	Mm00468144_m1	<i>S1pr1</i>	Mm00514644_m1
<i>Adamts2</i>	Mm00805170_m1	<i>S1pr2</i>	Mm00834825_g1
<i>Adamts4</i>	Mm00556068_m1	<i>S1pr3</i>	Mm00515669_m1
<i>Alpl</i>	Mm00475834_m1	<i>S1pr4</i>	Mm00468695_s1
<i>Bmp1</i>	Mm00802220_m1	<i>S1pr5</i>	Mm01177724_m1
<i>Cited1</i>	Mm01235642_g1	<i>Smpd3</i>	Mm00491359_m1
<i>Dkk1</i>	Mm00438422_m1	<i>Tnfrsf11b</i>	Mm01205928_m1
<i>Fosl2</i>	Mm00484442_m1	<i>Tnfsf11</i> (1)	Mm01313943_m1
<i>Mmp14</i>	Mm00485054_m1	<i>Tnfsf11</i> (2)	Mm00441906_m1
<i>Mtor</i>	Mm00444968_m1	<i>Tnfsf11</i> (3)	Mm00441908_m1

Der Reaktionsansatz wurde in eine 96-Vertiefungs-Platte (*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate*) pipettiert. Eine Reaktion bestand aus 2 µl cDNA, 1 µl TaqMan®-Sonde, 7 µl DEPC-H₂O und 10 µl TaqMan® Mastermix. Die Platte wurde verschlossen (*MicroAmp® Optical*

Adhesive Film) und die qRT-PCR gestartet (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Life Technologies).

4.4.11 Microarray-Genchip-Analyse

Um eine genomweite Expressionsanalyse zwischen unterschiedlich behandelten Zellen durchzuführen, wurde sich der Methode der Microarray-Genchip-Analyse bedient. Konkret wurde in dieser Arbeit die Affymetrix-Genchip-Analyse angewendet, um zum einen den Effekt des Moleküls S1P auf primäre Osteoblasten zu untersuchen. Hierfür wurden die 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten über Nacht in serumfreien Medium gehungert und im Anschluss für 6 Stunden mit 1 μ M S1P stimuliert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese auf Genchips hybridisiert. Mittels der Affymetrix-Software konnten durch die entstehenden Signale die Expressionsprofile von knapp 30.000 Genen analysiert werden. Zum zweiten wurde die Genchip-Analyse auch verwendet, um den Effekt von PTH auf die Genexpression in primären Osteoblasten zu untersuchen. Die Durchführung erfolgte analog zur Analyse der S1P-stimulierten Osteoblasten mit dem Unterschied, dass zur Stimulation humanes PTH [1-34] in der Konzentration 10 nM verwendet wurde. Die Hybridisierung und die Auswertung beider Genchips wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Streichert (Klinische Chemie, UKE) durchgeführt.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Affinitätschromatographie

Um Rankl für eine massenspektrometrische Untersuchung aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierbei wurde ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem Rankl-Antagonisten OPG und einem Antikörper Fc-Teil (OPG FC, AMGN-0007, Amgen) verwendet. OPG-Fc wurde nach Herstellerangaben (Affi-Gel Hz Immunoaffinity Kit, Bio-Rad) aufgereinigt, oxidiert, entsalzt und mit dem FC-Teil kovalent an ein Affi Gel Hz gekoppelt. Das Affi-Gel wurde in eine Chromatographie-Säule gefüllt und mit PBS (1x), pH 7.0 gewaschen. Die Affi-Gel-Säule wurde nach Herstellerangaben konditioniert und der komplette Zellkulturüberstand im Anschluss über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 50 ml PBS (1x), pH 7.0, und danach mit 50 ml PBS (1x), pH 7.0,

inklusive 0.5 M NaCl, gewaschen und die Säule verschlossen. Es wurden 20 Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit 50 µl Neutralisationspuffer befüllt und 10 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Nach dem Öffnen der Säule wurden jeweils 500 µl Eluat in jedem Reaktionsgefäß aufgefangen, das Reaktionsgefäß verschlossen, umgehend bei -80 °C gelagert und im Anschluss eine Konzentrationsbestimmung von Rankl per ELISA vorgenommen.

4.5.2 Proteinisolation aus Zellkulturen

Um Rankl in der Zellkultur aus primären Osteoblasten nachzuweisen, wurden sowohl die Membranproteine als auch die Proteine des Zellkulturmediums der IL-33- und PTH-stimulierten Zellen und der Kontrollzellen isoliert. Für die Isolation der Membranproteine wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss 80 µl CHAPS-Puffer, welcher mit Protease- und Phosphatase-inhibitoren versetzt war, pro Vertiefung der Zellkulturplatte mit 3,8 cm² Wachstumsfläche pipettiert. Die Zellen wurde mit einem Zellkulturspatel abgekratzt und mit einer Pipette Zellen und Flüssigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten auf Eis gelagert und danach bei 4 °C zentrifugiert (10 Minuten, 13.000 rpm). Der flüssige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Das Zellkulturmedium einer Vertiefung der Zellkulturplatte je Bedingung wurde über Nacht mit Aceton (Verhältnis Medium : Aceton 1:4) bei -20 °C gefällt, das entstandene Zellpellet in Western-Blot Probenpuffer gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht das Auftrennen von Proteingemischen. Die Proteine werden dabei durch SDS denaturiert und erhalten alle eine gleichmäßige Ladung, so dass sie nur anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Die 12,5%igen Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 10: Ansatz des 12,5% Polyacrylamid-Gel

Bestandteil	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	3,3 ml	3 ml
Trenngel- /Sammelgelpuffer	2,5 ml	1,25 ml
30% Acrylamid	4,2 ml	0,75 ml
TEMED	8 µl	10 µl
10% Ammonium Persulfat	50 µl	50 µl

Zur Auftrennung der Membranproteine wurden 20 µl Überstand mit 5 µl 4x Westernblot-Probenpuffer versetzt. Diese Suspension und das komplette gefällte Zellkulturmedium, welches schon in 25 µl Probenpuffer gelöst war, wurden dann 10 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend im SDS-Polyacrylamidgel bei 100-150 V aufgetrennt.

4.5.4 Western-Blot

Für die Detektion von Rankl in den per SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde ein Western-Blot durchgeführt. Der Westernblot erlaubt den spezifischen und sensitiven Nachweis von Proteinen mittels einer Antikörperreaktion. Die im Gel enthaltenen Proteine wurden in einem Semi-Dry Verfahren bei 15 Volt für 1 Stunde mit Westernblot-Transferpuffer auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde im Anschluss für 30 Minuten in WB-Blockpuffer blockiert und danach mit dem 1:1000 verdünnten Rankl-Primärantikörper (#AF462, R&D Systems) in 5 ml Blockpuffer unter Rollen bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und im Anschluss für 30 Minuten bei RT mit dem 1:2000 in Blockpuffer verdünnten Sekundär-Antikörper (Polyklonal Rabbit Anti-Goat, #P0449, Dako) inkubiert, bevor sie wiederum dreimal gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte mittels der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). Die Membran wurde mit frisch angesetzter ECL-Chemilumineszenz-Lösung beträufelt und im Dunkeln ein Westernblot-Film zur Belichtung aufgelegt. Die Belichtungszeit betrug zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten, der Film wurde mit einem automatischen Entwicklersystems (Protec GmbH) entwickelt.

4.5.5 ELISA

Die Konzentrationsbestimmung von Serum- und Zellkulturüberstandparametern wurde per ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) nach Herstellerangaben der verwendeten Kits (Tab.5) durchgeführt.

4.6 Statistische Analysen

Der statistische Vergleich zweier Gruppen wurde mit einem t-Test der Windows Excel Software durchgeführt. Eine Varianzanalyse (One-way ANOVA) wurde mit der Software Graphpad Prism durchgeführt. Alle gezeigten Daten entsprechen den ermittelten Mittelwerten und Standardabweichungen, als statistisch signifikant wurden p-Werte unterhalb von 0,05 angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Einfluss von PTH auf die Osteoblasten-Osteoklasten-Kommunikation unter Freisetzung von Rankl

Dieser Abschnitt der Arbeit schließt an meiner 2012 der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften (Universität Hamburg) vorgelegten Masterarbeit mit dem Titel „Molekulare Untersuchung der Wirkung von PTH auf die Rankl-Produktion in Osteoblasten“ an. Zum besseren Verständnis sind Teilergebnisse in diese Arbeit eingegangen bzw. bestätigt worden und im Text als solche gekennzeichnet.

5.1.1 Die Stimulation primärer Osteoblasten mit PTH induziert neben der Genexpression auch die Freisetzung von löslichem Rankl

2011 stellten Schulze *et al.* fest, dass das Zytokin IL-33 als potenter Inhibitor der Osteoklastogenese wirkt, obwohl es die Expression des Rankl-Gens in primären Osteoblasten schon nach kurzer Zeit stark induziert.¹⁶³ Trotz dieser Induktion konnte im Medium der Zellen keine lösliche Form des als Transmembranprotein exprimierten Rankl (*soluble* Rankl, sRankl) nachgewiesen werden, was eine Erklärung für den fehlenden pro-osteoklastogenen Effekt lieferte. Im Gegensatz zur Wirkung von IL-33 konnte schon in der vorangegangenen Masterarbeit zu diesem Thema festgestellt werden, dass eine Stimulation von primären Osteoblasten mit hPTH [1-34] für 6 und 24 Stunden nicht nur zu einer Induktion der Genexpression von Rankl führt, sondern im Gegensatz zur Stimulation mit IL-33, auch zu einer Freisetzung von sRankl durch Osteoblasten.¹⁶⁴ Dieser Effekt der Freisetzung von sRankl durch PTH konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb.12). Hierfür wurden primäre Osteoblasten aus Schädeldächern von 3-5 Tage alten Wildtyp-Mäusen isoliert und für 10 Tage differenziert. Die Zellen wurden an Tag 9 der Differenzierung über Nacht in serum-freien Medium gehungert und an Tag 10 für 6 und 24 Stunden mit hPTH [1-34] und IL-33 stimuliert. Im Anschluss wurde RNA isoliert, in cDNA translatiert und per qRT-PCR die Expression des Rankl-Gens *Tnfsf11* analysiert. Das Medium der Zellen wurde gesammelt und die Konzentration an Rankl per ELISA bestimmt.

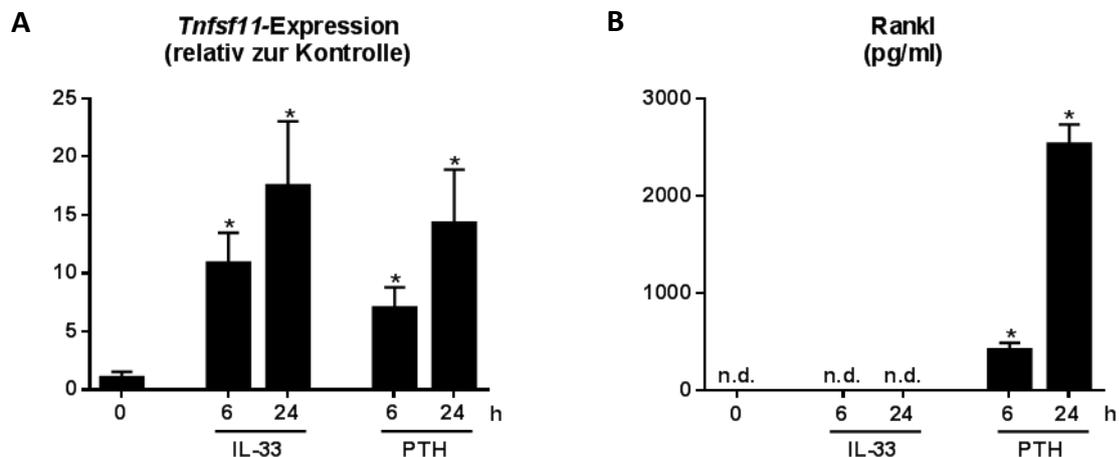


Abbildung 12: IL-33 und PTH induzieren beide die Genexpression des Rankl-Gens *Tnfsf11* in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten nach 6 und 24 Stunden Stimulation, aber nur PTH ist in der Lage die Abspaltung von sRankl zu katalysieren. (A) Dargestellt ist die relative *Tnfsf11*-Expression in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (0h; Kontrolle) nach Stimulation mit PTH [1-34] oder IL-33 für 6 und 24 Stunden, sowie (B) die Konzentration von Rankl im Medium derselben Zellen. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$, n.d.; nicht detektierbar)

Die Freisetzung von sRankl in das Medium der Zellen kann entweder durch eine Abspaltung der extrazellulären Domäne von Rankl durch eine oder mehrere Protease/n erfolgen, oder durch Sezernierung einer, durch alternatives Splicing entstandenen, Form des Proteins. Um zu untersuchen, ob sRankl nach PTH-Stimulation durch alternatives Splicing entsteht, wurde die qRT-PCR-Expressionsanalyse der PTH- und IL-33 stimulierten Zellen mit drei verschiedenen Primern wiederholt, welche die Genexpression verschiedener kodierender Bereiche von *Tnfsf11* widerspiegeln (Abb.13A). sRankl, die extrazelluläre Form des Proteins, wird dabei durch Exon 4 und 5 des Gens kodiert, die Expression dieses Bereiches, wird dabei spezifisch durch den qRT-PCR Primer 3 dargestellt. Die Expressionsanalyse mit allen drei Primern zeigte, dass die Expression aller im Gen enthaltenden Exone in gleichem Maße durch PTH und IL-33 induziert wurden (Abb.13B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass beide Faktoren die Expression der kompletten transmembranen Form des Proteins induzieren und das Vorhandensein von sRankl im Medium der PTH-stimulierten Zellen durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne zustande kommt. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde in einem nächsten Schritt die Konzentration von Rankl im Medium von PTH-

stimulierten, 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten unter gleichzeitiger Zugabe des Breitband-Metalloproteaseninhibitors Marimastat [10 μ M] per ELISA bestimmt. In diesen Zellen konnte kein Rankl im Medium detektiert werden (Abb.13C), so dass diese Ergebnisse zusammengenommen ein eindeutiger Beleg für eine Proteaseaktivität-abhängige Abspaltung von Rankl sind.

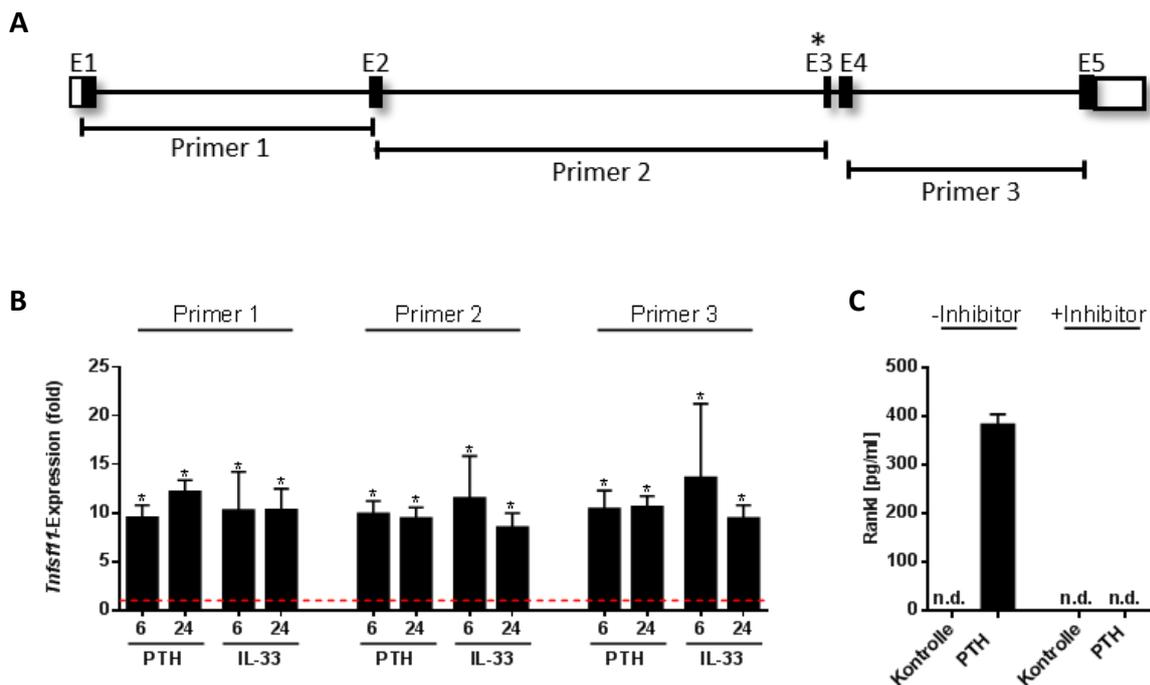


Abbildung 13: Alle kodierenden Bereiche von *Tnfsf11* werden in gleichem Maße durch PTH und IL-33 induziert. (A) Schematische Darstellung des Rankl-Gens *Tnfsf11* mit den enthaltenen Exons 1-5 (E1-5) und den Bereichen, deren Expression durch die drei Primer dargestellt werden (*: Spaltstelle von Rankl). (B) Relative Expression der intrazellulären und transmembranen Domäne (Primer 1 + 2), sowie der extrazellulären Domäne (Primer 3) von *Tnfsf11* in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (rote Linie) nach Stimulation mit hPTH [1-34] oder IL-33 für 6 und 24 Stunden. (C) Konzentration von Rankl im Medium von 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten nach Stimulation mit hPTH [1-34] ohne und mit dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat [10 μ M] für 6 Stunden (*p < 0,05 im t-Test, n = 3, n.d.: nicht detektierbar)

Kollmann *et al.* konnten in Zusammenhang mit einem Mausmodell für Mukopolidose Typ II den proteolytischen Effekt von PTH auf Rankl ebenfalls in Zellkulturen von primären Osteoblasten beobachten.¹⁶⁵ Eine dort zusätzlich reduzierte Opg-Konzentration im Medium der PTH-stimulierten Zellen konnte in dieser Arbeit per ELISA bestätigt werden (Abb.14A). Die

Konzentration von Opg im Medium der IL-33 behandelten Zellen war dabei unverändert. Um auszuschließen, dass die höhere Opg-Konzentration im Medium der Kontroll- und IL-33-behandelten Zellen in der Rankl-ELISA-Messung mit sRankl interferiert und so für die nicht vorhandene Detektion von sRankl im ELISA verantwortlich ist, wurde von Medium und Zelllysat von IL-33 und PTH-stimulierten primären Osteoblasten ein Western Blot mit einem Rankl-spezifischen Antikörper durchgeführt. Im Zelllysat der stimulierten Zellen waren deutliche Proteinbanden von der unterschiedlichen Isoformen von Rankl zu erkennen, wobei bei den PTH-stimulierten Zellen schon die deutlich stärkere Induktion von Rankl erkennbar war (Abb.14B). Die Proteinbande bei knapp über 20 kDa stellte dabei die sRankl-Bande dar, welche auch deutlich im Zellmedium detektierbar war. In diesem Experiment konnte somit ebenfalls die PTH-induzierende Wirkung, als auch das spezifische Vorhandensein von sRankl im Medium der PTH-behandelten primären Osteoblasten bestätigt werden. Eine Opg-Rankl-Interferenz in der ELISA-Messung kann durch den Western-Blot ausgeschlossen werden.

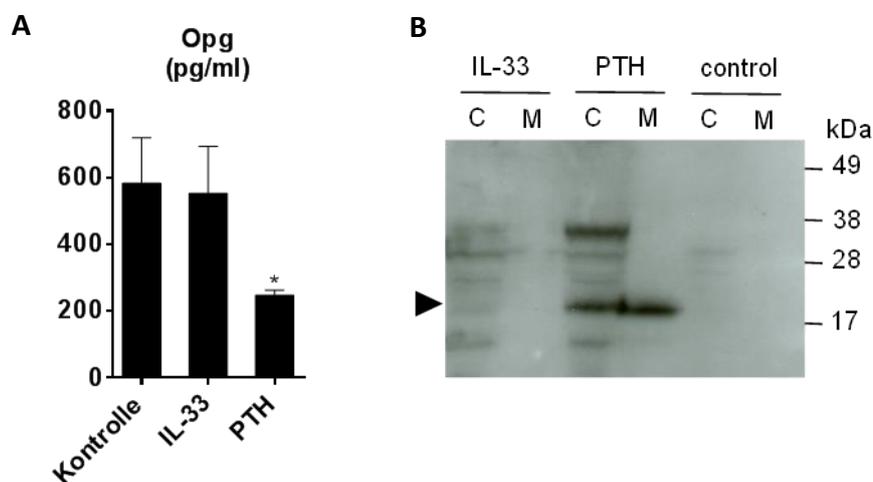


Abbildung 14: Obwohl eine 6-stündige PTH-Stimulation die Ausschüttung des Rankl-Antagonisten Osteoprotegerin in primären Osteoblasten reduziert, ist die höhere Konzentration von Opg in den Kontroll- und IL-33-stimulierten Zellen nicht verantwortlich für die Abwesenheit von sRankl im Medium dieser Zellen. (A) Dargestellt ist die Konzentration von Opg im Medium der Zellen nach Stimulation mit PTH oder IL-33 für 6 Stunden bezogen auf die Konzentration im Medium der unstimulierten Zellen (Kontrolle). (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$) (B) Dargestellt ist die Detektion von sRankl per Western Blot in Zelllysat (C) und Medium (M) der Zellen nach Stimulation mit PTH oder IL33 für 6 Stunden (Pfeil: sRankl)

Um zu testen, ob die proteolytische Abspaltung von Rankl auf einer transkriptionellen Regulation durch PTH beruht oder auf einer direkten Stimulation einer Proteaseaktivität, wurden 10 Tage differenzierte primäre Osteoblasten zunächst für 6 Stunden mit IL-33 stimuliert, um die Genexpression von Rankl zu induzieren. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 und 30 Minuten mit PTH stimuliert. In diesem Versuch konnte, mit Ausnahme bei der PTH-Kontrolle, kein sRankl im Medium der Zellen detektiert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die verantwortlichen Enzyme für die proteolytische Prozessierung nicht direkt durch PTH stimuliert werden, sondern die Proteolyse zunächst auf einer Induktion von Protease-kodierenden Genen beruht (Abb.15).

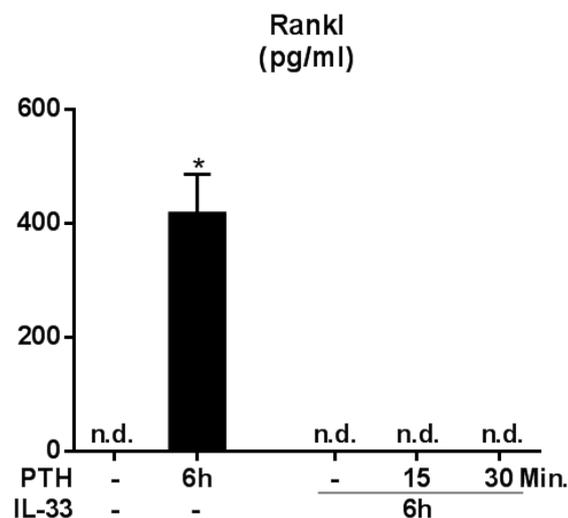


Abbildung 15: Der Rankl-prozessierende Effekt von PTH auf Osteoblasten wird nicht unmittelbar durch eine Aktivierung von Proteasen vermittelt, sondern beruht vermutlich auf einer transkriptionellen Regulation Protease-kodierender Gene. Dargestellt ist die Konzentration von Rankl im Medium von 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten nach Stimulation mit IL33 für 6 Stunden und anschließender Stimulation mit PTH [1-34] für 15 und 30 Minuten, sowie nach 6-stündiger Stimulation mit PTH [1-34] als Vergleichswert. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$, n.d.: nicht detektierbar)

5.1.2 Die intermittierende Injektion von PTH führt in Mäusen zu einer erhöhten Konzentration von Rankl im Serum und zu einer erhöhten Knochenmasse

Die intermittierende Injektion von PTH [1-34] in Form des Medikaments Teriparatid führt bei Osteoporose-Patienten in der Therapie zu einer Erhöhung der Knochendichte und

Verringerung des Frakturrisikos. Um herauszufinden, ob die proteolytische Abspaltung von sRANKl durch eine Behandlung mit PTH auch *in vivo* induziert wird und demzufolge relevant sein könnte, wurden 12 Wochen alte Wildtyp (C57Bl/6) – Mäusen täglich 100 µg pro kg Körpergewicht hPTH [1-34] und zur Kontrolle PBS (*Vehicle*) für 7 Tage injiziert, im Anschluss histologisch untersucht und die Konzentration von sRANKl im Serum der Mäuse per ELISA-Messung bestimmt. Die histologische Untersuchung der Wirbelkörper zeigte wie erwartet, dass eine intermittierende Behandlung mit PTH [1-34] eine signifikante Erhöhung der Knochendichte in den Mäusen bewirkt (Abb.16A-B).

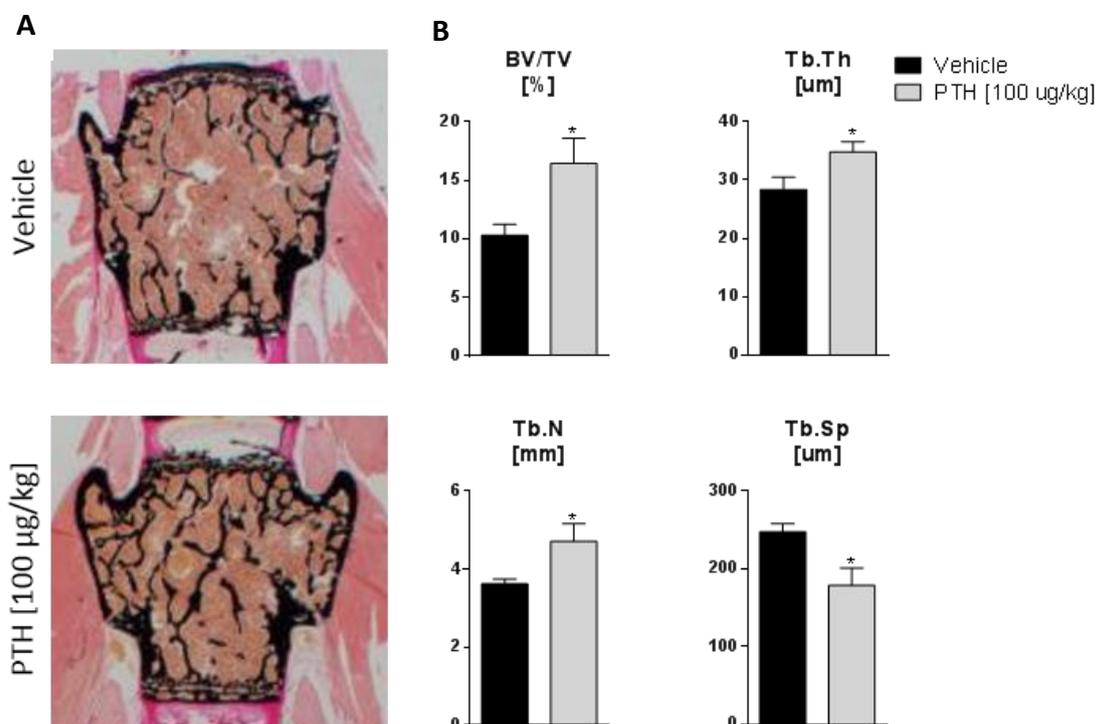


Abbildung 16: Die intermittierende Injektion von PTH [1-34] über 7 Tage in 12 Wochen alte Wildtyp-Mäuse führt zu einer Steigerung der Knochendichte. (A) von Kossa/van Gieson gefärbte, histologische Schnitte der Wirbelkörper, mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt; **(B)** Knochenvolumen pro Gewebvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekelabstand, gemessen im Wirbelkörper (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$)

Die histomorphometrische Analyse ergab eine leicht vermehrte Zahl an Osteoblasten und eine signifikant gesteigerte Knochenformationsrate in den PTH-behandelten Mäusen (Abb.17A). Interessanterweise war die Anzahl der Osteoklasten im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen ebenfalls signifikant erhöht, ein Befund, der durch die signifikant erhöhte

Konzentration von sRankl im Blut der Mäuse erklärbar war. Die Serumanalyse der Mäuse ergab außerdem, dass die Serumkonzentration von Opg und dem Knochenabbaumarker CTX durch die Behandlung mit PTH nicht beeinflusst wurde (Abb.17B).

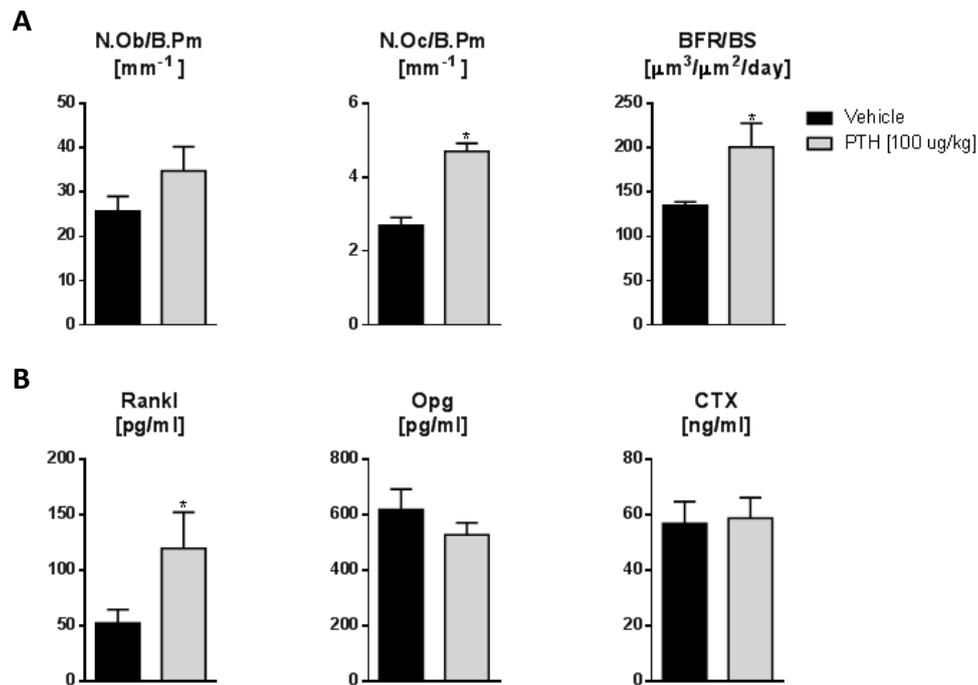


Abbildung 17: Die Anzahl der Osteoklasten und die Knochenformationsrate ist in PTH-behandelten Mäusen ebenso signifikant erhöht, wie die Konzentration von sRankl im Serum. (A) Anzahl der Osteoblasten (N.Ob.) und Osteoklasten (N.Oc.) pro Knochenparameter und Knochenformationsrate (BFR) pro Knochenoberfläche im Wirbelkörper von 12 Wochen alten Wildtyp-Mäusen ohne und mit intermittierender PTH-Injektion [100 $\mu\text{g}/\text{kg}$] über 7 Tage; **(B)** Konzentration von Rankl, Osteoprotegerin und β -Crosslaps im Serum der Mäuse; (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$)

Im Gesamtergebnis zeigten die PTH-behandelten Mäuse also eine verstärkte Prozessierung von transmembranen Rankl, eine erhöhte Knochenformationsrate und keine Anzeichen einer verstärkten Knochenresorption, trotz einer signifikant erhöhten Osteoklastenzahl. Die intermittierende Behandlung mit PTH verschiebt also, wie bekannt, den katabolen Effekt von PTH zugunsten eines osteoanabolen Effekts. Dieses Ergebnis ist ein klares Indiz für die Relevanz der PTH-induzierten Rankl-Proteolyse und bestätigt zusammengenommen sowohl die vorangegangenen Zellkulturversuche, als auch seine wichtige physiologische Funktion im Organismus.

5.1.3 Bekannte Rankl-spaltende Enzyme werden nicht PTH-abhängig induziert

Um sich der Antwort zu nähern, ob und durch welche Protease die Abspaltung auf enzymatischen Wege katalysiert wird, wurden die bekannten Endopeptidasen Adam10, Adam17 und Mmp14, welche Rankl zumindest *in vitro* in anderen Zelltypen prozessieren können^{93,166}, schon in der vorangegangenen Masterarbeit auf ihre Möglichkeit hin untersucht, durch PTH in primären Osteoblasten aktiviert bzw. induziert zu werden. Diese Untersuchung wurde in dieser Doktorarbeit zum Teil wiederholt und ausgeweitet. Hierfür wurde die Genexpression der drei Metalloproteasen nach 6 und 24 Stunden Stimulation mit PTH und IL-33 per qRT-PCR untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass keine der drei Proteasen eine signifikante Regulation durch PTH [1-34] in primären Osteoblasten aufweisen konnte. IL-33 induzierte die Expression von *Adam17* und *Mmp14* zwar nach 6-stündiger Stimulation in Osteoblasten signifikant, da aber auch nach 24 Stunden noch kein sRankl im Medium der Zellen detektierbar war, schieden die beiden Proteasen als allein verantwortliche proteolytische Enzyme aus. Gleiches galt für Adam10, wessen Genexpression in den primären Osteoblasten weder durch PTH noch durch IL-33 reguliert wurde (Abb.18).

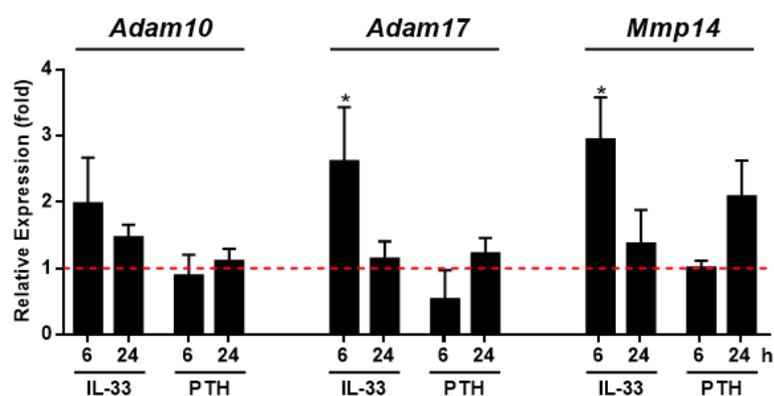


Abbildung 18: Die bekannten Proteasen Adam10, Adam17 und Mmp14, welche Rankl *in vitro* in anderen Zelltypen prozessieren können, werden nicht durch PTH reguliert. Dargestellt ist die relative Genexpression (*fold*) der Protease Adam10, Adam17 und Mmp14 in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (rote Linie, Kontrolle) nach Stimulation mit PTH [1-34] oder IL-33 für 6 und 24 Stunden (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$).

In Kollaboration mit dem Institut für Biochemie der Universität Kiel konnten zusätzlich *Adam17*-hypomorphe Mäuse histologisch untersucht und die Serumkonzentration von sRankl und CTX per ELISA bestimmt werden. Hierbei konnten weder im Knochenphänotyp, noch in der Konzentration der Serumparameter signifikante Veränderungen bei den *Adam17^{ex/ex}*-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren festgestellt werden, so dass eine entscheidende Beteiligung von Adam17 an der proteolytischen Prozessierung von Rankl in vivo im Prinzip ausgeschlossen werden kann (Abb.19A-D).

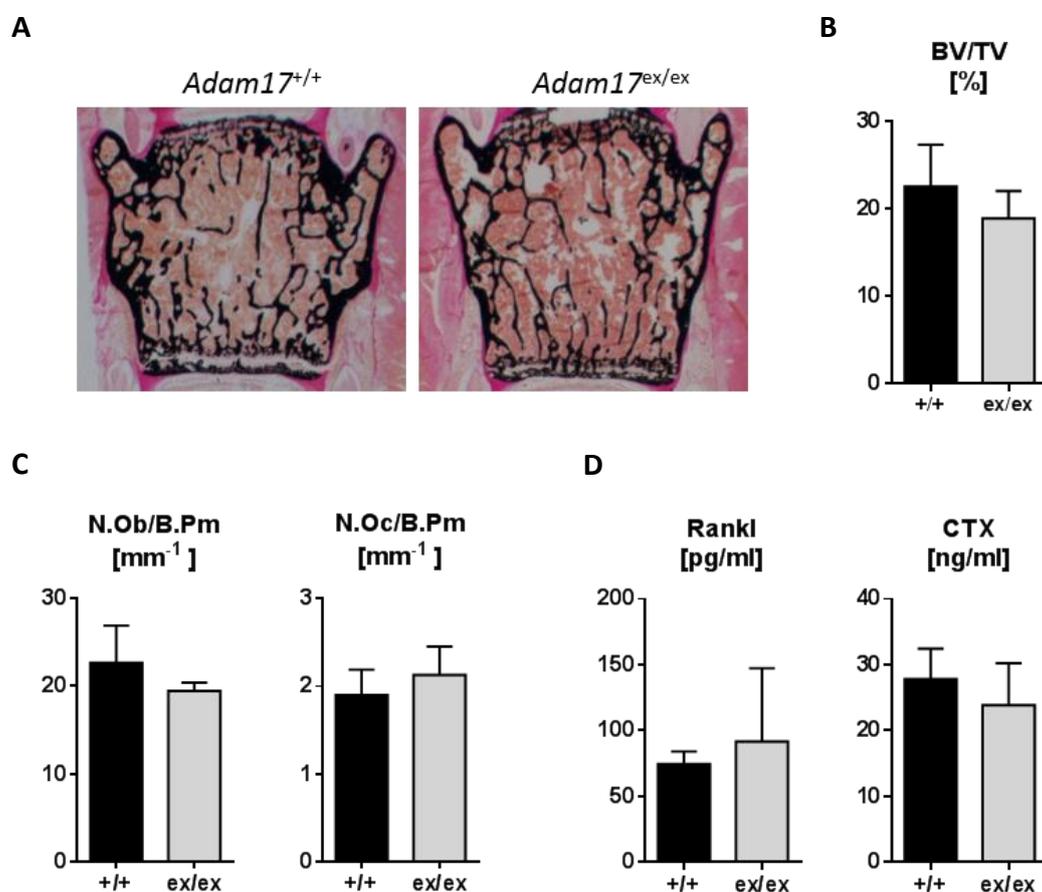


Abbildung 19: *Adam17*-hypomorphe Mäuse (*Adam17^{ex/ex}*) zeigen keinen veränderten Knochenphänotyp und keine veränderten knochen-relevanten Serumparameter im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren (*Adam17^{+/+}*). (A) von Kossa/van Gieson gefärbte, histologische Schnitte der Wirbelkörper, mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt, (B) Knochenvolumen pro Gewebvolumen, gemessen im Wirbelkörper, (C) Anzahl der Osteoblasten (N.Ob.) und Osteoklasten (N.Oc.) pro Knochenparameter im Wirbelkörper, (D) Konzentration von Rankl und β -Crosslaps (CTX) im Serum der Tiere; (n=4)

Die Proteasen Adam10, Adam17 und Mmp14 sind unter Zellkulturbedingungen in der Lage murines Rankl an zwei nahe beieinander liegenden Stellen (Arg¹³⁸-Phe¹³⁹ und Met¹⁴⁵-Met¹⁴⁶) im Protein zu prozessieren, wobei beide Stellen im humanen Protein komplett unkonserviert sind.¹⁶⁷ In einem Versuch die bekannten Spaltstellen von murinen Rankl zu validieren bzw. neue Spaltstellen zu identifizieren, wurde zunächst sRankl aus dem Medium von PTH-stimulierten primären Osteoblasten per Affinitätschromatographie in mehreren Fraktionen isoliert. Hierfür wurde ein Fusionsprotein aus humanen Opg und dem Fc-Teil von humanen Immunglobulin (OPG-Fc) an eine Säulenmatrix gekoppelt und das konditionierte Medium über die Säule gegeben. Das vom OPG-Proteinanteil gebundene Rankl wurde im Anschluss von der Säule eluiert und die Menge an Rankl im kompletten Medium vor dem Säulendurchfluss (Input, IP), nach dem Säulendurchfluss (Durchfluss, DF) und in den eluierten Fraktionen per ELISA bestimmt (Abb.20A). Um die Proteinmenge weiter zu konzentrieren und von Molekülen mit einem Molekulargewicht kleiner als 10 kDa zu reinigen, wurden die Fraktionen mit der höchsten sRankl-Konzentration per Ultrazentrifugation in Amicon®-Röhrchen aufkonzentriert und zusammengefasst. Im Anschluss wurde das Protein in zwei parallel laufenden Spuren per SDS-Gelelektrophorese weiter aufgereinigt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Bei einer Spur wurde zur Detektion der sRankl-Bande ein Western Blot mit einem Rankl-spezifischen Antikörper durchgeführt, während die parallel laufende Proteinbande zur weiteren Analyse aus der Membran geschnitten wurde (Abb.20B).

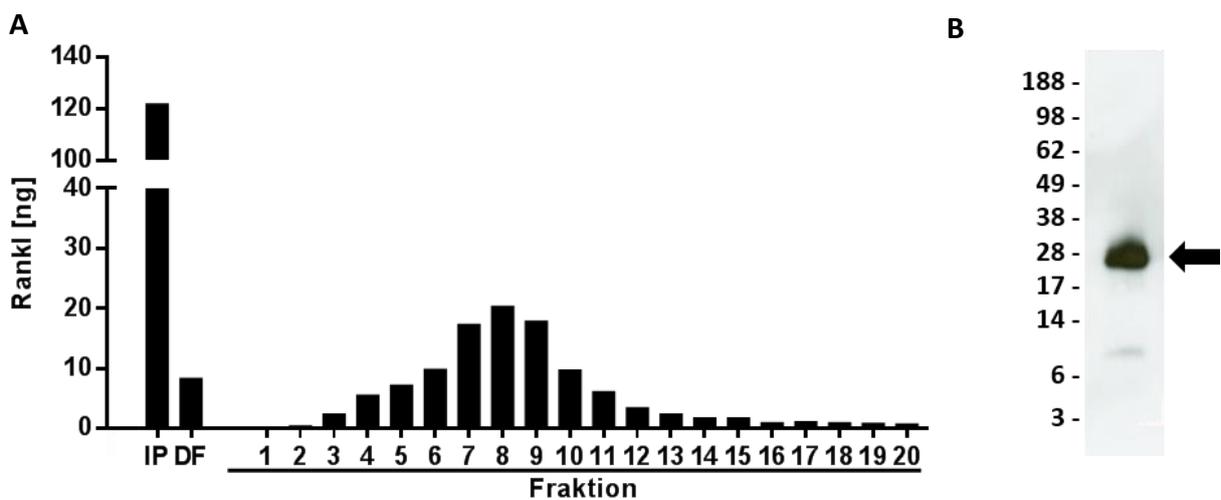


Abbildung 20: Rankl konnte erfolgreich aus dem Medium von PTH-stimulierten primären Osteoblasten isoliert werden. (A) Dargestellt ist die Menge an sRankl in den einzelnen Fraktionen der OPG-Fc-Affinitätschromatographie (IP: Input, DF: Durchfluss). (B) Detektion von Rankl im Western Blot aus den aufkonzentrierten und zusammengefassten Fraktionen 4-12

Der Versuch, die N-terminale Schnittstelle des Rankl-Proteins zu identifizieren wurde im Anschluss von der Core Facility der Massenspektrometrischen Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Da eine N-terminale Proteinsequenzierung nicht erfolgreich verlief, wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt, um aus den entstehenden Fragmenten auf die Schnittstelle schließen zu können. Bei der Analyse des verdauten Proteins konnten viele Fragmente von murinen Rankl identifiziert werden. Das N-terminal erste Fragment was detektiert werden konnte, startete mit der Aminosäure Phenylalanin (Phe¹³⁹), N-terminal aufsteigend konnte sonst kein weiteres Proteinfragment in der Sequenz nachgewiesen werden (Abb.21). Dieses Verfahren ließ zwar keine eindeutige Identifizierung der Rankl-Schnittstelle zu, da diese Schnittstelle allerdings schon zuvor von anderen Arbeitsgruppen als Rankl-Schnittstelle benannt wurde, kann diese Schnittstelle als wahrscheinlich korrekt angesehen werden. Andere Schnittstellen konnten in diesem Verfahren nicht identifiziert werden, können aber gleichzeitig auch nicht ausgeschlossen werden.

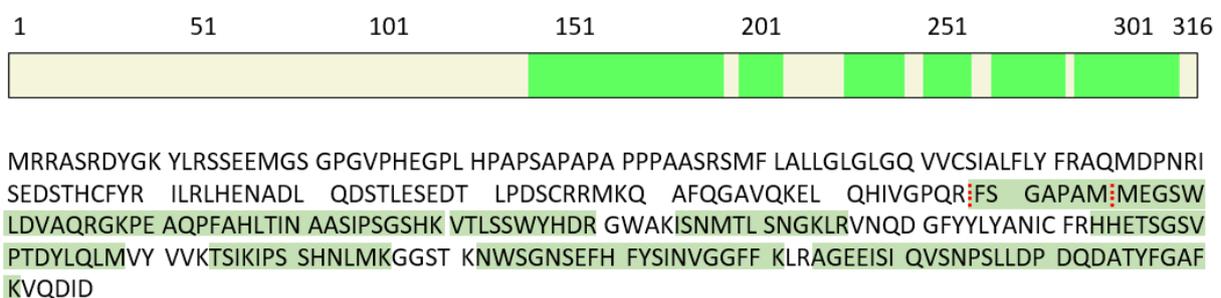


Abbildung 21: Ein Großteil der extrazellulären Rankl-Domäne konnte in der Massenspektrometrischen Analyse von sRankl detektiert werden. Schematische Darstellung, sowie Aminosäuresequenz des 316 AS langen murinen Protein Rankl. Die in der Analyse identifizierten Peptidfragmente sind grün hinterlegt, die zuvor von anderen Arbeitsgruppen postulierten Schnittstellen in der Proteinsequenz sind durch eine rote gepunktete Linie gekennzeichnet.

5.1.4 Eine Affymetrix-Genchip-Analyse identifiziert Adamts1 und Adamts16 als PTH-induzierte Metallopeptidasen

Um festzustellen, welche Gene in primären Osteoblasten PTH-abhängig reguliert werden, wurde schon im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit eine genomumfassende Expressionsanalyse mithilfe eines Affymetrix Genchips durchgeführt.¹⁶⁴ Hierfür wurden primäre murine Osteoblasten (n=3) für 10 Tage differenziert, 6 Stunden mit hPTH [1-34] stimuliert und im Anschluss die RNA der Zellen isoliert. Die Affymetrix Genchip Hybridisierung wurde anschließend vom Institut der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die identifizierten Gene wurden nach ihrem logarithmischen Signalverhältnis (*signal log ratio*, SLR) zwischen unstimulierten und PTH-stimulierten Proben sortiert und eine Rangliste der am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene mit einem mittleren SLR von mindestens 4.0 bzw. -4.0 erstellt (Abb.22A).

Um die in der Masterarbeit durchgeführte Genchip-Analyse zu validieren, wurden in dieser Arbeit in einer separaten Untersuchung abermals primäre Osteoblasten unter denselben Bedingungen kultiviert, mit hPTH [1-34] stimuliert und per qRT-PCR die Expression von zwei induzierten Genen (*Cited1*, *Ramp3*), zwei nicht-regulierten Genen (*Tnfrsf11b*, *Alpl*) und zwei reprimierten Genen (*Smpd3*, *Dkk1*) untersucht. Hierbei konnten die Ergebnisse der Affymetrix Expressionsanalyse vollständig bestätigt werden (Abb.22B).

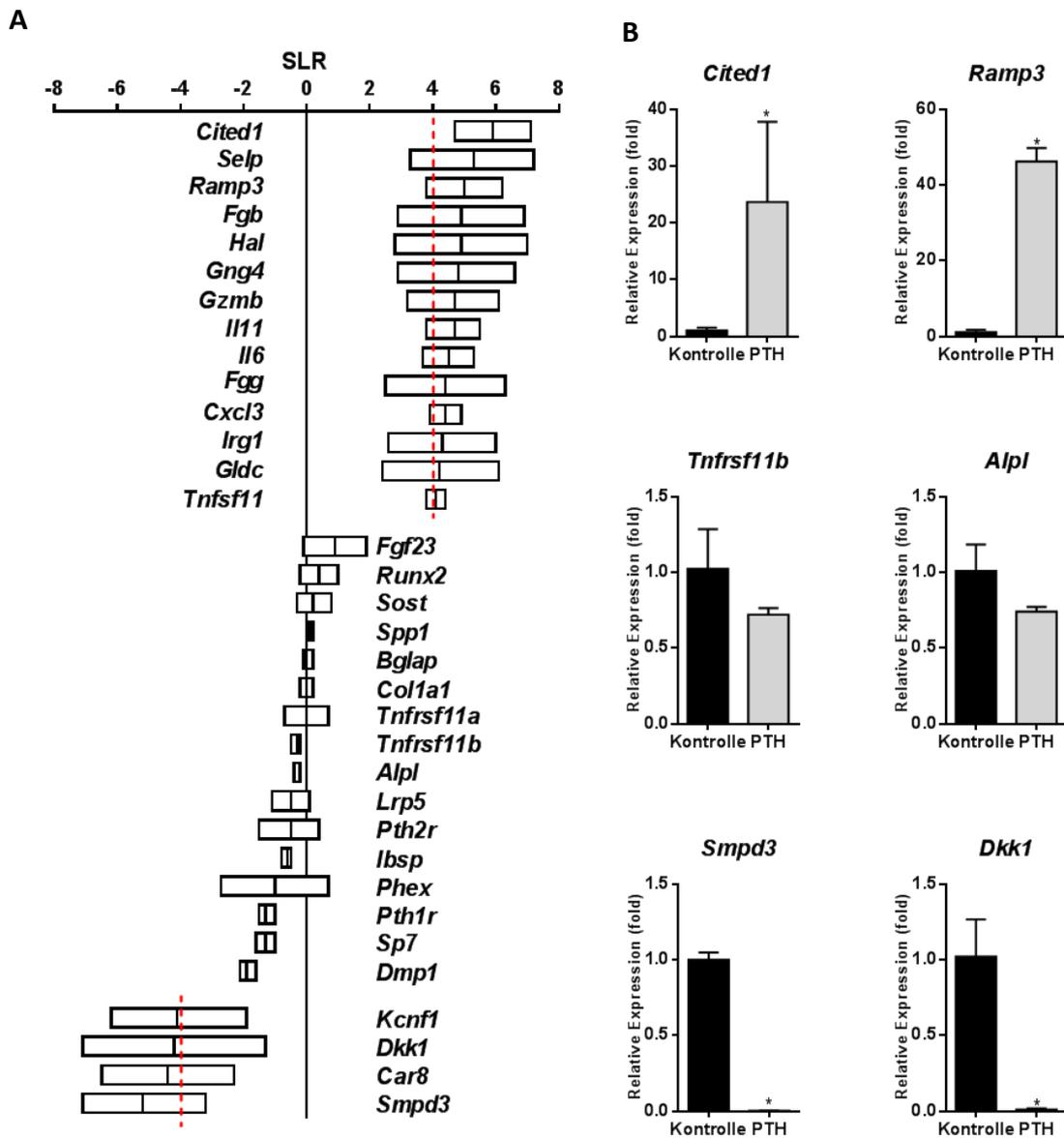


Abbildung 22: Rangliste der am stärksten induzierten und reprimierten Gene, sowie knochenrelevanten Gene in primären Osteoblasten nach 6 Stunden Stimulation mit PTH. (A) Dargestellt ist das logarithmische Signalverhältnis (SLR) zwischen nicht stimulierten und stimulierten Proben. Der Graph zeigt den SLR-Bereich (mit dem Median als eingefügte Linie) für alle Gene, deren mittlerer SLR-Wert über 4.0 bzw. unter - 4.0 lag (oberes und unteres Drittel), sowie im mittleren Bereich das SLR der knochenrelevanten Gene; (B) relative Expression von zwei induzierten Genen (*Cited1*, *Ramp3*), zwei nicht-regulierten Genen (*Tnfrsf11b*, *Alpl*) und zwei reprimierten Genen (*Smpd3*, *Dkk1*) in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) nach Stimulation mit PTH [1-34] für 6 Stunden. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$).

Im nächsten Schritt wurden die Expressionsanalyse-Ergebnisse in Hinblick auf die Regulation von Adam-, Adamts- und Matrix-Metalloproteasen untersucht. Hierbei wurden drei Mitglieder der Adamts-Proteinfamilie (*Adamts4*, *Adamts16* und *Adamts1*) identifiziert, die in primären Osteoblasten durch hPTH [1-34] induziert wurden (Tab.11).

Gen	PTH		SLR
	-	+	
<i>Adamts4</i>	320 ± 30	1311 ± 301	1.92 ± 0.1
<i>Adamts16</i>	22 ± 8	64 ± 5	1.47 ± 0.4
<i>Adamts1</i>	808 ± 152	1615 ± 213	1.07 ± 0.2

Tabelle 11: Rangliste der signifikant regulierten Metalloproteasen in primären Osteoblasten nach 6 Stunden PTH-Stimulation. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichungen der Affymetrix-Signal-Intensitäten und der logarithmische Signalverhältnisse (SLR) zwischen nicht stimulierten (-PTH) und stimulierten (+PTH) Proben. Gezeigt sind alle Metalloproteasen-kodierende Gene, deren mittlerer SLR-Wert über 1.0 lag.

Um die Induktion der drei identifizierten Proteasen in der Genchip-Analyse zu validieren, wurde ihre Expression in primären Osteoblasten nach 6 und 24 Stunden Stimulation mit PTH [1-34] und IL-33 per qRT-PCR überprüft (Abb.23). *Adamts4* wurde dabei in primären Osteoblasten nach 6 Stunden Stimulation in ihrer Genexpression durch beide verwendeten Faktoren signifikant induziert. Die PTH-Induktion von *Adamts16* konnte zu beiden Zeitpunkten per qRT-PCR bestätigt werden, während IL-33 keinerlei regulatorischen Effekt auf *Adamts16* ausübte. Eine ähnlich hohe PTH-Spezifität zeigte auch die Induktion von *Adamts1*. Zusammengefasst wurden also alle drei Proteasen durch PTH [1-34] in primären Osteoblasten induziert, was die Ergebnisse der Affymetrix Genchip Analyse bestätigte. Aufgrund der vorhandenen PTH-Spezifität von *Adamts16* und *Adamts1* wurde sich im Folgenden dieser Arbeit auf die Analyse dieser beiden Endopeptidasen als mögliche Rankl-Sheddasen konzentriert.

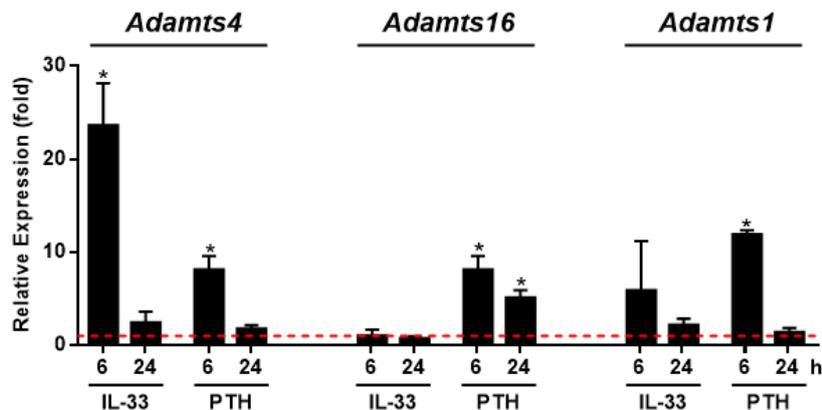


Abbildung 23: Adamts1 und Adamts16 werden im Vergleich zur Stimulation mit IL-33 in Osteoblasten spezifisch durch PTH stimuliert. Dargestellt ist die relative Expression von Adamts4, Adamts16 und Adamts1 in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (0h; rote Linie) nach Stimulation mit PTH [1-34] oder IL-33 für 6 und 24 Stunden. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$).

5.1.5 *Adamts16*-defiziente Ratten zeigen keine veränderte Knochenmasse, aber eine reduzierte Osteoklastenzahl und eine sehr geringe Rankl-Konzentration im Serum

Die Protease *Adamts16* ist bisher nur zu Teilen erforscht und wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Regulation des Knochenbaus untersucht. Es wurde deshalb eine vollständige Charakterisierung des Knochenphänotyps und der sRankl- und CTX-Konzentration im Serum eines von Joe et al. etablierten Rattenmodells mit einer ubiquitären *Adamts16*-Defizienz vorgenommen.^{168,169} Die knochenhistologischen Untersuchungen an Wirbelkörper und Tibia der 24 Wochen alten weiblichen Tiere zeigten, dass die Knochenmasse und die Knochenstruktur in den *Adamts16*-defizienten Tieren keine Veränderungen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen aufwies (Abb.24A-B).

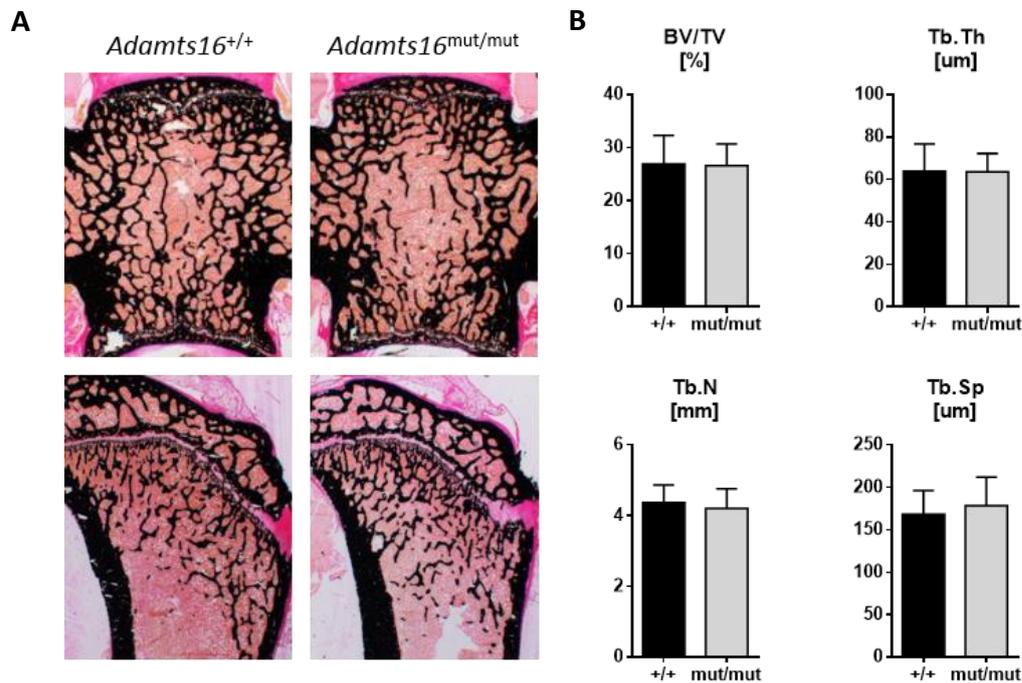


Abbildung 24: *Adamts16*-defiziente Ratten zeigen keine Veränderung in der Knochenmasse oder Trabekelstruktur. (A) von Kossa/van Gieson gefärbte, histologische Schnitte der Wirbelkörper und Tibiaköpfe, mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt; (B) Knochenvolumen pro Gewebvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekelabstand, gemessen im Wirbelkörper (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 10$)

Die Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche, der Anteil der mineralisierten Knochenoberfläche und die Knochenformationsrate war in den *Adamts16*-defizienten Ratten leicht, aber nicht signifikant, reduziert. Bemerkenswerterweise zeigte sich eine gemäßigte, aber doch signifikant reduzierte Anzahl an Osteoklasten auf der Knochenoberfläche (Abb.25A-B). Die per ELISA bestimmte sRankl-Konzentration im Serum der *Adamts16*-defizienten Tiere war sehr gering, es konnte aber aufgrund einer sehr starken Variation innerhalb der Messwerte der einzelnen Wildtyp-Geschwistertiere und in Ermangelung von Richt- bzw. Erfahrungswerten der sRankl-Konzentration im Serum von Dahl-S-Ratten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Die Konzentration von CTX wurde ebenfalls per ELISA bestimmt, zeigte aber ebenfalls keine signifikanten Genotyp-abhängigen Änderungen auf (Abb.25C). Zusammengefasst sprechen die reduzierte Osteoklastenanzahl und die geringe sRankl-Konzentration in den *Adamts16*-defizienten Tieren für eine Beteiligung der Protease an der Regulation der Osteoklastogenese *in vivo*, allerdings scheint *Adamts16* aufgrund des

unveränderten Knochenphänotyps keine hauptverantwortliche Funktion als Rankl-Sheddase zu besitzen.

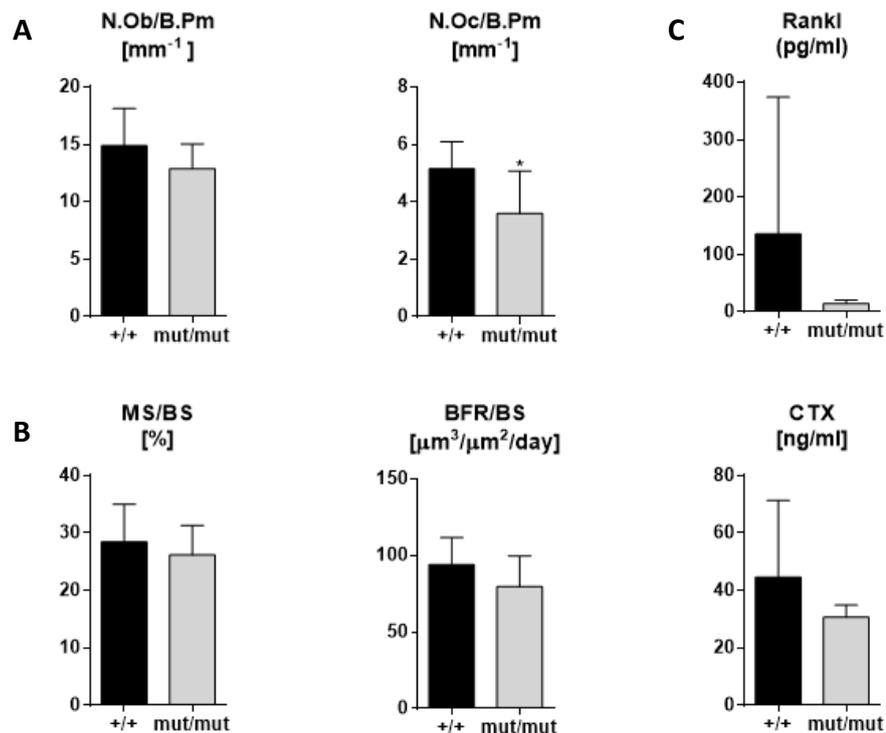


Abbildung 25: Die signifikant reduzierte Osteoklastenzahl, sowie die sehr geringe Konzentration an Serum-Rankl sprechen für eine Beteiligung von Adams16 an der Prozessierung von transmembranen Rankl. (A) Anzahl der Osteoblasten (N.Ob.) und Osteoklasten (N.Oc.) pro Knochenparameter und (B) Mineralisierte Knochenoberfläche (MS) und Knochenformationsrate (BFR) pro Knochenoberfläche (BS) im Wirbelkörper von 24 Wochen alten Dahl-S-Ratten ohne und mit Adams16-Defizienz; (C) Konzentration von Rankl und β -Crosslaps im Serum der Tiere ($n > 10$).

5.1.6 Die Abspaltung der extrazellulären Rankl-Domäne in primären Osteoblasten erfolgt spezifisch nach PTH-Stimulation

Um die Frage zu beantworten, ob andere Faktoren mit einer bekannten induzierenden Wirkung auf die *Tnfsf11*-Genexpression, in der Lage sind, die Abspaltung von sRankl in kurzer Zeit zu stimulieren, wurden zunächst 10 Tage differenzierte primäre Osteoblasten mit verschiedenen Faktoren für 6 Stunden stimuliert. Im Anschluss wurden die Expression des Rankl-Gens *Tnfsf11*, sowie die Konzentration an sRankl per ELISA im Medium der Zellen bestimmt.

Es zeigte sich, dass mit Ausnahme von IL-6 und seines Rezeptors, sowie Interferon- γ alle eingesetzten Faktoren eine Induktion der *Tnfsf11*-Genexpression bewirkten, wobei IL-1 β die mit Abstand größte Induktion verursachte (Abb.26A). Im Gegensatz dazu, waren nur nach Stimulation mit PTH [1-34] und IL-1 β eine messbare Konzentration von sRankl im Medium der Zellen vorhanden, wobei die Konzentration nach PTH Stimulation wesentlich höher ausfiel als nach Stimulation mit IL-1 β (Abb.26B). Dieses Ergebnis bestätigte die sehr hohe Spezifität mit der PTH eine Abspaltung der extrazellulären Rankl-Domäne induziert.

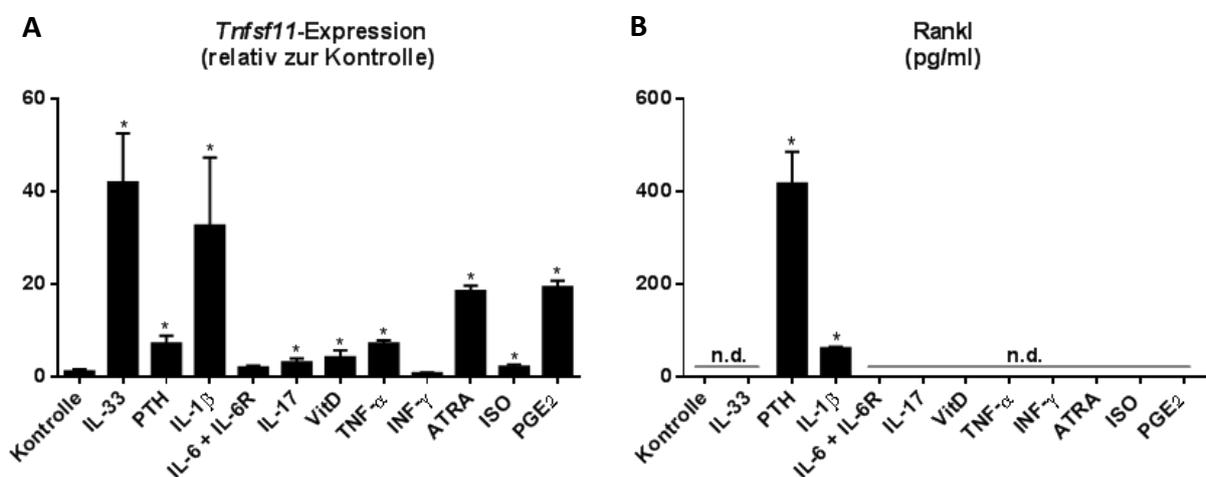


Abbildung 26: Die Rankl-Prozessierung erfolgt spezifisch durch PTH. Dargestellt ist die relative *Tnfsf11*-Expression in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (0h; Kontrolle) nach Stimulation mit diversen Faktoren für 6 Stunden (A), sowie die Konzentration von Rankl im Medium derselben Zellen (B). (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$).

Um zu untersuchen, ob dieser spezifische Effekt von PTH auf einer transkriptionellen Regulation einer der bekannten bzw. möglichen Rankl-prozessierenden Enzyme beruhen könnte, wurden in einem nächsten Schritt die Expressionsmuster der Proteasen Adam10, Adam17, Mmp14, Adamts1, Adamts4 und Adamts16 nach Stimulation mit allen verwendeten Faktoren untersucht. Bei Analyse der Expression der einzelnen Proteasen konnte dabei festgestellt werden, dass Adamts1 das einzige Enzym mit einer sehr starken und (mit Ausnahme von IL-6 und dessen löslichen Rezeptor) auch sehr spezifischen Induktion durch PTH [1-34] war. Alle anderen Enzyme wurden entweder durch andere oder eine ganze Reihe von Faktoren in ihrer Genexpression induziert (Abb.27).

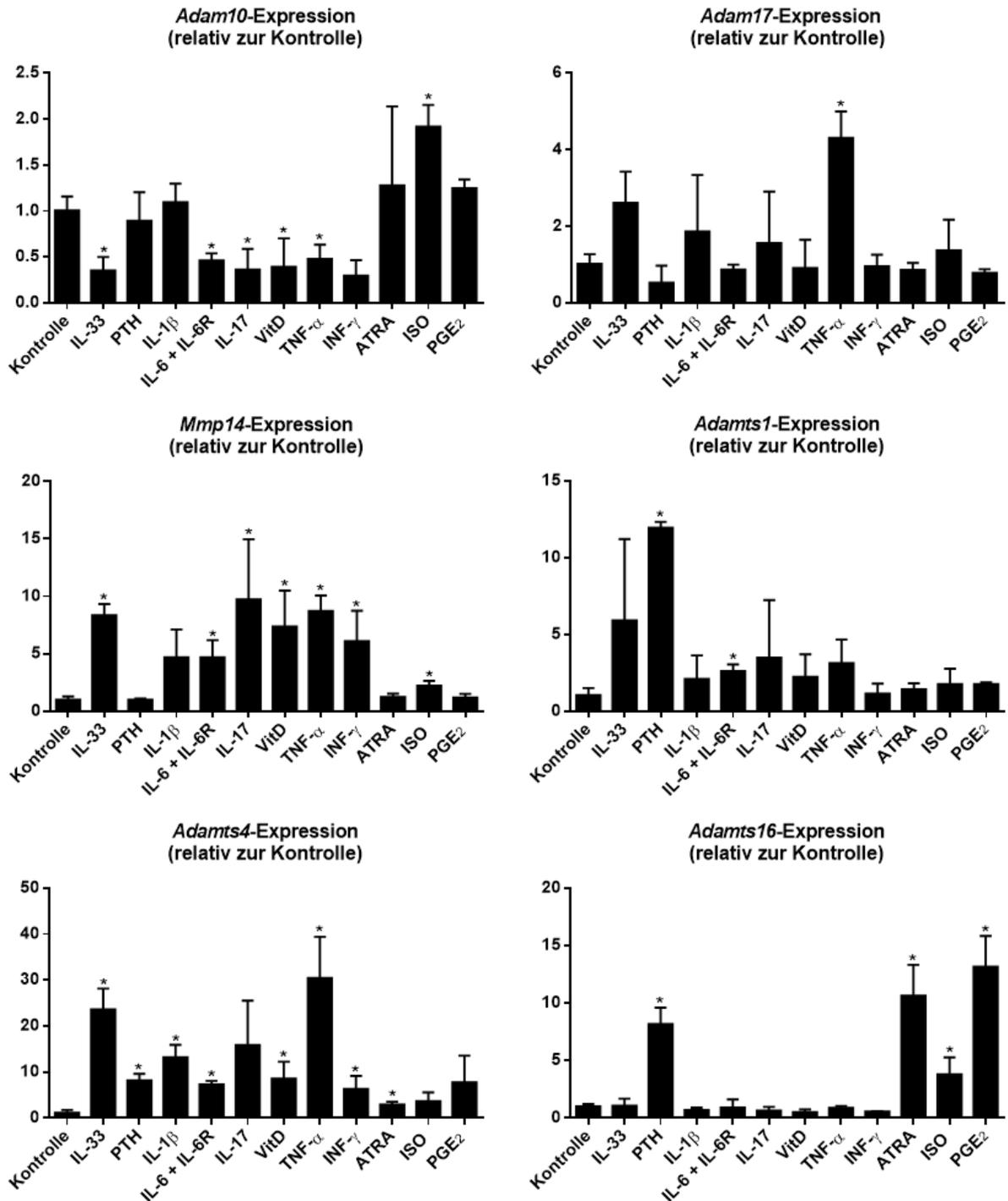


Abbildung 27: Die Protease Adamts1 wird in Osteoblasten sehr spezifisch durch PTH-Stimulation induziert.

Dargestellt ist die relative Genexpression von bekannten bzw. möglichen Rankl-prozessierenden Enzyme in 10 Tage differenzierten primären Osteoblasten bezogen auf die Expression in nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) nach Stimulation mit diversen Faktoren für 6 Stunden. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n = 3$).

Um die Rolle von *Adamts1* in der Rankl-Prozessierung *in vivo* zu untersuchen, wurden Spermien von Mäusen mit einer ubiquitären *Adamts1*-Defizienz in der Australian Phenomics Facility bestellt, um eine *Adamts1*-defiziente Mauskolonie etablieren zu können. Leider konnten bis zum Abschluss dieser Arbeit noch keine Nachkommen generiert werden, so dass die Analyse erst im Anschluss an diese Arbeit erfolgen wird.

5.2 Untersuchung der Kommunikation vom Osteoklasten zum Osteoblasten über die Calcitonin-regulierte Wirkungsweise von S1P und Pate4

Die Wirkung von PTH auf den Knochenstoffwechsel wird über den PTH-Rezeptor auf Osteoblasten, weiter über das Rankl-Rank-Opg-System und schließlich auf die Osteoklasten vermittelt. Der direkte Gegenspieler von PTH, das Hormon Calcitonin, wirkt im Gegensatz dazu über den entgegengesetzten Weg, indem es über den Calcitonin-Rezeptor auf Osteoklasten deren Genexpression beeinflusst, dadurch weniger S1P ausgeschüttet wird und auf diesem Wege die Knochenbildung erniedrigt wird. Da diese bilaterale Kommunikation zwischen den beiden Knochenzellen essentiell für ein geordnetes Knochenremodelling ist, wurde im zweiten Abschnitt dieser Arbeit die Wirkung und Funktion der beiden Calcitonin-regulierten Faktoren S1P und Pate4 im Knochenstoffwechsel untersucht.

5.2.1 *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte embryonale Letalität und eine kurze Lebenszeit

Um die Wirkung und Funktion von S1P im Knochenstoffwechsel näher zu untersuchen und um den Rezeptor zu identifizieren, welcher das S1P-Signal in eine gesteigerte Knochenformation übersetzt, wurden Mäuse mit einer Defizienz der S1P-Lyase (*Sgpl1*^{+/-} bzw. *Sgpl1*^{-/-}), dem S1P-abbauenden Enzym, generiert und mit Mäusen mit einer ubiquitären Defizienz für den Rezeptor *S1pr3* (*S1pr3*^{-/-}) verpaart. Die Genotypisierung der Nachkommen von *Sgpl1*-heterozygoten Elterntieren ergab eine verminderte Geburtenrate der homozygoten *Sgpl1*-defizienten Mäuse, wobei nur ungefähr halb so viele homozygote Mutanten geboren wurden, wie nach einer normalen Verteilung nach Mendel zu erwarten gewesen wäre (Abb.28). Die S1P-Lyase ist somit

nicht essentiell für die Embryogenese, der fehlende Abbau von S1P scheint aber schon in diesem Stadium einen Defekt zu verursachen, dessen Pathologie aber nicht absolut letal verläuft. Die erhöhte embryonale Letalität war dabei unabhängig von einer zusätzlichen Defizienz des Rezeptors S1pr3. Die genaue Charakterisierung des embryonalen Phänotyps der *Sgpl1*-defizienten Mäuse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

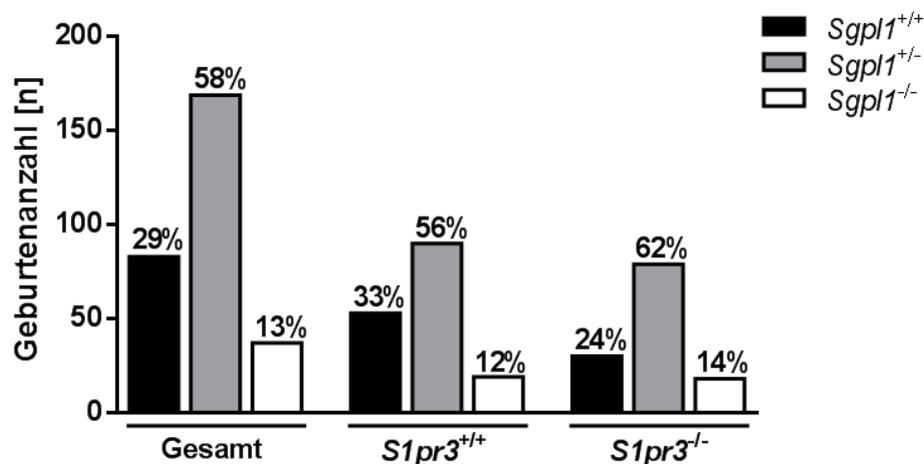


Abbildung 28: *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen eine leicht erhöhte embryonale Letalität, unabhängig von Fehlen des Rezeptors S1pr3. Dargestellt ist die Anzahl und der prozentuale Anteil der, von heterozygoten Elterntieren geborenen, Mäuse ohne (+/+), mit heterozygoten (+/-) und mit homozygoten (-/-) *Sgpl1*-Knockout, sortiert nach ihrer Gesamtzahl (n= 289), mit funktionellen S1pr3 (n=162) und mit einer S1pr3-Defizienz (n=127)

Die geborenen *Sgpl1*-defizienten Mäuse zeigten, einhergehend mit früheren Beschreibungen der Mäuse, eine sehr verkürzte Lebenszeit.^{137,157} Im Gegensatz zu Vogel et al. und Keller et al., mit einer durchschnittliche Lebenserwartung der *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse von 29 Tagen, betrug diese in dieser Arbeit allerdings nur 21 Tage (Abb.29A). Auf Grund dessen wurde entschieden, alle Mäuse an Tag 21 bzw. 3 Wochen nach der Geburt zu analysieren. Es wurden Röntgenaufnahmen der Mäuse angefertigt, sowie das Körpergewicht und die Femurlänge der Tiere bestimmt. Die Mäuse waren schon zu diesem Zeitpunkt wesentlich kleiner und hatten ein signifikant geringeres Gewicht als ihre Wildtyp-Geschwistertiere (Abb.29B-C). Bei der Knochenpräparation der Tiere zeigten sich, wie schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, unterschiedlichste morphologische Auffälligkeiten verschiedener Organe, wie

Läsionen an der Leber, im Magen-Darm-Trakt oder in der Lunge, sowie zum Teil eine Vergrößerung der Milz.^{157,170}

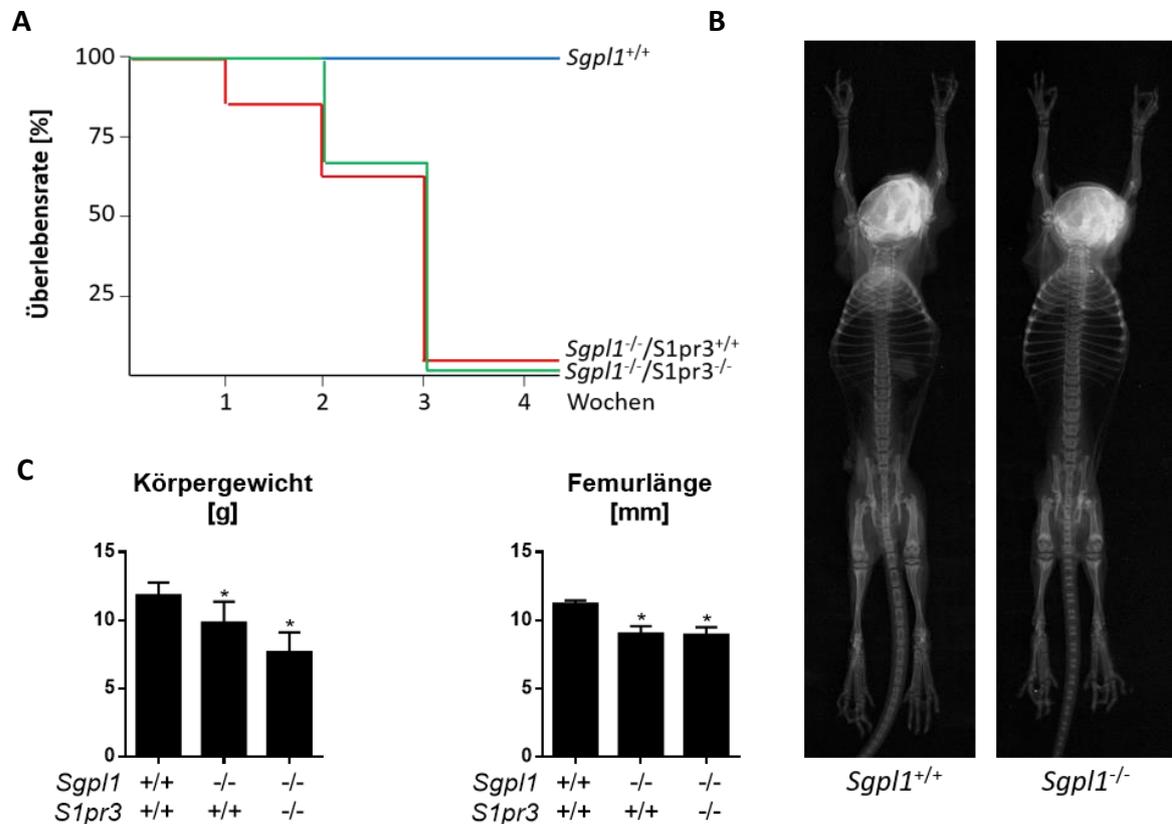


Abbildung 29: Das Lebensalter von *Sgpl1*-defizienten Mäuse ist stark reduziert und sie zeigen im Alter von 3 Wochen ein signifikant verringertes Körpergewicht und Körperlänge. (A) Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate von *Sgpl1*-defizienten Mäusen (rote Linie), *Sgpl1*-defizienten Mäusen mit *S1pr3*-Defizienz (grüne Linie) und ihren Wildtyp-Geschwistertieren (blaue Linie); **(B)** Röntgenbilder von *Sgpl1*-defizienten Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren; **(C)** Körpergewicht in Gramm und Femurlänge in Millimetern von Wildtyp, *Sgpl1*-defizienten und *Sgpl1-S1pr3*-defizienten Mäusen im Alter von 3 Wochen (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$).

5.2.2 Leber und Lunge der *Sgpl1*-defizienten Mäuse zeigen auffällige morphologische Veränderungen

S1P wurde schon zuvor als Fibrose-fördernder Faktor in zahlreichen Geweben, wie Lunge, Niere oder Leber identifiziert.¹⁴¹⁻¹⁴³ Um die morphologischen Veränderungen von Lunge und Leber in den *Sgpl1*-defizienten Mäusen näher zu untersuchen, wurden den Tieren beide Organe entnommen und Paraffinschnitte hergestellt. Da sich fibrotisches Gewebe durch eine pathologische Vermehrung von Bindegewebe und damit einen sehr hohen Anteil an

Kollagenfasern auszeichnet, wurde bei den Gewebeschnitten eine Sirius Red-Färbung vorgenommen, bei der sich Kollagenfasern rot darstellen, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Die Analyse der histologischen Schnitte zeigte sowohl in der Leber als auch in der Lunge der *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse eine starke Zunahme des Kollagenfaseranteils im Vergleich zu den Organen der Wildtyp-Mäuse (Abb.30A-B).

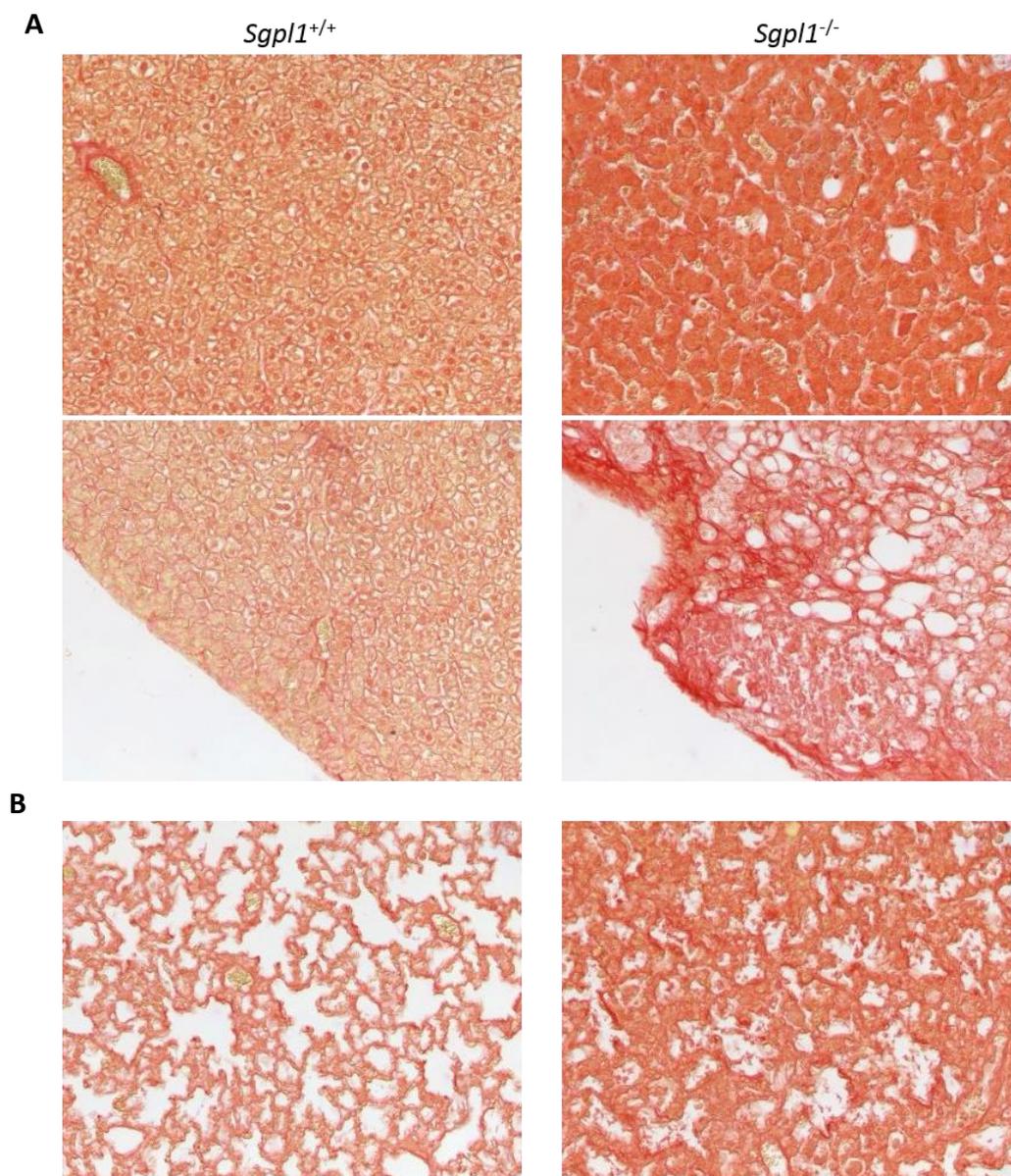


Abbildung 30: *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen starke fibrotische Gewebsveränderungen in Leber und Lunge. Sirius-red gefärbte Paraffinschnitte der Leber (A) und Lunge (B) in 20facher Vergrößerung. In beiden Organen der *Sgpl1*-defizienten Tiere ist eine deutliche Zunahme der Kollagenfasern zu erkennen, die Leber wies außerdem starke Fetteinlagerungen in den Randbereichen des Organs auf.

Es zeigte sich dabei deutlich eine Veränderung in Richtung einer Lungen- und Leberfibrose. Die Leber zeigte außerdem Anzeichen einer starken Fetteinlagerung in den äußeren Rändern des Organs. Da sich diese Arbeit in der Hauptsache auf den Einfluss von S1P auf den Knochen beschäftigt, wurden weitergehende Analysen an anderen Organen nicht vorgenommen.

5.2.3 *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen schon im Alter von 3 Wochen eine stark erhöhte trabekuläre Knochenmasse, unabhängig vom Rezeptor S1pr3

Bei Keller *et al.* konnte gezeigt werden, dass 6 Wochen alte *Sgpl1*-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Knochenmasse aufweisen, während im Alter von 3 Wochen nur eine leichte Tendenz in die Richtung zu erkennen war.¹³⁷ Eine der Fragestellungen dieser Doktorarbeit war, ob S1P diese anabole Wirkung auf den Knochen über den Rezeptor S1pr3 vermittelt oder ob ein anderer S1P-Rezeptor bzw. die Kombination von mehreren für die Übersetzung des S1P-Signals in einen Knochenphänotyp mit hoher Knochenmasse verantwortlich ist. Hierfür wurde ein Mausmodell generiert, welches neben der *Sgpl1*-Defizienz zusätzlich eine Defizienz für den Rezeptor S1pr3 besaß. Da eine Analyse von 6 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen aufgrund der kürzeren Lebenszeit in dieser Arbeit nicht möglich war, wurden die Untersuchungen an 3 Wochen alten Mäusen vorgenommen. Um zu untersuchen, ob eine zusätzliche Defizienz des Rezeptors S1pr3 bei *Sgpl1*-defizienten Mäusen den veränderten Knochenphänotyp korrigieren könnte, wurden von Kossa-Färbungen von histologischen Schnitten der Wirbelkörper von 3 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen, mit und ohne S1pr3-Defizienz, angefertigt und analysiert. Des Weiteren wurden μ CT-Aufnahmen des Femurs der Mäuse angefertigt. Die histomorphometrische Analyse der Wirbelkörper ergab schon in den 3 Wochen alten Mäusen einen ausgeprägten Knochenphänotyp mit einer deutlich veränderten Struktur der Trabekel, sowohl in den *Sgpl1*-defizienten Tieren als auch in den zusätzlich S1pr3-defizienten Tieren (Abb.31A-B). In beiden gentechnisch veränderten Mäuselinien war die Knochenmasse (BV/TV), genauso wie die Anzahl der Trabekel (Tb.N.) signifikant erhöht und der Abstand der Trabekel (Tb.Sp) untereinander signifikant erniedrigt (Abb.31C). Die Trabekeldicke (Tb.Th) war in allen Genotypen unverändert. Die μ CT-Aufnahmen des Femurs bestätigten diese Ergebnisse. Die Annahme, dass die Defizienz des S1pr3 zu einer Korrektur des Knochenphänotyps in den *Sgpl1*-defizienten Mäusen führen könnte, erwies sich in dieser

Analyse als nicht zutreffend, so dass der *S1pr3* als alleiniger und hauptverantwortlicher S1P-Rezeptor im Knochen ausgeschlossen werden konnte.

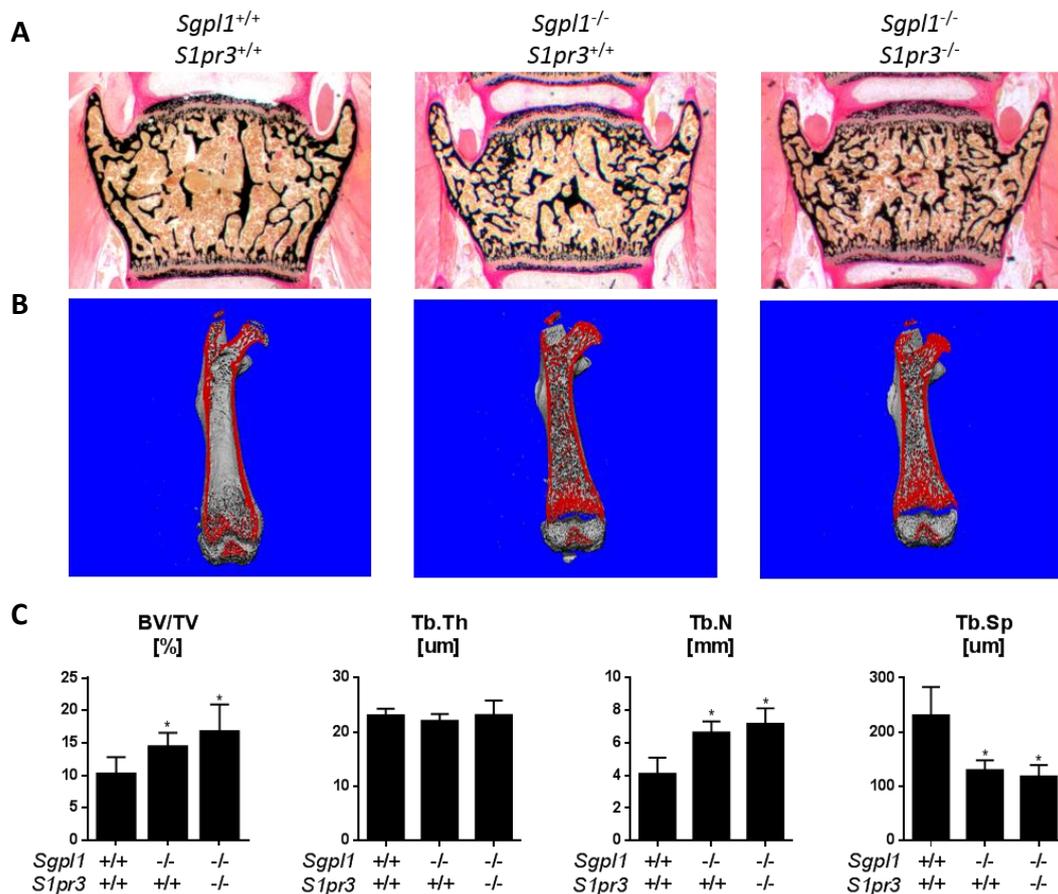


Abbildung 31: *Sgpl1*-defiziente Mäuse haben eine signifikant erhöhte Knochenmasse und Veränderungen in der Trabekelstruktur im Alter von 3 Wochen, unabhängig vom *S1pr3*. (A) von Kossa/van Gieson gefärbte, histologische Schnitte der Wirbelkörper, mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt. (B) μ CT-Aufnahmen des Femurs (C) Quantifizierungsergebnisse des Knochenvolumen pro Gewebevolumen (BV/TV), der Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelanzahl (Tb.N) und dem Trabekelabstand (Tb.Sp), gemessen in den histologischen Schnitten der Wirbelkörper (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$)

Da es allerdings durchaus möglich ist, dass eine Defizienz des *S1pr3* durch einen bzw. mehrere andere S1P-Rezeptoren kompensatorisch ausgeglichen wird, wurde in einem weiteren Schritt die Expression aller fünf S1P-Rezeptoren in Schwanzbiopsien von 3 Wochen alten Wildtyp- und *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit und ohne *S1pr3*-Defizienz untersucht. Hierfür wurde die RNA der Biopsien isoliert, in cDNA translatiert und per qRT-PCR analysiert, um zu überprüfen, ob in den *S1pr3*-defizienten Mäusen die Expression anderer S1P-Rezeptoren induziert war. Mit Ausnahme des

Rezeptoren *S1pr1* zeigten im Ergebnis alle Rezeptoren allerdings eine eher reprimierte Genexpression bei Verlust des *S1pr3*. Die *S1pr1*-Expression blieb Genotyp-abhängig unverändert (Abb.32). Eine kompensatorische Wirkung der anderen Rezeptoren bei *S1pr3*-Defizienz konnte somit nicht bestätigt werden.

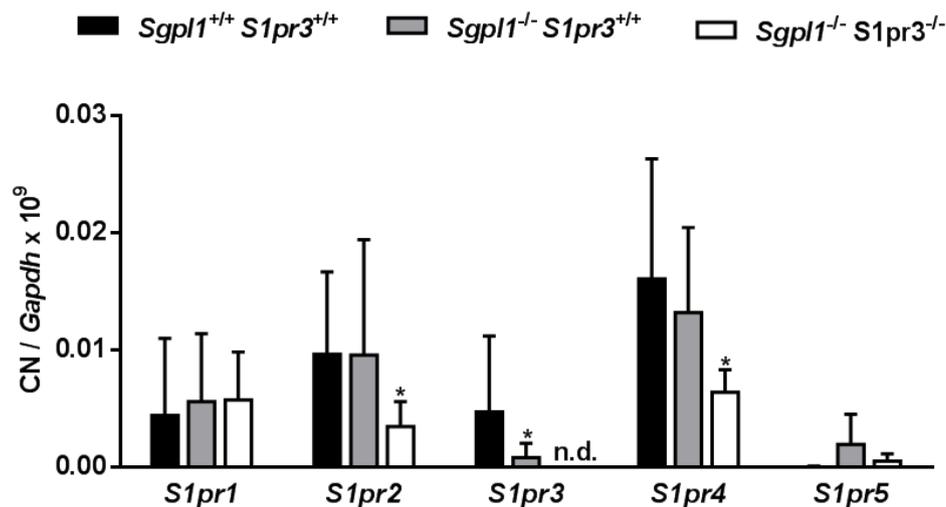


Abbildung 32: Die Defizienz des *S1pr3* führt zu keinem kompensatorischen Effekt bei den anderen vier S1P-Rezeptoren. Dargestellt ist die Anzahl der Kopien der fünf S1P-Rezeptor-Transkripte in 3 Wochen alten Wildtyp- und *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit und ohne *S1pr3*-Defizienz, bezogen auf die Expression des Haushaltgens *Gapdh* (**p* < 0,05 im t-Test, *n* = 3)

5.2.4 Die Knochenzellen von *Sgpl1*-defizienten Mäuse zeigen veränderte morphologische Eigenschaften

Um die Knochenzellen im Einzelnen eingehender zu analysieren, wurden Toluidinblau-Färbungen von histologischen Schnitten der Wirbelkörper von 3 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen, mit und ohne *S1pr3*-Defizienz, erstellt und ausgewertet. Die Anzahl der Osteoklasten war in den *Sgpl1*-defizienten Mäusen signifikant erhöht, während die Anzahl der Osteoblasten und Osteozyten nicht verändert war (Abb.33B). Die analysierten Zellen ähnelten in ihren morphologischen Veränderungen sehr stark den Knochenzellen, die schon von Vogel *et al.* beschrieben wurden (Abb.33A).¹⁵⁷ Die Osteoklasten waren erheblich vergrößert und schienen teilweise nicht mehr flach auf der Knochenoberfläche aufzuliegen. Die Morphologie der Osteoblasten zeigte sich ebenfalls leicht verändert. Im Gegensatz zu den Osteoblasten der

Wildtyp-Geschwistertiere waren sie leicht vergrößert und an vielen Stellen nicht mehr aufgereiht, sondern eher ungeordnet auf der Knochenoberfläche angesiedelt. Es zeigten sich Anzeichen einer erhöhten Aktivität der Osteoblasten, histologisch erkennbar durch einen verwischten Saum zur Knochenoberfläche hin.

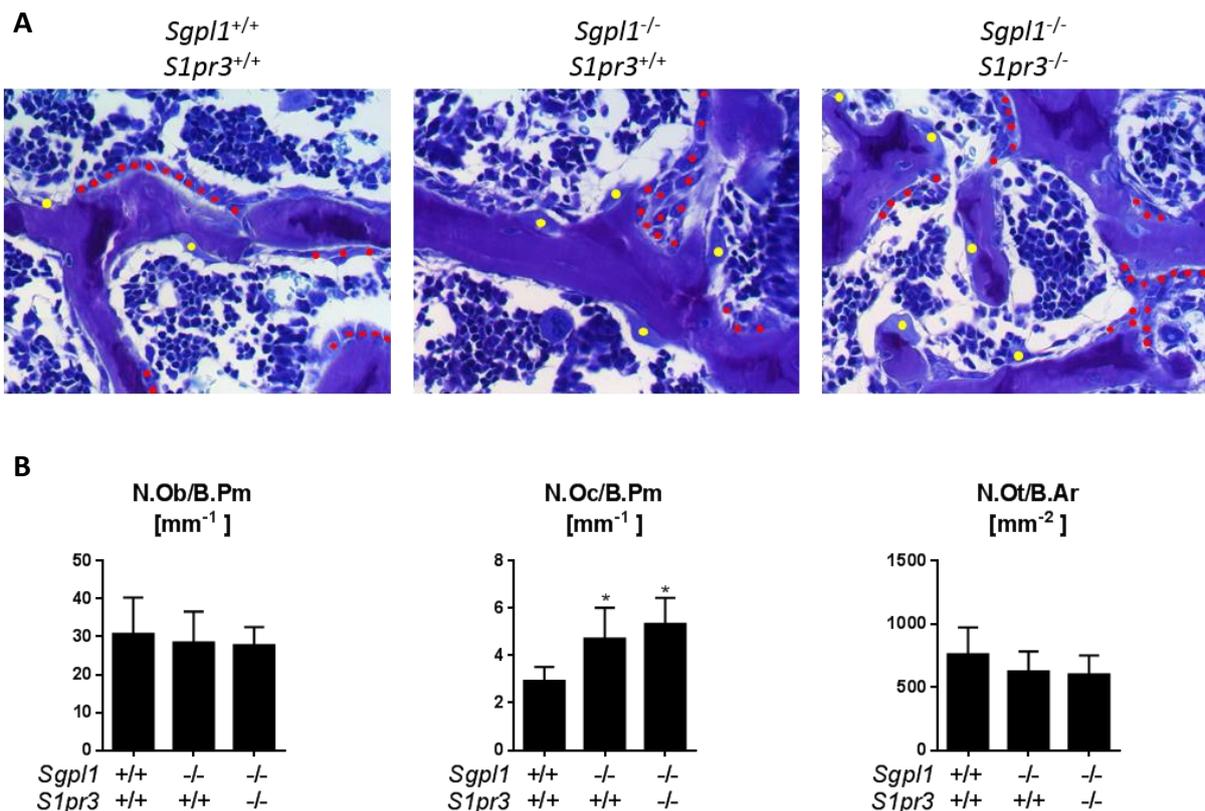


Abbildung 33: *Sgpl1*-defiziente Mäuse zeigen starke morphologische Veränderungen in Osteoblasten und Osteoklasten, unabhängig von einer Defizienz des *S1pr3*-Rezeptors. (A) Ausschnitt von Toulidinblau gefärbten, histologischen Schnitten der Wirbelkörper, nicht-mineralisierter Knochen ist dunkler gefärbt, Osteoblasten (rote Punkte) und Osteoklasten (gelbe Punkte) sind gekennzeichnet (B) Anzahl der Osteoblasten (N.Ob.) und Osteoklasten (N.Oc.) pro Knochenparameter (*bone parameter*, B.Pm) und Anzahl der Osteozyten (N.Ot) pro Knochenfläche (*bone area*, B.Ar) (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$)

5.2.5 CTX, PINP und PICP deuten auf einen hohen Knochenumsatz hin

Vogel *et al.* postulierten in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen einen osteopetrotischen Knochenphänotyp aufgrund von fehlerhaften, in ihrer Funktion gestörten, Osteoklasten.¹⁵⁷ Im Gegensatz dazu konnte man bei Keller *et al.* zeigen, dass die *Sgpl1*-defizienten Mäuse funktionell aktive Osteoklasten besitzen, was sich in einer ebenfalls erhöhten Osteoklastenzahl, einhergehend

mit einer signifikant erhöhten Konzentration des Kollagenabbaumarkers CTX, bemerkbar machte.¹³⁷ Zusammen mit der erhöhten Konzentration des Kollagensyntheseprodukts PICP im Serum der Tiere wurde daraus auf einen Knochenphänotyp mit erhöhten Knochenumsatz (*high bone turnover*) geschlossen. Um diese beiden Thesen in 3 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen zu überprüfen, wurden zunächst die Serumkonzentrationen der Knochenmarker CTX, PINP und PICP in den Mäusen per ELISA bestimmt.

Die Konzentration aller drei Knochenumsatzmarker war im Serum der *Sgpl1*-defizienten Mäuse signifikant erhöht, die Analyse der drei Wochen alten Mäuse bestätigte also die Ergebnisse von Keller *et al.* und den *high bone turnover*-Knochenphänotyp (Abb.34). Die Konzentration des Knochenabbaumarkers CTX war dabei unabhängig von einer *S1pr3*-Defizienz signifikant in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen erhöht. Obwohl die beiden Knochen- und Gewebeaufbaumarker PINP und PICP äquivalent in der Kollagen-I-Synthese als Propeptid von der N- und C-terminalen Seite der Kollagen-I-Vorstufe abgespalten werden, zeigten sie in ihrer Serumkonzentration sowohl untereinander als auch zwischen den verschiedenen Genotypen zum Teil deutliche Unterschiede auf. So war die Konzentration von PINP generell deutlich geringer als die PICP-Konzentration. Zusätzlich war die Serumkonzentration von PINP in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit funktionsfähigen *S1pr3* wesentlich höher als in den Mäusen mit *S1pr3*-Defizienz.

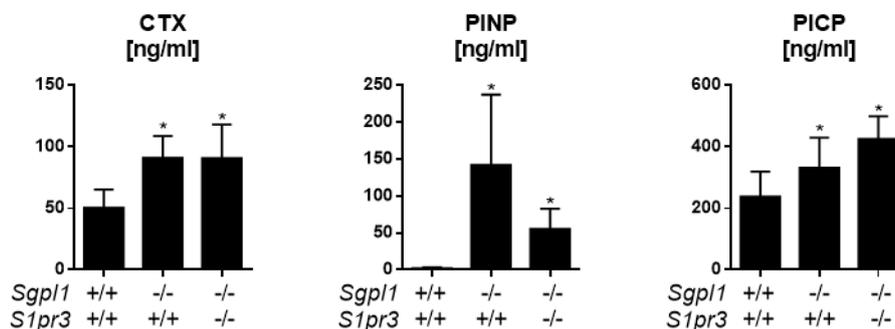


Abbildung 34: Die signifikant erhöhten Knochenauf- und abbaumarker bestätigen den *high bone turnover* Knochenphänotyp. Dargestellt ist die Konzentration von β -Crosslaps (CTX), Prokollagen Typ I N-Propeptid (PINP) und Prokollagen Typ I C-Propeptid (PICP) in 3 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit und ohne *S1pr3*-Defizienz und den Wildtyp-Geschwistertieren. (* $p < 0,05$ im t-Test, $n > 5$)

5.2.6 Das Verhältnis von Rankl/Opg im Serum der *Sgpl1*-defizienten Mäuse spricht für eine reprimierte Osteoklastogenese

Neben der CTX-Konzentration ist das Konzentrationsverhältnis des pro-osteoklastogenen Faktors Rankl und dessen Antagonisten Opg im Serum ein weiterer Indikator für die Osteoklastenaktivität bzw. das Ausmaß der Osteoklastogenese. Eine höhere Ratio spricht dabei für eine induzierte und eine niedrigere Ratio für eine reprimierte Osteoklastogenese.^{171,172} Hierfür wurde die Konzentration von Rankl und Opg im Serum der *Sgpl1*^{-/-}-defizienten Tiere, mit und ohne *S1pr3*-Defizienz im Vergleich zu deren Wildtyp-Geschwistertieren per ELISA bestimmt.

Bei den *Sgpl1*-defizienten Mäusen konnte, unabhängig von einer *S1pr3*-Defizienz, eine signifikant geringere Konzentration an Rankl und eine signifikant höhere Konzentration an Opg im Serum der Mäuse bestimmt werden (Abb.35). Das ermittelte Verhältnis der beiden Faktoren war somit bei den gentechnisch veränderten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren signifikant reduziert, ein Ergebnis was eher für eine reprimierte Osteoklastogenese in den Tieren sprechen würde und der signifikant erhöhten Konzentration an CTX und der erhöhten Anzahl an Osteoklasten in den Mäusen entgegensteht.

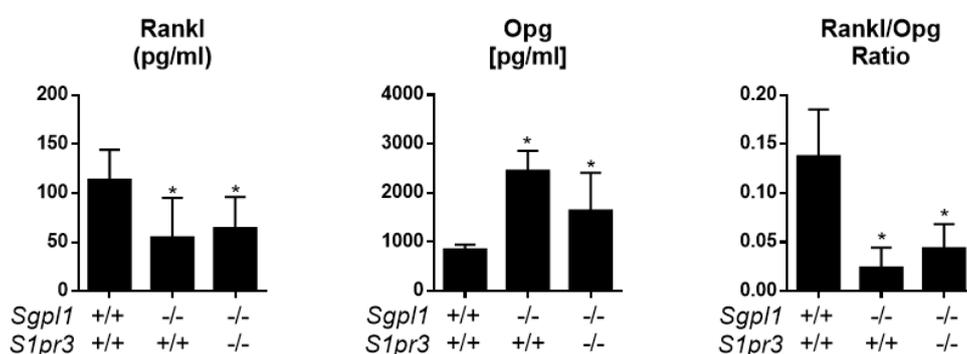


Abbildung 35: Die *Sgpl1*-defizienten Mäuse zeigen eine reduzierte Rankl/Opg-Ratio. Dargestellt ist die Konzentration von Rankl und Opg im Serum von 3 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit und ohne *S1pr3*-Defizienz und den Wildtyp-Geschwistertieren. (*p < 0,05 im t-Test, n > 5)

5.2.7 S1P-stimulierte primäre Osteoblasten zeigen eine starke Induktion von Genen, die die Osteoblastendifferenzierung und –formation fördern

Da die Analyse des Effektes von S1P auf die gemessenen Serumparameter sich sehr schwierig gestaltete, wurde in dieser Arbeit im Anschluss versucht, einer Erklärung für den Knochenmasse-aufbauenden Effekt von S1P näher zu kommen. Hierfür wurden in einem nächsten Versuch wiederum primäre Wildtyp-Osteoblasten direkt mit S1P stimuliert, um eine genomweite Expressionsanalyse der Zellen zu erstellen. Primäre Osteoblasten aus 3-5 Tage alten C57/BL6-Wildtyp-Mäusen wurden generiert, 10 Tage differenziert und für 6 Stunden mit 1 μ M S1P stimuliert. Die RNA der Zellen (n=3) wurde extrahiert und hiermit eine Affymetrix-Genchip-Analyse durchgeführt. Durch den Vergleich der Expressionsmuster von unstimulierten und S1P-stimulierten Osteoblasten wurde eine Rangliste mit den 15 am stärksten regulierten Genen erstellt (Tab.5). In der Liste konnten drei Gene identifiziert werden, die eine Erklärung für die gesteigerte Osteoblastenaktivität und den damit einhergehenden Knochenmassegewinn geben könnten.

	Induziertes Gen	SLR	Reprimiertes Gen	SLR
1	<i>Rbbp4</i>	6,50	<i>Zwilch</i>	-6,00
2	<i>C1qtnf1</i>	5,80	<i>9630021D06Rik</i>	-5,70
3	<i>F2r</i>	5,40	<i>Bet1l</i>	-5,70
4	<i>Mtor</i>	5,30	<i>AU015581</i>	-5,40
5	<i>Mgll</i>	5,30	<i>Malat1</i>	-5,40
6	---	5,10	<i>Lhx2</i>	-5,40
7	<i>Prkag1</i>	5,00	<i>Zfp618</i>	-5,30
8	<i>Zwint</i>	4,80	<i>Ptprz1</i>	-5,30
9	<i>Matr3</i>	4,60	---	-5,20
10	<i>Crispld2</i>	4,60	<i>Uchl3 /// Uchl4</i>	-4,90
11	<i>Fosl2</i>	4,40	<i>Cpsf3</i>	-4,70
12	<i>Tmed2</i>	4,30	<i>Tubb2b</i>	-4,60
13	<i>Hmgb2</i>	4,20	<i>Cdh4</i>	-4,40
14	<i>Cmc2</i>	4,00	<i>Cbr3</i>	-4,40
15	<i>Ugp2</i>	4,00	<i>Gcnt2</i>	-4,30

Tabelle 12: Rangliste der am stärksten induzierten und reprimierten Gene in primären Osteoblasten nach 6 Stunden Stimulation mit S1P. Angegeben ist das logarithmische Signalverhältnisse (SLR) zwischen nicht stimulierten und stimulierten Proben. Gezeigt sind alle Gene, deren mittlerer SLR-Wert über 4.0 bzw. unter - 4.0 lag.

Die beiden S1P-induzierten Gene *Mtor* (*mechanistic target of Rapamycin*) und *Fosl2* (*Fos-related antigen 2*) kodieren dabei beide für Proteine, welche das Zellwachstum, die Zellproliferation und -motilität und die Proteinbiosynthese von Zellen induzieren.^{173,174} Ein eher Proliferations-hemmendes Protein ist die Tyrosin-Phosphatase Rptp ζ (*Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta*), welche durch das Gen *Ptprz1* (*Protein tyrosine phosphatase receptor-type Z polypeptide 1*) kodiert wird. *Ptprz1* zeigte sich im Array stark durch S1P in Osteoblasten reprimiert, was ein deutliches Anzeichen für die osteoanabole Wirkung von S1P sein könnte.

Um die Expression der relevanten S1P-regulierten Gene zu validieren, wurden erneut primäre Osteoblasten von Wildtyp-Mäusen generiert, 10 Tage differenziert und für 6 Stunden mit 1 μ M S1P stimuliert. Die RNA der Zellen wurde extrahiert, in cDNA translatiert und per qRT-PCR die Expression von *Mtor*, *Fosl2* und *Ptprz1* im Vergleich zu unstimulierten Osteoblasten analysiert. Hierbei konnte eine S1P-abhängige Induktion von *Fosl2* und *Mtor* in Osteoblasten nicht bestätigt werden, während sich *Ptprz1* weiterhin signifikant negativ reguliert zeigte (Abb.36A). Um zu untersuchen, ob der Knochenphänotyp der *Sgpl1*-defizienten Mäuse mit einer Regulation der identifizierten Gene in den Osteoblasten der Tiere erklärbar sein könnte, wurden primäre Osteoblasten aus Schädeldächern von 3 bis 5 Tage alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren generiert, differenziert und an Tag 10 der Differenzierung die RNA der Zellen isoliert. Die RNA wurde in cDNA translatiert und die Expression der Gene per qRT-PCR analysiert. Bei dieser Expressionsanalyse konnte festgestellt werden, dass in den Osteoblasten der *Sgpl1*-defizienten Tiere die Gene *Fosl2* und *Mtor* nicht signifikant reguliert waren. *Ptprz1* hingegen zeigte in den transgenen Tieren ebenfalls eine signifikante Repression der Genexpression (Abb.36B). Durch die negative Regulation der Tyrosin-Phosphatase Rptp ζ , welche im Knochen eine anti-proliferative Wirkung auf Osteoblasten ausüben kann, könnte die osteoanabole Wirkung von S1P auf Osteoblasten und die erhöhte Knochenmasse in der *Sgpl1*-defizienten Tieren erklärt werden.

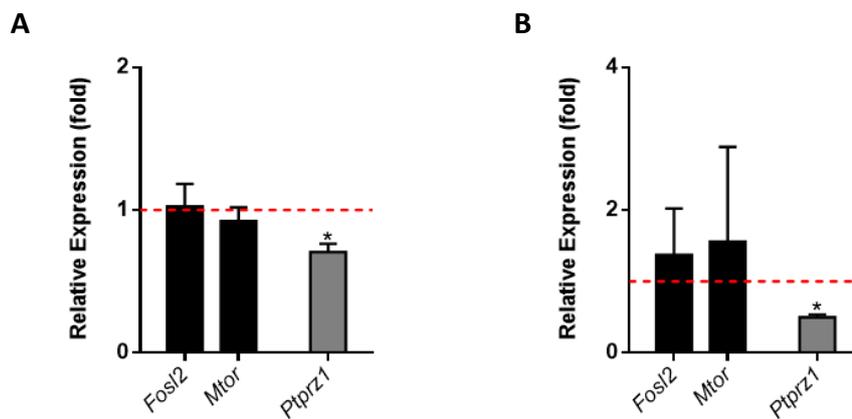


Abbildung 36: Die S1P-abhängige negativ regulierte Genexpression von *Ptpnz1* in den Osteoblasten könnte die osteoanabole Wirkung von S1P auf Osteoblasten und die erhöhte Knochenmasse in der *Sgp11*-defizienten Tieren erklären. (A) Dargestellt ist die relative Genexpression von *Fosl2*, *Mtor* und *Ptpnz1* in 10 Tage differenzierten, primären Wildtyp-Osteoblasten, die für 6 Stunden mit 1 μ M S1P stimuliert wurden, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (rote Linie). (B) Dargestellt ist die relative Genexpression von *Fosl2*, *Mtor* und *Ptpnz1* in 10 Tage differenzierten, primären Osteoblasten, welche aus *Sgp11*-defizienten 3-5 Tage alten Mäusen generiert wurden, im Vergleich zu primären Wildtyp-Osteoblasten (rote Linie) (*p < 0,05 im t-Test, n = 3).

5.2.8 *Pate4*-defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp

Pate4 wurde in Osteoklasten ebenfalls als ein durch CT negativ reguliertes Gen identifiziert. Da *Pate4* für ein sekretiertes Protein kodiert, war es ein guter Kandidat für eine Signalübertragung zwischen Osteoklasten und Osteoblasten.¹³⁷ Um die Wirkung und Funktion des Proteins *Pate4* im Organismus und im speziellen auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen, wurden *Pate4*-defiziente Mäuse generiert. Der Nachwuchs wurde mit Wildtyp- und Mutanten-spezifischen Primern genotypisiert, die transgenen Nachkommen zeigten dabei eine normale Geburtenverteilung nach dem Mendelschen Verhältnis (Abb.37). Im Alter von 24 Wochen zeigten die *Pate4*-defizienten Mäuse keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen bzw. offensichtlichen morphologischen oder verhaltensauffällige Unterschiede zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren. Eine essentielle Funktion von *Pate4* für die Entwicklung und Organogenese der Tiere konnte hiermit ausgeschlossen werden, es blieb also die Frage, ob die Defizienz des CT-regulierten *Pate4* einen Einfluss auf den Knochenumbau zeigen würde.

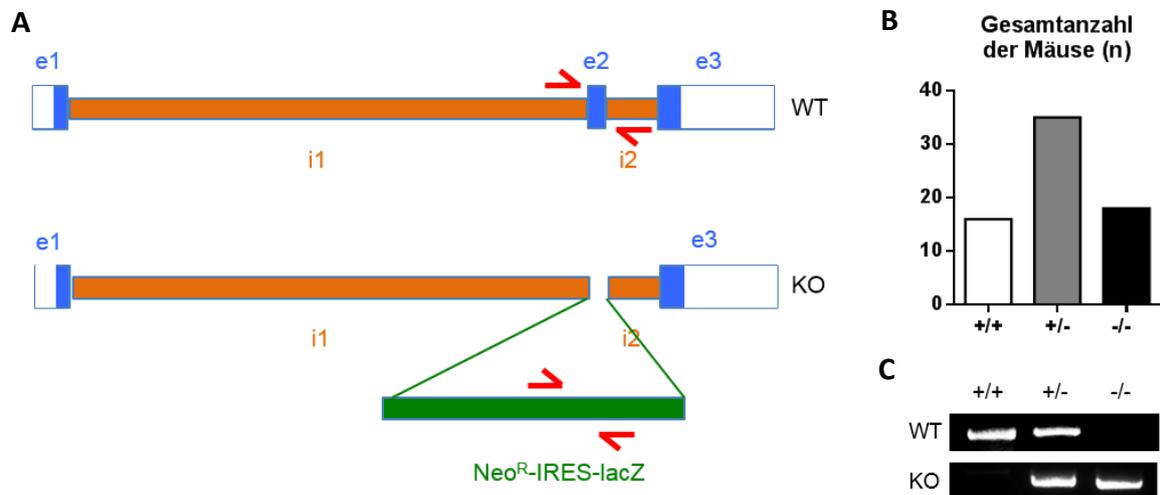


Abbildung 37: *Pate4*^{+/+}, *Pate4*^{+/-} und *Pate4*^{-/-}-Mäuse wurden im korrekten Verhältnis nach Mendel geboren. (A) Schematische Darstellung des *Pate4*-Locus in Wildtyp (WT) und *Pate4*-defizienten (KO) Mäusen. Die Primer-Bindungsstellen sind rot markiert. (B) Dargestellt ist die Gesamtanzahl der geborenen Mäuse aus der Verpaarung von heterozygoten *Pate4*^{+/-}-Mäusen. (C) RT-PCR mit spezifischen Primern für das Wildtyp- und mutanten Allel.

5.2.9 *Pate4*-defiziente Mäuse haben keinen veränderten Knochenphänotyp

Im nächsten Schritt wurden die Skelette von 24 Wochen alten männlichen und weiblichen *Pate4*-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren histologisch untersucht. Die Röntgenaufnahmen, Körperlänge und Gewicht der Tiere, als auch die Analyse der histologischen Schnitte der Wirbelkörper zeigten hierbei keine Genotyp-abhängigen Veränderungen in den Tieren (Abb.38A-B). Dies konnte durch die histomorphometrische Quantifizierung des trabekulären Knochenvolumens und der Knochenformationsrate bestätigt werden (Abb.38C-D). Zusammengefasst hatte eine Defizienz von *Pate4* keine Auswirkungen auf den Knochenumbau in den Tieren.

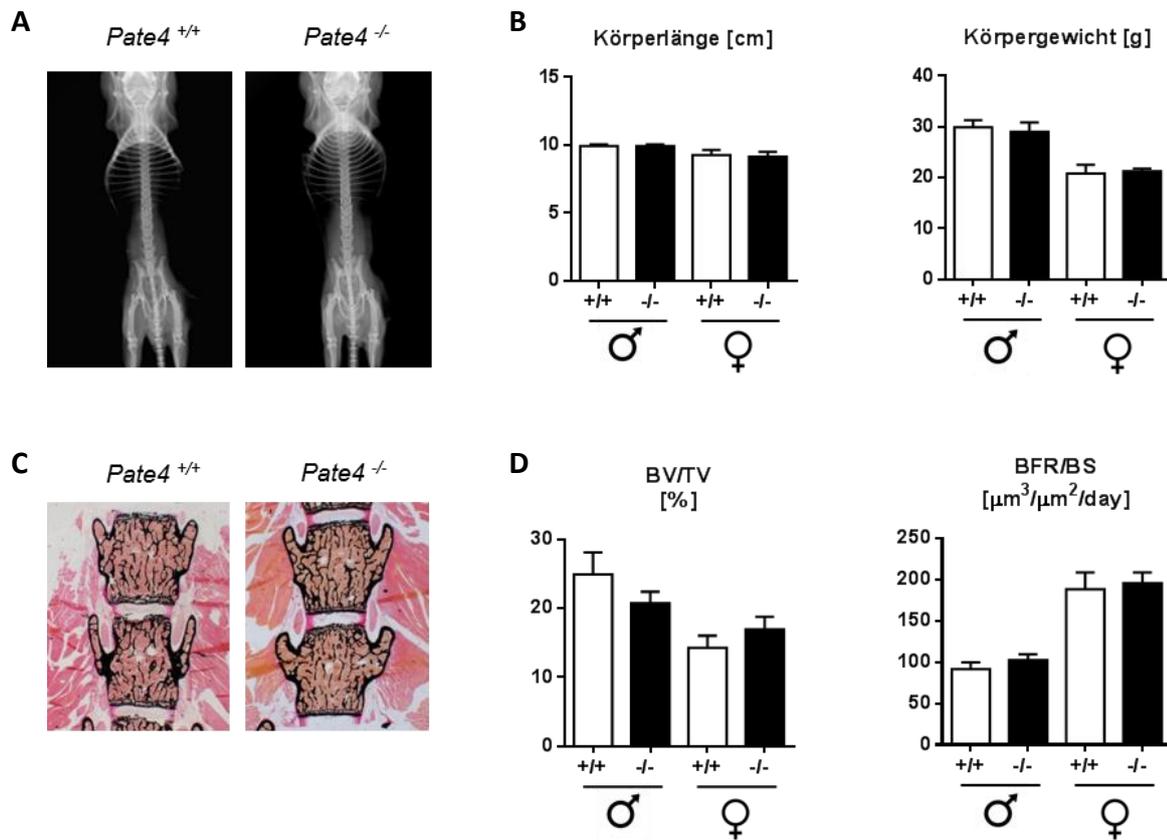


Abbildung 38: *Pate4*-defiziente Mäuse haben keinen veränderten Knochenphänotyp. (A) Repräsentative Röntgenaufnahme einer 24 Wochen alten *Pate4*-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihrem Wildtyp-Geschwistertier. (B) Quantifizierte Körperlänge und Körpergewicht von männlichen und weiblichen Wildtyp und *Pate4*-defizienten Mäusen im Alter von 24 Wochen ($n > 4$) (C) von Kossa/van Gieson gefärbte, histologische Schnitte der Wirbelkörper, mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt. (D) Knochenvolumen pro Gewebevolumen (BV/TV) und Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche (BFR/BS), gemessen im Wirbelkörper ($n > 4$)

5.2.10 *Pate4* wird spezifisch in der Prostata und Samenblase exprimiert

Da *Pate4* keinen Effekt auf den Knochenumbau zeigte, wurde nun zunächst untersucht, ob *Pate4* im Vergleich zur schwachen Expression in Osteoklasten, noch in anderen Organen exprimiert wurde. Hierfür wurden 12 Wochen alten Wildtyp- und *Pate4*-defizienten Mäusen diverse Organe entnommen, die RNA der Organe isoliert und in cDNA translatiert. Die Expression von *Pate4* wurde im Anschluss per qRT-PCR bestimmt. Hierbei konnte eine sehr spezifische Expression von *Pate4* in Prostata und Samenblase der Wildtyp-Mäuse festgestellt werden, während in den restlichen Organen, Wirbel und Femur eingeschlossen, keine *Pate4*-

Transkripte detektiert werden konnten (Abb.39A). Da bei der Generierung der *Pate4*-defizienten Mäuse ein LacZ-Reporter gen insertiert wurde, konnte mithilfe einer X-Gal Färbung in der Samenblase von *Pate4*^{+/-}- und *Pate4*^{-/-}-Mäusen die starke transkriptionelle Aktivierung der β -Galaktosidase und die damit lokalisierte Inaktivierung des *Pate4*-Gens nachgewiesen werden (Abb.39B).

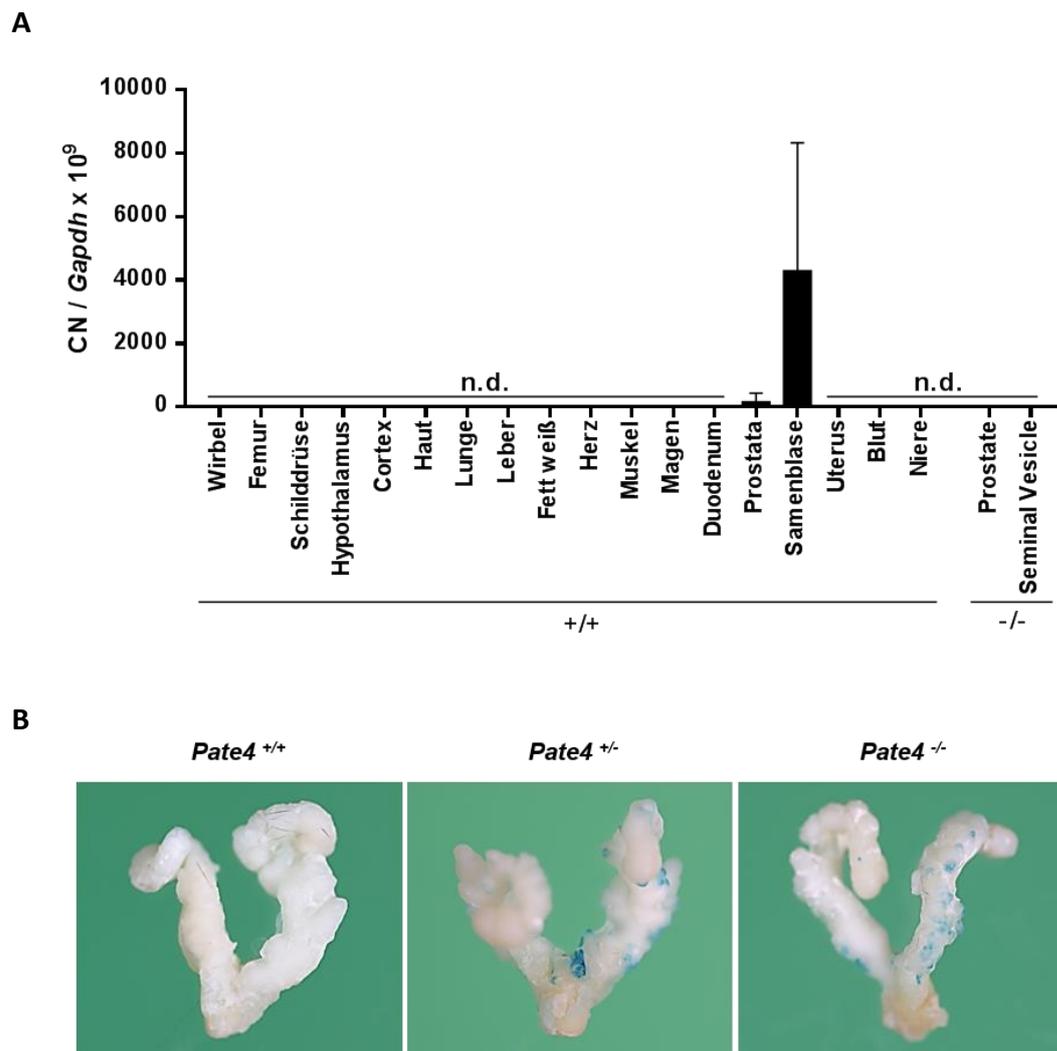


Abbildung 39: *Pate4* wird nicht im Knochen, aber sehr spezifisch in Prostata und Samenblase exprimiert.

(A) Dargestellt ist die Kopienzahl der *Pate4*-Transkripte in den einzelnen Organen, bezogen auf die Expression des Haushaltsgens *Gapdh*; (B) X-Gal-Färbung der Samenblase von *Pate4*^{+/+}, *Pate4*^{+/-}- und *Pate4*^{-/-}-Mäusen; blaue Bereiche zeigen die Expression der β -Galaktosidase und damit einhergehende Inaktivierung der *Pate4*-Gens.

5.2.11 Eine Defizienz von *Pate4* beeinträchtigt nicht die männliche Fertilität

Die bisherige Analyse der transgenen Mäuse zeigte, dass *Pate4* sehr spezifisch in den Zellen des Urogenitaltrakts exprimiert wird, weshalb es nun wichtig war die funktionellen Konsequenzen einer Defizienz von *Pate4* in diesen Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst die Samenblase inklusive der Prostata der Mäuse entnommen und gewogen, das Gewicht beider Organe war allerdings in allen Genotypen unverändert (Abb.40A). Es wurden von der Mauspathologie Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von beiden Organen und den Testikeln der Mäuse histologische Paraffinschnitte angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Die Untersuchung der Schnitte zeigte weder in Samenblase und Prostata, noch in den Testikeln erkennbare Pathologien aufgrund der *Pate4*-Defizienz (Abb.40B-D). Des Weiteren wurde von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf die Anzahl und Motilität der Spermien mithilfe eines Sperma Analysators *in vitro* überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass die Spermienanzahl der *Pate4*-defizienten Mäuse keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren aufwies. Allerdings war der Anteil der motilen Spermien, sowie der Anteil der progressiv motilen Spermien signifikant erhöht (Abb.40E). Um herauszufinden, ob sich die gesteigerte Motilität auch in einer erhöhten Fertilität der Mäuse widerspiegelte, wurden männliche *Pate4*^{+/+}, *Pate4*^{+/-} und *Pate4*^{-/-}-Mäuse mit weiblichen Wildtyp-Mäusen verpaart. Es konnten allerdings keine Genotyp-abhängigen Unterschiede in der Fertilität und Wurfgröße der Mäuse festgestellt werden, so dass eine essentielle Bedeutung von *Pate4* für die Fertilität der Mäuse ausgeschlossen werden kann.

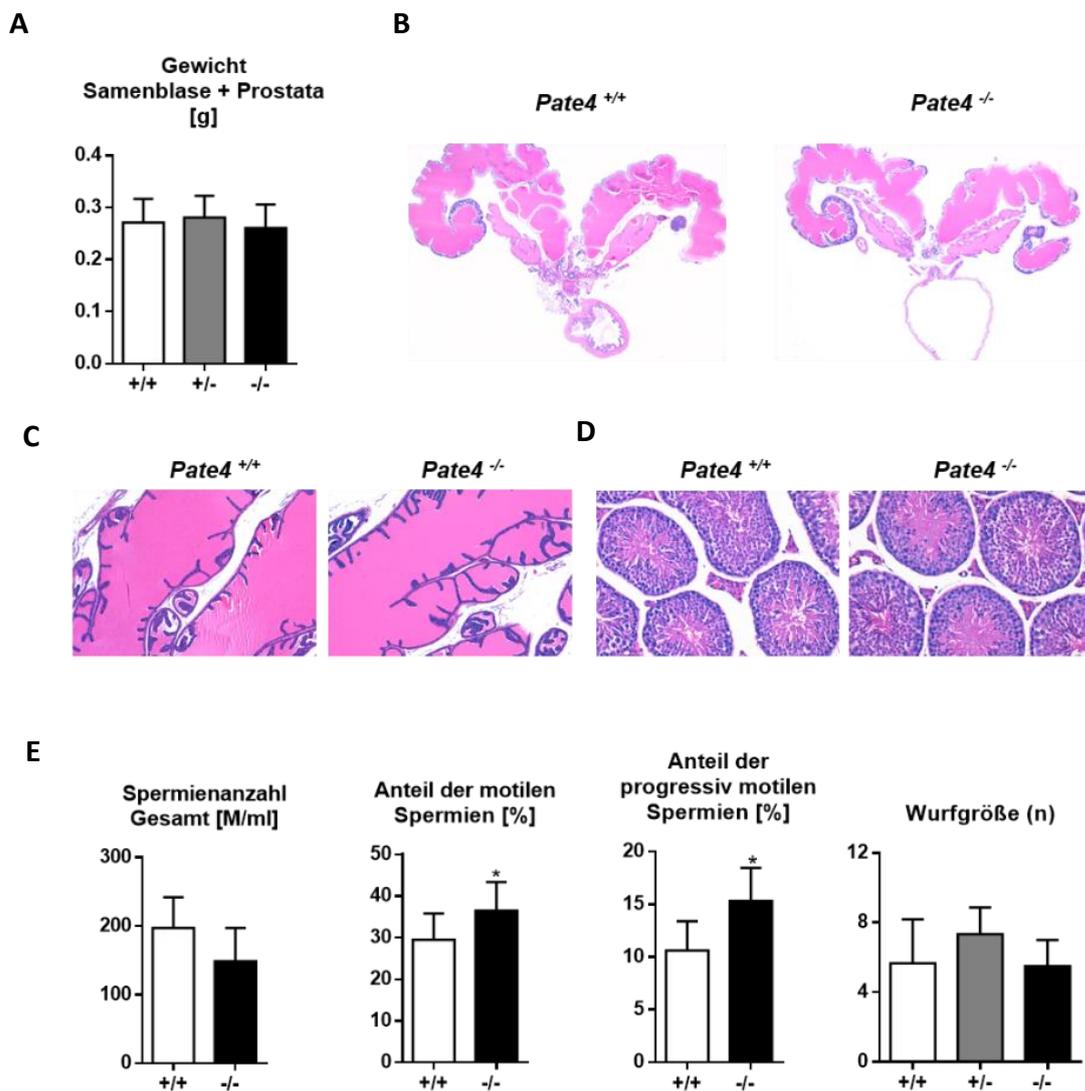


Abbildung 40: Die Defizienz von *Pate4* hat keine pathologischen Auswirkungen auf die Morphologie und Fertilität der Mäuse. (A) Gewicht der Samenblase inklusive Prostata von *Pate4*^{+/+} und *Pate4*^{-/-}-Mäuse; (B, C, D) HE-gefärbte Paraffinschnitte der Samenblase (B), Prostata (C) und Testis (D) der *Pate4*^{+/+} und *Pate4*^{-/-}-Mäuse; (E) Gesamtanzahl der Spermien, Anteil der motilen und progressiv motilen Spermien und die Wurfgröße von *Pate4*^{+/+} und *Pate4*^{-/-}-Mäusen (*p < 0,05 im t-Test, n > 4)

6. Diskussion

6.1 Die Rankl-vermittelte Kommunikation von Osteoblasten zu Osteoklasten

Rankl existiert im Organismus in 2 verschiedenen Varianten, einmal als komplettes transmembranes Protein und zum Zweiten als die lösliche Form sRankl, welcher die intrazelluläre und transmembrane Domäne fehlt.⁹¹ Die pro-osteoklastogene Wirkung von sRankl ist unbestritten, ist es doch gängige Praxis in Zellkulturexperimenten mithilfe des Faktors sRankl die Differenzierung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen voranzutreiben. Diese Wirkung von sRankl konnte *in vivo* bestätigt werden, da sowohl die Injektion von sRankl über einen längeren Zeitraum in Mäuse als auch die Überexpression von sRankl in transgenen Mäusen einen stark osteoporotischen Knochenphänotyp hervorruft.^{11,99,175} Während die physiologische Funktion von Rankl als Osteoklastogenese- und Knochenabbau-fördernder Faktor in der Knochenforschung allgemein anerkannt ist, sind die Funktion und der Mechanismus der Rankl-Prozessierung noch nicht eindeutig geklärt. So kamen einige Studien zu dem Ergebnis, dass die vollständige transmembrane Form von Rankl die Osteoklastogenese *in vitro* effektiver als sRankl induziert, woraus gefolgert wurde, dass die Aktivität von Rankl eigentlich durch dessen Prozessierung inhibiert wird.^{93,176-178} Die Annahme, dass die vollständige, transmembrane Form von Rankl im Gegensatz zur löslichen Form, die physiologisch aktivere ist, ist allerdings umstritten, da diese These einen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Osteoblasten und Osteoklasten erforderlich macht, welcher *in vivo* in den meisten Fällen nicht gegeben ist. In jedem Fall ist es aber aufgrund der Bedeutung des Rankl-Rank-Opg-Systems für die Knochenforschung wichtig, die molekularen Mechanismen hinter der Freisetzung von sRankl vom Osteoblasten besser zu verstehen. Schon in der vorangegangenen Masterarbeit konnte festgestellt werden, dass nicht nur bekanntermaßen die Expression des Rankl-Gens *Tnfrsf11* durch das Hormon PTH induziert wird, sondern auch die Freisetzung von sRankl durch das Hormon PTH hervorgerufen wird.¹⁶⁴ PTH ist in diesem Zusammenhang deshalb interessant, da es neben der osteokatabolen Wirkung beim Freisetzen des Kalziums aus dem Knochen, ebenfalls eine osteoanabole Wirkung nach intermittierender Gabe zeigt, eine Funktion die man sich pharmakologisch in der Osteoporose-Therapie zu Nutze macht.⁶⁸⁻⁷¹

In ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die proteolytische Abspaltung von Rankl für das Knochen-Remodelling *in vivo* relevant sein könnte und ob die PTH-vermittelte Freisetzung von sRankl eine Identifizierung von beteiligten Rankl-Sheddases ermöglicht und sich auch in transgenen Tieren verifizieren lässt.

Der sRankl-freisetzende Effekt von PTH auf Osteoblasten konnte in dieser Arbeit sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden bestätigt werden. Da sowohl in der Maus als auch im Menschen bisher 3 Isoformen von Rankl identifiziert werden konnten, war es wichtig zu erfahren, ob die durch PTH freigesetzte Form von sRankl das Ergebnis vom alternativen Splicing war oder ob es sich um einen extrazellulären proteolytischen Prozess handelte.^{91,179} Durch die Verwendung von qRT-PCR-Primern, die unterschiedliche Bereiche des Proteins darstellen, konnte auf diesem Wege ein differentieller Einfluss von PTH und IL-33 auf alternatives Splicing ausgeschlossen werden. Da ein Breitband-Metalloproteasen-Inhibitor die PTH-vermittelte Rankl-Freisetzung komplett reprimierte, konnte dieser Effekt außerdem eindeutig einem proteolytischen Effekt durch eine oder mehrere Metalloproteasen zugeordnet werden. Nach einer kurzzeitigen PTH-Stimulation über 15 und 30 Minuten konnte kein sRankl im Medium der Osteoblasten detektiert werden, so dass außerdem auf eine transkriptionelle Regulation der beteiligten Proteasen geschlossen werden konnte.

Um zu untersuchen, ob die proteolytische Prozessierung von Rankl überhaupt *in vivo* relevant sein könnte, wurde in dieser Arbeit hPTH [1-34] über eine intermittierende Injektion in Wildtyp-Mäuse eingebracht und deren Knochenphänotyp und Serumparameter untersucht. Hierbei konnte der osteoanabole Effekt von intermittierenden PTH bestätigt werden. Gleichzeitig konnte im Serum der Tiere eine signifikant erhöhte Konzentration an sRankl und eine signifikant erhöhte Osteoklastenzahl, bei gleichbleibender Konzentration der β -Crosslaps detektiert werden. In einer Studie von Patienten mit Glukokortikoid-induzierter Osteoporose, welche mit Teriparatid behandelt wurden, konnten Buxton *et al.* ebenfalls beobachten, dass die Konzentration von Osteoblastenmarkern wie Rankl oder Osteokalzin im Serum der Patienten nach kurzer Zeit signifikant anstieg, während sich Osteoklastenaktivitätsmarker wie β -Crosslaps erst zu einem späteren Zeitpunkt erhöht zeigten.¹⁸⁰ Zusätzlich konnten Delmas *et al.* in Schafen zeigen, dass der osteoanabole Effekt

von PTH durch eine Kombinationstherapie mit Bisphosphonaten, welche auf Osteoklasten eine hemmende Wirkung ausüben, blockiert wird, ein Ergebnis, welches in der Therapie von Osteoporose-Patienten bestätigt werden konnte.¹⁸¹⁻¹⁸³ Dies deutet darauf hin, dass der osteoanabole Effekt von PTH nicht nur allein durch die Wirkung von PTH auf Osteoblasten vermittelt wird, sondern durch die Signalweiterleitung vom Osteoblasten über Rankl zum Osteoklasten und vom Osteoklasten zurück zum Osteoblasten vermittelt werden könnte. Der osteoanabole Effekt von intermittierenden PTH beruht also wahrscheinlich auf einer kurzfristigen Erhöhung der Osteoblastenzahl und -aktivität, welcher die langsamere PTH-vermittelte Erhöhung der Osteoklastenzahl, hervorgerufen durch die gesteigerte Konzentration von sRankl im Blut, überlagert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Prozessierung von Rankl eine hohe Relevanz *in vivo* besitzt.

Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass einige Metalloproteasen murines Rankl mindestens *in vitro* prozessieren können. Lum *et al.* konnten zeigen, dass die Protease Adam17, welche 1997 von Black *et al.* als das TNF- α -prozessierende Enzym identifiziert wurde, in der Lage ist, in transfizierten 293T- und COS-7-Zellen, sRankl proteolytisch abzuspalten und bestätigten dies durch einen Inkubationsversuch eines Rankl-CD8-Fusionsprotein mit rekombinanten Adam17.^{166,184} Ein paar Jahre später identifizierten Hikita *et al.* die beiden Metalloproteasen Adam10 und Mmp14 als mögliche Kandidaten für die Prozessierung von Rankl, während sie gleichzeitig zeigten, dass Adam17 in ihrer Versuchsanordnung nicht in der Lage war, vollständiges Rankl zu prozessieren.⁹³ Während sie die Rankl-Prozessierung durch Adam10 ebenfalls nur *in vitro* nachweisen konnten, zeigte ein generiertes *Mmp14*-defizientes Mausmodell eine reduzierte Rankl-Konzentration im Serum der Tiere und Anzeichen einer beginnenden Osteoporose mit erhöhter Anzahl der Osteoklasten. Zusammengefasst scheinen alle bisherigen Untersuchungsergebnisse sehr von den verwendeten Zellen und Bedingungen abzuhängen, weshalb eindeutige Aussagen schwierig sind. In dieser Arbeit konnte weder nach 6 noch nach 24 Stunden eine PTH-abhängige Regulation der Metalloproteasen Adam10, Adam17 und Mmp14 festgestellt werden. Die Analyse eines hypomorphen *Adam17^{ex/ex}*-Mausmodells zeigte außerdem, dass eine abgeschwächte Synthese von Adam17 keinen veränderten Knochenphänotyp hervorbrachte. Eine Beteiligung der bekannten Rankl-

Sheddasen Adam10, Adam17 und Mmp14 an der PTH-vermittelten Prozessierung von Rankl *in vivo* konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Allen drei Metalloproteasen ist gemein, dass die identifizierten potentiellen Spaltstellen Arg¹³⁸-Phe¹³⁹ und Met¹⁴⁵-Met¹⁴⁶ im murinen Rankl-Protein alle in derselben Region (GPQRFSGAPAMMEGSW) liegen und diese im humanen Rankl, welches eigentlich zu fast 90% mit murinen Rankl identisch ist, komplett unkonserviert ist.¹⁶⁷ In dieser Arbeit wurde versucht, die Spaltstelle von murinen Rankl eindeutig zu identifizieren, indem zunächst sRankl per Opg-FC-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturmedium von PTH-stimulierten Osteoblasten erfolgreich aufgereinigt wurde, um es anschließend N-terminal sequenzieren zu lassen. Da die Sequenzierung leider ohne Ergebnis blieb, wurde im Anschluss ein tryptischer Verdau durchgeführt. Hierbei konnte die Spaltstelle Arg¹³⁸-Phe¹³⁹ mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert und somit bestätigt werden, da N-terminal aufsteigend keine weiteren Fragmente mehr detektiert werden konnten. Weitere Schnittstellen konnten in diesem Verfahren nicht identifiziert werden, können aber gleichzeitig auch nicht ausgeschlossen werden.

Um zu untersuchen, welche Gene in Osteoblasten durch PTH reguliert werden, wurde schon in der vorangegangenen Masterarbeit eine genomweite Expressionsanalyse per Microarray vorgenommen, die in dieser Arbeit durch eine Analyse per qRT-PCR verifiziert wurde. Es konnten 14 deutlich PTH-induzierte Gene identifiziert werden, von denen einige, wie z.B. *Cited1*, *Ramp3* und *Il6* bereits eine bekannte PTH-Regulation aufwiesen.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ In der Microarray-Analyse konnte auf Platz 14 der am stärksten induzierten Gene auch *Tnfrsf11*, das Rankl-kodierende Gen, identifiziert werden, eine PTH-Induktion die ebenfalls schon längere Zeit bekannt war.¹⁸⁹ Es wurden 4 Gene identifiziert, die in primären Osteoblasten deutlich durch PTH reprimiert wurden. *Smpd3* (*Sphingomyelin phosphodiesterase 3*), das am stärksten reprimierte Gen, ist ein Enzym, dessen Mutation im Mausmodell zu einer schwerwiegenden Osteoporose führt.¹⁹⁰ *Dkk1* (*Dickkopf-related protein 1*), ein weiteres reprimiertes Gen, kodiert für einen Inhibitor des Wnt-Signalweges, welcher bekanntermaßen die Knochenbildung durch Osteoblasten hemmt.^{191,192} Die Analyse weiterer Knochen-relevanter Gene ergab, dass ein Großteil der Gene nicht reguliert war und nur ein kleiner Teil eine, wenn auch nicht signifikante Regulation, aufwies. Im Einklang mit bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen,

konnte festgestellt werden, dass die Expression von *Fgf23* (*Fibroblast growth factor 23*), einem wichtigen Regulator der Phosphat-Homöostase, durch PTH induziert wurde, gleichzeitig aber die Expression der Gene *Sp7*, des Osteozytenmarkers *Dmp1* und *PheX* (*Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked*) reprimiert wurde.¹⁹³⁻¹⁹⁶

Im Zuge der Expressionsanalyse konnten auch drei Metalloproteasen identifiziert werden, die in Osteoblasten durch PTH induziert wurden: *Adamts4*, *Adamts1* und *Adamts16*. Der ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motifs*)-Proteinfamilie gehören im Menschen 19 Proteasen an, die im Gegensatz zur transmembranen ADAM- und MMP-Familie, alle sekretiert werden.¹⁹⁷ Die Metalloprotease *Adamts4* (auch: Aggrecanase 1) ist, zusammen mit *Adamts5*, das hauptverantwortliche Enzym für die Degradation von Proteoglykanen im Gelenkknorpel von Patienten mit Osteoarthritis und ist in der Lage unterschiedliche Matrixproteine, wie Aggrecan, Brevican, Neurocan und Versican zu prozessieren.^{198,199} In einem Versuch die Spezifität der PTH-Stimulation zu analysieren, wurden in dieser Arbeit Osteoblasten mit einer größeren Anzahl an verschiedenen Faktoren stimuliert. Da *Adamts4* nicht nur durch PTH, sondern auch durch viele andere Faktoren induziert wurde, wurde sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die anderen beiden Proteasen *Adamts1* und *Adamts16* konzentriert.

Adamts16 zeigte sich im Gegensatz zu *Adamts4* in Osteoblasten spezifisch durch PTH induziert. Die Protease *Adamts16* ist im Vergleich zu *Adamts4* und *Adamts1* relativ unbekannt und besitzt zurzeit noch keine belegten Substrate. *Adamts16* scheint eine Rolle in der Regulation des Blutdrucks zu spielen, da eine Defizienz von *Adamts16* in Ratten zu einem reduzierten systolischen und diastolischen Blutdruck führte.^{160,168} *Adamts16*-defiziente Ratten zeigten außerdem häufig Anzeichen einer Hodendystopie mit einhergehender Infertilität, so dass eine Funktion in der Ausbildung des männlichen Urogenitalsystems angenommen wird.¹⁶⁹ In Bezug auf eine potentielle Funktion von *Adamts16* im Knochen konnte bisher gezeigt werden, dass Patienten mit Osteoarthritis eine gesteigerte Expression von *ADAMTS16* und eine signifikant erhöhte Konzentration an *Adamts16* in der Gelenkflüssigkeit und im Knorpel aufwiesen.²⁰⁰ Außerdem führte eine Überexpression von *ADAMTS16* in SW1353 Chondrosarkom-Zellen zu einer reduzierten Proliferations- und Migrationsrate.^{201,202} Die Rolle von *Adamts16* im

Knochen-Remodelling wurde bislang noch nicht erforscht, so dass es von großem Interesse war, den Knochenphänotyp und Serumparameter des Knochenstoffwechsels in einem Rattenmodell mit einer ubiquitären *Adamts16*-Defizienz zu untersuchen. Die Analyse der 24-Wochen alten Weibchen zeigte eine signifikant reduzierte Osteoklastenzahl, einhergehend mit einer nicht-signifikant reduzierten Konzentration an β -Crosslaps und sRankl im Serum der Tiere, sowie unveränderter Osteoblastenzahl und Knochenformationsrate. Es zeigte sich allerdings, dass die trabekulären Knochenparameter gänzlich unverändert waren, so dass eine essentielle physiologische Funktion von *Adamts16* im Knochenumbau und Prozessierung von Rankl ausgeschlossen werden konnte.

Im Gegensatz zu *Adamts16* ist die Protease *Adamts1* keine Unbekannte im Bereich des Knochen-Remodelling. Die Induktion von *Adamts1* durch PTH im Knochen und in primären Osteoblasten ist schon längere Zeit bekannt.²⁰³ In der vorliegenden Dissertation konnte nun außerdem die hohe Spezifität dieser Induktion nachgewiesen werden. *Adamts1* wird bekanntermaßen u.a. von Osteoblasten exprimiert und ist in Bereichen der Knochenformation induziert.²⁰⁴ *Adamts1*-defiziente Mäuse zeigen ein verzögertes Wachstum, während eine Überexpression von *Adamts1* in weiblichen Mäusen die Knochenmineralisation behindert.^{205,206} Es ist außerdem an der Degradation von Kollagen I beteiligt und fördert so, nach Rehn *et al.*, die Osteoblasten-Proliferation.²⁰⁷ *Adamts1* besitzt ein großes Spektrum an Substraten, wie z.B. der Zellmembranbestandteile Entactin, Desmocollin, Dystroglycan oder auch die Thrombospondine.²⁰⁸⁻²¹⁰ Einige Studien zeigen außerdem, dass *Adamts1* häufig bei Krebserkrankungen eine auffallende transkriptionelle Dysregulation aufweist.²¹¹⁻²¹⁵ Im Kontext der Analyse von Brustkrebszellen und Knochenmetastasen konnten Lu *et al.* zeigen, dass *Adamts1* in der Lage ist zusammen mit der Metalloprotease *Mmp1* die extrazelluläre Domäne von transmembranen EGF-(*epidermal growth factor*) ähnlichen Wachstumsfaktoren proteolytisch abzuspalten und auf diesem Wege die Osteoklastogenese über eine Steigerung der Rankl/*Opg*-Ratio zu induzieren.²¹⁶ Ein direkter Effekt der beiden Proteasen auf die Osteoblasten der MC3T3-E1 Zelllinie konnte allerdings von Lu *et al.* nicht festgestellt werden. Nichtsdestotrotz ist es wichtig herauszufinden, ob die Protease *Adamts1* alleine oder auch zusammen mit anderen Metalloproteasen bei der Freisetzung von sRankl eine essentielle Rolle im Organismus spielt. Hierfür würde v.a. die Konzentration von sRankl im Serum von *Adamts1*-

defizienten Mäusen von großem Interesse sein. Aus diesem Grund wird zurzeit eine Adamts1-defizienten Mauskolonie etabliert, die aber zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine analysierbaren Nachkommen hervorgebracht hat.

6.2 Die S1P-vermittelte Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten

Während intermittierendes PTH einen osteoanabolen Effekt ausübt, inhibiert der direkte Gegenspieler von PTH, das Hormon Calcitonin, über die S1P-Ausschüttung vom Osteoklasten hin zum Osteoblasten den Knochenaufbau. Dieser CT-inhibierte osteoanabole Effekt von S1P auf Osteoblasten ist von großem Interesse für die Knochenforschung, da S1P als niedermolekulare chemische Verbindung und die S1P-Rezeptoren als 7-Transmembranrezeptoren ideale Ziele für die Therapien von Krankheiten mit einhergehenden Knochenmasseverlust, wie z.B. der wichtigsten und weit verbreitetsten Knochenerkrankung Osteoporose darstellen.

Aufgrund dessen wurde im zweiten Abschnitt dieser Arbeit der Knochenphänotyp von Mäusen mit einer Defizienz des S1P-abbauenden Enzyms S1P-Lyase auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen, denen zusätzlich noch eine Defizienz für den S1P-Rezeptor *S1pr3* eingekreuzt wurde. Diese *Sgpl1*^{-/-}-*S1pr3*^{-/-}-Mäuse wurden auf die Annahme hin untersucht, dass der Rezeptor *S1pr3* der hauptverantwortliche Rezeptor für die Übersetzung des S1P-Signals in die hohe Knochenmasse der Mäuse ist.

Die S1P-Lyase kommt in den meisten Säugetierzellen, außer in Erythrozyten und Thrombozyten, in unterschiedlicher Menge vor.^{156,217} Vogel *et al.* generierten 2009 ein Mausmodell mit einer ubiquitären Defizienz von *Sgpl1*, dem S1P-Lyase kodierenden Gen, um die Funktion des Enzyms in verschiedenen Geweben besser zu verstehen.¹⁵⁷ Aufgrund des fehlenden S1P-Abbauenzym kann in diesen Mäusen eine stark erhöhte Konzentration von S1P im Serum und in der Niere der Tiere detektiert werden, so dass in dieser Arbeit der Effekt der erhöhten S1P-Konzentration auf den Knochen untersucht werden konnte. Die analysierten Mäuse in dieser Arbeit waren lebensfähig, allerdings entstanden aus der Verpaarung von heterozygoten *Sgpl1*^{+/-}-Mäusen weniger *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse als Mäuse ohne S1P-Lyase-Defizienz.

Eine essentielle Rolle der S1P-Lyase für die Embryonalentwicklung konnte hiermit zwar ausgeschlossen werden, das Fehlen des Enzyms scheint aber teilweise schon Defekte in der Embryonalentwicklung zu verursachen. So konnten Newbigging *et al.* zeigen, dass *Sgpl1* auch schon in der Embryonalentwicklung in Gehirn, Nervensystem, Thymus und Knorpel exprimiert wird.²¹⁸ Die geborenen *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse waren in dieser Arbeit im Alter von 3 Wochen signifikant kleiner als ihre Wildtyp-Geschwistertiere und zeigten eine stark reduzierte mittlere Lebenszeit von 21 Tagen. Diese Beobachtung war unabhängig von einer zusätzlichen *S1pr3*-Defizienz und ist konsistent mit den beschriebenen Phänotypen der *Sgpl1*-defizienten Mäusen von anderen Arbeitsgruppen, die eine mittlere Lebenszeit zwischen 18 und 29 Tagen angeben.^{157,170,219}

Weiterhin konnte in dieser Arbeit der Fibrose-fördernde Effekt von S1P bestätigt werden. Huang *et al.* konnten zeigen, dass die S1P-Lyase sowohl im Tiermodell als auch bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) beim Menschen als Suppressor der Fibroseerkrankung auftritt.¹⁴⁴ Neben der Lunge ist auch die Leber ein Organ, indem Zusammenhänge zwischen S1P und fibrotischen Gewebe festgestellt wurden. Xiu *et al.* postulierten, dass intrazelluläres S1P eine wichtige Rolle in der TGF- β -induzierten Expression von *Col1a1*, dem Kollagen I kodierenden Gen, spielt und dass dieser induzierende Effekt unabhängig vom S1P-Rezeptor auftritt.¹⁴³ Die Analyse der Histologie von Lunge und Leber in den 3 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen zeigte eindeutige Anzeichen einer starken Vermehrung von Kollagenfasern, welches ein deutliches Merkmal einer fibrotischen Erkrankung darstellt.

Die histomorphometrische Untersuchung der Knochen der 3 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäuse ergab eine signifikant erhöhte trabekuläre Knochenmasse in den Wirbelkörpern und Röhrenknochen der Tiere. Die Osteoklastenzahl war signifikant erhöht und die Osteoblasten zeigten Anzeichen von erhöhter Aktivität. Die Morphologie von Osteoblasten und Osteoklasten war stark verändert. Beide Zelltypen hatten ein vergrößertes Volumen und waren eher ungeordnet auf der Knochenoberfläche angesiedelt. Eine zusätzliche Defizienz des Rezeptors *S1pr3* führte nicht, wie angenommen, zu einer Korrektur des *Sgpl1*^{-/-}-Knochenphänotyps. Es ist also davon auszugehen, dass der *S1pr3* zumindest nicht alleine für die S1P-Induktion der Knochenbildung verantwortlich ist. Ein kompensatorischer Effekt der

anderen S1P-Rezeptoren konnte in durchgeführten Expressionsversuchen nicht gefunden werden.

Der Knochenphänotyp der *Sgpl1*-defizienten Tiere ähnelte sehr stark dem schon von Keller *et al.* und Vogel *et al.* beschriebenen Phänotyp. Vogel *et al.* beschrieben eine erhebliche Vergrößerung der Osteoklasten aufgrund von Zytoplasma-Einlagerungen und Teilablösung der Zellen vom Knochen. Die Osteoblasten waren ebenfalls leicht vergrößert, zeigten einen verringerten Kontakt zur Knochenoberfläche und waren bei ihnen auch in einer größeren Anzahl vorhanden. Vogel *et al.* postulierten aus diesen Veränderungen des Knochens einen Osteopetrose-Phänotyp von *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen aufgrund eines Osteoklasten-Defekts.¹⁵⁷

Keller *et al.* kamen jedoch zu einem anderen Schluss, als sie *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse aufgrund einer anderen Fragestellung untersuchten. Die Analyse des Knochenphänotyps von 6 Wochen alten *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen zeigte bei ihnen ebenfalls eine erhöhte Knochenmasse im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren. Die Anzahl der Osteoklasten war wie bei Vogel *et al.* erhöht und die morphologischen Veränderungen ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt. Die Analyse der Serumparameter CTX und PICP zeigte jedoch, dass, anders als von Vogel *et al.* postuliert, neben den aktiveren Osteoblasten die Osteoklasten ebenfalls funktionell aktiv waren, was zu der Annahme führte, dass die gesteigerte Knochenmasse in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen nicht aufgrund einer Osteopetrose zustande kommt, sondern eine hohe Konzentration von S1P zu einem erhöhtem Knochenumsatz bzw. einer gesteigerten Knochenbildung führt.¹³⁷ Die These von Keller *et al.* dass es sich um einen Knochenphänotyp mit hohem Knochenumsatz (*high bone turnover*) handelt, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In den 3 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen waren die Konzentration des Knochenabbaumarkers CTX und der beiden Knochenaufbaumarker PINP und PICP im Verhältnis zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren ebenfalls signifikant erhöht. Die unterschiedlichen Serum-Konzentrationen von PINP und PICP könnten z.B. mit den unterschiedlichen Abbauwegen der Peptide erklärt werden. Beide Peptidfragmente werden durch Rezeptoren in die Endothelzellen der Leber aufgenommen und dort abgebaut, wobei PINP durch Scavenger-Rezeptoren und PICP durch Mannose-Rezeptoren in das Gewebe aufgenommen wird.^{220,221} Der Abbau von PICP wird dabei stark vom

hormonellen Milieu beeinflusst, wohingegen die Konzentrationsschwankungen von PINP im Blut eher durch Krankheiten und pharmakologische Eingriffe beeinflusst werden.²²²⁻²²⁵

Aufgrund der signifikant erhöhten Konzentration des Knochenabbaumarkers CTX im Serum der *Sgpl1*-defizienten Tiere und deren erhöhten Osteoklastenzahl war es überraschend, dass bei der Serumanalyse des pro-osteoklastogenen Faktors Rankl und dessen Antagonisten Opg das signifikant reduzierte Verhältnis der beiden Faktoren auf eine reprimierte Osteoklastogenese hindeutete. Eine Erklärung für die niedrigere Konzentration von Serum-Rankl bietet hierbei allerdings die Arbeit von Vogel *et al.*, die sich umfassend mit den pathologischen Auswirkungen einer *Sgpl1*-Defizienz bzw. der auf einer Restaktivität reduzierten S1P-Lyase auf das Immunsystem der Mäuse beschäftigte. Die Analyse der Blutzellen der Mäuse erbrachte dort eine massive Lymphopenie mit dem kompletten Fehlen von peripheren T-Zellen und einer stark reduzierten Zahl von B-Zellen in Blut, Thymus und lymphatisches Gewebe, welche aus einer gestörten Entwicklung und fehlerhaften Rezirkulation der Lymphozyten resultierte.¹⁵⁷ Diese immunsuppressive Wirkung von S1P zeigte sich schon in Studien des S1P-Analogons FTY-720 bzw. Fingolimod.^{226,227} Da Rankl nicht nur von Osteoblasten, sondern auch von T- und B-Zellen exprimiert wird, würde das komplette Fehlen der Lymphozyten im Blut der *Sgpl1*-defizienten Mäuse die verringerte Rankl-Konzentration erklären können.^{228,229} Onal *et al.* zeigten 2012 außerdem, dass die Defizienz von B- und T-Zell-exprimierten Rankl keinen Effekt auf die Knochenmasse von Mäusen besitzt.²³⁰

Trotz dieser zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der Serumparameter blieb festzuhalten, dass der defekte Abbau von S1P in den Mäusen, unabhängig vom Rezeptor S1pr3, zu einer signifikant erhöhten Knochenmasse führte. In diesem Zusammenhang war es wichtig herauszufinden, ob es eine Erklärung für den osteoanabolen Effekt von S1P auf die Osteoblasten geben könnte. Mithilfe der Affymetrix-Genchip-Analyse konnten zunächst die drei Gene *Mtor*, *Fosl2* und *Ptprz1* identifiziert werden, welche alle diesen Effekt möglicherweise erklären könnten. Die Serin/Threonin-Kinase mTOR reguliert bekanntermaßen das Zellwachstum, die Zellproliferation und -motilität und die Proteinbiosynthese der Zelle.¹⁷³ Die Induzierbarkeit von mTOR durch S1P ist schon länger bekannt und dass eine Induktion von mTOR die Osteoblastenaktivität steigern kann, wurde

ebenfalls schon publiziert.²³¹⁻²³³ Ein ebenfalls in Verbindung mit induzierter Osteoblastogenese bekanntes Gen ist *Fosl2*, kodierend für das Protein Fra-2, welches zusammen mit Mitgliedern der Jun-Familie, den AP-1 (*activator protein-1*) Transkriptionsfaktor-Komplex bildet. AP-1 ist ein wichtiger Regulator des Knochenstoffwechsels und induziert die Knochenbildung.^{174,234,235} Über eine Induktion von *Fosl2* durch S1P in Osteoblasten war bisher nicht viel bekannt, sie bot aber im Kontext der *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Knochenmasse in den Tieren. Eine Validierung der Genexpression der Gene zeigte allerdings, dass sie wohl eher unregelmäßig durch S1P reguliert werden, während die Repression von *Ptprz1* durch S1P in Osteoblasten konsistent war. Das Gen *Ptprz1* kodiert für die Tyrosin-Phosphatase Rptpζ. *Ptprz1*-defiziente Mäuse haben eine signifikant erhöhte Osteoblastenproliferationsrate, während *Ptprz1*-überexprimierende Zelllinien eine deutlich reduzierte Proliferation der Osteoblasten aufweisen.²³⁶ Die starke Repression der *Ptprz1*-Expression durch S1P bietet damit eine logische Erklärung für die osteoanabole Wirkung von S1P und für den Knochenphänotyp der *Sgpl1*-defizienten Mäuse.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass der osteoanabole Effekt von S1P auf Osteoblasten nicht alleine über den Rezeptor S1pr3 vermittelt wird. Eine ausreichende Analyse von *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen mit einer Defizienz der Rezeptoren S1pr1 und S1pr2 war aufgrund der hohen Letalitätsrate dieser Mäuse leider nicht möglich. Es wurde deshalb kurz vor Abschluss dieser Dissertation damit begonnen, Mäuse mit einer heterozygoten Defizienz der S1P-Lyase (*Sgpl1*^{+/-}), also einer stark abgeschwächten Aktivität des Enzyms, und einer Defizienz der Rezeptoren S1pr1, S1pr2 und S1pr3 zu generieren und im Alter von 24 Wochen zu untersuchen. Die Analyse der ersten Ergebnisse von weiblichen Tieren erbrachte dabei, dass auch heterozygote *Sgpl1*^{+/-}-Mäuse einen Knochenphänotyp mit hoher Knochendichte besitzen und das eine zusätzliche Defizienz des Rezeptors S1pr3 auch in diesen Mäusen keine Korrektur des Knochenphänotyps bewirkt. Da eine ubiquitäre Defizienz des S1pr1 in Mäusen generell embryonal letal verläuft, wurden *Sgpl1*^{+/-}-Mäusen mit einer Osteoklasten-spezifischen *S1pr1*-Defizienz generiert. Bei der ersten Untersuchung dieser Mäuse zeigte sich, dass die hohe Knochenmasse anscheinend durch die Defizienz des S1pr1 in Osteoklasten korrigiert wird. Auch wenn diese Ergebnisse noch auf Grundlage weniger Mäuse zustande kamen und noch keine *Sgpl1*^{+/-}-Mäuse mit einer zusätzlichen Osteoblasten-spezifischen *S1pr1*-Defizienz, als

auch einer zusätzlichen ubiquitären *S1pr2*-Defizienz untersucht wurden, sind die bisherigen Ergebnisse äußerst bemerkenswert und von großer Bedeutung für die S1P-vermittelte Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten.

6.3 *Pate4*-defiziente Mäuse zeigen keine phänotypischen Veränderungen bis zum Alter von 6 Monaten

Keller et al. publizierten 2014 ein Modell, mit dem die Wirkung von CT auf den Knochen erklärt werden konnte und S1P dabei eine Schlüsselrolle als Kommunikationsmolekül zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zuwies.¹³⁷ Im Rahmen der Arbeit an dieser Publikation identifizierten sie nicht nur das Gen *Spns2* als wichtiges CT-reguliertes Gen im Osteoklasten, sondern auch das Gen *Pate4* wies im Osteoklasten, wenn auch nur schwach exprimiert, eine deutliche Regulation durch CT auf. Es wurde angenommen, dass *Pate4*, ebenso wie S1P, ein von Osteoklasten sekretiertes Protein sein könnte, welches die Knochenbildung fördert und durch CT transkriptionell reprimiert wird. Aus diesem Grunde wurden *Pate4*-defiziente Mäuse generiert, welche im Rahmen dieser Doktorarbeit zum ersten Mal analysiert wurden. Die Hypothese, dass *Pate4* eine Rolle im Knochenumbau spielt, konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die *Pate4*-defizienten Mäuse zeigten keinen veränderten Knochenphänotyp und keine Veränderungen in den getesteten Serumparametern. Die sehr schwache Expression von *Pate4* in Osteoklasten unterstrich, v.a. im Vergleich zur sehr spezifischen starken Expression in Prostata und Samenblase, das Ergebnis. Das humane Gen *PATE4* ist zusammen mit den Genen *PATE1-3* und *ACRV1* auf Chromosom 11q24.2 lokalisiert und besitzt die gleiche Domänenstruktur wie seine genannten benachbarten Gene.²³⁷ Alle Gene kodieren für sekretierte Proteine, welche in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen alle eine Funktion in der Interaktion von Spermien und Oozyten zugeschrieben wurde.^{159,238-241} Da bisher noch keine Maus-Defizienzmodelle der entsprechenden Gene untersucht wurden, war es wichtig eine Analyse der beteiligten Organe in den *Pate4*-defizienten Mäuse vorzunehmen. Es konnten allerdings weder Veränderungen in der Fertilität der Mäuse festgestellt werden, noch zeigten die histologischen Untersuchungen der Organe (Samenblase, Prostata, Testis) Veränderungen im Phänotyp der Tiere. Hieraus muss nicht zwingend geschlossen werden, dass *Pate4* keine essentielle Funktion in den Organen besitzt. Es ist ebenso möglich, dass die Gene der *Pate*-Familie untereinander eine funktionelle Redundanz

besitzen, d.h. die Expression der anderen *Pate*-Gene ausreicht, um die Funktion aufrecht zu erhalten. Es könnte weiterhin möglich sein, dass sich Veränderungen im Phänotyp der Tiere erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestieren, so dass es durchaus Sinn machen könnte, die Fertilität und auch potentielle Veränderungen in der Prostata der Tiere in einem fortgeschrittenen Alter zu untersuchen. Da die Verbreitung von Erkrankungen der Prostata (Krebs, Hyperplasie) stetig zunimmt, wäre eine pathologisch *Pate4*-bedingte Veränderung der Prostata für die klinische Forschung äußerst relevant. In diesem Zusammenhang wäre es außerdem sehr informativ, die Defizienz von *Pate4* in Mausmodellen mit induziertem Prostatakrebs oder Prostatahyperplasie zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind allerdings nicht mehr Bestandteil dieser Doktorarbeit.

7. Ausblick

Auch wenn es in dieser Arbeit nicht gelungen ist, ein spezifisches Rankl-prozessierendes Enzym zu identifizieren, wurden wichtige Ergebnisse erzielt. So konnten mit Adamts16 und Adamts1 zwei weitere potentielle Rankl-prozessierende Enzyme identifiziert werden, von denen Adamts1 nach Abschluss dieser Arbeit weiter *in vitro*, als auch *in vivo*, in Form eines *Adamts1*-defizienten Mausmodells, untersucht werden soll. Hierbei wird vor allem die Konzentration von sRankl im Serum der Tiere von großem Interesse sein. In weiterführenden Versuchen sollte außerdem untersucht werden, ob die Prozessierung von Rankl die pro-osteoklastogene Aktivität fördert oder ob die Abspaltung der extrazellulären Rankl-Domäne die Osteoklastogenese eher reprimiert. Die physiologische Relevanz der Rankl-Prozessierung könnte z.B. mit einem Mausmodell, welche eine Mutation in der Rankl-Spaltstelle trägt, untersucht werden. Hierfür müsste allerdings zunächst die korrekte Spaltstelle z.B. per N-terminaler Sequenzierung von murinen oder humanen Rankl im Serum identifiziert werden.

Eine Defizienz des Rezeptors *S1pr3* alleine führt nicht wie angenommen zu einer Korrektur des *high bone mass*-Knochenphänotyp in den *Sgpl1*-defizienten Mäusen. Um der Identifizierung des bzw. der verantwortlichen S1P-Rezeptoren näher zu kommen, wurde in einem nächsten Schritt schon damit begonnen, die Knochenphänotypen von *S1pr1*-, *S1pr2*- und *S1pr3*-defizienten Mäusen in Kombination mit einer abgeschwächten Aktivität der S1P-Lyase (*Sgpl1*^{+/−}) zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung zu analysieren. Da die Rezeptoren *S1pr4* und *S1pr5* in Knochenzellen kaum exprimiert werden und ein ubiquitäre Defizienz des *S1pr1* embryonal letal verläuft, wurden dabei Mausmodelle generiert, die eine Osteoblasten- bzw. Osteoklasten-spezifische Defizienz für den Rezeptor *S1pr1* tragen, sowie ein Mausmodell mit einer ubiquitären Defizienz für die Rezeptoren *S1pr2* und *S1pr3*.

In Bezug auf Mäuse mit einer Defizienz für *Pate4* wäre es interessant, ob die Mäuse im Alter pathologische Defekte in der Prostata entwickeln. So ist es noch unbekannt, ob Faktoren wie *Pate4* bei Krankheiten, wie z.B. der benignen Prostatahyperplasie, welche auch erst bei Männern im fortgeschrittenen Alter auftritt, eine Rolle spielen.

8. Zusammenfassung

Die molekulare Kommunikation zwischen knochenbildenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten ist von fundamentaler Wichtigkeit für einen geregelten Knochenumbau im Organismus. Hierbei ist insbesondere die physiologische Rolle von 4 Faktoren von entscheidender Bedeutung: Parathormon (PTH) und Rankl, sowie Calcitonin und S1P. Alle 4 Faktoren beeinflussen, zusammen mit ihren Rezeptoren, das Gleichgewicht von Knochenaufbau und Knochenabbau und können in ihrer Wirkung zugunsten einer osteoanabolen Therapie beeinflusst werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen induziert PTH bei einem Kalziummangel im Blut den Knochenabbau, es kann aber, bei intermittierender Injektion des Hormonfragments PTH (1-34), ebenfalls den Knochenaufbau fördern. Der molekulare Mechanismus hinter dieser Wirkungsweise ist noch nicht vollständig geklärt, auch wenn vermutet wird, dass die osteoanabole Wirkung durch eine kurzfristige Stimulation der Osteoblastogenese und Osteoblastenaktivität hervorgerufen wird. Ein essentieller Bestandteil dieser Theorie ist das Rankl-Rank-Opg-System, welches als Modellsystem für die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten schon lange anerkannt ist. Der von Osteoblasten als Transmembranprotein exprimierte Faktor Rankl wirkt dabei über seinen Rezeptor Rank auf Osteoklasten und fördert so die Osteoklastogenese. Der ebenfalls von Osteoblasten exprimierte und sezernierte Faktor Osteoprotegerin bindet in diesem Prozess an Rankl und inhibiert die Osteoklastogenese. Unklar ist in diesem Zusammenhang, ob Rankl seiner physiologische Funktion effizienter als Transmembranprotein oder in seiner löslichen Form (sRankl) nachkommen kann und ob ein, und wenn ja welches, proteolytisches Enzym (Sheddase) für die Abspaltung der extrazellulären Domäne verantwortlich ist. Da schon aus vorherigen Untersuchungen bekannt war, dass das Hormon PTH in der Lage ist nicht nur die Expression des Rankl-Gens *Tnfrsf11* in Osteoblasten zu induzieren, sondern auch die Prozessierung des Proteins voranzutreiben, konnte auf Grundlage dieser Ergebnisse in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die PTH-induzierte Freisetzung von sRankl auf der Aktivität einer oder mehrerer Rankl-Sheddasen zurückzuführen ist und nicht auf einem alternativen Splicing der Rankl-prä-mRNA beruht. Die osteoanabole Wirkung von PTH (1-34) und die erhöhte Osteoblastogenese konnte nach intermittierender Gabe in Mäusen bestätigt werden. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass

intermittierendes PTH (1-34) *in vivo* ebenfalls die Prozessierung von Rankl induziert und dass die erhöhte Konzentration von sRankl im Blut der Tiere die Osteoklastogenese fördert. In einem Versuch, die verantwortliche Rankl-Sheddase zu identifizieren, konnte zunächst ausgeschlossen werden dass die Enzyme, die nachgewiesenermaßen in der Lage sind in verschiedenen Zellkultursystemen Rankl *in vitro* zu prozessieren, von PTH induziert werden. Stattdessen wurden in einer genomumfassenden Expressionsanalyse drei lösliche Metalloproteasen identifiziert, die in Osteoblasten durch PTH induziert werden. Durch den Vergleich mit diversen anderen *Tnfsf11*-induzierenden Faktoren konnten dabei sowohl die allgemeine PTH-Spezifität der Rankl-Prozessierung hervorgehoben werden, als auch die beiden Proteasen *Adamts1* und *Adamts16* als spezifisch PTH-induziert identifiziert werden. Die Analyse von *Adamts16*-defizienten Ratten zeigte dabei, dass trotz einer erhöhten Osteoklastenzahl, der Knochenphänotyp unverändert war, so dass *Adamts16* als essentielles Rankl-prozessierendes Enzym *in vivo* ausgeschlossen werden konnte. Die Generierung von *Adamts1*-defizienten Mäusen wird folgen, war aber nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

Während PTH über den Rankl-Rank-Signalweg vom Osteoblasten auf den Osteoklasten wirkt, übt der PTH-Gegenspieler Calcitonin seine Funktion über die Bindung an den Calcitonin-Rezeptor auf Osteoklasten und negativer Regulierung der S1P-Sezernierung aus. S1P wirkt über seine S1P-Rezeptoren weiter auf Osteoblasten und fördert auf diesem Wege die Knochenbildung. Welcher Rezeptor bzw. welche Rezeptoren von S1P in Osteoblasten dafür verantwortlich ist, das S1P-Signal in einen verstärkten Knochenaufbau zu übersetzen ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings gilt der Rezeptor *S1pr3* als aussichtsreicher Kandidat. S1P-Rezeptoren sind als 7-Transmembranrezeptoren und Rezeptoren für eine niedermolekulare chemische Verbindung wie S1P, dabei ein ideales *drug target* für osteoanabole Therapien, weshalb eine Erforschung der Rolle von S1P im Knochenstoffwechsel von großer Wichtigkeit ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Knochenphänotyp von *Sgpl1*-defizienten Mäusen mit und ohne Defizienz des Rezeptors *S1pr3* auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht. Eine Defizienz des S1P-abbauenden Enzyms S1P-Lyase führt in den *Sgpl1*-defizienten Mäusen zu einer hohen S1P-Konzentration im Organismus und u.a. einer erhöhten Knochenmasse. Bei Analyse der Mäuse konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die *Sgpl1*^{-/-}-Mäuse eine bekannte stark verkürzte Lebenszeit besitzen und pathologische Veränderungen an diversen

Organen aufweisen, die, zumindest im Falle von Leber und Lunge, in einer fibrotischen Gewebeerkrankung enden. Die hohe Konzentration an S1P führte in den Tieren schon im Alter von 3 Wochen zu einer signifikant erhöhten trabekulären Knochenmasse, welche nicht durch die zusätzliche Defizienz des Rezeptors S1pr3 korrigiert wurde. Der S1pr3 konnte damit als allein verantwortlicher Rezeptor in diesen Mäusen ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der knochenrelevanten Serumparmeter ließ hierbei auf einen Knochenphänotyp mit einem erhöhten Knochenumsatz (*high bone turnover*) schließen, welcher schon zuvor in 6 Wochen alten *Sgpl1*-defizienten Mäusen von unser Arbeitsgruppe postuliert wurde. Durch die Analyse einer durchgeführten genomweiten Expressionsstudie von S1P-stimulierten primären Osteoblasten konnte die Tyrosin-Phosphatase Rptpζ (*Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta*) als ein durch S1P negativ reguliertes Protein identifiziert werden. Diese Regulation eines Proteins, welches im Knochen eine anti-proliferative Wirkung auf Osteoblasten ausüben kann, bietet hierbei eine sinnvolle Erklärung für die osteoanabole Wirkung von S1P und die hohe Knochenmasse in den *Sgpl1*^{-/-}-Mäusen.

Wasserlösliche Peptide wie z.B. Pate4, welches in Osteoklasten ebenfalls negativ durch Calcitonin reguliert wird, sind im Hinblick auf medikamentöse Osteoporose-Therapien ebenfalls ein wichtiges Forschungsfeld. Da Pate4 für ein sekretiertes Protein kodiert, war es neben S1P ebenfalls ein guter Kandidat für eine Signalübertragung zwischen Osteoklasten und Osteoblasten. Um die Wirkung und Funktion des Proteins Pate4 im Organismus und im speziellen auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit ebenfalls *Pate4*-defiziente Mäuse generiert und analysiert. Die Analyse der Tiere erbrachte dabei, dass *Pate4*-defiziente Tiere keine Veränderungen im Knochenphänotyp aufweisen und dass das Gen *Pate4* im Gegensatz zur schwachen Expression in Osteoklasten sehr stark und hochspezifisch in Prostata und Samenblase von Mäusen exprimiert wird. Prostata und Samenblase der *Pate4*-defizienten Tiere zeigten dabei keine sichtbaren Veränderungen und auch die Fertilität der Mäuse bzw. die Wurfgröße war durch eine Defizienz von *Pate4* nicht beeinträchtigt oder anderweitig verändert. Allerdings konnte bei den *Pate4*-defizienten Tieren eine leicht, aber dennoch signifikant erhöhte Spermienmotilität festgestellt werden.

9. Summary

The molecular communication between bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts is of fundamental importance for the regulation of bone remodeling. Especially the physiological role of four different factors are of central importance: Parathyroid hormone (PTH) and Rankl, as well as Calcitonin and S1P. All factors affect the balance of bone formation and bone resorption together with their receptors and can be influenced in favour of an osteoanabolic therapy. Under normal physiological conditions PTH induces bone resorption in case of calcium deficiency, on the other hand intermittent treatment with PTH (1-34) can also promote bone formation. The underlying molecular mechanism is still not fully understood, even it is assumed, that the osteoanabolic effect of intermittent PTH is based on the short-term stimulation of osteoblastogenesis and osteoblast activity. An essential component of this theory is the Rankl-Rank-Opg-system, which is well established as a model for the communication between osteoblasts and osteoclasts. Rankl is expressed as a transmembrane protein from osteoblasts and acts via the receptor Rank on osteoclasts by supporting osteoclastogenesis. The Rankl-antagonizing factor Opg is also expressed and secreted by osteoblasts and inhibits osteoclastogenesis. In this context, it is unclear, whether Rankl exerts its physiological effect more efficiently as a transmembrane protein or in its soluble form (sRankl) and which proteolytic enzyme (shedase) is responsible for cleavage of the extracellular domain. As already known from previous studies, PTH is not only able to induce the expression of the Rankl gene *Tnfrsf11* in osteoblasts, but also to promote the proteolytic processing of the protein. Following these results it could be determined in this thesis that the PTH-induced release of sRankl is based on the activity of at least one Rankl shedase and that it is not due to an alternative splicing event of the Rankl pre-mRNA. The osteoanabolic effect of PTH (1-34) due to induced osteoblastogenesis could be confirmed after intermittent administration in mice. Furthermore it has been found that intermittent PTH (1-34) also induces the proteolytic processing of Rankl *in vivo* and that the increased concentration of sRankl in the serum promotes osteoclastogenesis in mice. In an attempt to identify the responsible Rankl shedase, it could initially be ruled out that the enzymes Adam10, Adam17 and Mmp14, which are demonstrably able to process Rankl *in vitro*, are induced by PTH. A genome-wide expression analysis in PTH-stimulated osteoblasts was performed, followed by

the identification of three metalloprotease-encoding genes, *Adamts4*, *Adamts1* and *Adamts16*, which are significantly induced by PTH. By addressing the question, how their expression is affected by PTH and various other *Tnfsf11*-inducing factors, it was firstly found that PTH-mediated shedding of Rankl is very specific and that secondly *Adamts16* expression is most specifically induced by PTH. A respective rat deficiency model was analyzed, where a significant reduction of the osteoclast number per bone surface, together with a non-significant decrease of serum crosslaps and sRankl concentrations were observed. Most importantly however, in the light of unaffected osteoblastogenesis and bone formation, these subtle differences did not cause a change in trabecular bone parameters, thereby ruling out a major physiological function of *Adamts16* in bone remodeling and Rankl processing.

While PTH acts via the Rankl-Rank-Opg pathway from osteoblasts to osteoclasts, the PTH antagonist calcitonin exerts its function by binding to the calcitonin receptor on osteoclasts and negative regulation of S1P secretion. S1P binds to S1P receptors on osteoblasts and promotes bone formation. It is not fully understood, which S1P receptor is responsible for translating the S1P signal into an increased bone formation, although the receptor S1pr3 is a promising candidate. S1P receptors are 7-transmembrane receptors, which are ideal drug targets for osteoanabolic therapies, so the study of the role of S1P in bone metabolism is of great interest. Therefore, the next objective of this work was to examine the bone phenotype of mice with a deficiency of the S1P-degrading enzyme S1P-lyase and additionally with and without a deficiency of the receptor S1pr3 on a molecular and cellular level. These *Sgpl1*-deficient mice have a known high S1P-level in the serum and increased bone mass. In this work, they showed a shortened life span on average of 3 weeks and have strong pathological changes in various organs, ending, at least in the case of liver and lung, in fibrosis. At the age of 3 weeks they showed a significantly increased trabecular bone mass, which was not corrected by the additional deficiency of the receptor S1pr3, so the receptor S1pr3 could thus be ruled out as the solely responsible S1P receptor in bone. The study of bone-related serum parameters demonstrated a high bone turnover phenotype, which was previously postulated by our working group in *Sgpl1*-deficient mice in the age of 6 weeks. By analyzing a genome-wide expression study of S1P-stimulated primary osteoblasts, the tyrosine phosphatase Rptpζ (receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta) was identified as a S1P-repressed protein.

The regulation of a protein that can exert an anti-proliferative effect on osteoblasts in bone provides a reasonable explanation for the osteoanabolic effect of S1P and the high bone mass phenotype of *Sgp1*-deficient mice.

Water-soluble peptides, such as Pate4, which is also negatively regulated by calcitonin in osteoclasts, are also important research objectives in terms of drug therapies for osteoporosis. Since *Pate4* encodes for a secreted protein, it was besides S1P a good candidate for a signaling between osteoclasts and osteoblasts, so another aim of this thesis was to investigate the effect and function of the Pate4 protein in the context of bone metabolism. For this purpose, *Pate4*-deficient mice were generated and analyzed, yet these mice do not display an obvious phenotype. The analysis demonstrated, that Pate4, in contrast to a weak expression in osteoclasts, is strongly and highly specifically expressed in prostate and seminal vesicles in mice. Prostate and seminal vesicles of *Pate4*-deficient mice showed no visible changes and the fertility and litter size was not affected by a deficiency of Pate4. However, a slight but significantly increased sperm motility was observed.

10. Sicherheit und Entsorgung

Der Umgang mit Chemikalien erfolgte unter Beachtung der jeweiligen, aktuellen Sicherheitsdatenblätter. Substanzen deren Gefährdungspotential noch nicht ermittelt wurde, wurden als potentiell gesundheitsschädliche Substanzen behandelt. Der Umgang mit Tieren und den daraus gewonnenen Proben erfolgte entsprechend der zutreffenden Sicherheitsrichtlinien. Alle Materialien, Lösungen und Komponenten der Versuchstiere wurden entsprechend der Entsorgungsrichtlinien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und in Rücksprache mit der Entsorgungsbeauftragten entsorgt. Alle Zellkulturen sowie kontaminierte Materialien wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

11. Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro Computertomographie
Adam10	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10
Adam17	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 17
Adamts1	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 1
Adamts16	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 16
Adamts2	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 2
Adamts4	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 4
ALP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
BFR/BS	Bone Formation Rate per Bone Surface
Bglap	Bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1
BMU	Bone Multicellular Units
Bsp	Bone Sialoprotein
BV/TV	Bone volume per tissue
Calca	Calcitonin-Related Polypeptide Alpha
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calciumsensitiver Rezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator 1
Clc-7	Chloride channel 7

Col1a1	Kollagen, Typ I, alpha 1
CT	Calcitonin
CTR	Calcitonin-Rezeptor
Ctsk	Cathepsin K
CTX	Crosslaps
DAG	Diacylglycerin
Dkk1	Dickkopf-1
Dmp1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF	fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
Fosl2	FOS-Like Antigen 2
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HRP	Horse Raddish Peroxidase
Ibsp	Bone Sialoprotein
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-17	Interleukin-17
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-33	Interleukin-33
IL-6	Interleukin-6

IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IP ₃	Inositoltrisphosphat
Iso	Isoprenalin
kDa	Kilodalton
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
Mmp14	Matrix Metallopeptidase 14
mRNA	messenger RNA
Mtor	Mechanistic Target Of Rapamycin
N.Ob/B.Pm	Number of Osteoblasts per Bone Perimeter
N.Oc/B.Pm	Number of Osteoclasts per Bone Perimeter
N.Ot/B.Ar	Number of Osteocytes per Bone Area
Ob.S/BS	Osteoblast Surface per Bone Surface
Obl	Osteoblast
Oc.S/BS	Osteoclast Surface per Bone Surface
Ocif	Osteoclastogenesis inhibitory factor
Ocl	Osteoklast
Ocn	Osteokalzin
Odf	<i>Osteoclast differentiation factor</i>
Opg	Osteoprotegerin
Opgl	Osteoprotegerin ligand
Pate4	Prostate And Testis Expressed 4
PBS	Phosphate buffered saline
PC-1	Prohormonkonvertase-1

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Pro-Calcitonin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PICP	Prokollagen Typ I C-terminales Propeptid
PINP	Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	para-Methoxyamphetamin
PTH	Parathormon
PTHR	Parathormon-Rezeptor
Ptprz1	Protein tyrosine phosphatase receptor-type Z polypeptide 1
qRT-PCR	Quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion
Ramp3	Rezeptoraktivität-modifizierende Protein 3
Rank	Receptor Activator of NF-κB
Rankl	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
Runx-2	Runt-related transcription factor 2
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PL	S1P-Lyase
S1pr1	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1
S1pr2	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 2

S1pr3	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 3
S1pr4	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 4
S1pr5	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 5
sCT	salmon Calcitonin
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Selp	P-Selektin
Sgpl1	Sphingosine-1-Phosphate Lyase 1
SLR	Signal Log Ratio
Smpd3	Sphingomyelin Phosphodiesterase 3
Sost	Sclerostin
Sp7	Sp7 Transcription Factor
Spns2	Spinster Homolog 2
Srp	Signal recognition particle
Svs7	Seminal vesicle secretory protein 7
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme
Tb.N	trabecular number
Tb.Sp	trabecular spacing
Tb.Th	trabecular thickness
Tnfrsf11a	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11a
Tnfrsf11b	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11b
Tnfsf11	Tumor Necrosis Factor Superfamily, Member 11
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
Tracp5	tartratresistente saure Phosphatase
Traf6	TNF-receptor associated cytoplasmic factor 6
Trance	TNF-related activation-induced cytokine

WB	Western Blot
Wnt	Wingless
α -CGRP	Alpha Calcitonin Gene-Related Peptide
α -MEM	alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle

12. Literaturverzeichnis

1. Lee, N.K., *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130**, 456-469 (2007).
2. Suominen, H. Muscle training for bone strength. *Aging clinical and experimental research* **18**, 85-93 (2006).
3. Vico, L., Lafage-Proust, M.H. & Alexandre, C. Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo. *Bone* **22**, 95S-100S (1998).
4. Carter, D.R. & Orr, T.E. Skeletal development and bone functional adaptation. *J Bone Miner Res* **7 Suppl 2**, S389-395 (1992).
5. Martin, T.J. & Seeman, E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **22**, 701-722 (2008).
6. Bar-Shavit, Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* **102**, 1130-1139 (2007).
7. Zaidi, M., Blair, H.C., Moonga, B.S., Abe, E. & Huang, C.L. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* **18**, 599-609 (2003).
8. Roodman, G.D. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* **17**, 308-332 (1996).
9. Amling, M. & Delling, G. [Biology of osteoclasts; their role in bone metastases]. *Der Orthopade* **27**, 214-223 (1998).
10. Felix, R., Hofstetter, W., Wetterwald, A., Cecchini, M.G. & Fleisch, H. Role of colony-stimulating factor-1 in bone metabolism. *J Cell Biochem* **55**, 340-349 (1994).
11. Yasuda, H., *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3597-3602 (1998).
12. Lacey, D.L., *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176 (1998).
13. Schinke, T., *et al.* Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nat Med* **15**, 674-681 (2009).

14. Bossard, M.J., *et al.* Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**, 12517-12524 (1996).
15. Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**, 1504-1508 (2000).
16. Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. & Aubin, J.E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *The Journal of cell biology* **106**, 2139-2151 (1988).
17. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. & Karsenty, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747-754 (1997).
18. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* **561**, 3-12 (2014).
19. Gao, Y., Jheon, A., Nourkeyhani, H., Kobayashi, H. & Ganss, B. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene* **341**, 101-110 (2004).
20. Komori, T., *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764 (1997).
21. Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., Buchet, R. & Magne, D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World journal of stem cells* **5**, 136-148 (2013).
22. Glass, D.A., 2nd, *et al.* Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental cell* **8**, 751-764 (2005).
23. Hu, H., *et al.* Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* **132**, 49-60 (2005).
24. Anderson, H.C. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports* **5**, 222-226 (2003).
25. Li, S.W., *et al.* The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenetic protein-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5127-5130 (1996).
26. Colige, A., *et al.* Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet* **65**, 308-317 (1999).
27. Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. & Greenspan, D.S. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* **271**, 360-362 (1996).

28. Boivin, G., *et al.* The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* **43**, 532-538 (2008).
29. Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M. & Manolagas, S.C. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* **13**, 793-802 (1998).
30. Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K. & Witten, P.E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 176-190 (2006).
31. Rochefort, G.Y., Pallu, S. & Benhamou, C.L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **21**, 1457-1469 (2010).
32. Bonewald, L.F. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* **26**, 229-238 (2011).
33. Mikuni-Takagaki, Y., *et al.* Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res* **10**, 231-242 (1995).
34. Poole, K.E., *et al.* Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* **19**, 1842-1844 (2005).
35. Miller, S.C., de Saint-Georges, L., Bowman, B.M. & Jee, W.S. Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy* **3**, 953-960; discussion 960-951 (1989).
36. Seeman, E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **14 Suppl 3**, S2-8 (2003).
37. Chapurlat, R. [Epidemiology of osteoporosis]. *Journal de la Societe de biologie* **202**, 251-255 (2008).
38. Dusso, A.S., Brown, A.J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *American journal of physiology. Renal physiology* **289**, F8-28 (2005).
39. Zehnder, D., *et al.* Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10**, 2465-2473 (1999).
40. Shinkyō, R., Sakaki, T., Kamakura, M., Ohta, M. & Inouye, K. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 451-457 (2004).

41. Amling, M., *et al.* Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* **140**, 4982-4987 (1999).
42. Wolff, A.E., Jones, A.N. & Hansen, K.E. Vitamin D and musculoskeletal health. *Nature clinical practice. Rheumatology* **4**, 580-588 (2008).
43. Elefteriou, F., *et al.* Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* **434**, 514-520 (2005).
44. Takeda, S., *et al.* Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111**, 305-317 (2002).
45. Ducy, P., *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* **100**, 197-207 (2000).
46. Lerner, U.H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research* **85**, 584-595 (2006).
47. Weitzmann, M.N. & Pacifici, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* **116**, 1186-1194 (2006).
48. Raisz, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* **115**, 3318-3325 (2005).
49. Habener, J.F., *et al.* Pre-parathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2616-2620 (1978).
50. Vasicek, T.J., *et al.* Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2127-2131 (1983).
51. Klee, G.G., Kao, P.C. & Heath, H., 3rd. Hypercalcemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* **17**, 573-600 (1988).
52. Mannstadt, M., Juppner, H. & Gardella, T.J. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* **277**, F665-675 (1999).
53. Brent, G.A., LeBoff, M.S., Seely, E.W., Conlin, P.R. & Brown, E.M. Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 944-950 (1988).
54. Nissen, P.H., Christensen, S.E., Heickendorff, L., Brixen, K. & Mosekilde, L. Molecular genetic analysis of the calcium sensing receptor gene in patients clinically suspected to have familial hypocalciuric hypercalcemia: phenotypic variation and mutation spectrum in a Danish population. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 4373-4379 (2007).

55. Friedman, P.A. & Goodman, W.G. PTH(1-84)/PTH(7-84): a balance of power. *American journal of physiology. Renal physiology* **290**, F975-984 (2006).
56. Hashizume, Y., Waguri, S., Watanabe, T., Kominami, E. & Uchiyama, Y. Cysteine proteinases in rat parathyroid cells with special reference to their correlation with parathyroid hormone (PTH) in storage granules. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **41**, 273-282 (1993).
57. Bringhurst, F.R., *et al.* Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo. *Am J Physiol* **255**, E886-893 (1988).
58. Rickard, D.J., *et al.* Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone* **39**, 1361-1372 (2006).
59. Martin, K.J., Hruska, K.A., Freitag, J.J., Klahr, S. & Slatopolsky, E. The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med* **301**, 1092-1098 (1979).
60. Juppner, H. Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **3**, 371-378 (1994).
61. Pinheiro, P.L., Cardoso, J.C., Power, D.M. & Canario, A.V. Functional characterization and evolution of PTH/PTHrP receptors: insights from the chicken. *BMC Evol Biol* **12**, 110 (2012).
62. Urena, P., *et al.* Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* **133**, 617-623 (1993).
63. Stanislaus, D., Devanarayan, V. & Hock, J.M. In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice. *Bone* **27**, 819-826 (2000).
64. Murer, H. & Biber, J. A molecular view of proximal tubular inorganic phosphate (Pi) reabsorption and of its regulation. *Pflugers Arch* **433**, 379-389 (1997).
65. Bouhtiauy, I., Lajeunesse, D. & Brunette, M.G. The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology* **128**, 251-258 (1991).
66. Bacskai, B.J. & Friedman, P.A. Activation of latent Ca²⁺ channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* **347**, 388-391 (1990).

67. Fraser, D.R. & Kodicek, E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* **228**, 764-766 (1970).
68. Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Roos, B.A. & Howard, G.A. Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J Bone Miner Res* **14**, 1504-1512 (1999).
69. Hock, J.M. & Gera, I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* **7**, 65-72 (1992).
70. Frolik, C.A., *et al.* Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone* **33**, 372-379 (2003).
71. Brommage, R., *et al.* Daily treatment with human recombinant parathyroid hormone-(1-34), LY333334, for 1 year increases bone mass in ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3757-3763 (1999).
72. Neer, R.M., *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **344**, 1434-1441 (2001).
73. Body, J.J., *et al.* A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4528-4535 (2002).
74. Rodan, G.A. & Martin, T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* **33**, 349-351 (1981).
75. Chambers, T.J. The cellular basis of bone resorption. *Clinical orthopaedics and related research*, 283-293 (1980).
76. Chambers, T.J. Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin-induced quiescence. *Journal of cell science* **57**, 247-260 (1982).
77. McSheehy, P.M. & Chambers, T.J. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* **119**, 1654-1659 (1986).
78. Takeda, S., *et al.* Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* **140**, 1005-1008 (1999).
79. Sakuma, Y., *et al.* Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res* **15**, 218-227 (2000).

80. Matsuzaki, K., *et al.* Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a coculture with SaOS-2 cells transfected with the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor gene. *Endocrinology* **140**, 925-932 (1999).
81. Liu, B.Y., *et al.* Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, 1952-1964 (1998).
82. Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* **13**, 66-80 (1992).
83. Simonet, W.S., *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
84. Tsuda, E., *et al.* Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 137-142 (1997).
85. Yasuda, H., *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, 1329-1337 (1998).
86. Anderson, D.M., *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179 (1997).
87. Wong, B.R., *et al.* TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* **186**, 2075-2080 (1997).
88. Wong, B.R., *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* **272**, 25190-25194 (1997).
89. Nakagawa, N., *et al.* RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 395-400 (1998).
90. Hsu, H., *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3540-3545 (1999).
91. Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M. & Hirokawa, K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* **142**, 1419-1426 (2001).

92. Walsh, N.C., *et al.* Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL. *Genes and immunity* **14**, 336-345 (2013).
93. Hikita, A., *et al.* Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* **281**, 36846-36855 (2006).
94. Hikita, A., *et al.* Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **87**, 581-593 (2009).
95. Holmbeck, K., *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81-92 (1999).
96. Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y. & Chambers, T.J. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* **188**, 997-1001 (1998).
97. Kong, Y.Y., *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
98. Fata, J.E., *et al.* The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50 (2000).
99. Mizuno, A., *et al.* Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *Journal of bone and mineral metabolism* **20**, 337-344 (2002).
100. O'Brien, C.A., Gubrij, I., Lin, S.C., Saylor, R.L. & Manolagas, S.C. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* **274**, 19301-19308 (1999).
101. Suzawa, T., *et al.* The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* **141**, 1554-1559 (2000).
102. Takami, M., *et al.* Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* **141**, 4711-4719 (2000).
103. Darnay, B.G., Ni, J., Moore, P.A. & Aggarwal, B.B. Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* **274**, 7724-7731 (1999).

104. Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D. & Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* **273**, 34120-34127 (1998).
105. Boyce, B.F., Yoneda, T., Lowe, C., Soriano, P. & Mundy, G.R. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest* **90**, 1622-1627 (1992).
106. Tanaka, S., *et al.* Osteoclasts express high levels of p60c-src, preferentially on ruffled border membranes. *FEBS Lett* **313**, 85-89 (1992).
107. Dougall, W.C., *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-2424 (1999).
108. Li, J., *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1566-1571 (2000).
109. Hakeda, Y., *et al.* Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 796-801 (1998).
110. Tsourdi, E., Rachner, T.D., Rauner, M., Hamann, C. & Hofbauer, L.C. Denosumab for bone diseases: translating bone biology into targeted therapy. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **165**, 833-840 (2011).
111. Bucay, N., *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12**, 1260-1268 (1998).
112. Copp, D.H. & Cameron, E.C. Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science* **134**, 2038 (1961).
113. Foster, G.V., *et al.* Thyroid Origin of Calcitonin. *Nature* **202**, 1303-1305 (1964).
114. Tauber, S.D. The ultimobranchial origin of thyrocalcitonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1684-1687 (1967).
115. Adema, G.J. & Baas, P.D. A novel calcitonin-encoding mRNA is produced by alternative processing of calcitonin/calcitonin gene-related peptide-I pre-mRNA. *J Biol Chem* **267**, 7943-7948 (1992).
116. Le Moullec, J.M., *et al.* The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Lett* **167**, 93-97 (1984).
117. Snider, R.H., Jr., Nysten, E.S. & Becker, K.L. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *Journal*

- of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* **45**, 552-560 (1997).
118. Whang, K.T., *et al.* Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3296-3301 (1998).
 119. Nylen, E.S., *et al.* Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med* **26**, 1001-1006 (1998).
 120. Pondel, M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International journal of experimental pathology* **81**, 405-422 (2000).
 121. Masi, L. & Brandi, M.L. Calcitonin and calcitonin receptors. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* **4**, 117-122 (2007).
 122. Goldring, S.R., Gorn, A.H., Yamin, M., Krane, S.M. & Wang, J.T. Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **25**, 477-480 (1993).
 123. Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P. & Tota, M.R. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* **9**, 745-754 (1995).
 124. Zaidi, M., Moonga, B.S., Bevis, P.J., Bascal, Z.A. & Breimer, L.H. The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **28**, 109-174 (1990).
 125. Moonga, B.S., *et al.* Regulation of cytosolic free calcium in isolated rat osteoclasts by calcitonin. *The Journal of endocrinology* **132**, 241-249 (1992).
 126. Chen, Y., *et al.* The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. Involvement of Gi, protein kinase C, and calcium. *J Biol Chem* **273**, 19809-19816 (1998).
 127. Chambers, T.J. & Moore, A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab* **57**, 819-824 (1983).
 128. Zaidi, M., Moonga, B.S. & Abe, E. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest* **110**, 1769-1771 (2002).
 129. Davey, R.A. & Findlay, D.M. Calcitonin: physiology or fantasy? *J Bone Miner Res* **28**, 973-979 (2013).
 130. Hirsch, P.F., Lester, G.E. & Talmage, R.V. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **1**, 299-305 (2001).

131. Hurley, D.L., Tiegs, R.D., Wahner, H.W. & Heath, H., 3rd. Axial and appendicular bone mineral density in patients with long-term deficiency or excess of calcitonin. *N Engl J Med* **317**, 537-541 (1987).
132. Hoff, A.O., *et al.* Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest* **110**, 1849-1857 (2002).
133. Huebner, A.K., *et al.* Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res* **21**, 1924-1934 (2006).
134. Lee, S.K., Goldring, S.R. & Lorenzo, J.A. Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* **136**, 4572-4581 (1995).
135. Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Sexton, P.M., Mendelsohn, F.A. & Martin, T.J. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* **78**, 355-360 (1986).
136. Schinke, T., *et al.* Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res* **19**, 2049-2056 (2004).
137. Keller, J., *et al.* Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun* **5**, 5215 (2014).
138. Hisano, Y., Kobayashi, N., Kawahara, A., Yamaguchi, A. & Nishi, T. The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *J Biol Chem* **286**, 1758-1766 (2011).
139. Kawahara, A., *et al.* The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* **323**, 524-527 (2009).
140. Lahiri, S. & Futerman, A.H. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**, 2270-2284 (2007).
141. Pyne, N.J., Dubois, G. & Pyne, S. Role of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid in fibrosis. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 228-238 (2013).
142. Sobel, K., *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonists mediate pro-fibrotic responses in normal human lung fibroblasts via S1P2 and S1P3 receptors and Smad-independent signaling. *J Biol Chem* **288**, 14839-14851 (2013).
143. Xiu, L., *et al.* Intracellular sphingosine 1-phosphate contributes to collagen expression of hepatic myofibroblasts in human liver fibrosis independent of its receptors. *The American journal of pathology* **185**, 387-398 (2015).

144. Huang, L.S., *et al.* Sphingosine-1-phosphate lyase is an endogenous suppressor of pulmonary fibrosis: role of S1P signalling and autophagy. *Thorax* **70**, 1138-1148 (2015).
145. Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J.J., Khosla, S. & Oursler, M.J. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20764-20769 (2008).
146. Lotinun, S., *et al.* Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest* **123**, 666-681 (2013).
147. Ryu, J., *et al.* Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO journal* **25**, 5840-5851 (2006).
148. Allende, M.L., Yamashita, T. & Proia, R.L. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* **102**, 3665-3667 (2003).
149. Kohama, T., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 23722-23728 (1998).
150. Mandala, S.M., *et al.* Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7859-7864 (2000).
151. Olivera, A. & Spiegel, S. Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins* **64**, 123-134 (2001).
152. Pyne, S. & Pyne, N.J. Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 121-131 (2002).
153. Van Veldhoven, P.P. Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol* **311**, 244-254 (2000).
154. van Veldhoven, P.P. & Mannaerts, G.P. Sphingosine-phosphate lyase. *Advances in lipid research* **26**, 69-98 (1993).
155. Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 397-407 (2003).
156. Pyne, S. & Pyne, N.J. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* **349**, 385-402 (2000).
157. Vogel, P., *et al.* Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PloS one* **4**, e4112 (2009).

158. Keller, J. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg (2011).
159. Luo, C.W., Lin, H.J. & Chen, Y.H. A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J Biol Chem* **276**, 6913-6921 (2001).
160. Gopalakrishnan, K., *et al.* Targeted disruption of Adamts16 gene in a rat genetic model of hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20555-20559 (2012).
161. Heckt, T., *et al.* No obvious phenotypic abnormalities in mice lacking the Pate4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* (2015).
162. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-1030 (1993).
163. Schulze, J., *et al.* Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res* **26**, 704-717 (2011).
164. Heckt, T. Molekulare Untersuchung der Wirkung von PTH auf die Rankl-Produktion in Osteoblasten. *Masterthesis - Universität Hamburg* (2012).
165. Kollmann, K., *et al.* Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolipidosis II. *EMBO molecular medicine* **5**, 1871-1886 (2013).
166. Lum, L., *et al.* Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* **274**, 13613-13618 (1999).
167. Hikita, A. & Tanaka, S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *Adv Exp Med Biol* **602**, 15-21 (2007).
168. Joe, B., *et al.* Positional identification of variants of Adamts16 linked to inherited hypertension. *Human molecular genetics* **18**, 2825-2838 (2009).
169. Abdul-Majeed, S., Mell, B., Nauli, S.M. & Joe, B. Cryptorchidism and infertility in rats with targeted disruption of the Adamts16 locus. *PLoS one* **9**, e100967 (2014).
170. Bektas, M., *et al.* Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem* **285**, 10880-10889 (2010).
171. Hofbauer, L.C., *et al.* The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* **15**, 2-12 (2000).

172. Rouster-Stevens, K.A., *et al.* RANKL:osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* **56**, 977-983 (2007).
173. Hay, N. & Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**, 1926-1945 (2004).
174. Bozec, A., *et al.* Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production. *The Journal of cell biology* **190**, 1093-1106 (2010).
175. Lloyd, S.A., *et al.* Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcif Tissue Int* **82**, 361-372 (2008).
176. Nakashima, T., *et al.* Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 768-775 (2000).
177. Schlondorff, J., Lum, L. & Blobel, C.P. Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J Biol Chem* **276**, 14665-14674 (2001).
178. Itoh, K., *et al.* Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J Bone Miner Res* **15**, 1766-1775 (2000).
179. Suzuki, J., *et al.* Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 1021-1027 (2004).
180. Buxton, E.C., Yao, W. & Lane, N.E. Changes in serum receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3332-3336 (2004).
181. Delmas, P.D., *et al.* The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate- is activated resorption a prerequisite for the in vivo effect of PTH on formation in a remodeling system? *Bone* **16**, 603-610 (1995).
182. Black, D.M., *et al.* The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **349**, 1207-1215 (2003).
183. Finkelstein, J.S., *et al.* The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* **349**, 1216-1226 (2003).

184. Black, R.A., *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729-733 (1997).
185. Grey, A., *et al.* A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* **140**, 4683-4690 (1999).
186. Yang, D., Guo, J., Divieti, P., Shioda, T. & Bringhurst, F.R. CBP/p300-interacting protein CITED1 modulates parathyroid hormone regulation of osteoblastic differentiation. *Endocrinology* **149**, 1728-1735 (2008).
187. Phelps, E., Bezouglaia, O., Tetradis, S. & Nervina, J.M. Parathyroid hormone induces receptor activity modifying protein-3 (RAMP3) expression primarily via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int* **77**, 96-103 (2005).
188. Lowik, C.W., *et al.* Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 1546-1552 (1989).
189. Lee, S.K. & Lorenzo, J.A. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* **140**, 3552-3561 (1999).
190. Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M. & Stoffel, W. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3638-3643 (1998).
191. Rauner, M., Sipos, W. & Pietschmann, P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *Age* **30**, 273-282 (2008).
192. Pinzone, J.J., *et al.* The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* **113**, 517-525 (2009).
193. Lavi-Moshayoff, V., Wasserman, G., Meir, T., Silver, J. & Naveh-Many, T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *American journal of physiology. Renal physiology* **299**, F882-889 (2010).
194. Vargas, M.A., St-Louis, M., Desgroseillers, L., Charli, J.L. & Boileau, G. Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway. *Endocrinology* **144**, 4876-4885 (2003).
195. Alos, N. & Ecarot, B. Downregulation of osteoblast Phex expression by PTH. *Bone* **37**, 589-598 (2005).

196. Hong, S.H., Lu, X., Nanes, M.S. & Mitchell, J. Regulation of osterix (Osx, Sp7) and the Osx promoter by parathyroid hormone in osteoblasts. *Journal of molecular endocrinology* **43**, 197-207 (2009).
197. Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. & Edwards, D.R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386**, 15-27 (2005).
198. Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N. & Edwards, D.R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome biology* **16**, 113 (2015).
199. Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C. & Caterson, B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clinical and experimental rheumatology* **26**, 139-145 (2008).
200. Kevorkian, L., *et al.* Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 131-141 (2004).
201. SurrIDGE, A.K., *et al.* Characterization and regulation of ADAMTS-16. *Matrix Biol* **28**, 416-424 (2009).
202. Davidson, R.K., *et al.* Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis research & therapy* **8**, R124 (2006).
203. Miles, R.R., *et al.* ADAMTS-1: A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs is a target for parathyroid hormone in bone. *Endocrinology* **141**, 4533-4542 (2000).
204. Lind, T., McKie, N., Wendel, M., Racey, S.N. & Birch, M.A. The hyaluronan degrading ADAMTS-1 enzyme is expressed by osteoblasts and up-regulated at regions of new bone formation. *Bone* **36**, 408-417 (2005).
205. Hu, L., *et al.* Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. *Journal of bone and mineral metabolism* **30**, 304-311 (2012).
206. Shindo, T., *et al.* ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* **105**, 1345-1352 (2000).
207. Rehn, A.P., Birch, M.A., Karlstrom, E., Wendel, M. & Lind, T. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone* **41**, 231-238 (2007).
208. Jonsson-Rylander, A.C., *et al.* Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 180-185 (2005).
209. Lee, N.V., *et al.* ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *The EMBO journal* **25**, 5270-5283 (2006).

210. Canals, F., Colome, N., Ferrer, C., Plaza-Calonge Mdel, C. & Rodriguez-Manzaneque, J.C. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S28-35 (2006).
211. Ricciardelli, C., *et al.* The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. *The American journal of pathology* **179**, 3075-3085 (2011).
212. Hirano, T., *et al.* Inhibition of tumor growth by antibody to ADAMTS1 in mouse xenografts of breast cancer. *Anticancer research* **31**, 3839-3842 (2011).
213. Tyan, S.W., *et al.* Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. *PloS one* **7**, e35128 (2012).
214. Kohno, T., *et al.* A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes, chromosomes & cancer* **49**, 342-352 (2010).
215. Lind, G.E., *et al.* ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **28**, 259-272 (2006).
216. Lu, X., *et al.* ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* **23**, 1882-1894 (2009).
217. Ito, K., *et al.* Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 212-217 (2007).
218. Newbigging, S., Zhang, M. & Saba, J.D. Immunohistochemical analysis of sphingosine phosphate lyase expression during murine development. *Gene expression patterns : GEP* **13**, 21-29 (2013).
219. Allende, M.L., *et al.* Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J Biol Chem* **286**, 7348-7358 (2011).
220. Melkko, J., Hellevik, T., Risteli, L., Risteli, J. & Smedsrod, B. Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med* **179**, 405-412 (1994).
221. Smedsrod, B., Melkko, J., Risteli, L. & Risteli, J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J* **271**, 345-350 (1990).
222. Risteli, L. & Risteli, J. Biochemical markers of bone metabolism. *Annals of medicine* **25**, 385-393 (1993).

223. Tahtela, R., Turpeinen, M., Sorva, R. & Karonen, S.L. The aminoterminal propeptide of type I procollagen: evaluation of a commercial radioimmunoassay kit and values in healthy subjects. *Clinical biochemistry* **30**, 35-40 (1997).
224. Alvarez, L., *et al.* Relationship between biochemical markers of bone turnover and bone scintigraphic indices in assessment of Paget's disease activity. *Arthritis Rheum* **40**, 461-468 (1997).
225. Dominguez Cabrera, C., Sosa Henriquez, M., Traba, M.L., Alvarez Villafane, E. & de la Piedra, C. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **8**, 147-151 (1998).
226. Suzuki, S., *et al.* Immunosuppressive effect of a new drug, FTY720, on lymphocyte responses in vitro and cardiac allograft survival in rats. *Transplant immunology* **4**, 252-255 (1996).
227. Suzuki, S., *et al.* A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* **61**, 200-205 (1996).
228. Kawai, T., *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology* **169**, 987-998 (2006).
229. Tan, W., *et al.* Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* **470**, 548-553 (2011).
230. Onal, M., *et al.* Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *J Biol Chem* **287**, 29851-29860 (2012).
231. Sun, H., *et al.* Osteoblast-targeted suppression of PPARgamma increases osteogenesis through activation of mTOR signaling. *Stem cells* **31**, 2183-2192 (2013).
232. Maeurer, C., Holland, S., Pierre, S., Potstada, W. & Scholich, K. Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM. *Cellular signalling* **21**, 293-300 (2009).
233. Singha, U.K., *et al.* Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* **103**, 434-446 (2008).
234. Bozec, A., *et al.* Osteoblast-specific expression of Fra-2/AP-1 controls adiponectin and osteocalcin expression and affects metabolism. *Journal of cell science* **126**, 5432-5440 (2013).

235. Wagner, E.F. & Eferl, R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunological reviews* **208**, 126-140 (2005).
236. Schinke, T., *et al.* The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone* **42**, 524-534 (2008).
237. Levitin, F., *et al.* PATE gene clusters code for multiple, secreted TFP/Ly-6/uPAR proteins that are expressed in reproductive and neuron-rich tissues and possess neuromodulatory activity. *J Biol Chem* **283**, 16928-16939 (2008).
238. Coronel, C.E., Winnica, D.E., Novella, M.L. & Lardy, H.A. Purification, structure, and characterization of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J Biol Chem* **267**, 20909-20915 (1992).
239. Dematteis, A., *et al.* Rat caltrin protein modulates the acrosomal exocytosis during sperm capacitation. *Biology of reproduction* **79**, 493-500 (2008).
240. Mirosevich, J., Bentel, J.M. & Dawkins, J.S. Regulation of caltrin mRNA expression by androgens in the murine prostate. *Journal of andrology* **22**, 449-457 (2001).
241. Margalit, M., *et al.* Involvement of the prostate and testis expression (PATE)-like proteins in sperm-oocyte interaction. *Human reproduction* **27**, 1238-1248 (2012).

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Menschen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank an **Thorsten Schinke** und **Michael Amling** für die Bereitstellung des Themas, die tolle Unterstützung meiner Arbeit und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ich danke **Christian Lohr** für die Begutachtung der Arbeit.

Ein großes Dankeschön an **Anke, Christin, Christina, Jean-Pierre, Johannes, Julia, Kris, Mona, Nele, Olga, Sandra, Stephanie, Till, Timur** und **alle anderen Mitarbeiter und Ex-Mitarbeiter des IOBM** für eure immerwährende Hilfsbereitschaft, das wunderbare Arbeitsklima, interessante Gespräche und den einen und anderen netten Feierabend.

Ich bedanke mich allen **Tierpflegern der Versuchstierhaltung**, v.a. bei **Gudrun Arndt, Phillip Missberger** und **Nicole Lüder**, für die Pflege und Organisation der Mauslinien.

Mein Dank geht immer an **Christoph, Christoffer, Dennis, Jan, Lasse, Lorenz, Sebastian und Sören**.

Anneke & Julius Vielen Dank für eure Unterstützung, für eure Liebe und für unser schönes Zuhause. Ihr seid und werdet immer das Wichtigste in meinem Leben bleiben.

Meinen Eltern Ohne euch wären diese Arbeit und vieles andere in meinem Leben aus vielerlei Gründen nicht möglich gewesen. Dafür danke ich euch sehr.

14. Vorveröffentlichungen

14.1 Publikationen

Yorgan TA, **Heckt T**, Rendenbach C, Helmis C, Seitz S, Streichert T, Amling M, Schinke T. Immediate effects of retinoic acid on gene expression in primary murine osteoblasts. *J Bone Miner Metab.* **34**, 161-170 (2016)

Heckt T, Keller J, Reusch R, Hartmann K, Krasemann S, Hermans-Borgmeyer I, Amling M, Schinke T. No obvious phenotypic abnormalities in mice lacking the *Pate4* gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **469**, 1069-1074 (2016).

Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, **Heckt T**, Lueth A, Krause M, Koehne T, Albers J, Schulze J, Schilling S, Haberland M, Denninger H, Neven M, Hermans-Borgmeyer I, Streichert T, Breer S, Barvencik F, Levkau B, Rathkolb B, Wolf E, Calzada-Wack J, Neff F, Gailus-Durner V, Fuchs H, de Angelis MH, Klutmann S, Tsourdi E, Hofbauer LC, Kleuser B, Chun J, Schinke T, Amling M. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun.* **5**, 5215 (2014)

Heckt T, Bickert T, Jeschke A, Seitz S, Schulze J, Ito WD, Zimmermann W, Amling M, Schinke T, Horst AK, Keller J. Increased osteoclastogenesis in mice lacking the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *PLoS One* **9**, 12 (2014)

Rendenbach C, Yorgan TA, **Heckt T**, Otto B, Baldauf C, Jeschke A, Streichert T, David JP, Amling M, Schinke T. Effects of extracellular phosphate on gene expression in murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* **94**, 474-483 (2014)

14.2 Präsentationen

Stimulating the release of soluble Rankl by osteoblasts is a unique property of PTH. Posterpräsentation. Annual ASBMR-Meeting, Houston, US. September 2014

15. Eidesstaatliche Erklärung

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

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

Unterschrift: