

# **Die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Knochenentwicklung**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Carina Würfel

geb. am 03.10.1985 in Sömmerda

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Gary Sawers
2. Prof. Dr. Inaam Nakchbandi
3. PD Dr. Martin S. Staeger

Halle (Saale), den 15.10.2015

**I INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>5</b>
<b>III</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Aufbau des Knochens .....</b>	<b>12</b>
1.1.1	Knochenentstehung während der Embryogenese .....	13
1.1.2	Entwicklung zum reifen Lamellenknochen .....	15
1.1.3	Zellen des Knochens .....	15
1.1.4	Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten .....	17
1.1.5	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	19
<b>1.2</b>	<b>Rho GTPasen .....</b>	<b>24</b>
1.2.1	Cdc42 .....	25
1.2.2	Rac1 .....	26
<b>1.3</b>	<b>Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Versuchstiere .....	36
2.2.2	Experimentelle Behandlung der Mäuse .....	38
2.2.3	Zellkultur und <i>in vitro</i> -Untersuchungen .....	39
2.2.4	DNA-Untersuchungsmethoden .....	44
2.2.5	RNA/cDNA-Untersuchungsmethoden .....	45
2.2.6	Protein-Untersuchungsmethoden .....	47
2.2.7	Knochenmethoden und histologische Untersuchungen .....	49
2.2.8	Statistische Auswertung .....	54
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung konditioneller Cdc42 und Rac1 Knockout-Mäuse .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Projekt Cdc42 .....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten .....	58
3.2.2	Phänotyp der Cdc42 Knockout-Mäuse .....	58

---

3.2.2.1	Entwicklung der langen Knochen .....	58
3.2.2.2	Entwicklung der Schädelknochen .....	60
3.2.2.3	Knochendichte .....	61
3.2.3	Histomorphometrie .....	62
3.2.4	<i>in vitro</i> -Versuche .....	65
3.2.4.1	Mineralisierungsfähigkeit isolierter Osteoblasten .....	65
3.2.4.2	Proliferations-Assay .....	66
3.2.4.3	Apoptose-Assay .....	67
3.2.4.4	Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen .....	68
3.2.4.5	Kultivierung von Knochenmarkszellen .....	69
3.2.4.6	Einfluss des Knochenmarks auf die Osteoblasten .....	70
3.2.5	Transplantationsexperimente .....	72
3.2.6	Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker .....	73
<b>3.3</b>	<b>Projekt Rac1 .....</b>	<b>76</b>
3.3.1	Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten .....	76
3.3.2	Phänotyp der Rac1 Knockout-Mäuse .....	76
3.3.2.1	Entwicklung der langen Knochen .....	76
3.3.2.2	Entwicklung der Schädelknochen .....	78
3.3.2.3	Knochendichte .....	79
3.3.3	Histomorphometrie .....	80
3.3.4	<i>in vitro</i> -Versuche .....	82
3.3.4.1	Mineralisierungsfähigkeit isolierter Osteoblasten .....	82
3.3.4.2	Proliferations-Assay .....	83
3.3.4.3	Apoptose-Assay .....	84
3.3.4.4	Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen .....	85
3.3.4.5	Einfluss des Knochenmarks auf die Osteoblasten .....	86
3.3.5	Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker .....	87
3.3.6	Behandlung mit Parathormon .....	89
3.3.6.1	Behandlung mit Parathormon <i>in vitro</i> .....	89
3.3.6.2	Behandlung mit Parathormon <i>in vivo</i> .....	90
3.3.6.2.1	Knochendichten der Parathormon-behandelten Mäuse .....	90
3.3.6.2.2	Histomorphometrische Auswertung von Knochenschnitten Parathormon-behandelter Mäuse .....	92
<b>3.4</b>	<b>Projekt Doppel-Knockout Cdc42/Rac1 .....</b>	<b>94</b>
3.4.1	Phänotyp der Knockout-Mäuse .....	94

3.4.1.1	Entwicklung der langen Knochen und der Schädelknochen .....	94
3.4.1.2	Knochendichte .....	96
3.4.2	Histomorphometrie .....	96
3.4.3	<i>in vitro</i> -Versuche .....	98
3.4.3.1	Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit Cdc42/Rac1 ausgeschalteter Osteoblasten .....	98
3.4.3.2	Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen .....	99
3.4.4	Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker .....	99
3.5	Überblick über die wichtigsten Ergebnisse	100
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Ausschaltung der Rho GTPasen mit Hilfe des Osx-Promoters in Osteoblasten</b> .....	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolierung und Nachweis von Präosteoblasten</b> .....	<b>103</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der Cdc42-cKO-Osteoblasten</b> .....	<b>103</b>
4.3.1	Proliferation und Apoptose .....	103
4.3.2	In Abwesenheit von Cdc42 ist die Differenzierung der Osteoblasten gestört	105
4.3.3	Eine gezielte Cdc42-Ausschaltung in Präosteoblasten beeinträchtigt die Knochenentwicklung .....	106
4.3.4	Cdc42 beeinflusst die Aktivität der Alkalische Phosphatase .....	107
4.3.5	Die Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten führt zu einer Adipozytendifferenzierung .....	109
4.3.6	Die Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten führt zu einer Überexpression adipozytärer Differenzierungsgene .....	110
4.3.7	Bedeutung von Cdc42 für die Osteoblasten .....	112
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der Rac1-cKO-Osteoblasten</b> .....	<b>113</b>
4.4.1	Proliferation und Apoptose .....	113
4.4.2	In Abwesenheit von Rac1 ist die Funktion der Osteoblasten gestört .....	115
4.4.3	Die Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten beeinträchtigt die Knochenentwicklung .....	116
4.4.4	Die Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten hat eine vermehrte Adipozytendifferenzierung zur Folge .....	117
4.4.5	Defizite, die durch den Verlust von Rac1 entstehen, können teilweise durch Parathormon kompensiert werden .....	118
4.4.6	Bedeutung von Rac1 für den Knochenumsatz .....	120
<b>4.5</b>	<b>Charakterisierung der Cdc42/Rac1-cKO-Osteoblasten</b> .....	<b>122</b>

---

<b>4.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>124</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>139</b>
<b>IV</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>151</b>
<b>V</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>153</b>
<b>VI</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>154</b>
<b>VII</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>155</b>

**II ABKÜRZUNGEN**

$\alpha$ MEM	<i>advanced minimum essential medium</i>
Abb.	Abbildung
abs	absolut
Ac.N	<i>adipocyte number</i>
Aj.AR	<i>adjusted apposition rate</i>
Alp	Alkalische Phosphatase Protein
<i>Alpl</i>	Alkalische Phosphatase Gen
Ap2	<i>fatty acid binding protein 4 (Fabp4)</i>
BFR	<i>bone formation rate</i>
BMD	<i>bone mineral density</i>
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BS	<i>bone surface</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
C/ebp $\alpha$ , $\beta$	<i>CCAAT/enhancer binding protein, <math>\alpha</math>,<math>\beta</math></i>
cKO	konditioneller Knockout
Cre	Rekombinase, <i>causes recombination</i>
CT	Kontrolle
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fl	<i>floxed</i>
fwd	<i>forward</i>

---

ges.	gesamt
Hprt	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyltransferase
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
loxP	<i>locus of crossing over</i>
Lsg.	Lösung
MAR	<i>mineral apposition rate</i>
Mlt	<i>mineralization lag time</i>
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	<i>mineralizing surface</i>
Ob	<i>osteoblasts</i>
Oc	<i>osteoclasts</i>
Ob.N	<i>osteoblast number</i>
OC	Osteokalzin
Oc.N	<i>osteoclast number</i>
Oc.S	<i>osteoclast surface</i>
Opg	Osteoprotegerin
OS	<i>osteoid surface</i>
Osx	Osterix
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
Ppar $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
Pref-1	<i>delta-like 1 homolog</i>
qPCR	<i>quantitative real time PCR</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rankl	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i>
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

---

RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt related transcription factor 2</i>
s.c.	subkutan
SPF	spezifiziert pathogen-freie Haltung
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Sost	<i>sclerostin</i>
s.u.	siehe unten
SV-scan	<i>scout-view-scan</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
u.a.	unter anderem / und andere
UV-Licht	ultraviolettes Licht
Vegf	<i>vascular endothelium growth factor</i>
vs.	versus
WB	Western Blot
Wisp1	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 1</i>
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZZ	Zellzahl

### **III ABILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS**

#### Einleitung

- Abb. 1.1: Allgemeiner Aufbau eines Röhrenknochens
- Abb. 1.2: Stadien der endochondralen Ossifikation
- Abb. 1.3: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten
- Abb. 1.4: Regulatoren der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen
- Abb. 1.5: Die Rolle des Wnt-Signalwegs bei der Knochenremodellierung

#### Material und Methoden

- Tab. 2.1: generierte Mauslinien konditioneller Cdc42/Rac1-Knockouts
- Tab. 2.2: Sequenzen der Genotypisierungsprimer
- Tab. 2.3: Parameter der dynamischen Histomorphometrie
- Tab. 2.4: Parameter der statischen Histomorphometrie
- Tab. 2.5: Berechnete Sekundär-Parameter

#### Ergebnisse (Cdc42)

- Abb. 3.1: Kreuzungsschemata
- Abb. 3.2: Ausschaltung von Cdc42 in Osteoblasten
- Abb. 3.3: Größe und Gewicht der Mäuse
- Abb. 3.4: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung
- Abb. 3.5: Periphere Computertomographie
- Abb. 3.6: Knochenschnitte der Tibiae, Kalzein-Färbung
- Abb. 3.7: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung
- Abb. 3.8: Anzahl der Adipozyten/Fläche
- Abb. 3.9: Hydroxyapatithaltige Knoten nach von Kossa-Färbung und deren Quantifizierung
- Abb. 3.10: Proliferations-Assay
- Abb. 3.11: Apoptosenachweis bei isolierten Osteoblasten mittels Durchflusszytometrie

- Abb. 3.12: Adipozyten-Färbung (Oil Red O) auf differenzierten Osteoblasten und Quantifizierung
- Abb. 3.13: Co-Kulturen: von Kossa-Färbung zur Detektion der Hydroxyapatit-Knoten und Oil Red O-Färbung zum Nachweis der Adipozyten
- Abb. 3.14: Transplantationsmodell
- Abb. 3.15: Histomorphometrische Analyse der Tibiae der transplantierten Mäuse
- Abb. 3.15: Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase
- Tab. 3.1: Histomorphometrie
- Tab. 3.2: Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 3.3: Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

#### Ergebnisse (Rac1)

- Abb. 3.16: Ausschaltung von Rac1 in Osteoblasten
- Abb. 3.17: Größe und Gewicht der Mäuse
- Abb. 3.18: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung
- Abb. 3.19: Periphere Computertomographie
- Abb. 3.20: Knochenschnitte der Tibiae, Kalzein-Färbung
- Abb. 3.21: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung
- Abb. 3.22: Anzahl der Adipozyten/Fläche
- Abb. 3.23: Hydroxyapatithaltige Knoten nach von Kossa-Färbung und deren Quantifizierung
- Abb. 3.24: Proliferations-Assay
- Abb. 3.25: Apoptosenachweis bei isolierten Osteoblasten mittels Durchflusszytometrie
- Abb. 3.26: Adipozyten-Färbung (Oil Red O) auf differenzierten Osteoblasten und Quantifizierung
- Abb. 3.27: Co-Kulturen, von Kossa-Färbung zur Detektion der Hydroxyapatit-Knoten und Oil Red O-Färbung zum Nachweis der Adipozyten
- Abb. 3.28: Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase
- Abb. 3.29: Periphere Computertomographie
- Abb. 3.30: Histomorphometrische Auswertung der Knochenschnitte von Mäusen vor und nach PTH-Behandlung

- Abb. 3.31: Histomorphometrische Auswertung, Anzahl der Osteoklasten und Adipozyten vor und nach der PTH-Behandlung
- Tab. 3.4: Histomorphometrie
- Tab. 3.5: Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 3.6: Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 3.7: Osteoblastenmarker nach PTH-Behandlung (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

#### Ergebnisse (Cdc42/Rac1)

- Abb. 3.32: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung
- Abb. 3.33: Periphere Computertomographie
- Abb. 3.34: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung
- Abb. 3.35: Quantifizierung der von Kossa-Färbung und Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Medium
- Tab. 3.8: Histomorphometrie
- Tab. 3.9: Osteoblasten- und Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

#### Diskussion

- Abb. 4.1: Übersichtsschema zur Funktion von Cdc42 beim Knochenumsatz
- Abb. 4.2: Übersichtsschema zur Funktion von Rac1 beim Knochenumsatz
- Abb. 4.3: Einfluss von Cdc42 und Rac1 im osteoblastischen Differenzierungsweg

#### Anhang

- 1 Tab. 1A: Zusammenfassung untersuchter Faktoren
- 2 Tab. 2A: Sequenzen der verwendeten qPCR-Primer
- 3 Tab. 3A: verwendete Antikörper
- 4 Abb. 1A: Röntgenaufnahmen (Cdc42)

- Abb. 2A: Röntgenaufnahmen (Rac1)
- 5 Abb. 3A Verlauf der Mineralisierung
- 6 Tab. 4A: Cdc42, Co-Kulturen, Osteoblastenmarker (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 4B: Cdc42, Co-Kulturen, Adipozytenmarker (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 4C: Rac1, Co-Kulturen, Osteoblastenmarker (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 4D: Rac1, Co-Kulturen, Adipozytenmarker (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- 7 Tab. 5A: Cdc42, reine Osteoblastenkultur zu Adipozyten differenziert (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 5B: Cdc42, Co-Kultur zu Adipozyten differenziert (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 5C: Rac1, reine Osteoblastenkultur zu Adipozyten differenziert (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- Tab. 5D: Rac1, Co-Kultur zu Adipozyten differenziert (rel. mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)
- 8 Tab. 9A: vergleichende Übersicht der Knochendichten vor und nach PTH- bzw. Vehikel-Behandlung
- 9 Abb. 6A: Knochenschnitte der Tibiae nach PTH- bzw. Vehikel-Behandlung (Masson-Goldner-Färbung)
- 10 Abb. 7A: Übersicht MAPK-Signalweg

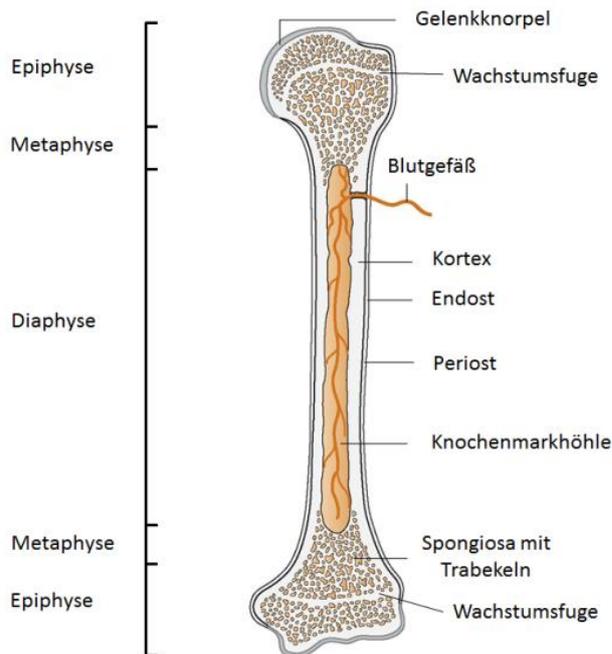
## **1 EINLEITUNG**

Die Embryogenese des Skelettsystems wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren streng reguliert. Schon geringste Veränderungen im Expressionsmuster können gravierende Folgen für den entstehenden Organismus haben. Im Folgenden werden Knochenaufbau und –umbau sowie die daran beteiligten Faktoren näher erläutert. Außerdem wird auf die Rolle von Rho GTPasen bei der Zellproliferation, Zellmigration und der spezifischen Zellfunktionen eingegangen.

### **1.1 Aufbau des Knochens**

Knochen (lat. „Os“) bilden das innere Stützskelett in Wirbeltieren. Die einzelnen Knochen sind aufgrund ihrer stützenden und schützenden Funktion zugleich druck- und zugfest. Das Knochengewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter extrazellulärer Matrix zusammen, die hauptsächlich aus Kollagen und Hydroxyapatitkristallen besteht. Chemisch gesehen besteht ein Knochen aus 45% Mineralien, 30% organischem Material und 25% Wasser (Quelch et al., 1983). Die Hydroxyapatitkristalle ( $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ ), die den Knochen stabil machen, setzen sich vorwiegend aus Kalzium-, Phosphat- und Hydroxid-Ionen zusammen, wodurch die Knochen gleichzeitig als wichtiger Mineralienspeicher dienen (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Trotz dieser Festigkeit ist der Knochen gleichfalls ein sehr dynamisches System. Ein Leben lang wird Knochen abgebaut und wieder neu gebildet, was durch intrinsische und extrinsische Faktoren bestimmt wird.

Die langen Röhrenknochen, auf denen das Hauptaugenmerk der Abhandlung liegt, können in drei Abschnitte gegliedert werden. Der lange, schmale Schaft (Diaphyse) wird von einer proximalen und einer distalen Epiphyse begrenzt, wobei Diaphyse und Epiphyse im wachsenden Knochen jeweils durch eine Wachstumsfuge getrennt sind. Die Metaphyse stellt die trichterförmige Erweiterung der Diaphyse dar und grenzt unmittelbar an die Wachstumsfuge an (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Allgemeiner Aufbau eines Röhrenknochens.** Lange Knochen werden in drei Abschnitte untergliedert. Die Diaphyse geht am proximalen und distalen Ende in die Metaphyse über. Diese wiederum wird durch eine Wachstumsfuge von der Epiphyse getrennt. Im Inneren des Knochens werden die Spongiosabälkchen und die Kompakta vom Endost überzogen, außen lagert sich das Periost an. (modifiziert nach <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/periosteal+bone>)

Am Knochen werden zwei Bauformen unterschieden: Spongiosa und Kompakta (Kortex). Das spongiöse Knochengewebe (Trabekel) ist makroskopisch betrachtet gitternetzartig aufgebaut, bestehend aus dünnen Platten und Bälkchen. Diese Spongiosa-Architektur gewährleistet eine hohe Festigkeit bei minimalem Gewicht. Der Kortex bildet eine Rindenschicht, die homogen erscheint. Im Vergleich zum Kortex bildet die Spongiosa den Hauptteil der Knochenoberfläche. Am trabekulären Knochen findet die höchste Aktivität statt (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Deshalb ist eine Veränderung der Knochendichte hier am deutlichsten sichtbar.

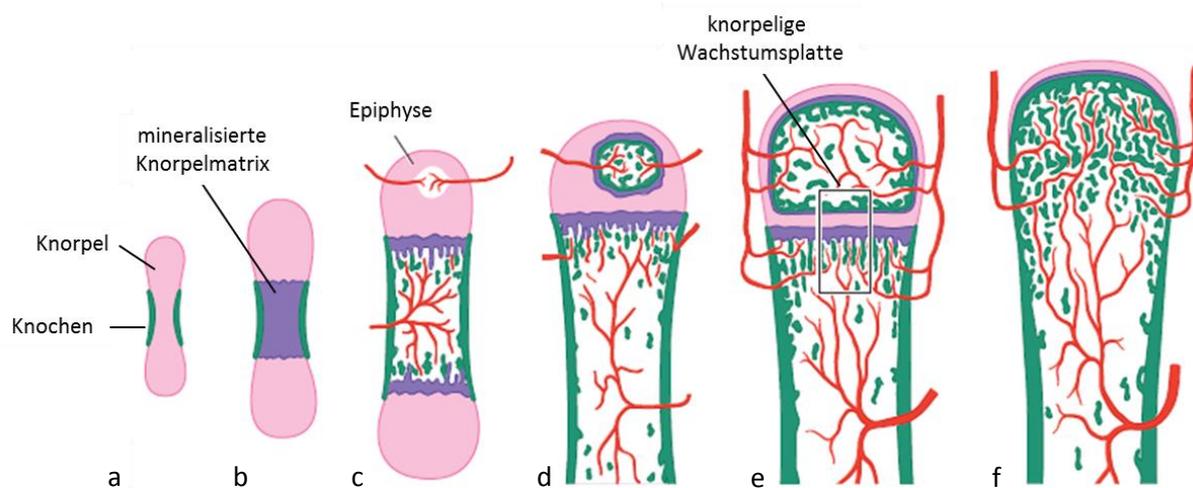
Die Bindegewebshaut bzw. Knochenhaut (Periost) bedeckt die äußere Oberfläche des Knochens. Die innere Knochenoberfläche wird von Endost bedeckt. Diese Schicht besteht aus nicht mineralisierten Kollagenfibrillen sowie Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten.

### 1.1.1 Knochenentstehung während der Embryogenese

Die Osteogenese ist ein streng kontrollierter Prozess, der je nach Art und Funktion des Knochens auf zwei Wegen ablaufen kann. Bei beiden Mechanismen kommt es im ersten Schritt zu einer Verdichtung mesenchymaler Zellen. Differenzieren sich diese Zellen direkt zu Osteoblasten, so spricht man von desmaler (intramembranöser) Ossifikation. Auf diesem Weg entstehen platte Knochen wie z. B. die Schädel- oder Beckenknochen. Der zunächst entstandene Geflechtknochen wird noch während der Entwicklung in Lamellenknochen umgebaut.

Der größte Teil des Skelettsystems entsteht jedoch durch die endochondrale Ossifikation. Der Vorgang ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Im ersten Schritt bildet sich eine Knochenmanschette um

den Knochenschaft, entsprechend der desmalen Ossifikation. Diese Manschette gibt dem sich entwickelnden Knochen Halt und Form (Pachak et al., 1986). Im Zentrum der Diaphyse differenzieren sich die kondensierten mesenchymalen Zellen des embryonalen Bindegewebes zu Chondrozyten (Knorpelzellen), (Hall, 1987). Chondrozyten produzieren hyalinen Knorpel, der hauptsächlich aus  $\alpha_1(\text{II})$ -Kollagen und Aggrecan besteht. Im Laufe der Ossifikation bilden die Chondrozyten Säulenknorpel (Proliferationszone) und differenzieren sich weiter zu hypertrophen Knorpelzellen (Blasenknorpel). Die Knorpelmatrix verkalkt, wodurch der Blasenknorpel zugrunde geht. In diesem Stadium dringen Blutgefäße durch das Perichondrium. Zusammen mit Blutzellen gelangen auch knorpelabbauende Chondroklasten in das Knorpelgewebe. Der mineralisierte Knorpel wird reguliert abgebaut. In den entstandenen Hohlräumen lagern sich mesenchymale Zellen ein, darunter auch Osteoblasten, die auf Teilen des mineralisierten Knorpels mit der Osteoidablagerung beginnen. Während die Diaphyse nach und nach verknöchert, bleibt die Epiphyse noch knorpelig. Hier setzt die Ossifikation zeitlich versetzt, aber nach gleichem Prinzip, ein. So lange eine knorpelige Wachstumsplatte vorhanden ist, kann ein Knochen in die Länge wachsen (Mackie et al., 2007; Nakashima und Crombrughe, 2003).



**Abb. 1.2: Stadien der endochondralen Ossifikation.** a) Bildung einer Knochenmanschette nach desmalem Prinzip. b) In der Diaphyse beginnt die Mineralisierung der Knorpelmatrix. c) Blutgefäße durchbrechen das Periost. Mitgeführte hämatopoetische Stammzellen differenzieren sich zu Chondroklasten, die mit dem Abbau der mineralisierten Knorpelmatrix beginnen. d) Zeitlich versetzt beginnt auf gleichem Weg die Ossifikation der Epiphyse. e) Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich eine knorpelige Wachstumsplatte, an der Längenwachstum stattfindet. f) Im ausgewachsenen Knochen ist die Wachstumsfuge geschlossen und ein Längenwachstum nicht mehr möglich. (Modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2012)

Mit der Vaskularisierung gelangen auch hämatopoetische Stammzellen (HSZ), die der Blutzellbildung dienen, in den Knochen (Cheshier et al., 1999).

### 1.1.2 Entwicklung zum reifen Lamellenknochen

Im Anfangsstadium ist das Knochenmaterial ein unregelmäßiges Gewebe. Es wird als Geflechtknochen bezeichnet. Zum Zeitpunkt der Geburt hat sich aus dem Geflechtknochen ein Lamellenknochen entwickelt. Diesen Prozess nennt man Remodellierung des Knochens. Die Remodellierung läuft in vier Schritten ab: Aktivierung, Resorption, Aufhebung und Knochenbildung. Im ersten Schritt, der Aktivierung, kommt es zur Rekrutierung von einkernigen Osteoklastenvorläuferzellen und zur Bildung von Synzytien auf der ruhenden Knochenoberfläche (Roodman, 1999). Bei der Resorption wird der Osteoklast polarisiert, wobei ein abgeschirmtes Mikromilieu aufgebaut wird. Der pH-Wert fällt durch die Sekretion von  $H^+$ -Ionen in den Resorptionsbereich, zusätzlich werden lysosomale Enzyme abgegeben (Teitelbaum und Ross, 2003). Bei der Aufhebung handelt es sich um das Absterben des Osteoklasts durch Apoptose. Im Anschluss erfolgt die Knochenbildung durch Rekrutierung von Präosteoblasten, die die entstandenen Lakunen in konzentrischen Lagen mit Knochen auffüllen. Es entstehen sekundäre Osteone, röhrenartige Zylinder, in deren Zentrum sich der Havers-Kanal befindet. In dem Havers-Kanal verlaufen Nervenfasern und Blutgefäße, an denen sich perivaskuläre Zellen anlagern. Der in dieser Entwicklung modellierte Lamellenknochen ist hoch organisiert.

### 1.1.3 Zellen des Knochens

#### Osteoblasten

Die knochenbildenden Zellen, Osteoblasten, leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab. Für die Reifung der Osteoblasten sind der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und damit die osteogenen Transkriptionsfaktoren CBFA1/RUNX2 (*core-binding factor  $\alpha$ -1/Runt related transcription factor 2*) sowie Osterix verantwortlich. Die aktiv matrixbildenden, reifen Osteoblasten sind im Gegensatz zu den Präosteoblasten nicht mehr teilungsfähig (Malaval et al., 1999).

Im aktiven Wachstumsprozess liegen die Osteoblasten in epithelähnlicher Anordnung auf der Matrixoberfläche auf. Ihre Form ist kubisch bis prismatisch. Sie produzieren eine Reihe extrazellulärer Proteine. Dazu gehören neben Kollagen Typ I auch Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin und andere Proteine. Weiterhin produzieren sie para- und autokrin Wachstumsfaktoren und besitzen Rezeptoren für Hormone, Zytokine und Vitamin  $D_3$ . Die zu Beginn abgeschiedene Matrix, vornehmlich Kollagen Typ I, ist noch nicht verkalkt und wird Osteoid genannt (Anderson, 1989; Blair et al., 2002). Anschließend akkumuliert Kalziumphosphat in Form von Hydroxyapatit in der Matrix, wodurch diese mineralisiert. Für die Mineralisierung der Knochenmatrix sind lokal hohe Konzentrationen an Kalzium- und Phosphat-Ionen notwendig. Die Kristalle werden in kleine Vesikel verpackt, die sich von den Osteoblastenprogenitoren abschnüren. Die Vesikel sind reich an

verschiedenen Phosphatasen. Eine besondere Rolle spielt die Alkalische Phosphatase, mit deren Hilfe Phosphate für die Mineralisierung von Knochen bereitgestellt werden. Im Inneren der Vesikel bilden sich erste Hydroxyapatitkristalle. Diese wachsen immer weiter, bis die Vesikelmembran zerstört wird und sich die Kristalle in die Kollagenmatrix einlagern (Anderson und Reynolds, 1973).

Um für eine synchrone Knochenbildung durch die Osteoblasten sorgen zu können, sind diese über *gap junctions* miteinander verbunden (Stains und Civitelli, 2005).

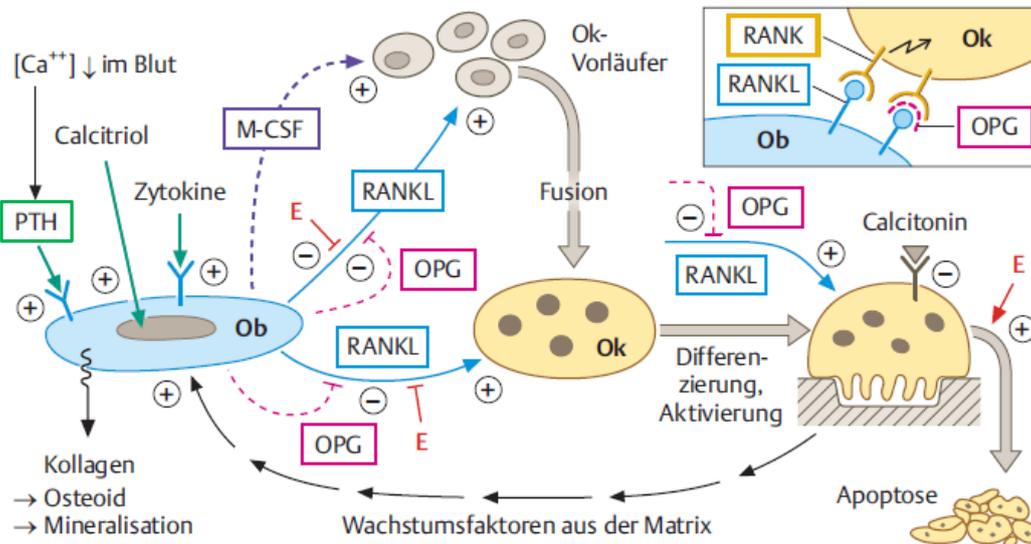
Nach der aktiven Phase der Osteoblasten ist das weitere Schicksal dieser Zellen unterschiedlich. Einige werden zu Osteozyten, indem ihnen von der nachfolgenden Osteoblastengeneration eine Osteoidschicht aufgelagert wird, sodass sie nach der Mineralisierung des Osteoids eingemauert sind. Osteozyten, die etwa 90% aller Knochenzellen ausmachen, sind keinesfalls funktionslos. Diese terminal ausdifferenzierten Osteoblasten sind stark verzweigt. Ihr Zellkörper liegt in kleinen Lakunen der Knochenmatrix. Sie bleiben über Pseudopodien, die durch *Canaliculi* verlaufen, miteinander verbunden. Ebenso kommunizieren sie mit Osteoblasten und Osteoklasten. Sie dienen der Registrierung mechanischer Reize aus der Umgebung und deren Weiterleitung (Aarden et al., 1994, Bonewald, 2007). Apoptotische Osteozyten können Signale, die u.a. zur Rekrutierung von Osteoklasten dienen, aussenden (Verborgt et al., 2002). Neueste Studien deuten zusätzlich auf eine Regulation im Phosphatmetabolismus hin (Bonewald, 2007). Der größte Teil der Osteoblasten geht jedoch nach Fertigstellung der Knochenmatrix in Apoptose. Zellen, die am Aufbau der obersten Lamelle beteiligt waren und nicht eingemauert wurden, können in einen inaktiven Zustand (*bone lining* Zellen) verfallen und sich wieder in das Endost einreihen (Bellido et al., 2012; Long, 2011).

### Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen. Deren Aufgabe besteht darin, mineralisierten Knochen abzubauen. Die aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehenden Osteoklasten sind hoch polarisiert. An der basalen, dem Knochen zugewandten Seite ist ein starker Faltenbesatz, sog. *ruffled border* zu erkennen. Dieser dient der Oberflächenvergrößerung, womit eine große Anzahl an Protonenpumpen in die Zellmembran eingelagert werden kann. Durch Abgabe von Protonen in die Resorptionslakunen werden Kalzium-Verbindungen aus der Knochenmatrix herausgelöst. Sekretierte, lysosomale Enzyme, wie Kathepsin, bauen die Matrix ab (Gowen et al., 1999). Die frei werdenden Matrixbestandteile werden von den Osteoklasten phagozytiert und auf der apikalen Seite wieder ausgeschleust. Zusammen mit Osteoblasten bewirken sie die Knochenremodellierung (Teitelbaum, 2000; Sims und Gooi, 2008).

### 1.1.4 Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten

Die Bildung und Mineralisierung der Knochen wird durch Kalzium-, Phosphat- und  $H^+$ -Konzentrationen, Hormone und mechanische Beanspruchung reguliert. Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die beteiligten Faktoren und deren Auswirkungen auf den Prozess.



**Abb. 1.3: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten.** In der Abbildung sind die wichtigsten Faktoren, die bei der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten eine Rolle spielen, dargestellt. Essentiell ist das RANK/RANKL-System. Hierbei sezernieren die knochenaufbauenden Zellen RANK-Ligand, der an Oberflächenrezeptoren (RANK) der knochenabbauenden Zellen binden kann. Somit werden die Osteoklasten in ihrer Aktivität stimuliert. Gleichzeitig produzieren die Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG), einen löslichen Rezeptor für RANKL, wodurch dessen Wirkung wieder aufgehoben wird. (Modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2012)

Die Mineralisierung ist abhängig von der  $Ca^{2+}$ - und Phosphatkonzentration im Blutplasma. Bei einer kalziumarmen Ernährung kann es zur Entmineralisierung des Knochens kommen. Wichtig für die Mineralisierung ist ebenfalls ein basischer pH-Wert, da Kalziumphosphatsalze im sauren Milieu löslich sind. Eine besonders wichtige Rolle bei der Knochenhomöostase spielen Hormone. Parathormon (PTH) und Kalzitriol beispielsweise fördern die Knochenresorption, indem sie die Bildung und Aktivität der Osteoklasten stimulieren. Gleichzeitig werden durch Kalzitriol die Bildung von Kollagen und die Mineralisierung des Knochens durch freiwerdendes  $Ca^{2+}$  und Phosphat angeregt. Durch einen Anstieg an  $Ca^{2+}$  wird die Freisetzung von Parathormon aus den Nebenschilddrüsen vermindert.

Das Hormon Kalzitinin wirkt hemmend auf die Osteoklastenaktivität und fördert die Bildung von Kalzitriol und die Osteogenese. Ein allgemein bekannter Stimulator des Knochenaufbaus ist Östrogen.

Ein Östrogenmangel führt besonders in der Postmenopause zur Entmineralisierung und zum Verlust der Knochendichte. Weitere Faktoren, die an der Knochenremodellierung mitwirken, sind Schilddrüsenhormone und Glukokortikosteroide (Wimpenny und Moroz, 2007; Baron et al., 2012; Matsumoto et al., 2012; Wojcicka et al., 2012).

Den Verlust an Knochensubstanz bezeichnet man als Osteoporose. Kommt es hingegen zu einer deutlichen Zunahme an Knochenmasse und Knochendichte, spricht man von Osteopetrose.

Zwei für das Verständnis der Arbeit wichtige Osteoblasten-Osteoklasten-Interaktionen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

### RANK/RANKL-Signalweg

Notwendig für die Proliferation von Osteoklastenprogenitoren, die Bildung von Synzytien sowie die Differenzierung zu ausgereiften, aktiven Osteoklasten sind M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und die RANK/RANKL-Interaktion. RANKL (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) wird von Osteoblasten sezerniert und kann an membranständigen RANK-Rezeptoren der Osteoklasten binden. Über diesen Mechanismus können Osteoklasten durch Osteoblasten in ihrer Bildung und Funktion stimuliert werden. Als Antagonist dieser Interaktion dient Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls von den Osteoblasten in die Umgebung abgegeben wird und an RANKL bindet. Auf diesem Weg wird eine Osteoklastenentstehung und -aktivierung vermindert. Ein Großteil der Hormone, die auf die Knochenremodellierung wirken, tut dies über den RANK/RANKL-Signalweg (Lüllmann-Rauch, 2012; Kong et al., 1999; Tang und Alliston, 2013).

### Wirkung des Parathormons

Parathormon (PTH) ist ein aus 84 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in den Nebenschilddrüsen gebildet und in den Blutkreislauf sekretiert wird (Habener und Kronenberg, 1978). PTH wird bei einem niedrigen Kalziumspiegel im Blut ausgeschüttet. Die durch das Hormon in Gang gesetzten Signalwege stimulieren die Osteoklastenaktivität, um das  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht im Blut wieder herzustellen (Baron et al., 2012). Wegen seiner klinischen Relevanz (Therapie bei Osteoporose) wurden die anabolischen Effekte von Parathormon genau untersucht. Wie bereits erwähnt wirkt PTH sowohl auf Osteoblasten als auch indirekt auf Osteoklasten. Bei einer kontinuierlichen Gabe setzt sich die katabolische Wirkung (Knochenresorption) durch. Wird PTH jedoch intermittierend verabreicht, wird der anabolische Knochenaufbau stimuliert (Tam et al., 1982; Hock und Gera, 1992) indem die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen, vor allem in der Spongiosa, hochreguliert werden (Nishida et al., 1994). Neben PTH existiert weiterhin PTHrP (*PTH-related protein*). Über die kalziumregulierende Funktion dieses verwandten Proteins gibt es noch keine

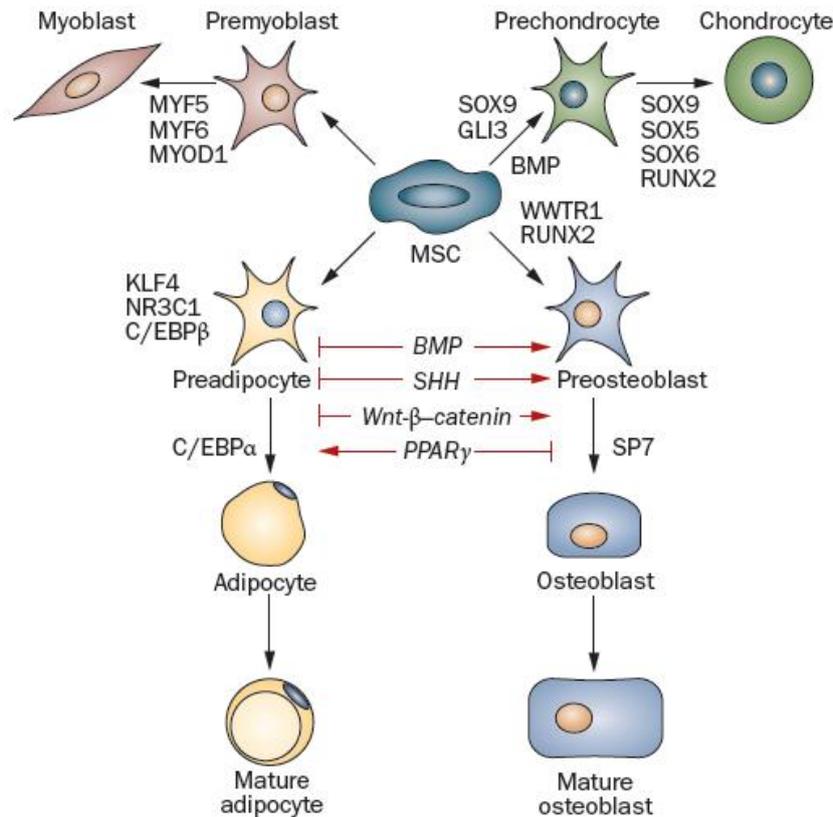
klaren Aussagen der Wissenschaftler. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Patienten, die an Hypoparathyreoidismus leiden, PTHrP allein eine Normokalzämie nicht aufrechterhalten kann.

PTH und PTHrP weisen eine hohe Affinität zu den gleichen Rezeptoren auf. So können sie an oberflächlichen PTH-Rezeptoren (PTH1R) der Osteoblasten binden. Eine verkürzte Form des Parathormons (PTH 1-34) und PTHrP können durch Bindung an den Rezeptor ebenfalls die Wirkung auf die Knochenremodellierung ausüben. Im Knochen, wie auch in der Niere, ist PTH der Hauptagonist für den PTH1-Rezeptor (Heinrich et al., 2014, Montagnani, 2014). Die PTH1R-Aktivierung spielt ebenfalls im WNT-Signalweg eine wichtige Rolle. Infolge der Kaskade kommt es zur Stabilisierung der  $\beta$ -Catenins, wodurch es in den Zellkern transloziert und dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Genexpression knochenbauender Faktoren hoch- und die der knochenresorbierenden Faktoren herunterreguliert (Abb. 1.5), (Baron und Kneissel, 2013).

Osteoblasten besitzen als einzige Knochenzellen Rezeptoren für Parathormon (Wong, 1984). In der Literatur sind weitere Rezeptoren beschrieben, deren Aufgaben aber noch nicht vollständig wissenschaftlich belegt sind (Usdin et al., 2000).

#### 1.1.5 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) wurden 1970 zum ersten Mal von Friedenstein beschrieben (Friedenstein et al., 1970). Diese Stammzellen wurden aus verschiedenen Geweben isoliert, u.a. aus Knochenmark und Fettgewebe. Daher vermutete man ein großes Differenzierungsspektrum (Bobis et al., 2006; Kern et al., 2006). Die multipotenten Zellen können sich zu Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten (Friedenstein et al., 1976; Pittenger et al., 1999) und Myoblasten (Zuk et al., 2001) entwickeln. In Abbildung 1.4 sind die Differenzierungswege und Regulatoren der einzelnen Entwicklungsstadien der MSZ vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1.4: Regulatoren der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.** Die multipotenten Stammzellen des Knochenmarks können sich zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren. (Takada et al., 2009)

### Osteoblastendifferenzierung

Im gesunden Knochengewebe gehen aus den mesenchymalen Stammzellen vorwiegend Osteoblasten hervor, während die Adipogenese gehemmt ist. Wie in Abschnitt 1.1.1 erklärt, verläuft die Differenzierung in mehreren Stadien: 1.) Proliferation der Progenitorzellen und Entwicklung reifer Osteoblasten, 2.) Ablagerung extrazellulärer Matrix und 3.) Mineralisierung der Matrix. Jeder Entwicklungsschritt ist durch ein genaues Expressionsmuster gekennzeichnet. Faktoren der Osteoblastendifferenzierung werden hauptsächlich durch den WNT-Signalweg induziert. Eine genauere Beschreibung hierzu befindet sich auf Seite 22ff.

Die Hauptinduktoren des osteoblastischen Differenzierungsweges sind die *bone morphogenic proteins* (BMP 2, 4, 6 und 7), die sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Adipogenese ausüben (Muruganandan et al., 2009). Ein weiterer essentieller Faktor, der zur Bildung von Präosteoblasten führt, ist RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*). RUNX2 kann von BMP oder ERK1/2-abhängigen Wegen induziert werden (Lee et al., 2000). Welche Rolle RUNX2 in der Knochenentwicklung spielt wird deutlich, wenn die Genexpression spezifisch in Osteoblasten

ausgeschaltet wird. Die Ausschaltung führt zur Akkumulation unreifer Osteoblasten sowie zum vollständigen Ausbleiben der Mineralisierung des Skelettsystems (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). RUNX2 kann an das *osteoblast-specific cis-acting element 2* (OSE2) binden und so die Bildung weiterer Proteine der Osteoblastogenese, wie z.B. Osteopontin (OPN) induzieren (Ducy et al., 1997; Nakashima und de Crombrughe, 2003). Ebenfalls ein früher osteoblastärer Marker ist der Transkriptionsfaktor Osterix (OSX, SP7). RUNX2 wirkt *upstream* von Osterix. (Nakashima et al., 2002). Die Bildung der Alkalischen Phosphatase (ALP) ist ebenfalls in einem frühen Stadium der Knochenentwicklung nachweisbar. Dieses Enzym ist an einen Lipidanker an der Außenseite der Plasmamembran gebunden. Durch Spaltung organischer Phosphate und Pyrophosphat wird anorganisches Phosphat für die Mineralisierung zur Verfügung gestellt (Stanford et al., 1995; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Bei Einsetzen des Mineralisierungsprozesses werden weitere Gene in ihrer Expression durch die Wirkung von RUNX2 hochreguliert. Dazu zählt u.a. Osteokalzin. Das in die Umgebung sezernierte Protein bindet Hydroxyapatit und Kalziumphosphat. Mit diesem Schritt ist die Osteogenese abgeschlossen.

Die Knochenmatrix besteht größtenteils aus Kollagen Typ I, welches über  $\alpha_1\beta_1$ -Intergrine mit der Membranoberfläche der Osteoblasten interagiert. Dieses Zusammenspiel führt zur Aktivierung des ERK-Signalwegs, was wiederum in der Aktivierung von RUNX2 endet (Salaszynk et al., 2004).

### Adipozytendifferenzierung

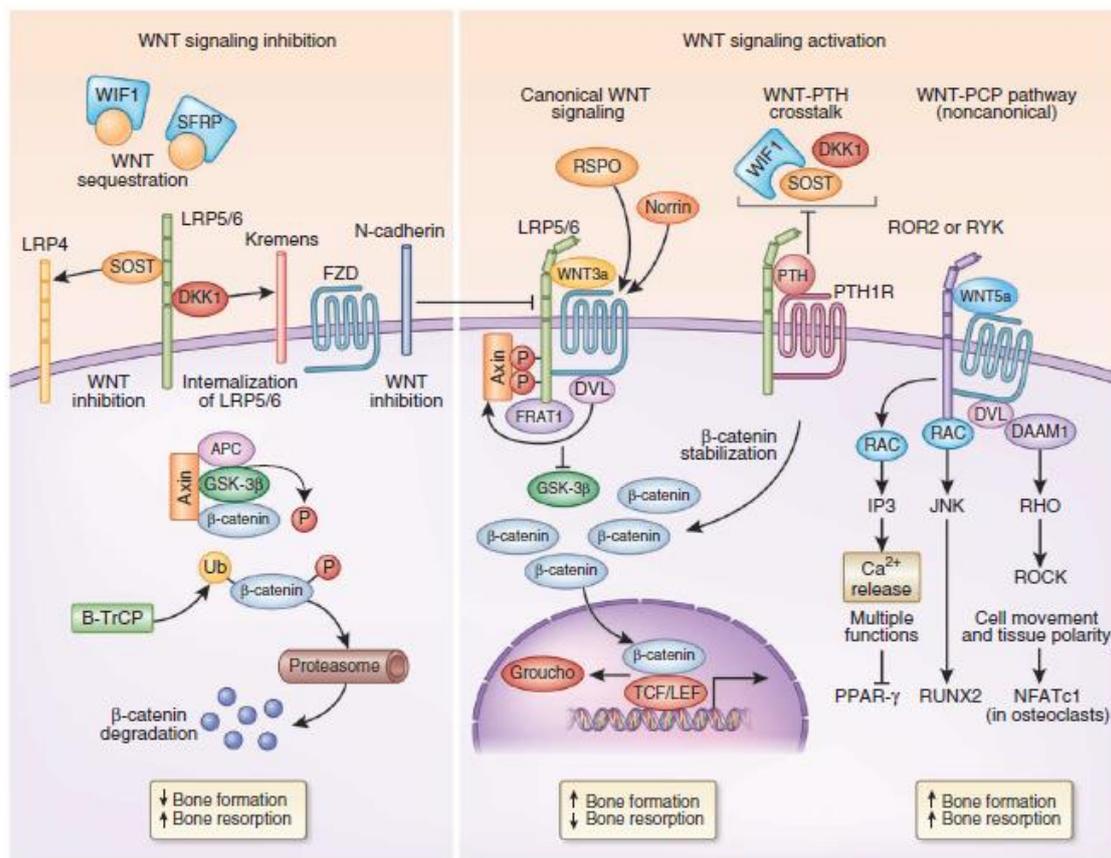
Fettzellen gehen ebenfalls aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen hervor. Bevor die Proliferation arretiert und die Differenzierung einsetzt, machen die Zellen einige Mitosen durch. Für den ersten Differenzierungsschritt sind die BMP 4 und 2 notwendig. Wie bei der Osteogenese sind auch WNT-Proteine daran beteiligt (Pairault und Green, 1979; Tang und Lane, 2012).

Die frühe Adipozytendifferenzierung ist durch hohe Expressionsraten an *CCAAT/enhancer binding protein*  $\beta$  und  $\delta$  (C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ ) gekennzeichnet. Diese Faktoren lagern sich zu Heterodimeren zusammen, welche dann PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferative activated receptor*  $\gamma$ ) aktivieren. C/EBP leitet somit die Differenzierung ein (Christy et al., 1989), während PPAR $\gamma$  die Reifung der Adipozyten fördert (Tontonoz et al., 1994). Zusammen mit C/EBP $\alpha$  koordiniert PPAR $\gamma$  auch die Arrest-Phase, die typisch für den Beginn der Adipozytenentwicklung ist (Timchenko et al., 1996; Altioek et al., 1997). Beide Proteine aktivieren anschließend weitere adipozytenspezifische Moleküle, wie beispielsweise AP2 (FABP4, *fatty acid binding protein 4*), GLUT4 (*solute carrier family 2, facilitated glucose transporter*), SCD1 (*stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*), PEPCCK (*Phosphoenolpyruvat carboxykinase*) und Leptin. Diese werden für den Auf- und Abbau der Lipidtropfen im Zytoplasma benötigt (Gregoire et al., 1998). Reife Adipozyten fallen im Gewebe durch ihre Größe auf (bis 100 $\mu$ m). Die Zellen

erscheinen als Form eines Siegelrings. Durch die große mit Triglyceriden gefüllte Vakuole (univakuolär) ist nur ein schmaler Zytoplasmasaum zu erkennen. Der Zellkern ist an den Zellrand gedrängt (Lüllmann-Rauch, 2012).

WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg, der bisher nur kurz angesprochen wurde, ist essentiell für grundlegende biologische Prozesse, wie der Embryo-, Organo- und Tumorgenese. Welche Rolle er in der Knochenentwicklung einnimmt, ist der Abbildung 1.5 zu entnehmen. Der WNT-Signalweg kann in zwei Hauptäste aufgespalten werden: 1.) kanonischer (Cardigan und Peifer, 2009) und 2.) nicht-kanonischer Weg. Dieser ist wiederum in einen WNT/PCP-Signalweg (*planar cell polarity*) und einen WNT-Kalzium Signalweg unterteilt (Piters et al., 2008; Kühl et al., 2000; Kohn und Moon, 2005; Jenny, 2010).



**Abb. 1.5: Die Rolle des WNT-Signalwegs bei der Knochenremodellierung.** Die WNT-Signalwege werden in einen kanonischen ( $\beta$ -Catenin-abhängig) und einen nicht-kanonischen ( $\beta$ -Catenin-unabhängig) Weg unterteilt. Nähere Ausführungen im Text. (Baron und Kneissel, 2013)

WNT-Proteine (*wingless-type MMTV integration site family*) sind Glykoproteine, die an transmembranalen FZD-Rezeptoren (*frizzled homolog*) binden. Im kanonischen Signalweg führt das zur Rekrutierung von Co-Rezeptoren, wie LRP5 oder LRP6 (*low density lipoprotein receptor related protein 5,6*). Durch die Interaktion von *dishevelled* (DVL) wird Axin zum LRP5/6 rekrutiert. Dieser Komplex bewahrt zusammen mit FRAT1 (*frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1*) und GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 beta*)  $\beta$ -Catenin vor einer Phosphorylierung und seinem Abbau im Proteasom.  $\beta$ -Catenin kann nun im Zytoplasma akkumulieren und in den Zellkern wandern, wo es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T-cell specific transcription factor/ lymphoid-enhancer binding factor*) Zielgene, wie die Alkalische Phosphatase (Baron und Kneissel, 2013; Rawadi et al., 2003) und Osteoprotegerin (Glass et al., 2005) aktiviert. Der kanonische Signalweg wird nicht nur durch die zahlreichen WNT-Moleküle reguliert, sondern auch über extrazelluläre Antagonisten, wie DKK1 (*dickkopf homolog 1*), SOST (*sclerostin*) und WISE (*Sostdc1, sclerostin domain containing 1*), die an LRP5/6 binden können.

In Abwesenheit von WNT-Molekülen kann dieser Signalweg auch über den PTH1-Rezeptor aktiviert werden. Durch Bindung von PTH kommt es ebenfalls zum Zusammenschluss des Komplexes mit LRP5/6 (Bodine, 2008; Piters et al., 2008).

Der bisher weniger gut verstandene nicht-kanonische WNT-Signalweg ist  $\beta$ -Catenin-unabhängig. Im WNT/PCP-Weg binden WNT-Proteine ebenfalls an FZD-Rezeptoren, wodurch *dishevelled* und DAAM1 (*dishevelled associated activator of morphogenesis 1*) rekrutiert werden. Dieser Komplex aktiviert die kleinen G-Proteine Rho, welche dann ihrerseits die Rho-assoziierten Kinasen (ROCK) aktivieren. Proteine, die über diesen Weg stimuliert werden, dienen hauptsächlich der Migration und Zellpolarität (Strutt et al., 1997; Akiyama und Kawasaki, 2006; Piters et al., 2008). DVL kann aber auch an RAC (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) binden, wodurch die Jun Kinase (JNK) initiiert wird, knochenbauende Faktoren, wie RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), in ihrer Bildung zu steigern.

Der WNT-Kalzium-Signalweg wird durch WNT5a induziert. Durch Bindung an den *frizzled*-Rezeptor wird die Phospholipase C aktiv, welche PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) spaltet. Das aus PIP<sub>2</sub> entstandene IP<sub>3</sub> (Insositoltriphosphat) bewirkt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>. Dieser Botenstoff ist in der Lage Zielproteine, wie z.B. PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) einem essentiellen Adipozyten-Differenzierungsmarker, zu aktivieren oder zu hemmen (Baron und Kneissel, 2007; Baksh et al., 2007, Takada et al., 2009).

## WNT-Liganden Funktion in der Knochenentwicklung

Bis heute sind 19 humane bzw. murine WNT-Gene bekannt. Die WNT-Liganden wirken auf verschiedene Stadien der Knochenentwicklung ein, Chondrogenese, Osteoblastogenese und Osteoklastogenese sind inbegriffen. Mutationen und Deletionen können gravierende Auswirkungen auf die Skelettentwicklung haben. Wissenschaftler fanden heraus, dass bestimmte Mutationen im WNT1-Gen zu *Osteogenesis imperfecta* (Glasknochenkrankheit) führen (Fahiminiya et al., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass WNT3a für die Ausbildung der Gliedmaßen und die kraniofaziale Entwicklung von Bedeutung ist. WNT4, WNT6, WNT9a und WNT16 sind wichtig für die Gelenkentwicklung. WNT4 wird zudem für die Chondrogenese benötigt. WNT5a und WNT5b koordinieren die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten (Wang et al., 2014). Takada et al. stellten in einer Studie *Wnt3<sup>+/-</sup>* und *Wnt5a<sup>+/-</sup>* Mäuse vor, die nur eine sehr geringe Knochendichte aufwiesen (Takada et al., 2007a,b). Für WNT7a wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Entwicklung der Extremitäten nachgewiesen. WNT7b und WNT11 wurden als endogene Liganden identifiziert, die die Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung regulieren. WNT6, WNT10a und WNT10b stimulieren die Osteoblastogenese und inhibieren die Adipogenese. Ein Verlust an WNT16 führt zu einer verminderten Knochendichte und erhöht somit das Frakturrisiko (Wang et al., 2014).

Alle in der Dissertation untersuchten Markergene bzw. Proteine sind tabellarisch im Anhang 1 zusammengefasst.

## **1.2 Rho GTPasen**

Die Familie der Rho-Proteine gehört zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen. Rho GTPasen sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 21kDa. Rho-Proteine unterscheiden sich durch eine zusätzliche Rho-Struktur in der GTPase-Domäne, begleitet von einer kurzen N- und C-terminalen Kette (Valencia et al., 1991; Wennerberg und Der, 2004). Sie gelten als Schlüsselmediatoren des nicht-kanonischen und kanonischen WNT-Signalwegs (Schlessinger et al., 2009) und besitzen daher in zahlreichen Zellprozessen regulatorische Funktionen. Sie sind beteiligt an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, dem Zellzyklus und der Gentranskription. Ebenso beeinflussen sie die Zelladhäsion, Zellmigration, Phagozytose, Zytokinese, zelluläre Morphogenese, Polarisation sowie das Zellwachstum und Zellüberleben (Olson et al., 1995; Evers et al., 2000; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Yang et al., 2001). Eine Fehlregulierung kann demzufolge zu malignen Transformationen führen. Eine Rolle in der Tumorgenese wurde bereits beschrieben (Sahai und Marshall, 2002). Die Aktivierung der Rho GTPasen wird über verschiedene Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Zu den

wichtigsten Rezeptoren zählen die Zytokin- und Tyrosinkinase, Adhäsions-Rezeptoren (u.a. Integrine) und die GPC-Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*), (Kjoller und Hall, 1999; Sah et al., 2000).

Rho GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, Guanosintriphosphat-gebundenem (GTP) und inaktiven, Guanosindiphosphat-gebundenem (GDP) Zustand. Dieser Wechsel wird von zwei Klassen regulatorischer Moleküle kontrolliert. *Guanine nucleotide-exchange factors* (GEF) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und generieren so die aktive Form. Diese ist dann in der Lage, auf Zielproteine zu wirken. *GTPase-activating proteins* (GAP) hingegen regulieren den Wechsel von der GTP- zur GDP-gebundenen Form. Somit wird die intrinsische Funktion der kleinen GTPasen verstärkt. Eine dritte Gruppe regulatorischer Proteine stellen die *guanine nucleotide-dissociation inhibitors* (GDI) dar. Diese Proteine stabilisieren die GDP-gebundene Konformation. Außerdem führen die GDI zur Loslösung der GTPase aus der Membran, sodass der Transport zwischen verschiedenen Zellkompartimenten möglich wird. Besonders die Studien zur Rolle der GDI befinden sich noch weitgehend in den Anfängen (Schmidt und Hall, 2002; Rossman et al., 2005).

Aufgrund struktureller Eigenschaften werden die Rho-Proteine in zehn Untergruppen unterteilt. Diese sind: Cdc42, Rac1, RhoA, RhoD, Rif/RhoF, Rnd3/RhoE, TTF/RhoH, Chp/RhoV, mitochondriales Rho (Miro1/RhoT1) und RhoBTB (*Rho-related BTB-domain-containing protein*), (Wennerberg und Der, 2004; Bishop und Hall, 2000).

### 1.2.1 Cdc42

Cdc42 (*cell division cycle protein*) wurde als erstes Mitglied der Rho GTPase-Familie in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Es wurde als essentieller Faktor der Aktin-Zytoskelett-Organisation identifiziert. Das im Menschen gefundene Homolog ist hochkonserviert, was auf grundlegende Funktionen bei Zellprozessen hindeutet (Johnson und Pringle, 1990).

Die Cdc42-Subfamilie besteht aus Cdc42, Rhoj (TC10L, TCL), Rhpq (TC10), Wrch-1 und Wrch-2/Chp. Am besten erforscht sind bisher zwei Isoformen, die durch alternatives Spleißen des *Cdc42*-Gens hervorgehen: das ubiquitär exprimierte Cdc42H und das gehirnspezifische G25K (Wennerberg und Der, 2004). TCL und TC10 sind ebenfalls Isoformen, deren Funktionen Cdc42 sehr ähnlich sind. Außerdem interagieren sie mit den meisten bekannten Cdc42-Effektorproteinen. Die Aktivität von TCL und TC10 kann dennoch auch Cdc42-unabhängig und durch weitere Stimuli reguliert werden (Murphy et al., 1999).

Alle Mitglieder der Cdc42-Familie, ausgenommen Wrch-1, binden an WASP (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein*) und an das ubiquitär verbreitete N-WASP. Dieser Komplex bindet und aktiviert daraufhin den Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*)-Komplex, was zur Aktin-Polymerisierung führt (Cory et al., 2003). Somit kommt Cdc42 eine wichtige Bedeutung bei der Ausbildung von Filopodien,

Zellmigration, Endozytose und dem Vesikeltransport zu (Bu et al., 2010). Ein weiterer *downstream* Effektor von Cdc42 ist Pak (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase*). Er ist an der Ausbildung von fokalen Adhäsionsstellen beteiligt und beeinflusst den Tretmühlenmechanismus bei migrierenden Zellen (Bagrodia und Cerione, 1999). Gut verstanden ist auch die Interaktion zwischen Cdc42 und dem Par6-Par3-atypischen PKC-Komplex (aPKC, *atypical protein kinase C*). Dieser spielt eine vordergründige Rolle in der Etablierung der Polarität von Epithelzellen. Der Aufbau einer apikalen-basalen Polarität in wachsendem Gewebe ist ein Schlüsselereignis in der Entwicklung. Bei einer fehlerhaften Zellpolarität droht außerdem die Ausbildung eines falsch orientierten Spindelapparates während der Zellteilung (Jaffe et al., 2008). Dass Cdc42 wichtig für diese Zellprozesse ist, aber nicht essentiell, konnten Czuchra et al. zeigen (Czuchra et al., 2005).

Welche Rolle Cdc42 in der Knochenentwicklung spielt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Ito et al. generierten Mausmodelle, in denen die Osteoklasten das Gen nicht exprimierten bzw. überexprimierten. Die *loss-of-function* Mäuse entwickelten eine Osteopetrose, während *gain-of-function* Mäuse osteoporotisch wurden. Es stellte sich heraus, dass Cdc42 die Proliferation und Apoptose der Osteoklasten moduliert. Außerdem ist es an M-CSF- und Rankl-induzierten Signalwegen beteiligt, die zur Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen führen (Ito et al., 2010).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cdc42 an der Aufrechterhaltung hämatopoetischer Stammzellnischen im Knochenmark beteiligt ist (Yang und Zheng, 2007).

Ein für die Diskussion wichtigen Fakt liefern die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Chang. Es wird vermutet, dass TC10 durch Rapgef1 (*Ras proximity guanine nucleotide exchange factor 1*) nach Insulin-Stimulation in Adipozyten aktiviert wird. TC10 vermittelt daraufhin die Glut4-Translokation zur Plasmamembran für die Aufnahme von Glukose in die Zelle, wo sie zu Triacylglycerinen umgewandelt wird. Somit konnte auch die Beteiligung einer Cdc42-GTPase an der Adipozytendifferenzierung nachgewiesen werden (Chang et al., 2002).

### 1.2.2 Rac1

Zur Rac-Unterfamilie gehören Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, 2, 3*) und RhoG. Rac1 wird ubiquitär exprimiert, Rac2 kommt in hämatopoetischen Zellen und Rac3 vorwiegend in Neuronen und malignem Gewebe vor (Didsbury et al., 1989). Die Hauptaufgabe der Rac-Proteine besteht in der Bildung von Lamellipodien und Falten an der Zellperipherie. Diese Strukturen sind reich an Aktinfilamenten, welche auch der Migration dienen (Hawkins et al., 1995; Nobes und Hall, 1995). Ebenfalls spielen die Rac-Moleküle eine Rolle bei der Endo- und Exozytose, sowie beim Vesikeltransport. Die Ausschaltung von Rac1 ist embryonal letal. Ein Verlust an Rac2 erlaubt hingegen eine nahezu normale Entwicklung. Jedoch sind Defekte der hämatopoetischen

Zellen zu beobachten (Sugihara et al., 1998; Roberts et al., 1999). Ursache hierfür ist die Bindung von Rac an eine NADPH-Oxidase-Untereinheit, sodass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gefördert wird. Die ROS-Produktion spielt mitunter eine wichtige Rolle bei der Phagozytose durch Immunzellen. Außerdem aktivieren die ROS auch den NFκB (*nuclear factor κ B*)-Signalweg, der u.a. zur Ausbreitung von Zellen führt (Werner, 2004).

Veröffentlichungen von Croke, Williams und Teitelbaum zeigen, dass Rac-Proteine an der Knochenentwicklung beteiligt sind. Da in Osteoklasten sowohl Rac1 als auch Rac2 vorkommen, wurden Einzel- und Doppel-Knockoutmäuse generiert. Eine kombinierte Ausschaltung beider Isoformen führte zum Ausbleiben der Knochenresorption und somit zur Bildung osteopetrotischer Knochen. In Abwesenheit nur eines Rac-Moleküls war kein vergleichbarer Effekt zu beobachten. Bei Verlust von Cdc42 kommt es zu einer verminderten Osteoklastenzahl durch Inhibierung der Proliferation von Progenitorzellen und durch eine beschleunigte Apoptose reifer knochenabbauender Zellen. Fehlt hingegen Rac, so kann nur *in vitro* eine verminderte Zellzahl festgestellt werden, nicht jedoch *in vivo*. Vermutlich wird durch die Ausschaltung hauptsächlich die Funktion der Osteoklasten beeinträchtigt (Croke et al., 2011).

Weiterhin wurde in einigen Experimenten nachgewiesen, dass Rac-Proteine auch die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen kontrollieren. Es wurde gezeigt, dass sowohl Cdc42 als auch Rac1 die Chondrogenese positiv beeinflussen, während RhoA diesen Prozess inhibiert. Die Inhibierung von Rac1 *in vitro* (ATDC5, Knorpelzell-Linie) resultiert in einer verminderten mRNA-Expression chondrogener Markergene, wie Kollagen II, Aggrecan, Sox9, 5 und 6 (*sex determining region Y-box*). Interessanterweise war auch das Adhäsionsmolekül N-Cadherin betroffen. Eine Überexpression von Cdc42 und Rac1 bewirkte das Gegenteil (Woods et al., 2007).

### **1.3 Zielstellung der Arbeit**

In der vorliegenden Abhandlung soll die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 in der Entwicklung der Knochen untersucht werden.

Rho GTPasen sind an zahlreichen grundlegenden Zellprozessen beteiligt. Die Hauptaufgabe besteht in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Daraus ergibt sich eine Beteiligung an der Zellproliferation und -migration, dem Zellzyklus, der Endo- und Exozytose und dem Vesikeltransport. Demzufolge sind sie Mitglieder wichtiger Signalkaskaden, die streng reguliert werden müssen. Es stellte sich die Frage, wie sich die Abwesenheit einer dieser Rho GTPasen spezifisch in Osteoblasten auf die Knochenentwicklung auswirkt. Erwartet wurden deutliche Fehlregulationen während der Ossifikation. Vordergründig sollten ausgeschaltete Zellen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert und deren neuen Eigenschaften beschrieben werden. Weiterhin interessierten auch die Folgen der

Ausschaltung von Cdc42 bzw. Rac1, ob beide Genprodukte zum gleichen Zeitpunkt in der Entwicklung benötigt werden und ob Defizite durch ein verändertes Expressionsmuster kompensiert werden können. Inwieweit sich Cdc42 und Rac1 in der Knochenentwicklung beeinflussen, sollte mit Hilfe von Doppel-Knockout-Mäusen geklärt werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **Geräte**

Autoklav	Tuttnauer Systec 5075 EL, Systec (Wettenberg)
Binokular	Carl Zeiss GmbH (Göttingen)
Brutschrank	Innova CO-170, New Brunswick Scientific (Edison NJ, USA)
Blotsystem	Blot Module Kit CE Mark EI0002, Invitrogen (Karlsruhe)
Entwicklungsgerät	Typ CP1000, Agfa (Köln)
Gelsystem DNA	PerfectBlue 40-1410, Peqlab (Erlangen)
Gelsystem Protein	XCell Sure Lock Mini-Cell EI0002, Invitrogen (Karlsruhe)
Geldokumentation	Gel Doc 1000, Bio-Rad (München)
Densitometer	GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad (München)
Durchflusszytometer	LSRII, BD Biosciences (Heidelberg)
Hämatologieanalysator	CELL-DYN Emerald, Abbott Diagnostics (Wiesbaden)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Kameras	EOS 350 Digital, Canon (Spiegelreflex), (Tokio, Japan)
Light Cycler	Light Cycler 2.0 Instrument, Roche (Mannheim)
Magnetrührer	Yellow line MSH basic, Carl Roth (Karlsruhe)
Mikroskope	DM IL, inverses Routinemikroskop, Leica, mit Canon Kamera (Wetzlar) Vanox-S, Olympus, mit Sony Kamera (CCD), (Valley PA, USA)
Mikrotom	Kryostat, CM 3050, Leica (Wetzlar)
Mikrowelle	MS-1715TU Multiwave, LG Electronics (Seoul, Korea)
Pipettierhilfe	Pipetboy Comfort Classic, IBS Integra (Fernwald)
pH-Meter	Typ 761 Calimatic, Knick (Berlin)
Pumpe	Pharmacia LKB Pump P1, GE Healthcare (Freiburg)
pQCT	XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik (Pforzheim)
Röntgengerät	Typ 8050-010 Faxitron, Field Emission Corporation (McMinnville, OR, USA)
Scanner	CanoScan5600F, Canon (Tokio, Japan)
Sterilbank	Holten LaminAir 1.2, Thermo (Waltham MA, USA)
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems (Waltham MA, USA) T Personal Thermocycler, Biometra (Göttingen)

Trockenschrank	Sterilisator, Memmert (Schwabach)
Ultragefrierschrank	Innova U725, New Brunswick Scientific (Edison NJ, USA)
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender & Hobein (Zürich, Schweiz)
Waagen	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern (Balingen) Feinwaage, ABJ 120-4M, Kern (Balingen)
Wasserbad	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Zellzählapparatur	Typ TT CASY®; Innovatis, Roche (Mannheim)
Zentrifugen	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz) Biofuge 15, Heraeus (Wehrheim) Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo (Wehrheim) Light Cycler 2.0 Sample Carousel (20µl), Roche (Mannheim)

### Chemikalien

Aluminiumsulfat	#192430050, Acros Organics (Geel, Belgien)
Borsäure	#A3581,1000, Applichem (Darmstadt)
Brilliant Blau R250	#3862.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	#T116.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Dexamethason	#D1756-100MG, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	#A3567, 0500, Applichem (Darmstadt)
EDTA	#E5134, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Eiweiß-Albumin	#P049.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	#10296, Grüssing (Filsum)
Ethanol	#32205, Riedel-de Haën (Seelze)
Formaldehyd	#31245, Riedel-de Haën (Seelze)
Glycerin	#7530.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	#A1377,1000, Applichem (Darmstadt)
Guanidin-HCl	#0037.2, Carl Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	#U5128, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hexadimethrin Bromide	#H9268, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat	#1.04873.1000, Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	#A3582,1000, Applichem (Darmstadt)
Lichtgrün SF	#L5382-10g, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Molybdätophosphorsäure	#1.00532.0025, Merck (Darmstadt)

MgCl <sub>2</sub> (PCR)	#01-1030, Peqlab (Erlangen)
Mowiol 4-88 Reagent	#475904, Calbiochem, Merck (Darmstadt)
2-Methylbutan	#A1263.1000, Applichem (Darmstadt)
Natriumcarbonat	#A4332.1000, Applichem (Darmstadt)
Natriumchlorid	#0277, Mallinckrodt Baker (Griesheim)
Natriumhydrogencarbonat	#106323, Merck (Darmstadt)
Natriumorthovanadate	#S6508, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumthiosulfat	#S7026, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumzitat	#S4641, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Oil Red O	#00625-25G, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Orange G	#0318.2, Carl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
pNPP (4-Nitrophenol)	#35836-1G, Fluka (Taufkirchen)
2-Propanol	Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Red-Safe	#21141, Hiss Diagnostics (Freiburg im Breisgau)
Säurefuchsin	#T128.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure	#13073, Grüssing (Filsum)
TriFast	#30-2010, Peqlab (Erlangen)
Tris	#4855.2, Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	#9090.3, Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	#108603, Merck (Darmstadt)

### Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie	#2596.1, Carl Roth (Karlsruhe)
Augen- & Nasensalbe	#2182442, Bepanthen, Bayer (Leverkusen)
Chamber Slides:	Lab-Tek Chamber Slides, #177445, Nunc (Waltham MA, USA)
Deckgläser	#6101242, Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einbettform	#64708955, Heraeus Kulzer GmbH (Wehrheim)
Einmalinjektionskanülen	#304000, Microlance, 30G, BD Biosciences (Heidelberg) #302200 Microlance, 27G, BD Biosciences (Heidelberg)
Einmalröhrchen	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt (Nümbrecht)
Frischhaltefolie	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Glaskapillaren qPCR	# 04929292001, Roche (Mannheim)
Handschuhe	#3780872, Sempercare, Semperit AG (Wien, Österreich)

Kryoröhrchen	#123263, Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten	#439454 Maxi Sorp, Nunc (Waltham MA, USA) #655061 Mirolon, Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Microvette	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt (Nümbrecht) #20,1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt (Nümbrecht)
Objektträger	#4951PLUS, Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Parafilm	#P-996, Alcan Packaging (Singen)
Pasteurpipetten	#197734230, neo lab (Heidelberg)
Petrischalen	#633171, Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	#739296, 740290, Greiner Bio-One (Frickenhausen)
PVDF-Membran	#RPN303F, Amersham Hybond-P, GE Healthcare (Freiburg)
Reaktionsgefäße	#72.706 1,5 ml, #72.695 2 ml, Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilme	#10595000 Structurix D4 DW, AGFA (Köln) #34090 CL-X Posure Filme, Pierce, Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
Serologische Pipette	(2, 5, 10 & 25 ml), Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Spritzen	#300013 Plastipak, BD Biosciences (Heidelberg)
Sterilfilter	Millex GS, 0,22 µm, MCE-Membran, SLGS033SS, Millipore Millex GV, 0,22 µm, PVDF-Membran, SLGV033RS, Millipore Millex HV, 0,45 µm, PVDF-Membran, SLHV033RS, Millipore (Darmstadt) Flaschensterilfilter, Nalgene, Nunc (Waltham MA, USA)
Whatman Papier	#3030917 3MM CHR, Whatman International Ltd. (Dassel)
Zellkulturflaschen	#169900 25 cm <sup>2</sup> ; #156800 75 cm <sup>2</sup> ; #159926 175 cm <sup>2</sup> , Nunc (Waltham MA, USA)
Zellkulturplatten	#150239 6-Loch; #144530 24-Loch; #150787 48-Loch; #269620 96-Loch, Nunc (Waltham MA, USA)
Zellfilter	100 µm: Cell Strainer, REF 352360, BD Biosciences 70 µm: Cell Strainer, REF 352350, BD Biosciences 40 µm: Cell Strainer, REF 352340, BD Biosciences (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen	#188271 15 ml; #227261 50 ml, Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Medien, Puffer und Reagenzien

ACK-Puffer	4,15g Ammoniumchlorid; 0,5g Kaliumhydrogencarbonat; 100µl 0,5M EDTA (pH=7,5), in 500ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , sterilfiltriert 0,22µm, Lagerung bei 4°C
Agarose	#15510-027, Invitrogen (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	#8076.2, Carl Roth (Karlsruhe)
αMEM	#22561, Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Annexin V Alexa Fluor 647	#640911, Bio Legend (Fell)
Annexin V/PI-Bindepuffer	10mM HEPES (pH7,4); 140mM NaCl; 2,5mM CaCl in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
β-Glycerophosphat-Lsg.	216mg/ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> einwiegen (1M), sterilfiltrieren Lagerung in Aliquots (-20° C), 1:200 einsetzen
Blot-Transferpuffer	3g Tris; 14,4g Glycin, ad 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei 4°C
Blot-Blocklösung	5g Milchpulver in 100ml PBS-T, frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei 4°C
Borgal-Lösung	1ml der 7,5%igen Borgal-Lösung (Antibiotikum) in 500ml autoklaviertem H <sub>2</sub> O verdünnen; Veterinaria AG (Zürich, Schweiz)
cDNA Synthese Kit	iScript Select, #170-8896, BioRad (München)
Dexamethason-Stocklsg.	39,2mg/100ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> einwiegen (10mM), Lösung 1:1000 mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> verdünnen (10µM), sterilfiltrieren, Lagerung in Aliquots (-20°C), 1:1000 einsetzen
DMEM	#41965-039, Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)

---

DNA-Marker	100bp-DNA-Leiter extended, #T835.1, Roth (Karlsruhe)
Enhancer (PCR)	#01-1030, Peqlab (Erlangen)
Kaliumhydroxid	0,5N
Kalzein-Lösung	100mg Kalzein in 9ml Kochsalzlösung und 1ml 1M NaCO <sub>3</sub> lösen, dann weitere 10ml Kochsalzlösung zugegeben und Lösung sterilfiltrieren
Laufpuffer (10x, Western Blot)	30,25g Tris, 144g Glycin, 10g SDS, ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Lichtgrün-Lösung	0,4g Lichtgrün; 0,4ml Essigsäure, ad 200ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , Lagerung bei RT
Lysepuffer (DNA)	100mM Tris pH 8,5; 200mM NaCl, 5mM EDTA pH 8,0, 2% SDS, ad 10ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , autoklavieren/sterilfiltrieren, Lagerung bei RT
Lysepuffer (Protein)	20mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 10% Glycerin; 0,5% Triton X-100, 2mM EDTA; 10mM NaF; 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , Lagerung bei 4°C
Mowiol (Elvanol)	5g Mowiol 4-88 Reagent (#475904, Calbiochem, Merck (Darmstadt)) 20ml PBS (pH 8,0), ü. N. rotieren lassen bei RT, 10ml Glycerin, 30min bei 50°C im Wasserbad schütteln, 30min bei 5000g zentrifugieren, Lagerung bei -20°C
Nitrophenylstandard	5µl Nitrophenolstandard in 995µl Stopplösung
Nitrophenolblank	50µl Substratpuffer + 50µl pNPP-Lösung
Oil Red O-Lösung	60ml Stock-Lsg. (0,5g/100ml 2-Propanol) mit 40ml H <sub>2</sub> O mischen und für 1h bei RT inkubieren, anschließend durch ein Whatman-Papier 3MM filtern

Paraformaldehyd-Lsg. (4%)	22,5ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> mit 5µl 10M NaOH auf 60°C erhitzen, dann 1g Paraformaldehyd und 2,5ml 10x PBS dazu, abkühlen, pH auf 7,4 einstellen, Lagerung in Aliquots bei -20°C
p-Nitroph.-Phos.-Lsg. (pNPP)	pNPP-Tablette (5mg); 2,5ml Substratpuffer, vor Gebrauch auf 37°C erwärmen
PBS	100ml PBS (10x), ad 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , Lagerung bei RT
PBS (10x)	400g NaCl; 58g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10g KCl, pH auf 7,0 einstellen, ad 5l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , Lagerung bei RT
PBS-T (10x)	100ml 10x PBS, 900ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , 500µl Tween
Phosphormolybdän-Lsg.	8g Molybdatophosphorsäure; 4g Orange G, ad 200ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , Lagerung bei RT
Probenpuffer (DNA, 4x)	50% Glycerin in 4x TBE, etwas Bromphenolblau zugeben
Probenpuffer (Protein, 4x)	0,15ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> ; 1,25ml 0,5M Tris (pH 6,8)/1ml Glyzerin, 2ml 10% SDS; 0,1ml 1% Bromphenolblau/0,5ml β-Mercaptoethanol
Proteinase-Inhibitor	#535142 Cocktail Set I, Calbiochem, Merck (Darmstadt)
Proteinmarker	Precision Plus Protein Standard, Dual Color (#161-0374, Bio-Rad (München))
Säurefuchsin-Lösung	0,2g Ponceau Xylidine; 0,1g Säurefuchsin; 0,6ml Essigsäure, ad 300ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , Lagerung bei RT
Silbernitratlösung	1,25g AgNO <sub>3</sub> in 50ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> lösen, Lagerung bei RT
Substratpuffer (AP)	7,51g Glycin (0,1M), 203mg MgCl <sub>2</sub> (1mM), 1ml pro 1l Puffer, pH 10,4, 136mg ZnCl <sub>2</sub> (1mM), 1ml pro 1l Puffer, pH 10,4

Taq DNA-Polymerase	#01-1030, Peqlab (Erlangen)
TaqMan® Master Kit	#04735536001, Roche (Mannheim)
Taq-Reaktionspuffer rot	#01-1030, Peqlab (Erlangen)
TBE	100ml TBE (10x), ad 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , Lagerung bei RT
TBE (10x)	108g Tris; 55,6g Borsäure; 5,65g EDTA, ad 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , Lagerung bei RT
Verdaulösung (Ob)	0,025g Collagenase NB4 (#17454, Serva); 0,005g Dispase (#17105-041, Gibco, Invitrogen) in 25ml αMEM, sterilfiltrieren, frisch ansetzen
Vitamin C-Stocklösung	50mg Vitamin C/ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> einwiegen (0,28M), sterilfiltrieren, Lagerung in Aliquots (-20°C), 1:1000 einsetzen

verwendete Primer und Antikörper, siehe Methoden (Tab. 2.1, Anhang 2, Anhang 3)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchstiere**

Die für die Doktorarbeit verwendeten Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten, sodass eine Vergleichbarkeit der Experimente gegeben war. Die verwendeten Mausstämme wurden in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) gezüchtet. Zusätzlich wurden weitere Mäuse direkt von Charles River bezogen.

#### **Verwendete Mausstämme**

<b>Osx-Cre</b>	Jackson Laboratory, Bar Harbor (USA)
B6.Cg-Tg(Sp7-tTA,tetO-EGFP/cre)1Amc/J	
<b>Cdc42 fl/fl</b>	Brakebusch, Martinsried (Deutschland)
B6.129sv-Cdc42tm1Ref	

**Rac1 fl/fl**

Brakebusch, Martinsried (Deutschland)

B6.129sv-Rac1tmRef

Nomenklatur von Genen und Proteinen

Kursiv geschriebene Abkürzungen bezeichnen das Gen, nicht kursiv geschriebene Abkürzungen hingegen das Protein. Groß- und Kleinschreibungen von Abkürzungen beziehen sich auf verschiedene Spezies (Shows et al., 1987; Maltais et al., 1997).

groß: human; klein: Maus, Ratte etc.

Konditioneller Cdc42- und Rac1-Knockout

Cdc42 und Rac1 wurden spezifisch in Osteoblasten ausgeschaltet. Hierfür müssen beide Gene sogenannte *floxed* Stellen tragen (*cdc42 fl/fl* und *rac fl/fl*). Um eines der Gene auszuschalten, wurden diese Tiere über zwei Generationen mit Tieren verpaart, die das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewünschten Promoters trugen. Dabei ergaben Verpaarungen von Mäusen, die homozygot gefloxtes *cdc42* bzw. *rac1* trugen, mit Tieren, die das Enzym Cre-Rekombinase besaßen, eine heterozygote F1-Generation. Alle Nachkommen waren heterozygot für gefloxtes *Cdc42* bzw. *Rac1* (*cdc42 fl/+* oder *rac1 fl/+*) und positiv oder negativ für die Cre-Rekombinase (*Cre/+* oder *+/+*). Durch eine Kreuzung der F1-Nachkommen untereinander entstanden in der F2-Generation homozygote *Cdc42* bzw. *Rac1 floxed* Mäuse (*cdc42 fl/fl* oder *rac1 fl/fl*) mit der Cre-Rekombinase (konditioneller Cdc42- bzw. Rac1-Knockout) oder ohne Cre (Kontrollen). Um anschließend Doppelknockout-Mäuse (*cdc42 fl/fl rac1 fl/fl*) zu erhalten, wurden *Cre-cdc42 fl/fl* und *rac1 fl/fl* bzw. *cdc42 fl/fl* mit *Cre-rac1 fl/fl* Mäusen über 2 Generationen verpaart.

Promoter (Linie):	Osx (OsxCre)
Ausschaltung:	endogen, embryonal (ab Tag 13,5) <sup>1</sup>
Spezifität:	frühe Osteoblasten <sup>1</sup>
Genotypen:	<i>cdc42 fl/fl rac1 fl/fl</i> (Doppel-Knockout) <i>cdc42 fl/fl rac1 +/+</i> (Einzel-Knockout) <i>cdc42 +/+ rac fl/fl</i> (Einzel-Knockout)

<sup>1</sup> Nakashima et al., 2002; Sinha und Zhou, 2012

### 2.2.2 Experimentelle Behandlung der Mäuse

#### Kalzein-Injektion

Kalzein ist ein Fluoreszenzmarker, der die Knochenmineralisierung sichtbar macht. Der Fluoreszenzfarbstoff, der unter Anregung (ca. 495nm) grün emittiert (ca. 515nm) und aufgrund seiner starken Affinität zu Kalzium am Ort aktiver Mineralisierung in den Knochen eingebaut wird, wurde den Versuchstieren zweimal in einem altersabhängigen Abstand intraperitoneal injiziert. Drei Wochen alte Mäuse wurden in einem Abstand von drei Tagen injiziert (an den Tagen -5 und -2 vor der Tötung (Tag 0)), sieben Wochen alte und ausgewachsene Mäusen bekamen Kalzein in einem Abstand von sieben Tagen an den Tagen -10 und -3 vor der Tötung (Tag 0)). Den Mäusen wurden 200µl pro 30g Körpergewicht verabreicht (das entspricht 30mg/kg Körpergewicht). Die Lösung war bis zu 2 Wochen haltbar (Lagerung dunkel bei 4°C).

#### Parathormon-Injektion

Mäusen der Rac1-Linie wurde zum Knochenaufbau intermittierend Parathormon (PTH-34) injiziert. Hierzu wurden die Versuchstiere in vier Gruppen eingeteilt: 1) CT-Mäuse mit PTH, 2) CT-Mäuse mit Vehikel, 3) cKO-Mäuse mit PTH und 4) cKO-Mäuse mit Vehikel. Die Substanz wurde in 10mM Essigsäure mit 2% inaktiviertem Mausserum aufgenommen und 80ng/g injiziert, was bei einer 30g schweren Maus 2,4µg PTH pro Tag sind (Injektionsvolumen: 8µl/g). Die Kontrollgruppen erhielten nur das Lösungsmittel (Vehikel, 10mM Essigsäure mit 2% inaktiviertem Mausserum). Zu Beginn der Injektion waren die Mäuse drei Wochen alt. Die Injektion erfolgte täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen subkutan in die Nackenfalte. Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurden die Knochendichten der Versuchstiere gemessen. Nach Tötung wurden den Tieren die hinteren Extremitäten entnommen und fixiert bzw. das Knochenmark für molekulare Untersuchungen ausgespült.

#### Tötung der Mäuse und Probenentnahme

Die drei und sieben Wochen alten sowie die ausgewachsenen Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und Proben entnommen. Es wurde den Mäusen eine Niere entnommen und bei -20°C eingefroren, für eine eventuelle Nachgenotypisierung. Weiterhin wurden die hinteren Extremitäten entnommen (Tibiae und Femura) und in 70%igem Ethanol bzw. 4%igem PFA fixiert.

## Transplantation

Die Transplantationsexperimente sollten den Einfluss des Knochenmarks der CT- und cKO-Mäuse (OsxCre-Linie) auf die Osteoblasten in unserem Versuchsvorhaben zeigen. Hierzu wurden sechs Wochen alte C57/BL6-Mäuse (Wildtyp) zweimal im Abstand von 4h subletal bestrahlt (je 9,6Gray). Dadurch wurden die hämatopoetischen Zellen irreversibel zerstört. Mesenchymale Stammzellen sind hingegen sehr strahlungsresistent (Lange et al., 2011). Am Folgetag wurden die bestrahlten Mäuse in einer Plexiglasröhre immobilisiert und das Knochenmark von drei Wochen alten CT- und cKO-Tieren in die laterale Schwanzvene injiziert ( $1 \times 10^6$  Zellen), (Montanez et al., 2007; Chen et al., 2014; Duran-Struuck und Dysko, 2009). Die Zellen wurden hierfür in Kochsalzlösung (0,9%) aufgenommen. Um zu kontrollieren, dass die Bestrahlung planmäßig erfolgte, wurde einigen Mäusen nur Kochsalzlösung injiziert. Diese Mäuse starben innerhalb weniger Tage. Die behandelten Mäuse wurden für etwa drei Wochen unter sterilen Bedingungen gehalten. Dem Trinkwasser wurde ein Antibiotikum (1ml einer 7,5% Borgal-Lösung in je 500ml autoklaviertem Trinkwasser) zugesetzt, zur Vermeidung einer Infektion. Mit regelmäßigen Blutbildern wurde das Befinden der Mäuse überprüft. Nach vier Monaten wurden die Mäuse schließlich mit CO<sub>2</sub> getötet und die Extremitäten für weitere Untersuchungen konserviert.

### 2.2.3 Zellkultur und *in vitro*-Untersuchungen

#### Isolierung primärer Calvaria-Osteoblasten

Die Isolierung der Osteoblasten erfolgte aus den Schädeldecken neugeborener Mäuse (24h-72h) der Linie OsxCre. Die Mäuse wurden hierzu durch Dekaptierung getötet. Die Schädel wurden dann unter sterilen Bedingungen freipräpariert und von allen Gewebsresten befreit. Die Feinsäuberung der Calvariae erfolgte in Petrischalen mit PBS (mit 1% Pen/Step) bei RT und die Lagerung bis zum gemeinsamen Verdau in  $\alpha$ MEM (mit 1% Pen/Step) auf Eis. Verdaut wurde mit einer Collagenase- und Dispasehaltigen Lösung. Pro Verdau schritt wurden 0,5ml der Verdauung auf einen Schädel gegeben. Der erste Verdau erfolgte schüttelnd (280g) bei 37°C in einem Heizblock für 10min. Die Lösung des ersten Verdau wurde verworfen und frische Verdauung auf den Schädel pipettiert. Wie bereits beschrieben, wurde wieder 10min inkubiert, diesmal die Verdauung am Ende jedoch gesammelt und beiseite gestellt (RT). Zwei weitere Schritte folgten, genau wie in Verdau 2 beschrieben. Die Überstände der drei Verdau je Schädel wurden gemischt und bei 250g für 5min bei RT zentrifugiert (modifiziert nach Carpenter et al., 1998). Das Zellpellet wurde in  $\alpha$ MEM (mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) resuspendiert und die Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät.

### Kultivierung primärer Präosteoblasten

Sobald die Genotypen der Neugeborenen Mäuse bekannt waren, wurde von den tags zuvor ausgesäten, frischen Präosteoblasten das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine Trypsin-EDTA-Behandlung vom Plastik abgelöst. Die Behandlung erfolgte bei 37°C und wurde dann durch Zugabe von  $\alpha$ MEM (mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden entsprechend ihres Genotyps zusammen pipettiert, durch ein Zellsieb gefiltert (100 $\mu$ m), die Zellzahl am Zellzähler (Casy) bestimmt und  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Kultivierung der isolierten Osteoblasten erfolgte in  $\alpha$ MEM (mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, begann die Differenzierung.

### Differenzierung primärer Präosteoblasten zu Osteoblasten

Zur Differenzierung wurde das Medium der Osteoblasten auf Differenzierungsmedium umgestellt. Das bedeutete, dem  $\alpha$ MEM wurden neben 10%FCS, 1% Pen/Strep noch 50 $\mu$ g/ml Vitamin C (Endkonzentration: 1,4mM), sowie 1mg/ml  $\beta$ -Glycerophosphat (Endkonzentration: 5mM) und 0,39ng/ml Dexamethason (Endkonzentration 10nM) zugegeben. Die Zugabe der drei Differenzierungsfaktoren erfolgte stets frisch bei jedem Medienwechsel, der alle 2-3 Tage durchgeführt wurde. Die Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von drei Wochen. Im Zuge der Differenzierung stellen die Osteoblasten ihre Proliferation ein und beginnen kalziumphosphathaltige Knoten auszubilden, die sich über eine von Kossa-Färbung anfärben lassen.

### Differenzierung primärer Präosteoblasten zu Adipozyten

Hierzu wurde das Kultivierungsmedium durch Adipozytendifferenzierungsmedium ersetzt. Dem  $\alpha$ MEM wurde neben 10% FCS und 1% Pen/Strep auch 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Insulin und Dexamethason zugesetzt. Die IBMX-Lösung musste vor jedem Medienwechsel frisch angesetzt werden (0,0115g/ml 0,5M KOH). IBMX wurde 1:100 eingesetzt. Für Insulin wurde eine Stocklösung hergestellt (1mg/ml 0,02M HCl) die in Aliquots über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden konnte. Insulin wurde 1:1000 verdünnt. Auch für Dexamethason wurde eine Stocklösung angesetzt (10mM in 100% Ethanol) und bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch musste die Stocklösung 1:10 mit DPBS verdünnt und dann 1:1000 ins Medium gegeben werden. Alle Lösungen wurden zuvor steril filtriert.

### Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkszellen

Für die Isolation von Knochenmarkszellen wurden drei Wochen alte Mäuse verwendet. Nach der Tötung wurden den Mäusen beide Hinterextremitäten entfernt. Die Femura und Tibiae wurden freipräpariert, von umgebenden Geweben gesäubert und kurz zum Desinfizieren in 70%iges 2-Propanol getunkt. Das weitere Vorgehen geschah unter sterilen Bedingungen. Die Knochen wurden an beiden Enden aufgeschnitten und mit Hilfe einer 5ml Spritze mit PBS (mit 5% FCS) das Knochenmark ausgespült. Im nächsten Schritt wurden die Knochenmarkszellen über ein 40µm Zellsieb gefiltert und abzentrifugiert (250xg, 5min, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in 6ml ACK-Lysepuffer aufgenommen. Dieser Schritt dient der Lyse der Erythrozyten und muss möglichst schnell ablaufen um andere Zellen nicht zu beschädigen. Die Zellen werden wieder bei 250xg für 5min abzentrifugiert, in 5ml PBS mit 5% FCS aufgenommen und mit Hilfe des Zellzählers die Zellzahl bestimmt. Etwa  $5 \times 10^5$  Zellen wurden pro Loch einer 96-Lochplatte ausgesät und in DMEM mit 10% FCS, 1% Pen/Step und 1% L-Glutamin (200mg) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Da sich die Zellen sehr schnell absetzen, konnte der erste Medienwechsel schon wenige Stunden später erfolgen. Bei weiterer Kultivierung wurde das Medium alle 2-3 Tage ausgetauscht.

### Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Osteoblasten bzw. Adipozyten

Ein bis zwei Tage nach dem Aussäen der Knochenmarkszellen konnte mit der Differenzierung zu Osteoblasten bzw. Adipozyten begonnen werden. Nach Erreichen der Konfluenz begann die Differenzierung, wie sie auch bei isolierten Osteoblasten durchgeführt wurde.

### Anlegen von Co-Kulturen

Hierfür wurden frisch isolierte Knochenmarkszellen mit ebenfalls frischen Osteoblasten, in einem Verhältnis, wie es auch unter physiologischen Verhältnissen vorkommt, angesetzt. Es wurden Knochenmarkszellen, wie oben beschrieben, isoliert.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in ein Loch einer 96-Lochplatte ausgesät. Nachdem sich alle Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium abgenommen und  $1 \times 10^4$  Präosteoblasten in frischem Medium in jedes Loch vorsichtig auf die Knochenmarkszellen pipettiert.

### Von Kossa-Färbung

Nachdem die Osteoblasten drei Wochen lang mit Ob-Differenzierungsmedium behandelt wurden und sich Knoten gebildet hatten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und danach mit eiskaltem Alkohol (95% Ethanol, 5% 2-Propanol) für 1h bei 4°C fixiert. Im Anschluss

wurde 2x mit  $\text{H}_2\text{O}_d$  gewaschen und dann 200 $\mu\text{l}$  Silbernitratlösung pro Loch addiert. Die Färbung erfolgte unter UV-Licht bei RT für 10-20min (visuelle Kontrolle der Intensität). Danach wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_d$  gewaschen und zur Konservierung 300 $\mu\text{l}$  Natriumthiosulfat-Lösung zugegeben (5min, RT). Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift. Am Ende wurden 100 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_d$  auf die Zellen addiert und so die Löcher unter einem Binokular abfotografiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ.

#### Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Die Alkalische Phosphatase wird in den frühen Stadien der Differenzierung von Osteoblasten produziert. Zum Nachweis des Proteins in Zellen und im Medium wurde ein Alkalisches Phosphatase-Assay (Methode abgewandelt nach Bessey, Lowry und Brock, 1946) durchgeführt. Hierfür wurde zum einen das Medium von den Zellen gesammelt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und anschließend in 50 $\mu\text{l}$  Zelllysepuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30min bei 37°C wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst, zusammen mit dem Lysepuffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, gemischt und bei 14000g für 90sek zentrifugiert. 20 $\mu\text{l}$  Zelllysat bzw. Medium wurden mit 180 $\mu\text{l}$  Substratpuffer versetzt (1:20 Verdünnung). Davon wiederum wurden 100 $\mu\text{l}$  mit 100 $\mu\text{l}$  p-Nitrophenyl-Phosphatlösung gemischt und je 100 $\mu\text{l}$  dieser Lösung in Duplikaten auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Außerdem wurden ein Nullwert und ein Standard zugefügt. Nach einer Inkubation der Platte für 15min bei 37°C folgte das Abstoppen der Reaktion mit 200 $\mu\text{l}$  0,5M NaOH. Die Proben wurden in einem Photometer bei 405nm gemessen.

#### Oil Red O-Färbung

Mit Hilfe der Oil Red O-Lösung konnten die Lipidtropfen in den Adipozyten angefärbt werden. Hierfür mussten zunächst 6ml einer Stocklösung (0,5g Oil Red O-Pulver/100ml 2-Propanol) mit 4ml  $\text{H}_2\text{O}$  gemischt und für 1h bei RT inkubiert werden. Um ungelöste Reste heraus zu filtern, wurde die Lösung über ein Whatman Papier (3MM) gegeben. Für die Färbung wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen anschließend in 4%igem PFA für 30min fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit der Oil Red O-Färbelösung für 1h bei RT gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mindestens 2x mit destilliertem Wasser gewaschen. Bis zur Auswertung wurden die Zellen mit 100 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_d$ /Loch einer 96-Lochplatte bedeckt und bei 4°C gelagert.

### Proliferations-Assay

Um das Proliferationsverhalten der Osteoblasten zu bestimmen, wurde eine definierte Anzahl ( $5 \times 10^4$ ) an Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät und für fünf Tage kultiviert. Am Ende wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturschalen abgelöst und erneut gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl zu Beginn und am Ende des Versuchs geschah mit der Neubauer-Zählkammer.

### Durchflusszytometrie

Die Analyse der Durchflusszytometrie (FACS, *flow associated cell sorting*) ermöglicht die Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression verschiedener Moleküle durch Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Für die Untersuchung der Knochenmarkszellen wurden  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Es ist wichtig, die Proben während der gesamten Prozedur auf Eis zu halten. Vor der Färbung wurden die jeweiligen Zellen bei 2400rpm zentrifugiert und in 100µl FACS-Puffer (DPBS mit 5% FCS) mit den gewünschten Antikörpern wieder aufgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgte nun über einen Zeitraum von 30min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden je Ansatz 1ml eiskalter FACS-Puffer zugegeben und die Zellen 5min lang bei 2400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und direkt am Zytometer gemessen. Als Negativkontrollen wurden ungefärbte Zellen bzw. mit unspezifisch bindenden Antikörpern (Isotypkontrollen) versetzte Zellen verwendet.

Alle durchgeführten zytometrischen Messungen erfolgten an einem LSRII Gerät der Firma BD Biosciences und die Analysen mit dem dazugehörigen Programm FACSDiva 5.0.2. Eine Liste aller verwendeten Antikörper ist im Anhang 3 zu finden.

### Apoptose-Assay

Die Apoptoserate der Osteoblasten wurde durchflusszytometrisch gemessen. Hierfür wurden Zellen, die für zwei Tage in Kultur gehalten wurden mit einem speziellen Puffer (*cell dissociation buffer*), der die Oberflächenmoleküle nicht angreift, von den Kulturschalen abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei 1400xg für 5min zentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift muss zweimal durchgeführt werden. Anschließend wurden die Zellen in 50µl Annexin-Bindepuffer aufgenommen, hinzu kommt jeweils 1µl Annexin V (1:50). Nach einer 20minütigen Inkubationszeit im Dunkeln bei RT, wird die Reaktion mit 100µl Annexin-Bindepuffer abgestoppt. Kurz vor der Messung am LSRII Gerät (BD) wird noch 1µl einer 1:10 verdünnten Propidiumiodid-Lösung (1µg/ml) zugesetzt.

## 2.2.4 DNA-Untersuchungsmethoden

### DNA-Isolation aus Gewebe

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ihnen im Alter von etwa drei Wochen ein kleines Stückchen des Schwanzes abgeschnitten und ca. 0,5mm davon in 92µl DNA-Lysepuffer und 8µl Proteinase K-Stocklösung (20mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) gegeben. Der Ansatz wurde für 1-2 Stunden schüttelnd bei 55°C inkubiert. Nach erfolgreicher Lyse wurde die DNA-Lösung für 10min auf 99°C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Dann wurden verbliebene Gewebsreste abzentrifugiert (13000g, 20min, RT) und der Überstand zur PCR-Analyse abgenommen.

Um eine Nachgenotypisierung der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde bei der Tötung statt einer Schwanzbiopsie ein Stück Niere entnommen, das auf die gleiche Weise lysiert wurde, wie bereits für die Schwänzchen beschrieben.

### PCR-Analyse zur Genotypisierung

Die Genotypisierungs-PCR erfolgte (für alle Primer) stets nach dem folgenden Protokoll und wurde mit dem beschriebenen Programm durchgeführt.

Ansatz der Probe:	15,25µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1µl 5'-Primer (10 oder 25pmol/µl)
	2,5µl Puffer	1µl 3'-Primer (10 oder 25pmol/µl)
	2µl Enhancer	0,25µl Taq DNA-Polymerase
	1,5µl MgCl <sub>2</sub>	0,5µl DNA-Lysat
	1µl dNTPs	= 25µ pro Ansatz

PCR-Programm:	Thermocycler (PE Applied Biosystems, Biometra)		
	1.)	95°C	3min
	Touch down:	2.)	95°C 30sek
		3.)	63°C 30sek
		4.)	72°C 30sek → Schritte 2 bis 4 10x, dann zu 5.)
	Amplifikationsphase:	5.)	95°C 30sek
		6.)	53°C 30sek
		7.)	72°C 30sek → Schritte 5 bis 7 35x, dann zu 8.)
	8.)	72°C	3min, danach 4°C

Tabelle 2.1: Sequenzen der Genotypisierungs-Primer

Gen (murin)	fwd-Primer	rev-Primer	Produktgröße
<i>Osx</i>	CTCTTCATGAGACCCT	GCCAGGCAGGGGACAT	400bp
<i>Cdc42</i>	CATCGGAATATGTACCAACTGT	CCATGACAACCTAAGTTCAACT	mit loxP 420bp ohne loxP 277bp
<i>Rac1</i>	GTCTTGAGTTACATCTCTGG	CTGACGCCAACCAACTATGC	mit loxP 350bp ohne loxP 250bp

### Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Zur Analyse wurden 2%ige Gele verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden pro 100ml Gel 5µl *Red Safe* zugegeben und die Agaroselösung unter Schwenken in einen Schlitten gegossen. Nach Aushärten des Gels wurden die PCR-Proben mit 10µl DNA-Probenpuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit TBE-Puffer bei 130Volt.

### 2.2.5 RNA/cDNA-Untersuchungsmethoden

#### Isolierung von RNA aus Gewebe

Um RNA aus frischem Knochenmark zu gewinnen, wurde zunächst das Knochenmark isoliert, nach ACK-Lyse und anschließender Zentrifugation wurde das Zellpellet allerdings in Trifast aufgenommen, resuspendiert und bei -80°C gelagert. Für die RNA-Isolierung wurden 0,2ml Chloroform auf 1ml Trifast gegeben und für 15sek stark geschüttelt. Danach wurden die Proben für 2-3min bei RT inkubiert und bei 12000xg für 15min (4°C) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 0,5ml 2-Propanol addiert und sorgfältig gemischt. Die Proben mussten nun für 10min bei RT inkubieren und wieder zentrifugiert werden (12000xg, 10min, 4°C). Im nächsten Schritt wurde der Überstand entfernt und verworfen. Es folgte ein Waschschriff. Hierfür wurde auf das Pellet 1ml 75%igem Ethanol pro 1ml Trifast pipettiert und die Proben für 5min bei 7500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand musste restlos entfernt werden, dazu wurde das Pellet kurzzeitig an der Luft getrocknet. Am Ende wurde das Pellet in 30µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen

Für die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurde ebenfalls nach dem obengenannten Protokoll vorgegangen. Nach Entfernen des Mediums und einem Waschschrift mit PBS wurde Trifast direkt auf die Zellen gegeben, dabei wurden 100µl Trifast auf einer Fläche von 0,8mm<sup>2</sup> verwendet. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden die Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst.

Reverse Transkription

Für das Umschreiben der isolierten RNA in copy-DNA (cDNA) wurde das iScript Select cDNA Synthesis Kit (BioRad, #170-8896) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, pro Ansatz wurden 5µl RNA eingesetzt.

Quantitative PCR-Analyse der cDNA

Um zu ermitteln wie sich das Expressionsmuster verschiedener Gene, die in Zusammenhang mit Cdc42 und Rac1 stehen, in frisch isolierten oder kultivierten Zellen darstellt, wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Hierbei wurde die relative Veränderung der Genexpression in den Zellen bestimmt. Die Normalisierung der Zielgen-cDNA erfolgte mit Hilfe des Haushaltsgens Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase (Hprt). Es wurde dabei im Vorfeld sichergestellt, dass die Expression dieses Gens in den zu untersuchenden Gruppen gleich bleibt. Für die Untersuchung der jeweils interessierenden cDNA wurde mittels der spezifischen Sonde (Anhang 2) eine Standardkurve erstellt. Zur Berechnung und Normalisierung der erhaltenen Werte war es außerdem notwendig, auch Standardkurven für das Haushaltsgen zu etablieren. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Computersoftware RelQuant (Roche applied science). Für die quantitativen PCRs wurde ein Kit von Biorline verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang 2 zu finden.

PCR-Ansatz:	10,7µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4µl SensiMix Cap Mix
	0,8µl 5´-Primer (10pmol/µl)	1,5µl Enzyme Mix
	0,8µl 3´-Primer (10pmol/µl)	2µl cDNA
	0,2µl Sonde	= 20µl pro Ansatz

PCR-Programm:	Light Cycler 2.0 Instrument (Roche)
1.)	95°C 10min
2.)	95°C 10sek
3.)	55°C 30sek
4.)	72°C 1sek (45x Schritte 2-4, dann Schritt 5)
5.)	40°C 30min

## 2.2.6 Protein-Untersuchungsmethoden

### Proteingewinnung aus kultivierten Zellen und Gewebe

Für eine Proteingewinnung aus kultivierten Zellen wurde der Protein-Lysepuffer (M-PER) mit Proteinase-Inhibitor (1:100) auf die Zellen gegeben und für 20min auf Eis inkubiert, um die Zellen anschließend mit einer Pipette mitsamt der Lösung abzukratzen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (20min, 13000g, 4°C), das Lysat aliquotiert und bis zu seiner Verwendung bei -20°C eingefroren. Um Protein aus frisch isoliertem Mausmaterial, wie Osteoblasten und Knochenmark zugewinnen, wurde auf die frisch isolierten Zellen ebenso Protein-Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitor gegeben und verfahren wie zuvor beschrieben.

### Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmengenbestimmung aus Lysaten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### Protein-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können denaturierte Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Es wurde 12%ige Polyacrylamidgele verwendet. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird ein 1xLaufpuffer benötigt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 3min bei 99°C erhitzt. Es wurde je nach Gelgröße zwischen 10 und 25µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150Volt.

### Proteintransfer auf eine Membran (Western Blotting)

Das Western Blotting diente der Überführung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Diese wurde vor Gebrauch mit 2-Propanol aktiviert und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gewaschen. Es wurde ein *Semidry*-Verfahren angewendet. Hierfür wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel gebracht,

beides zwischen mehreren Filterpapieren in die Blot-Kammer überführt und mit Blottransferpuffer befeuchtet. Der Transfer erfolgte für 1h bei 10Volt und RT. Nach dem Blotten wurde die Membran mit einer Ponceau-Lösung gefärbt, um die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Die Entfärbung erfolgte mit  $H_2O_d$ . Im Anschluss fand die Antikörperbehandlung der Membran statt.

#### Immundetektion von Proteinen auf einer Membran

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran fand eine Behandlung mit Antikörpern statt, um bestimmte Proteine zu detektieren. Der Primärantikörper wurde dazu in Blocklösung aufgenommen und zusammen mit der Membran in eine Folie eingeschweißt. Die Antikörper Anti-Cdc42 und Anti-Rac1 wurden in PBS-T mit 5% Milchpulver verwendet, für alle anderen Antikörper wurde 5% Albumin in PBS-T gewählt. Die Inkubation erfolgte für 1h bei RT. Anschließend wurde die Membran 3x je 5min mit PBS-T gewaschen und danach mit dem Sekundärantikörper in Blocklösung behandelt (Inkubation wie Primärantikörper). Es folgte erneut das Waschen der Membran wie oben beschrieben, wobei der letzte Waschschrift mit PBS durchgeführt wurde. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mit dem Detektionsreagenz Pierce ECL Western Blotting Substrat nach den Angaben des Herstellers. Danach wurde die Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt und ein CL-X posure Film aufgelegt. Eine Liste aller verwendeten Antikörper ist im Anhang 3 zu finden.

#### Densitometrische Bestimmung der Bandendichte von Western Blots

Für eine quantitative Bestimmung eines Signals auf dem Western Blot im Verhältnis zu einem Haushaltsgen wie beispielsweise Gapdh, wurde eine densitometrische Dichtemessung der Banden durchgeführt. Dazu wurde der Film mit dem GS-800 Calibrated Densitometer eingescannt und die Dichte ( $OD/mm^2$ ) mit Hilfe der Quantity One Software gemessen. Das Signal der jeweiligen Probe wurde zu dem Signal des Haushaltsgens ins Verhältnis gesetzt.

### 2.2.7 Knochenmethoden und histologische Untersuchungen

#### Radiographie

Um Entwicklungsdefekte im Skelett der cKO-Mäuse zu erkennen, wurde die Radiographie eingesetzt. Die Röntgenbilder wurden mit dem Röntgengerät Faxitron am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg erstellt. Hierfür wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin betäubt und mittig in dorsaler Ausrichtung auf einen lichtdichten, einzelverpackten Röntgenfilm in der Röntgenkammer platziert. Die Röhrenspannung betrug 30kv bei einer Bestrahlungsdauer von 90sek. Die Röntgenfilme wurden anschließend mit Hilfe einer Entwicklermaschine in der Dunkelkammer entwickelt. Zur Bestimmung verschiedener Parameter (Körperlänge, Länge der Gliedmaßen, Kopfbreite und -länge) wurden die Röntgenbilder eingescannt und mit Hilfe des Computerprogramms Image J vermessen.

#### Radiologische Messungen der Knochendichte

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) ist ein Verfahren, mit dem die Knochendichte peripherer Körperteile ermittelt werden kann. Zur Untersuchung der Knochendichte in Mäusen wurden *ex vivo* Messungen am distalen Femur der Tiere durchgeführt. Dazu wurde der Femur von Becken und Tibia getrennt und in einem Röhrchen mit 70% Ethanol positioniert. Das Gefäß wurde in einen Halter am Gerät (XCT Research SA) eingespannt. Die Untersuchungen erfolgten nach der Prozentmethode, dabei wurden Querschnitte in einem bestimmten Bereich des Knochens gemessen. Ausgehend von einer Referenzlinie wurde ihre Position dabei proportional zur Knochenlänge berechnet. Alle Messungen erfolgten mit den gleichen Parametern Schichtdicke 0,5mm, äußere Schwelle bei  $280\text{mg}/\text{cm}^3$  (äußere Grenze des Knochens zur Umgebung) und Auflösung (70 Millivoxel). Vor der Messung wurde mit Hilfe eines *scout view scans* (SV-scan) die Positionierung der Referenzlinie unterhalb der Wachstumsfuge vorgenommen. Die Messung der ersten beiden Querschnitte diente der Erhebung der trabekulären Knochendichte und erfolgte in einem Bereich proximal der Wachstumsfuge (sekundäre Spongiosa) bei 5% und 7,5%, bezogen auf die individuelle Knochenlänge. Für die Auswertung dieser Messung wurde der Abschälmodus 20 (30%) verwendet. Dieser Modus bestimmt die Trennung zwischen dem trabekulären Knochen und dem Kortex, dabei wurden die 30% mit der geringsten Knochendichte als Spongiosa betrachtet. Für die Messung der kortikalen Knochendichte wurde ein zweiter Schnitt bei 40% der Knochenlänge vermessen. In diesem Bereich des Femurs gibt es keine Spongiosa mehr. Bei diesem Modus wurde alles oberhalb eines Wertes von  $400\text{mg}/\text{cm}^3$  als Kortex betrachtet.

Für *in vivo* Messungen mussten die Mäuse mit Ketanest/Xylazin narkotisiert werden. Anschließend wurden die Mäuse auf einem geeigneten Halter so ausgerichtet, dass die Messung der Femura möglich war.

#### Kunststoff-Einbettung des Knochens

Um Schnitte von mineralisiertem Knochengewebe anfertigen zu können, wurden die Proben in Kunststoff eingebettet. Mit einem Hartmetallmesser konnten dann dünne Schnitte des Gewebes angefertigt werden. Für die Herstellung von Kunststoffschnitten wurde die Tibia von ausgewählten Versuchstieren verwendet. Die Knochen wurden bei der Tötung in 4%igem PFA fixiert. Im ersten Schritt mussten die Proben durch eine graduell aufsteigende Alkoholreihe entwässert werden (70-100%iger EtOH, 2h Inkubation in jeder Alkoholkonzentration). Über Nacht mussten die Knochen in 100%igen EtOH verbleiben, diese wurde am nächsten Tag noch einmal ausgetauscht, bevor die Einbettung beginnen konnte. Die Einbettung in Kunststoffblöckchen erfolgte anschließend unter der Verwendung eines Kunststoffeinbettungs-Kits (Osteo-bed bone embedding kit). Dazu wurden die Knochen in speziellen Förmchen platziert, die mit einer Kunststofflösung, bestehend aus Methylmethacrylat (MMA), Dibutylphthalat und Benzoylperoxid, befüllt und luftdicht verschlossen wurden. Es folgte das Auspolymerisieren des Kunststoffs für 24h bei 34°C.

#### Anfertigen von Kunststoffschnitten

Nach dem Aushärten des Kunststoffs wurde nun wieder ein Großteil des Kunststoffes rund um die Probe durch Aussägen entfernt. Bevor die Schnitte angefertigt werden konnten, mussten noch speziell beschichtete Objektträger vorbereitet werden. Je ein Tropfen Eiweißglyzerin kam auf einen Objektträger und wurde gleichmäßig verrieben und auf einer Heizplatte getrocknet. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte mit einem Tischmikrotom. Die Schnittdicke betrug 3µm. Die entstandenen Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels mit 30%igem Ethanol benetzt und in eine Schale mit 70% Ethanol überführt. Dort wurden sie vorsichtig auf einen Objektträger aufgezogen und mit einem feuchten Papierblättchen bedeckt, welches durch Rollen mit einer Handrolle fest angedrückt wurde. Ein zweiter Objektträger wurde auf das Papier gepresst und die Schnitte auf einer erwärmten Platte getrocknet.

#### Masson-Goldner-Färbung

Durch die dreimalige Inkubation der Knochenproben in Azeton für jeweils 5min bei RT wurde der verbliebene Kunststoff um den Schnitt herum entfernt. Durch eine absteigende Ethanolreihe wurden

die Proben wieder gewässert (100%, 98%, 80%, 70% und  $\text{H}_2\text{O}_d$ , je 3min). Die erste Färbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Gill für 10min bei RT und eine Bläuung der Schnitte in Leitungswasser ebenfalls für 10min schloss sich an. Danach wurden die Proben für 6min in Säurefuchsin-Lösung gefärbt und jeweils in  $\text{H}_2\text{O}_d$  und 1% Essigsäure gewaschen. Weiterhin wurden die Schnitte für 2min in Phosphomolybdän-Lösung inkubiert und anschließend je 3x in 1%iger Essigsäure gewaschen. Zuletzt folgten eine Färbung in Lichtgrünlösung für 5min, erneut drei Waschschrte mit 1%iger Essigsäure und eine Entwässerung der Schnitte mit reinem Ethanol 2x je 3min. Vor dem Abdecken mit einem Deckglas wurden die Proben in einer Xylol-Ersatz-Lösung für 2min inkubiert und schließlich mit Roti-Histokitt permanent eingedeckt.

### Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenschnitte

Für die histomorphometrische Analyse der dynamischen Parameter wurden zuerst ungefärbte Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop und einer entsprechenden Kamera abfotografiert (Vergrößerung Objektiv: 10-fach). Hierdurch konnten die Orte aktiver Mineralisierung (positives Kalzeinsignal) analysiert werden (Tab. 2.2). Eine erste Kalzeininjektion äußert sich durch ein fluoreszierendes Signal im bereits mineralisierten Knochen (sLS, einfaches Kalzeinsignal). Eine zweite Injektion führt zur Einlagerung von Kalzein in neu mineralisierten Knochen, wodurch an einigen Stellen im Knochen ein zweites Kalzeinsignal entsteht (dLS, doppeltes Kalzeinsignal).

Anschließend wurden die gleichen Schnitte histologisch gefärbt (Masson-Goldner) und es wurden erneut Übersichtsbilder des Knochens aufgenommen (Vergrößerung Objektiv: 20-fach), diesmal jedoch bei Durchlicht. Diese Aufnahmen wurden für die Erhebung der statischen histomorphometrischen Parameter verwendet (Tab. 2.3). Für die Proben ließen sich anschließend aus den Daten der dynamischen und der statischen Histomorphometrie die sekundären Parameter berechnen (Tab. 2.4). Ausgemessen wurde der gesamte Bereich ab der Wachstumsfuge 2mm in den Knochen hinein. In die Auswertung gingen nur die sekundäre Spongiosa, die etwa  $120\mu\text{m}$  unterhalb der Wachstumsfuge beginnt, sowie der Kortex ein. In diesem Abschnitt wurden die unten genannten Parameter mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ evaluiert. Die Auswertung erfolgte nach der international anerkannten ASMBR Nomenklatur (Parfitt et al., 1987).

Tabelle 2.2: Parameter der dynamischen Histomorphometrie

Parameter	Beschreibung
sLS, single label surface (mm)	Oberfläche mit einfachem Kalzeinsignal, Ort aktiver Mineralisierung nach einer Injektion
dLS, double label surface (mm)	Oberfläche mit doppeltem Kalzeinsignal, Ort aktiver Mineralisierung nach beiden Injektionen
ddLS, distance between double label ( $\mu\text{m}$ )	Abstand zwischen doppeltem Kalzeinsignal

Tabelle 2.3: Parameter der statischen Histomorphometrie

Parameter	Beschreibung
BS, bone surface (mm)	Knochenoberfläche abgegrenzt zum Knochenmark
OS, osteoid surface (mm)	Ort, an dem noch nicht mineralisiertes Knochengewebe neu gebildet wurde
O.Th, osteoid thickness ( $\mu\text{m}$ )	Dicke des neu gebildeten Knochengewebes
Ob.N, osteoblast number	Anzahl aktiver Osteoblasten, die Osteoid bilden
Oc.S, osteoclast surface (mm)	Oberfläche, an der Knochen resorbiert wird
Oc.N, osteoclast number	Anzahl knochenresorbierender Osteoklasten

Tabelle 2.4: Berechnete Sekundär-Parameter

Parameter	Berechnung	Beschreibung
MS, mineralizing surface (mm)	$MS=dLS+(\frac{1}{2} sLS)$	Oberfläche, die positives Kalzeinsignal zeigt
MAR, mineral apposition rate ( $\mu\text{m}/\text{d}$ )	$MAR=ddLS/7$	neu mineralisierter Knochen pro Tag
BFR, bone formation rate (mm/y)	$BFR=(MS*MAR)/BS+365/1000$	gebildeter Knochen pro Jahr
OS/BS		Osteoidoberfläche korrigiert zur Knochenoberfläche
MS/BS		mineralisierte Oberfläche korrigiert zur Knochenoberfläche
Ob.N/BS (number/mm)		Osteoblastanzahl korrigiert zur Knochenoberfläche
Oc.N/BS (number/mm)		Osteoklastanzahl korrigiert zur Knochenoberfläche
Ob.S/Ob.N ( $\mu\text{m}$ )		Osteoblastoberfläche korrigiert zur Osteoblastenanzahl
Oc.S/Oc.N ( $\mu\text{m}$ )		Osteoklastoberfläche korrigiert zur Osteoklastenanzahl
Oc.S/BS		Osteoklastoberfläche korrigiert zur Knochenoberfläche
Aj.AR, adjusted apposition rate ( $\mu\text{m}/\text{d}$ )	$Aj.AR=MAR*MS/OS$	Knochenbildungsrate einer Osteoblastengruppe pro Tag
Mlt, mineralization lag time (d)	$Mlt=(O.Th/Aj.AR)$	Mineralisationszeit, die eine Osteoblastengruppe in Tagen benötigt
OMT, osteid maturation time (d)		Zeit von Osteoidablagerung bis zur Mineralisierung in Tagen

### Skelettfärbung

Mit Hilfe zweier Farbstoffe können Knochen- und Knorpelgewebe gut sichtbar gemacht werden. Nachdem die drei Wochen alten Mäuse mit  $\text{CO}_2$  getötet wurden, wurden sie bestmöglich enthäutet und die inneren Organe sowie die Augen entfernt. Für 3-5 Tage werden die Skelette in 95%igem EtOH fixiert. Danach werden die Skelette noch für 2 Tage in Azeton gelagert. Die Färbung erfolgte dann mit einer Alcian blue/Alizarin red-Lösung für 1 bis maximal 3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden die Skelette in 1%ige KOH-Lösung gelegt, die dem Entfärben diente. Etwa alle 2 Tage musste die Lösung gewechselt werden, bis sie schließlich farblos blieb. Um die Skelette nun zu konservieren, kamen sie in eine absteigende KOH-Reihe (1% KOH; 0,8% KOH + 20% Glycerin; 0,6% KOH + 40% Glycerin; 0,4% KOH + 60% Glycerin; 0,2% KOH + 80% Glycerin; 100% Glycerin). Beim Umbetten der Skelette muss sehr vorsichtig vorgegangen werden, da sie an Stabilität verlieren und auseinander fallen könnten.

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Versuche erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel (2007, Microsoft, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism (V3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistische Unterschiede wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test evaluiert. Die Fehlerraten sind jeweils als Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben.

### **3 ERGEBNISSE**

Um die Funktionen von *Cdc42* und *Rac1* bei der Knochenentwicklung verstehen zu können, wurden Knockout-Modelle so generiert, dass diese Gene zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Knochen ausgeschaltet werden. Außerdem sollte die Ausschaltung spezifisch in Knochenzellen erfolgen. Aus diesem Grund entschieden wir uns für den Osterix (*Osx*)-Promoter, der ab Embryonaltag 13,5 aktiv ist. Nakashima et al. zeigten mittels *in situ* Hybridisierung, dass *Osx*-Transkripte zeitweise in differenzierenden Chondrozyten, aber nicht in bereits kondensiertem Knorpelgewebe vorkommen. Die höchste Expressionsrate wurde aber in den endochondralen Osteoblasten gefunden. Auch bei zwei Wochen alten Mäusen war die Expressionsrate im Bereich der Trabekel und sekundären Ossifikation weiterhin sehr hoch (Nakashima et al., 2002).

Für unsere Mausmodelle bedeutete es, dass wichtige Zellprozesse gravierend beeinträchtigt waren. Dazu zählten allgemeine Funktionen wie die Zytokinese (plus Chromosomenverteilung), Zellpolarisierung, Adhäsion, Migration sowie osteoblastenspezifische Funktionen.

#### **3.1 Generierung konditioneller *Cdc42*- und *Rac1*-Knockout-Mäuse**

Um die Funktion von *Cdc42* und *Rac1* in der Knochenentwicklung untersuchen zu können war es notwendig, Mäuse zu generieren, in denen jeweils eines der beiden Gene spezifisch im Knochen ausgeschaltet war.

Für die Herstellung konditioneller Knockout-Mäuse wurden zunächst Kreuzungen über zwei Generationen durchgeführt. In der Elterngeneration wurden Mäuse, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines osteoblastenspezifischen Promoters auf einem Allel trugen, mit Tieren verpaart, die auf beiden Allelen gefloxtes *Cdc42* bzw. *Rac1* besaßen. Das bedeutet, diese Gene enthielten spezielle Sequenzen (loxP-Stellen, „*floxed sites*“), an denen das Enzym Cre-Rekombinase ansetzt und relevante Bereiche des betreffenden Gens heraus schneidet. Dadurch wurde eine korrekte Transkription der Gene verhindert. In der F1-Generation entstanden somit Tiere, die heterozygot für gefloxtes *Cdc42* bzw. *Rac1* und entweder positiv oder negativ für die Cre-Rekombinase waren. Durch Kreuzung der F1-Generation untereinander sowie durch Rückkreuzung von Mäusen mit homozygot gefloxtem *Cdc42*- und *Rac1*-Gen der Elterngeneration, entstanden unter anderem cKO-Mäuse mit homozygot gefloxtem *Cdc42* und *Rac1* mit oder ohne Cre. Durch Verpaarungen dieser Tiere wurden schließlich die Versuchstiergruppen generiert. Ein Viertel der Nachkommen waren konditionelle *Cdc42*- und *Rac1*-Knockout-Mäuse. Ein weiteres Viertel war homozygot für gefloxtes *Cdc42* bzw. *Rac1* ohne Cre, wobei Letztere als Kontrollen dienten.

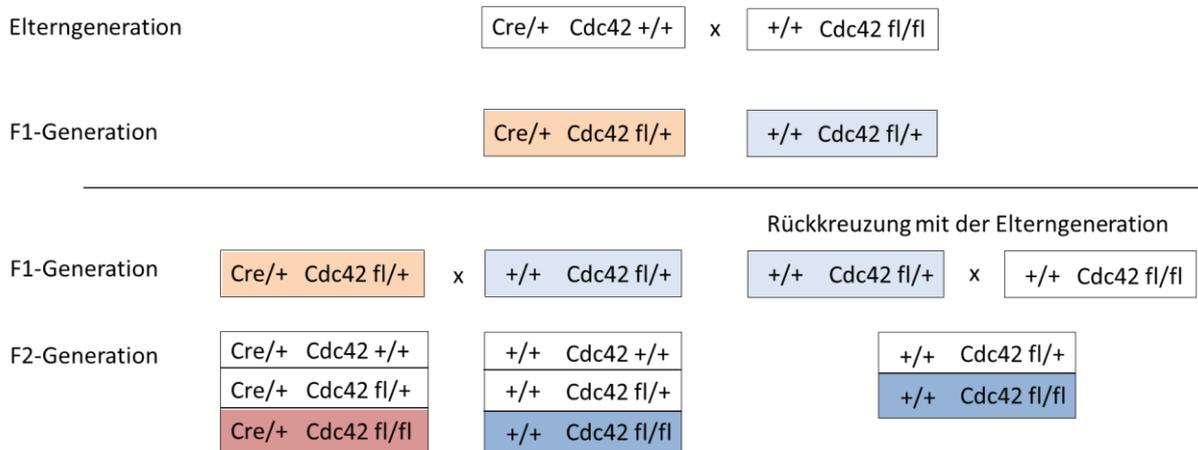
Für die Generierung von Doppel-cKO-Mäusen wurden heterozygote Mäuse der F1-Generation beider Einzel-cKO-Linien verwendet, die positiv bzw. negativ für die Cre-Rekombinase waren. In der

nächsten Generation entstanden Mäuse, die heterozygot für *Cdc42* und *Rac1* waren, auch diese waren entweder positiv oder negativ für die Cre-Rekombinase. Durch Verpaarungen innerhalb dieser F1-Generation wurden die Doppel-cKO-Mäuse generiert.

Eine Verpaarung von Mäusen mit homozygot gefloxtem *Cdc42* und/oder *Rac1* mit Cre-Rekombinase war nicht möglich. Es wurden ausschließlich Mäuse verwendet, die heterozygot für Cre waren.

Der konditionelle Knockout erfolgte mit dem Osterix-Promoter. Dieser verhinderte die Bildung eines dieser Proteine in den Osteoblasten des Knochens ab dem Embryonaltag 13,5 (Nakashima et al., 2002; Sinha und Zhou, 2012).

#### Cdc42 Einzel-Knockout:



Cdc41/Rac1 Doppel-Knockout:

Elterngeneration	Cre/+ Cdc42 fl/+	x	+/+ Rac1 fl/+
	+/+ Cdc42 fl/+	x	Cre/+ Rac1 fl/+
F1-Generation	Cre/+ Cdc42 +/+ Rac1 +/+		+/+ Cdc42 +/+ Rac1 +/+
	Cre/+ Cdc42 fl/+ Rac1 +/+		+/+ Cdc42 fl/+ Rac1 +/+
	Cre/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/+		+/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/+
	Cre/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+		+/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+
F1-Generation	Cre/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+	x	+/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+
F2-Generation	Cre/+ Cdc42 +/+ Rac1 +/+		+/+ Cdc42 +/+ Rac1 +/+
	Cre/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/+		+/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/+
	Cre/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/fl		+/+ Cdc42 +/+ Rac1 fl/fl
	Cre/+ Cdc42 fl/+ Rac1 +/+		+/+ Cdc42 fl/+ Rac1 +/+
	Cre/+ Cdc42 fl/fl Rac1 +/+		+/+ Cdc42 fl/fl Rac1 +/+
	Cre/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+		+/+ Cdc42 fl/+ Rac1 fl/+
	Cre/+ Cdc42 fl/fl Rac1 fl/fl		+/+ Cdc42 fl/fl Rac1 fl/fl

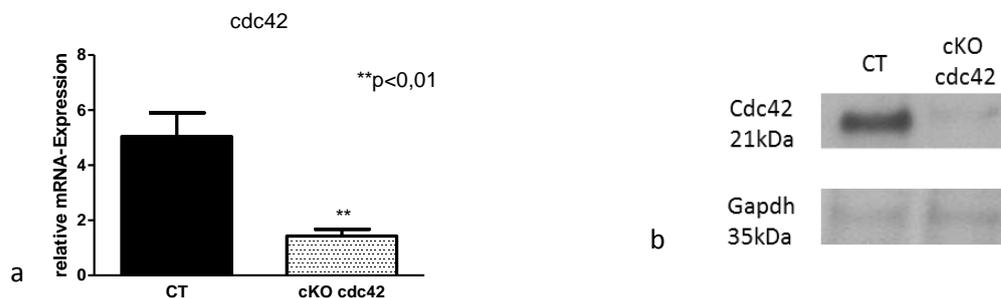
**Abb. 3.1: Kreuzungsschemata.** Einzel-Knockouts: Die Generierung der Einzel-cKO-Mäuse ist am Beispiel von *Cdc42* dargestellt. Analog wurden *Rac1*-cKO-Mäuse hergestellt. Für die Elterngeneration wurden Mäuse verwendet, die homozygot gefloxtes *Cdc42* ohne die Cre-Rekombinase besaßen, sowie Mäuse, bei denen das Zielgen nicht gefloxt vorlag, aber Cre-positiv waren. Die in der F1-Generation entstandenen Mäuse mit heterozygot gefloxtem Zielgen mit und ohne Cre-Rekombinase wurden weiter verpaart. Ebenso bestand die Möglichkeit der Rückkreuzung mit Tieren der Elterngeneration, die homozygot gefloxtes *Cdc42* bzw. *Rac1* besaßen und Cre negativ waren. Doppel-Knockouts: Für die Generation dieser Mauslinie bediente man sich der in der F1-Generation entstandenen Mäuse mit heterozygot gefloxten *Cdc42* und *Rac1*. Durch Verpaarungen innerhalb der F1-Generation wurden Mäuse generiert, die homozygot gefloxt Zielgene besaßen und Cre-Rekombinase positiv bzw. negativ waren.

## TEIL 1

### 3.2 Projekt Cdc42

#### 3.2.1 Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten

Um mit den Experimenten beginnen zu können, musste zunächst die Ausschaltung in frischen Osteoblasten untersucht werden. Hierfür wurden aus den Calvariae von neugeborenen Mäusen Präosteoblasten isoliert und die Cdc42-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, war die Transkription um 75% in den cKO-Osteoblasten vermindert. In den Proteinlysaten wurde die Menge des Gesamt-Proteins mit einem BCA-Kit bestimmt. Mit Hilfe eines Western Blots wurde die Bildung des Cdc42-Proteins analysiert. Hierfür wurden äquivalente Proteinmengen aufgetragen. Die Detektion des Cdc42-Proteins zeigt eine deutliche Bande in den Lysaten der CT-Zellen, während die cKO-Proben nur ein schwaches Signal aufweisen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der *Osx*-Promoter in den Osteoblasten die Cdc42-Synthese erfolgreich unterbindet. Als Haushalts-Protein wurde Gapdh verwendet.



**Abb. 3.2: Ausschaltung von Cdc42 in Osteoblasten.** a) Die relative mRNA-Expression von Cdc42 in den cKO-Osteoblasten war signifikant vermindert. CT, cKO: n=4. b) Western Blot. In den konditionellen cKO-Zellen war nur ein schwaches Signal für Cdc42 nachweisbar. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels eines Kits. Es wurden vergleichbare Mengen aufgetragen.

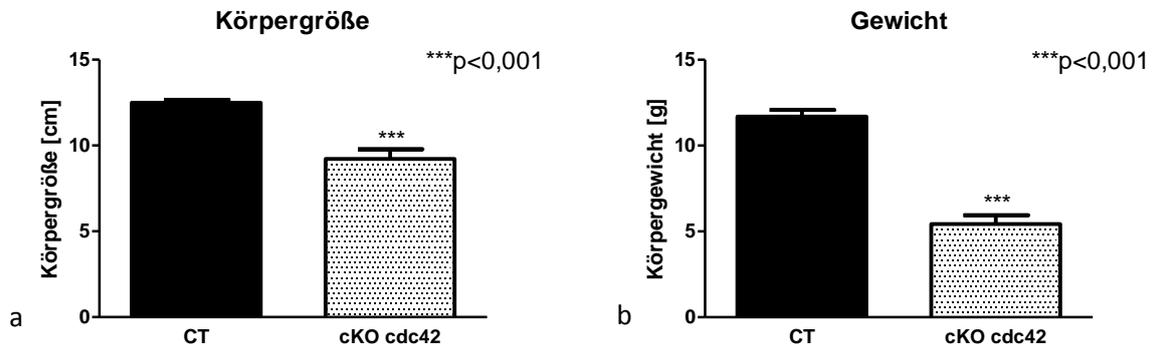
#### 3.2.2 Phänotyp der Cdc42-Knockout-Mäuse

##### 3.2.2.1 Entwicklung der langen Knochen

Die Ausschaltung von Cdc42 in einem frühen Stadium der Osteoblastendifferenzierung führte zu auffälligen Veränderungen im Phänotyp der Mäuse.

Die drei Wochen alten homozygoten cKO-Mäuse waren deutlich kleiner als die drei Wochen alten CT-Mäuse. Kontrollmäuse waren in diesem Alter im Durchschnitt 12,2cm groß, während die cKO-Mäuse nur eine Größe von 9,2cm erreichten (Abb. 3.3a). Dementsprechend war auch das Körpergewicht

geringer. Das Körpergewicht der cKO-Mäuse betrug unter 50% des Körpergewichts gesunder, drei Wochen alter Tiere (CT:  $11,7 \pm 1,3$ g vs. cKO:  $5,4 \pm 1,3$ g;  $p < 0,05$ ), (Abb. 3.3b).



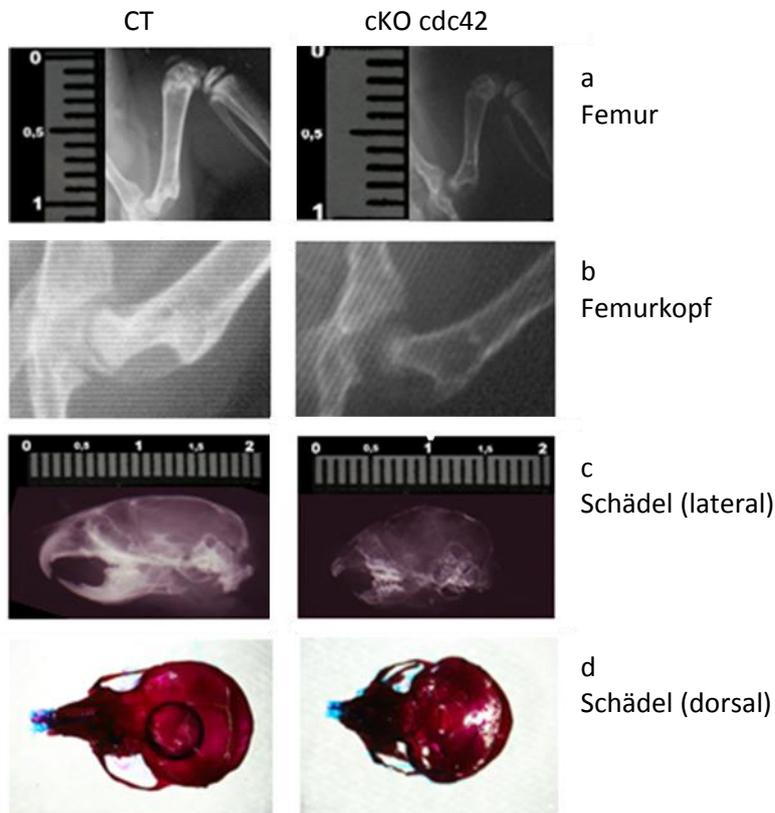
**Abb. 3.3: Größe und Gewicht der Mäuse.** a) Die cKO-Mäuse waren deutlich kleiner als die gleichaltrigen Kontrolltiere. CT-Mäuse waren im Alter von drei Wochen 12,2cm groß, während die cKO-Mäuse nur eine Größe von 9,2cm erreichten. b) Das Körpergewicht der cKO-Mäuse betrug unter 50% des Körpergewichts gesunder CT-Tiere. CT: n=5, cKO: n=6

Um genauere Aussagen über das Wachstum langer und platter Knochen treffen zu können, wurden die Extremitäten sowie die Schädel vermessen. Im Anhang 4 (Abb. 1A) sind Übersichtsbilder (Röntgenaufnahmen) der Mausskelette dargestellt, auf denen man die Größenverhältnisse erkennen kann. In Abbildung 3.4a ist ein Größenvergleich am Beispiel der Femura beider Versuchsgruppen gezeigt. Die Femura der CT-Tiere waren im Durchschnitt  $0,98 \pm 0,05$ cm lang und die der cKO-Tiere  $0,78 \pm 0,09$ cm ( $p < 0,0001$ ). Auffällig waren ebenfalls die Femurköpfe der cKO-Mäuse. In den Röntgenbildern sieht man, dass die Knochen der cKO-Mäuse kontrastärmer erscheinen. Das zeigte sich auch in den Gelenkregionen, z.B. am Femurkopf. Diese waren deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 3.4b).

Zusätzlich wurde untersucht, ob auch die Proportionen der Cdc42-cKO-Mäuse verändert sind. Es wurden die Längen von Femur, Tibia, Humerus, Ulna und des gesamten Körpers gemessen sowie Kopflänge und Kopfbreite, jeweils an der breitesten Stelle, bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Verhältnisse Femur zu Tibia und auch Humerus zu Ulna bei cKO- und CT-Mäusen bei 0,65 bzw. 0,9 lagen. Die Proportionen zwischen den Extremitäten und der Körpergröße entsprachen denen gesunder Tiere. Vergleich man aber die Fußlängen, zeigten sich deutliche Unterschiede. Das Verhältnis von Fußlänge zur Körpergröße war verschoben (CT:  $0,13 \pm 0,005$  vs. cKO:  $0,145 \pm 0,011$ ;  $p < 0,05$ ).

Die Cdc42-cKO-Mäuse waren nach Absetzen von der Mutter nicht in der Lage, sich selbstständig von Trockenfutter zu ernähren. Bereits vor dem Absetzen waren die betroffenen Tiere sichtlich schwächer als die gleichaltrigen, gesunden Geschwistertiere. Ein wichtiger Grund hierfür war u.a. eine Fehlentwicklung der Kiefer und Zähne. Wie in den folgenden Röntgenbildern gut zu sehen ist,

zeigten die cKO-Mäuse eine rundliche Kopfform und nicht wie typischerweise eine spitze Kopfform. Zudem waren die Zähne im Unter- und Oberkiefer nur schwach oder gar nicht ausgebildet (Abb. 3.4c, Anhang 4 (Abb. 1A)).



**Abb. 3.4: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung.** a) Röntgenbild zur Darstellung der Größe der Femura von CT- und cKO-Mäusen. b) Röntgenbild, Vergrößerung des Femurkopfes. Der Femurkopf der CT-Tiere war deutlich kräftiger und vollständig ausgebildet als bei den cKO-Tieren. c) Auch die laterale Aufnahme der Schädel zeigte ein inkomplettes Cranium der cKO-Mäuse. d) Skelettfärbung zur Darstellung von Knochengewebe (rot). Die Fontanellen und Schädelnähte der cKO-Mäuse waren nicht verschlossen.

### 3.2.2.2 Entwicklung der Schädelknochen

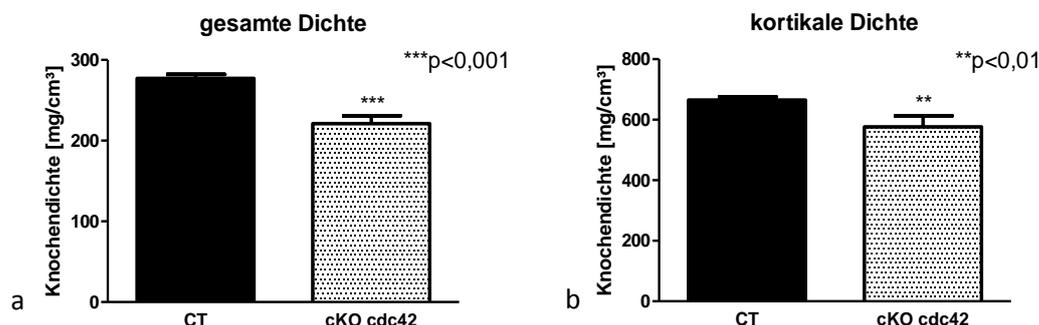
Wie eingangs beschrieben unterscheidet man zwischen der endochondralen und intramembranösen Knochenentwicklung (Ossifikation). Die endochondrale Ossifikation beschreibt die Entwicklung der langen Knochen. Wir konnten zeigen, dass hier starke Beeinträchtigungen bei den cKO-Tieren vorliegen. Es stellte sich die Frage, ob auch die Bildung der Plattenknochen (intramembranöse Ossifikation) gestört ist. Hierzu wurden Skelettfärbungen und Röntgenuntersuchungen vom Schädel der Mäuse angefertigt. Mit Hilfe der Skelettfärbung konnten Knochengewebe (rot) und Knorpelgewebe (blau) voneinander unterschieden werden. Wie die Abbildungen 3.4c und 3.4d zeigen, erscheint die Schädeldecke der cKO-Mäuse sehr löchrig und die Schädelnähte und

Fontanellen waren nur stellenweise zusammengewachsen. Bei den CT-Mäusen war die Schädeldecke komplett geschlossen. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl neben der endochondralen Knochenbildung auch die intramembranöse Knochenbildung durch eine Ausschaltung von Cdc42 spezifisch in Osteoblasten zu drastischen Veränderungen im Phänotyp führte.

### 3.2.2.3 Knochendichte

Im Folgenden mussten Untersuchungen direkt am Knochen erfolgen, um den Minderwuchs der Cdc42-cKO-Mäuse erklären zu können. Hierfür wurde zunächst die Knochendichte der Femura drei Wochen alter Mäuse ermittelt. Die Messung erfolgte *ex vivo*. Nach Tötung der Mäuse wurden die Knochen frei präpariert und bis zur Verwendung in 4%igem PFA fixiert. Die Knochendichte wurde an zwei Stellen im Knochen gemessen, zum einen in der Trabekelregion (bei 7,5% der Knochenlänge) und zum anderen in einer trabekelfreien Region (bei 40% der Knochenlänge), wo ausschließlich die Dichte des Kortex ermittelt werden konnte. Die Abbildungen 3.5a und 3.5b zeigen die gesamte Dichte des Knochens bei 7,5% der Knochenlänge und die kortikale Knochendichte bei 40% der Knochenlänge.

Die Knochendichte der Cdc42-cKO-Mäuse war signifikant vermindert. Sowohl die gesamte Dichte (Trabekel und Kortex) als auch die kortikale Dichte waren deutlich reduziert (Abb. 3.5a,b). Die gesamte Knochendichte der cKO-Mäuse war um 20,25% im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert (CT:  $277,1 \pm 23,4 \text{ mg/cm}^3$  vs. cKO  $221 \pm 24 \text{ mg/cm}^3$ ;  $p < 0,001$ ). Die kortikale Knochendichte der Cdc42-cKO-Mäuse war um 13,3% im Vergleich zu den CT-Mäusen vermindert (CT:  $665,1 \pm 61 \text{ mg/cm}^3$  vs. cKO  $576,6 \pm 103,8 \text{ mg/cm}^3$ ;  $p < 0,01$ ).



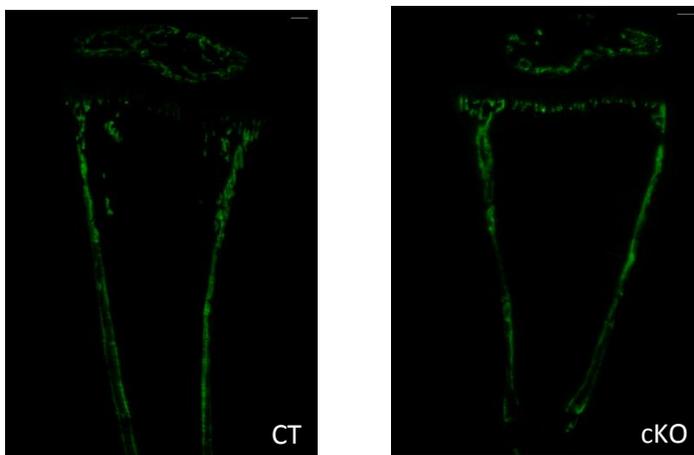
**Abb. 3.5: Periphere Computertomographie.** a) Die gesamte Knochendichte (Trabekel und Kortex) war bei den cKO-Mäusen deutlich vermindert. b) Gleiches zeigte sich, wenn man nur die kortikale Knochendichte betrachtete. Auch hier war die Dichte der Knochen der cKO-Mäuse vermindert. CT: n=5, cKO n=6

Diese Ergebnisse gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass die Ausschaltung von Cdc42 in den Osteoblasten tiefgreifende Auswirkungen auf die Knochenentwicklung hatte. Das verminderte

Knochenwachstum konnte verschiedene Ursachen haben. Es bestand die Möglichkeit, dass die Proliferation der Osteoblasten beeinträchtigt war, bzw. die Osteoblasten vermehrt in Apoptose gingen oder deren Funktion negativ beeinflusst wurde. Weiterhin konnten auch die Anzahl der Osteoklasten und/oder deren Funktion erhöht sein. Das würde einen verstärkten Knochenabbau erklären. Um die Anzahl der knochenbildenden und knochenabbauenden Zellen und deren Funktion zu untersuchen, mussten Knochenschnitte angefertigt werden. Diese zu untersuchenden Zellen wurden mit einer speziellen Färbemethode angefärbt und histomorphometrisch ausgewertet.

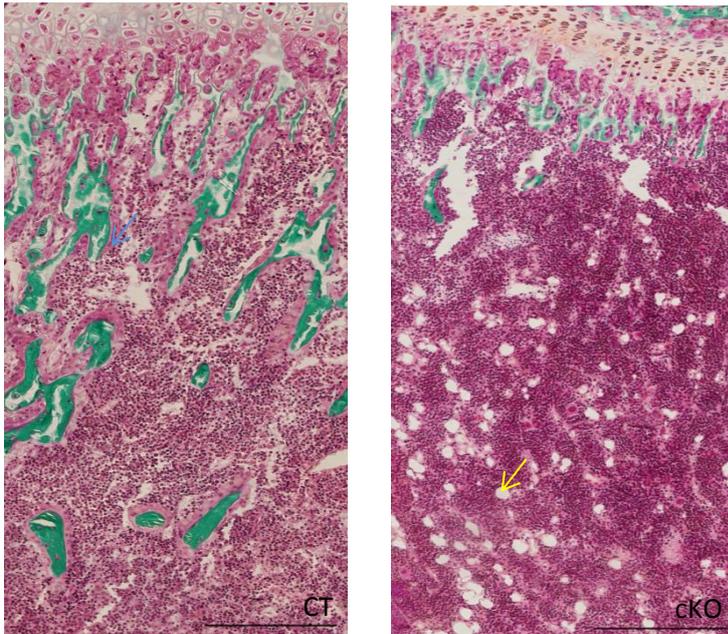
### 3.2.3 Histomorphometrie

Mit Hilfe der histomorphometrischen Analyse sollten Erkenntnisse auf histologischer Ebene im Knochen der CT- und cKO-Mäuse gewonnen werden. Hierfür wurden Tibia-Schnitte verwendet, die zuvor für die dynamische Histomorphometrie (Abb. 3.6) herangezogen und mit der Masson-Goldner Methode gefärbt wurden (Abb. 3.7). Mineralisierter Knochen erscheint grün, die Zellen des Knochenmarks werden rötlich gefärbt und Stellen, an denen aktiv neues Knochengewebe gebildet wird, färben sich dunkelrosa. Dabei handelt es sich um Osteoid (neu gebildetes Knochengewebe), das noch nicht mineralisiert und von den darüber liegenden aktiven Osteoblasten gebildet wurde.



**Abb. 3.6: Knochenschnitte der Tibiae, Kalzein-Färbung.**

Das injizierte Kalzein baute sich während des Wachstums in das frisch gebildete Osteoid ein und markierte somit die Stellen, an denen Knochenaufbau betrieben wird. Im Vergleich zu dem CT-Knochen war in dem cKO-Knochen keine Trabekelstruktur zu sehen. Balken: 100µm



**Abb. 3.7: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung.** Es sind Ausschnitte der Trabekelregion kurz unterhalb der Wachstumsfuge dargestellt. Bei den CT-Mäusen ist eine ausgeprägte sekundäre Spongiosa zu sehen, die von aktiven Osteoblasten gesäumt sind (blauer Pfeil). Bei den cKO-Mäusen treten nur vereinzelt Trabekel auf. Hingegen befanden sich im Knochenmark der cKO-Mäuse zahlreiche Adipozyten (gelber Pfeil). Balken: 100µm

Betrachtete man die Knochenschnitte, fielen zwei offensichtliche Unterschiede auf. Die Anzahl der Trabekel im Knochen der cKO-Mäuse war deutlich vermindert und die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark war erhöht. Insgesamt war die Knochenfläche bei den cKO-Mäusen um 42,1% verkleinert. Die Fläche der Trabekel war um 56,0% in den Tibiae der cKO-Tiere vermindert. Das reduzierte Knochenwachstum kann einer geringeren Osteoblastenanzahl bzw. eingeschränkten Osteoblastenfunktion oder durch eine gesteigerte Osteoklastenanzahl bzw. -funktion geschuldet sein. Tatsächlich war die Osteoblastenanzahl in den Tibiae der cKO-Tiere um 24,7% verringert. Die Anzahl der Osteoklasten war hingegen in beiden Gruppen gleich. Weiterhin vermuteten wir, dass die Funktionsfähigkeit der Cdc42-defizienten Osteoblasten verändert ist. Allerdings waren sowohl die Bildungsrate des gesamten Knochens als auch des Osteoids bei den cKO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erhöht (BFR/BS: Steigerung um 43,6%, BFR/OS: Steigerung um 52,0%). Die Osteoblasten der cKO-Mäuse schienen deutlich aktiver in ihrer Matrixablagerung zu sein. Diese Vermutung konnte durch die Berechnung der Zeitspanne von der Matrixablagerung bis zur Mineralisierung (MLT, *mineralizing lag time*) und der Osteoidreifungszeit (OMT, *osteoid maturation time*) bestätigt werden. Wir konnten zeigen, dass der Zeitraum von der Matrixbildung bis zur Mineralisierung und die Osteoidreifungszeit in den cKO-Mäusen kürzer sind (Tab. 3.1).

Osteozyten sind Zellen, die als aktive Osteoblasten selbst Matrix in die Umgebung abgelagert haben, dann aber von darüber liegenden Osteoblasten „eingemauert“ wurden. Diese Zellen waren dann nicht mehr in der Lage, weiter direkt am Knochenaufbau mitzuwirken. Sie übernehmen jetzt Aufgaben, wie beispielsweise die Signalweiterleitung von mechanischen Reizen an andere

Osteoblasten. Durch die vermehrte und schnellere Matrixablagerung ließen sich etwa 47,2% mehr Osteozyten in den Tibiae der cKO-Mäuse finden.

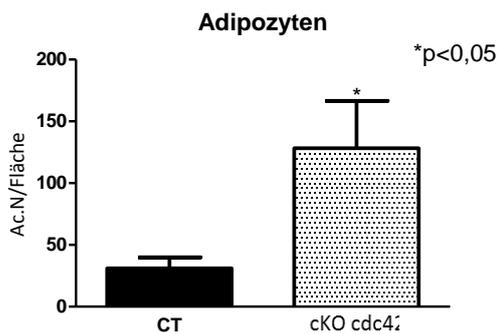
Tabelle 3.1: Histomorphometrie

Parameter	Einheit	CT	cKO cdc42	Signifikanz p
Knochenoberfläche (BS)	mm	18,52±3,61	10,71±1,89	0,0003***
Osteoid/Knochenoberfläche (Ob.S/BS)		0,67±0,05	0,52±0,16	0,0411*
Anzahl d. Osteoblasten/ Knochenoberfläche (Ob.N/BS)		60,06±7,52	45,25±15,69	0,0383*
Erosionsfläche /Knochenoberfläche (Oc.S/BS)		0,065±0,031	0,066±0,023	0,9344
Anzahl d. Osteoklasten/ Knochenoberfläche (Oc.N/BS)		1,84±0,507	1,98±0,98	0,7339
Mineralisierungsfläche/ Knochenfläche (MS/BS)		0,15±0,043	0,23±0,055	0,0116*
Knochenbildungsrate/ Knochenoberfläche (BFR/BS)	mm/y	0,08±0,03	0,11±0,03	0,0457*
Knochenbildungsrate/Osteoid (BFR/OS)	mm/y	0,15±0,04	0,23±0,05	0,0749
Zeit von Matrixablagerung bis Mineralisierung (MLT)	d	31,73±15,73	14,26±7,93	0,0222*
Osteoidreifungszeit (OMT)	y	6,61±2,33	5,25±1,67	0,2326
Anzahl d. Osteozyten/ Knochenoberfläche		5,26±0,42	7,74±1,4	0,0019**

CT, cKO: n=6; \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001

Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu den Knochendichtemessungen, die eindeutig eine Osteoporose bei den cKO-Tieren zeigten. Eine weitere Erklärung für die verminderte Knochendichte der cKO-Tiere könnte sein, dass die Matrixablagerung diffus erfolgt. Durch die Ablagerung von Kollagen Typ I in Fibrillen und die anschließende Einlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphaten wird ein Knochen stabil. Erfolgt die Ablagerung jedoch diffus, das heißt nicht engmaschig und fibrillär, so kommt es zu einer weniger starken Einlagerung der Ionen, was die Knochendichte vermindert.

Wie zuvor erwähnt waren im Knochenmark der cKO-Mäuse deutlich mehr Adipozyten (Ac.N, Adipozytenanzahl) vorhanden als bei den Mäusen der Kontrollgruppe (CT: 33±13,1Ac.N vs. cKO: 134,4±123,5Ac.N; p<0,05). Adipozyten entwickeln sich genau wie Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen. So bestand die Möglichkeit einer vermehrten Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten oder einer Transdifferenzierung der Cdc42-defizienten Präosteoblasten hin zu Adipozyten.



**Abb. 3.8: Anzahl der Adipozyten/Fläche.** Im Knochenmark der cKO-Mäuse fanden sich etwa viermal mehr Adipozyten als in den Tibiae der CT-Mäuse. CT, cKO: n=6

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der verminderten Osteoblastenzahl, der Knochenbildung sowie der erhöhten Adipozytenzahl sollten in *in vitro*-Versuchen vertieft werden.

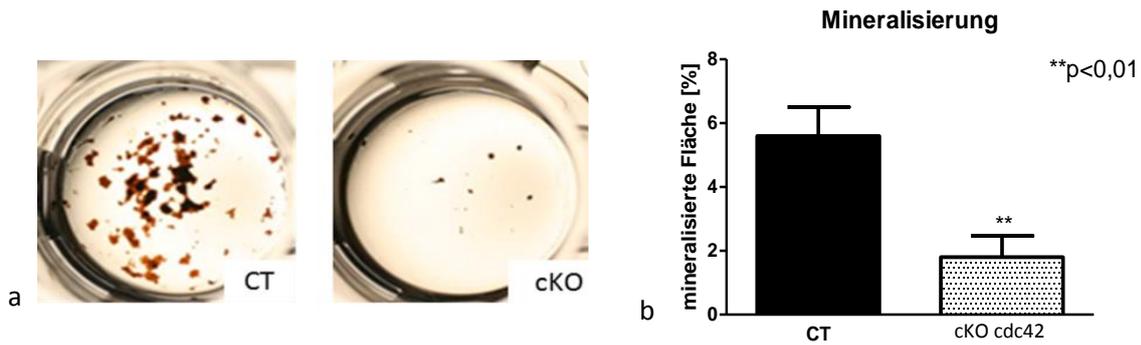
### 3.2.4 In vitro-Versuche

#### 3.2.4.1 Mineralisierungsfähigkeit isolierter Osteoblasten

Um die Fähigkeit der Osteoblasten zur Mineralisierung zu untersuchen, wurden primäre Osteoblasten aus der Calvaria von neugeborenen CT- und cKO-Mäusen isoliert und kultiviert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Osteoblastenisolierung wurde die Expression von Osteokalzin herangezogen (Sims et al., 2013). Osteoblasten weisen eine deutlich erhöhte Osteokalzin-Expression auf (Tab. 3.2).

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 90% erreichten, wurden die Osteoblasten auf Differenzierungsmedium umgestellt. Das Differenzierungsmedium enthielt verschiedene Zusätze, die die Ausdifferenzierung der Zellen und die damit einhergehende Mineralisierung zur Folge hatten. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach etwa einer Woche bildeten sich in den Kulturschalen gut sichtbare hydroxyapatithaltige Knoten. Nach drei wöchiger Kultivierung wurde das Experiment beendet und die Knoten mit einer von Kossa-Färbung besser sichtbar gemacht. Die Fläche der Knoten in jeder Kulturschale wurde vermessen (ImageJ) und zur Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.9a,b).



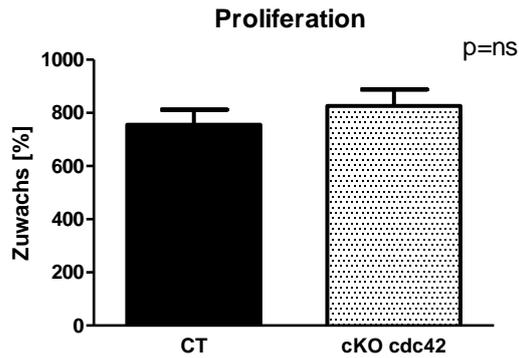
**Abb. 3.9: Hydroxyapatithaltige Knoten nach von Kossa-Färbung und deren Quantifizierung.** a) Nach Inkubation der reinen Osteoblasten-Kulturen mit Differenzierungsmedium kam es zur Mineralisierung, d.h. zur Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten. Die Mineralisierung war in den cKO-Kulturen deutlich vermindert. b) Quantifizierung der Mineralisierung durch CT- und cKO-Osteoblasten. CT, cKO: n=6

Wie in den Abbildungen 3.9a und 3.9b dargestellt, ist die Mineralisierungsfähigkeit der cKO-Osteoblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen stark eingeschränkt. Die Quantifizierung der mineralisierten Fläche zur Gesamtfläche zeigte, dass die Ausschaltung von Cdc42 für eine um zwei Drittel reduzierte Mineralisierung verantwortlich war.

Die Auswertung der Mineralisierungsfähigkeit erfolgte immer nach drei wöchiger Kultivierung. Die Knotenbildung wurde über den gesamten Zeitraum beobachtet. Es zeigte sich, dass die ersten Mineralisierungserscheinungen der cKO-Osteoblasten bereits zu Beginn zeitlich verzögert auftraten. Dieser Rückstand konnte über die gesamte Zeit nicht aufgeholt werden (Anhang 5).

#### 3.2.4.2 Proliferations-Assay

Um weitere Auswirkungen der Cdc42-Ausschaltung in Osteoblasten zu finden, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Hierzu wurden frisch isolierte Präosteoblasten aus den Schädeldecken beider Versuchsgruppen in gleicher Anzahl in Kulturschalen ausgesät und fünf Tage lang kultiviert. Die Auszählung zu Beginn und am Ende des Experiments erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Proliferation zwischen CT- und cKO-Osteoblasten beobachtet werden.

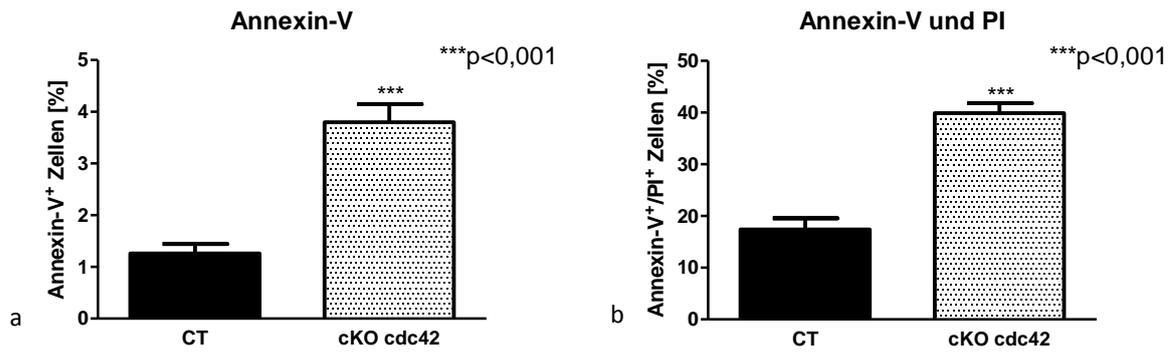


**Abb. 3.10: Proliferations-Assay.** Sowohl die CT- als auch cKO-Osteoblasten zeigten einen deutlich Zuwachs an Zellen innerhalb von fünf Tagen. Die Proliferationsrate war in beiden Gruppen gleich. CT: n=14, cKO: n=4

### 3.2.4.3 Apoptose-Assay

*In vivo* wiesen die cKO-Mäuse eine um fast 25% verminderte Osteoblastenanzahl auf. Da eine defekte Proliferation ausgeschlossen werden konnte, mussten weitere Parameter in Betracht gezogen werden. Im Folgenden sollte die Apoptoserate von CT- und cKO-Osteoblasten bestimmt werden. Hierfür wurden isolierte Osteoblasten auf einen frühen und einen späten Apoptosemarker im Durchflusszytometer untersucht. Frisch isolierte Zellen wurden zunächst für einige Tage in Kultur gehalten, um sich von der Isolierungsprozedur zu regenerieren. Anschließend wurden sie von den Zellkulturschalen abgelöst, ohne Oberflächenmoleküle dabei anzugreifen. Annexin-V färbte nur apoptotische Zellen an, bei denen Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die Außenseite transportiert wurde. Propidiumiodid (PI) interkalierte in die DNA toter Zellen. Das bedeutete, dass sie sowohl nekrotische als auch spätapoptotische Zellen markierten. Mit Hilfe dieser Methode konnte jedoch nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass cKO-Osteoblasten eine höhere Apoptoserate aufwiesen. Betrachtete man nur die frühapoptotischen Zellen, fand man in der Kontrollgruppe  $1,25 \pm 0,5\%$  Annexin-V positive Zellen, während es in der cKO-Gruppe  $3,8 \pm 0,8\%$  Annexin-V positive Zellen waren (Abb 3.11a). Etwa dreimal mehr Osteoblasten der cKO-Gruppe verglichen mit der CT-Gruppe waren apoptotisch. Das gleiche Bild zeigte sich auch bei den Doppelfärbungen (Annexin-V und PI). Der Anteil doppelpositiver CT-Osteoblasten lag bei  $17,4 \pm 5,9\%$  und bei den cKO-Osteoblasten bei  $39,9 \pm 4,7\%$  (Abb. 3.11b). Die Cdc42-defizienten Osteoblasten wiesen eine deutlich höhere Apoptoserate auf.

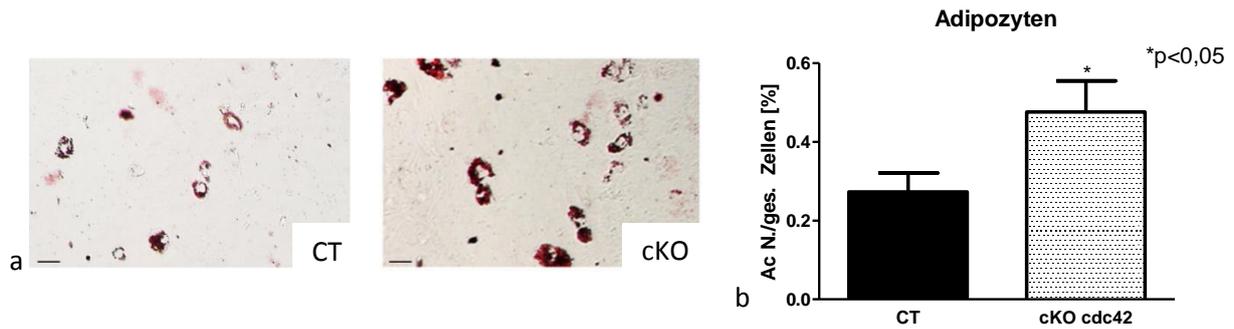


**Abb. 3.11: Apoptosenachweis bei isolierten Osteoblasten mittels Durchflusszytometrie.** a) Die Annexin-V-Färbung zeigt, dass die Osteoblasten der cKO-Kulturen eine etwa 3-fach erhöhte Apoptoserate aufwiesen. b) Auch bei der Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidiumiodid war zu sehen, dass die cKO-Osteoblasten deutlich häufiger in Apoptose gingen. CT: n=9; cKO: n=6

Es wurde ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht, ob das veränderte Apoptoseverhalten in den cKO-Osteoblasten einen Einfluss auf die Anzahl der mesenchymalen Stammzellen hatte. Hierfür wurde der prozentuale Anteil mesenchymaler Stammzellen aller frisch isolierten Knochenmarkszellen bestimmt. Jedoch konnten hier keine Veränderungen in den cKO-Mäusen verglichen mit den CT-Mäusen festgestellt werden (CT:  $0,12 \pm 0,05\%$  vs. cKO:  $0,13 \pm 0,03\%$ ; p=ns; CT: n=9, cKO: n=4).

#### 3.2.4.4 Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen

Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Marker, wie Bmp2 (*bone morphogenic protein 2*) leiten die osteogene Zelldifferenzierung ein. Je nach Bedingung der Mikroumgebung können sich die mesenchymalen Stammzellen auch zu Chondrozyten, Myoblasten, Fibroblasten und Adipozyten entwickeln. Da sich in vorhergehenden Versuchen zeigte, dass sich im Knochenmark der cKO-Mäuse mehr Adipozyten befanden als in CT-Mäusen, stellte sich die Frage, ob es durch eine gestörte Osteoblastendifferenzierung zu einer Transdifferenzierung hin zu Adipozyten kommt. Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass sich auch bereits differenzierte Zellen unter bestimmten Bedingungen in einen jeweils anderen Zelltyp transdifferenzieren können (Savopoulos et al., 2011). Aus diesem Grund wurden in weiteren Experimenten erneut frisch isolierte Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten differenziert und anschließend eine Adipozytenfärbung mit Oil Red O durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung wurden die Lipidtropfen der Fettzellen rot angefärbt.



**Abb. 3.12: Adipozytenfärbung (Oil Red O) auf differenzierten Osteoblasten und Quantifizierung.** a) Adipozytenfärbung. Wie in den Bildausschnitten zu sehen ist, haben sich in den cKO-Kulturen mehr Adipozyten gebildet als in den CT-Kulturen. Balken: 50µm. b) Die quantitative Auswertung ergab einen Anstieg von etwa 45% an Adipozyten in den cKO-Kulturen. CT, cKO: n=6

Sowohl in den CT- als auch cKO-Osteoblasten-Kulturen wurden Adipozyten gefunden. Jedoch war die Anzahl dieser Zellen in den cKO-Osteoblasten-Kulturen deutlich erhöht. Dieses Experiment bestätigte die *in vivo* gemachten Beobachtungen. Auch in den histologischen Untersuchungen der Knochen stellten wir fest, dass die cKO-Mäuse mehr Adipozyten im Knochenmark aufwiesen.

In einem weiteren Teilversuch wurden die CT- und cKO-Osteoblasten ebenfalls für drei Wochen mit Medien versorgt, die Stimulantien der Adipozytendifferenzierung enthielten. Es konnten keine Unterschiede in der Adipozytenanzahl pro Gesamtzellzahl zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (CT:  $0,056 \pm 0,05\%$  vs. cKO:  $0,072 \pm 0,08\%$ ;  $p=ns$ ; CT: n=5, cKO: n=6). Die cKO-Osteoblasten reagierten also nicht sensibler auf die Anwesenheit von Substanzen, die die Adipozytendifferenzierung einleiteten. Nachfolgend musste untersucht werden, ob die erhöhte Adipozytendifferenzierung allein auf eine fehlerhafte Osteoblastendifferenzierung zurückzuführen war, oder ob auch das Knochenmark daran beteiligt war.

#### 3.2.4.5 Kultivierung von Knochenmarkszellen

Um zu untersuchen, ob nicht auch das Knochenmark zu einer erhöhten Adipozytendifferenzierung bei den cKO-Mäusen beiträgt, wurde das Knochenmark von CT- und cKO-Tieren aus den Tibiae und Femura ausgespült und die Zellen nach einer Erythrozytenlyse ausgesät. Anschließend wurden auch diese Zellen zu Osteoblasten differenziert. Nach drei wöchiger Differenzierungszeit wurden die Adipozyten angefärbt und gezählt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Adipozytenanzahl zwischen dem CT- und cKO-Knochenmark (CT:  $4,56 \pm 2,04\%$  vs. cKO:  $3,66 \pm 1,63\%$ ;  $p=ns$ ; CT: n=3, cKO: n=6).

Dieses Ergebnis bestätigte, dass die vermehrte Differenzierung zu Fettzellen von den frühen Osteoblasten ausging und das Knochenmark weitestgehend unbeteiligt war. Um eine abschließende

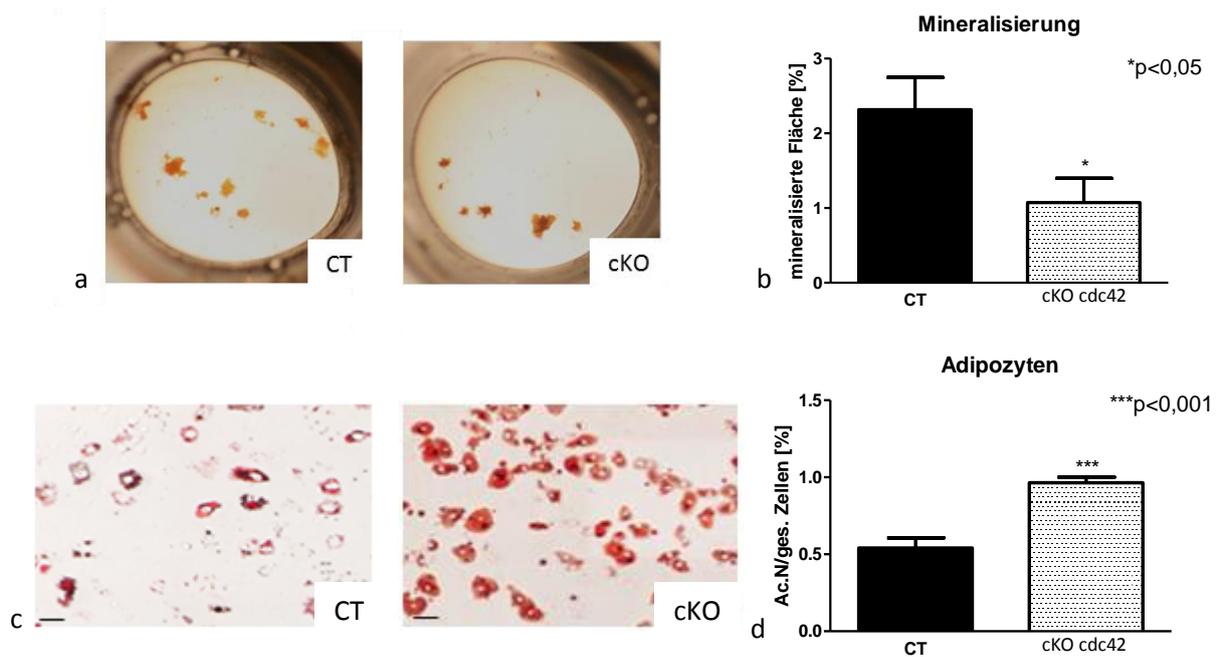
Aussage treffen zu können, sollte im Folgenden das WT-Knochenmark mit CT- bzw. cKO-Osteoblasten co-kultiviert werden.

#### 3.2.4.7 Einfluss des Knochenmarks auf die Osteoblasten

Für die Prüfung, welchen Einfluss Wildtyp-Knochenmark auf die isolierten Osteoblasten hatte, wurden Co-Kulturen angelegt. Das Knochenmark und die Osteoblasten wurden in einem Verhältnis, wie es auch unter physiologischen Bedingungen vorkommt, angesetzt.

Zunächst wurden die Co-Kulturen für drei Wochen in Osteoblasten-Differenzierungsmedium gehalten. Die Mineralisierung wurde über den gesamten Zeitraum beobachtet und dokumentiert. Wie in den reinen Osteoblasten-Kulturen auch, war die Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten in den cKO-Kulturen stets vermindert. Abbildung 3.13a zeigt exemplarisch den Unterschied zwischen CT- und cKO-Kulturen hinsichtlich der Mineralisierungsfähigkeit. Die Auswertung ergab, dass die Mineralisierung durch die cKO-Osteoblasten um 43,5% herabgesetzt war. Generell konnte beobachtet werden, dass in Gegenwart von WT-Knochenmark die Mineralisierung weiterhin reduziert blieb.

In einem weiteren Experiment wurden Co-Kulturen wie beschrieben behandelt. Sie wurden jedoch mit Oil Red O gefärbt, um Adipozyten sichtbar zu machen. Wieder zeigte sich eine deutliche Zunahme an Adipozyten in den cKO-Kulturen (Abb. 3.13c). Es wurde ein Anstieg von 48% verzeichnet (Abb. 3.13d).



**Abb. 3.13: Co-Kulturen: von Kossa-Färbung zur Detektion der Hydroxyapatit-Knoten und Oil Red O-Färbung zum Nachweis der Adipozyten.** a) von Kossa-Färbung, die cKO-Kulturen wiesen eine deutliche Verminderung der Mineralisationsfähigkeit auf. b) Quantifizierung der gebildeten Knoten. CT, cKO: n=6. c) Oil Red O-Färbung. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der Adipozytenanzahl zwischen CT- und cKO-Kulturen. Balken: 50µm. d) Bestimmung der Adipozyten pro Gesamtzellzahl. CT, cKO: n=4

Um herauszufinden, ob die Co-Kulturen, die cKO-Osteoblasten enthielten, unter bestimmten Umständen bevorzugt zu Adipozyten differenzieren, wurden die Kulturen für ebenfalls drei Wochen mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt. Hier gab es keine Unterschiede zwischen den CT- und cKO-Kulturen (CT:  $0,051 \pm 0,03\%$  vs. cKO:  $0,058 \pm 0,04\%$ ;  $p=ns$ ; CT, cKO: n=6). Der sehr geringe prozentuale Anteil an Adipozyten in den cKO-Co-Kulturen bei Stimulierung der Adipozytendifferenzierung wird in Abschnitt 4.3.5. diskutiert.

Die Daten belegen, dass trotz Zugabe von WT-Knochenmarkszellen zu cKO-Osteoblasten keine offensichtliche Besserung der Mineralisationsfähigkeit und keine Verminderung einer Differenzierung zu Adipozyten eintraten. Bisher deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte Adipozytenanzahl allein auf einer fehlerhaften Differenzierung der Osteoblasten beruhte.

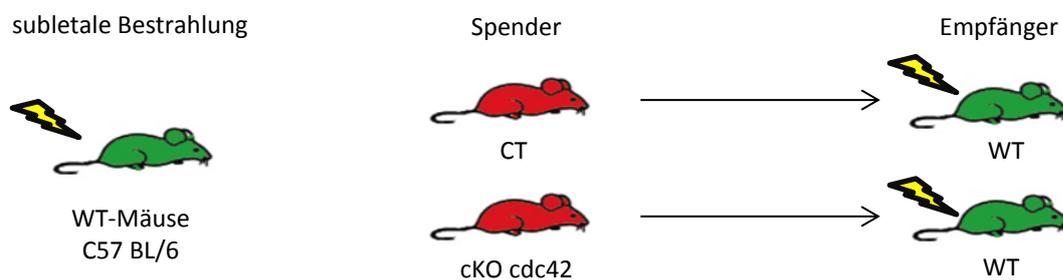
Um gesicherte Aussagen treffen zu können, sollten im nächsten Schritt diese Ergebnisse auch *in vivo* reproduziert werden. Dies sollte mit Transplantationsexperimenten erfolgen.

### 3.2.5 Transplantationsexperimente

Der gedankliche Hintergrund dieser Versuche war der Beweis, dass sich durch die Transplantation von Knochenmark aus CT- bzw. cKO-Mäusen in Wildtypmäuse keine Veränderungen bezüglich der Adipozytenzahl in beiden Gruppen ergaben.

Hierfür wurden sechs Wochen alte (Chen et al., 2014) WT-Mäuse (C57 BL/6) bestrahlt und erhielten im Anschluss das Knochenmark ( $1 \times 10^6$  Zellen) von drei Wochen alten CT- bzw. cKO-Mäusen i.v. (Montanez et al., 2007)

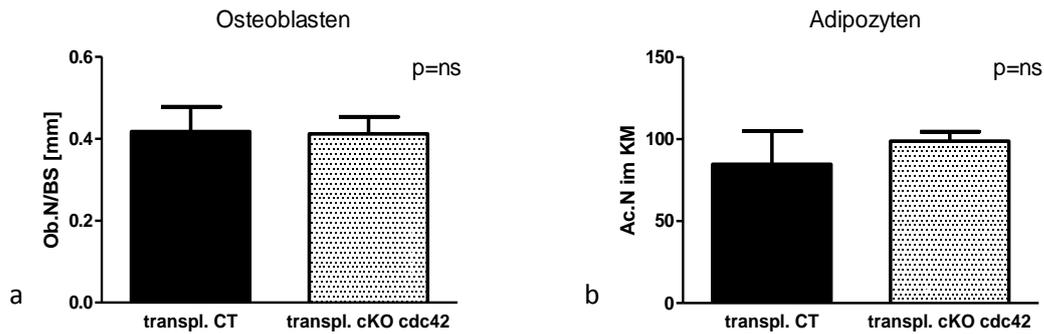
#### Transplantationsmodell



**Abb. 3.14: Transplantationsmodell.** Wildtypmäuse wurden subletal bestrahlt und erhielten nach dieser Behandlung das Knochenmark von CT- bzw. cKO-Mäusen über die Schwanzvene. (Modifiziert nach Bersenev, 2011)

Um sicher zu gehen, dass die Bestrahlung erfolgreich war, wurde einigen bestrahlten WT-Mäusen statt Knochenmark nur PBS injiziert. Diese Mäuse waren nicht in der Lage ihre hämatopoetischen Zellen zu regenerieren. Sie starben spätestens zehn Tage nach Bestrahlung. Alle Mäuse wurden für etwa einen Monat unter sterilen Bedingungen gehalten und mit Antibiotika versorgt, um einem Tod durch Infektion vorzubeugen.

Sieben der zehn (3/5 CT und 4/5 cKO) mit Knochenmark behandelten Mäuse erholten sich, was durch regelmäßige Blutbilder überprüft wurde. Vier Monate nach der Transplantation wurden die Mäuse getötet, deren Tibiae histomorphometrisch ausgewertet und auf Adipozyten untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede im Aufbau der Knochen von WT-Mäusen, die CT- bzw. cKO-Knochenmark erhielten. Wie in den Abbildungen 3.15a und 3.15b zu sehen ist, wirkte sich das Knochenmark der cKO-Mäuse nicht negativ auf die Osteoblastenzahl aus (CT:  $0,42 \pm 0,12$  Ob.N/mmBS vs. cKO:  $0,41 \pm 0,09$  Ob.N/mmBS;  $p=ns$ ) und stimulierte auch nicht die Adipogenese (CT:  $84,7 \pm 40,5$  Ac.N vs. cKO:  $98,8 \pm 12,9$  Ac.N;  $p=ns$ ).



**Abb. 3.15: Histomorphometrische Analyse der Tibiae der transplantierten Mäuse.** a) Die Anzahl der Osteoblasten unterschied sich in beiden Gruppen nicht. b) Auch die Anzahl der Adipozyten war in den Mäusen, die CT- bzw. cKO-Knochenmark bekamen, gleich. transpl. CT: n=3, transpl. cKO: n=4

Diese Ergebnisse bestätigten die *in vitro*-Versuche. Das Knochenmark hatte keine Auswirkungen auf die Differenzierung von Präosteoblasten bzw. mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten. Wir gingen davon aus, dass durch die Bestrahlung der WT-Mäuse die Osteoblasten und auch mesenchymalen Stammzellen nur wenig in Mitleidenschaft gezogen wurden. Die Arbeitsgruppe um Lange et al. zeigte, dass diese Zellen strahlungsresistent waren (Lange et al., 2011). Da die WT-Mäuse intakte Osteoblasten entwickelten, konnten wir bestätigen, dass das Knochenmark von cKO-Mäusen keinen wesentlichen Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung ausübte.

Transplantationsversuche, bei denen CT- und cKO-Mäuse das Knochenmark von WT-Mäusen erhielten, waren nicht möglich. Die cKO-Mäuse würden eine solche Prozedur nicht überstehen.

### 3.2.6 Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker

Frühe Marker der Osteoblastendetermination sind die Bmps, Runx2, Osterix und die Alkalische Phosphatase. Es wurden Wisp1, stellvertretend für den  $\beta$ -Catenin-Signalweg und Vegf für die Angiogenese untersucht. Ein Marker, der reife Osteoblasten kennzeichnet, ist Osteokalzin.

Sind hingegen Ppar $\gamma$  und C/ebp $\alpha$  bzw.  $\beta$  hochreguliert, entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen Adipozyten. Ein Marker für reife Adipozyten ist Ap2. Im Folgenden sollte die Expression dieser Gene auf mRNA-Ebene untersucht werden. Die Untersuchung der Bmps wurde vernachlässigt, da diese nicht einem eindeutigen Differenzierungsweg zugeschrieben werden konnten. Der Nachweis der Genexpression erfolgte mit Osteoblasten, die drei Wochen lang in Osteoblastendifferenzierungsmedium kultiviert wurden.

Zunächst wurde die Expression der Osteoblastenmarker in differenzierten Osteoblastenkulturen untersucht. Wider Erwarten zeigten sich keine unterschiedlichen Expressionsmuster zwischen den CT- und cKO-Osteoblasten. Marker, wie Runx2 und Alp, die die Osteoblastendifferenzierung einleiten, waren auf mRNA-Ebene unverändert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die

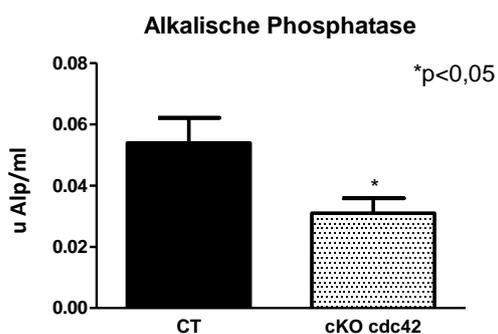
Transkription dieser Gene von *Cdc42* unbeeinflusst blieb (Tab. 3.2). Daraufhin sollte ein Alkalische Phosphatase-Assay zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms im Medium durchgeführt werden. Wie in Abbildung 3.16 zu sehen, ist die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den cKO-Osteoblasten signifikant eingeschränkt, was eine Mineralisierung vermindert. Möglicherweise waren aus diesem Grund die Marker *Wisp1* und *Vegf* auf mRNA-Ebene hochreguliert, um dieses Defizit zu überwinden. Sklerostin (*Sost*) wird von Osteozyten sezerniert und schützt vor übermäßigem Knochenaufbau. Dabei vermindert es die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten, steigert aber deren Apoptose (Baron und Kneissel, 2013). Interessanterweise war die *Sost*-Expression in den cKO-Osteoblasten hochreguliert. Bei Osteoprotegerin (*Opg*) konnte man eine tendenzielle Zunahme an mRNA in den cKO-Osteoblasten beobachten. *Opg* ist in der Lage, die Osteoklastenentstehung und –aktivierung zu unterbinden (Baron und Kneissel, 2013), (Tab. 3.2).

Die Expression der untersuchten Gene wurde zur Expression des Haushaltsgens *Hprt* korrigiert.

Tabelle 3.2: Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu *Hprt* korrigiert)

Gen	CT	cKO <i>cdc42</i>	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	8,04 ± 2,9	14,06 ± 11,3	0,282
<i>Alpl</i>	7,32 ± 4,4	9,12 ± 7,0	0,599
<i>Oc</i>	2455,15 ± 2153,9	2275,02 ± 1347,5	0,866
<i>Wisp1</i>	1,96 ± 0,5	4,25 ± 2,8	0,039*
<i>Vegf</i>	1,19 ± 0,4	1,68 ± 0,9	0,256
<i>Sost</i>	0,77 ± 0,7	3,29 ± 2,8	0,025*
<i>Opg</i>	8,99 ± 2,8	16,22 ± 12,9	0,212

CT, cKO: n=6; \*p<0,05



**Abb. 3.16: Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Medium.** Das Enzym, das anorganisches Phosphat zur Mineralisierung bereitstellt, war in den cKO-Osteoblasten deutlich in seiner Aktivität eingeschränkt. CT, cKO: n=18

Fortführend wurde das Expressionsmuster der Adipozytenmarker näher untersucht. Ein essentieller Faktor der Adipogenese ist *Ppar $\gamma$* . Die cKO-Osteoblasten wiesen eine signifikant hochregulierte mRNA-Expression dieses Gens auf. Auch der frühe Marker *C/ebp $\alpha$*  zeigte eine erhöhte Transkription. *Ap2*, welches von reifen Adipozyten gebildet wurde, zeigte jedoch keine Unterschiede. Eventuell war die Kultivierungszeit von drei Wochen zu kurz, um *Ap2*-produzierende, ausgereifte Fettzellen in sicherem Umfang zu bilden. Die Expression der untersuchten Gene wurde zur Expression des Haushaltsgens *Hprt* korrigiert.

Tabelle 3.3: Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu *Hprt* korrigiert)

Gen	CT	cKO <i>cdc42</i>	Signifikanz p
<i>Ppar<math>\gamma</math></i>	49,13 $\pm$ 12,3	88,79 $\pm$ 36,9	0,031*
<i>C/ebp<math>\alpha</math></i>	12,31 $\pm$ 7,6	20,32 $\pm$ 11,7	0,189
<i>C/ebp<math>\beta</math></i>	0,52 $\pm$ 0,1	0,57 $\pm$ 0,1	0,544
<i>Ap2</i>	4,76 $\pm$ 4,9	7,17 $\pm$ 7,9	0,545

CT, cKO: n=6; \*p<0,05

Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise darauf, welche Gene durch eine Ausschaltung von *Cdc42* in ihrer Expression hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Besonders die erhöhte Transkription der Adipozytenmarkergene spiegelte die *in vitro* und *in vivo* gemachten Beobachtungen wider. Sichere Aussagen konnten jedoch nicht getroffen werden, da weitere Untersuchungen auf Proteinebene unerlässlich sind.

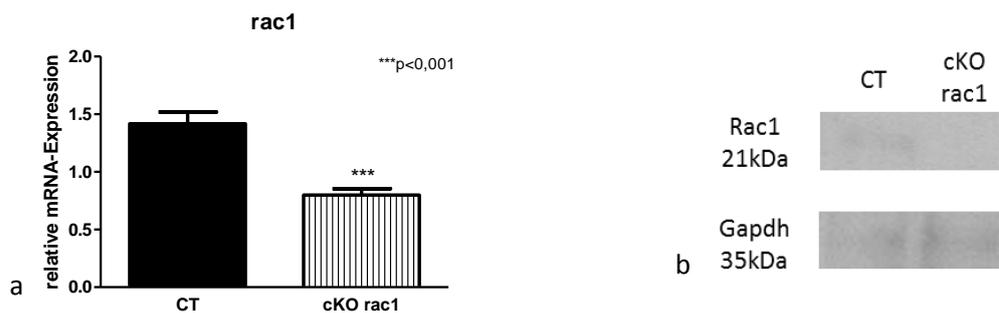
Das Expressionsmuster dieser Markergene wurde ebenfalls in Co-Kulturen untersucht. Hierbei ergaben sich sehr ähnliche Ergebnisse (Anhang 6 (Tab. 4A,B)). Eine Differenzierung reiner Osteoblasten-Kulturen und Co-Kulturen zu Adipozyten brachte keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen beiden Versuchsgruppen (Anhang 7 (Tab. 5A,B)).

## TEIL 2

### 3.3 Projekt Rac1

#### 3.3.1 Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten

Zu Beginn der Studie musste die Ausschaltung mit Hilfe des *Osx*-Promotors von Rac1 in den Osteoblasten bestätigt werden. Hierfür wurden aus den Calvariae von neugeborenen Mäusen Präosteoblasten isoliert und die Rac1-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Auf mRNA-Ebene konnte lediglich eine 37%ige Rac1-Ausschaltung nachgewiesen werden. Für die Bestimmung der Ausschaltung auf Proteinebene wurden Western Blots durchgeführt. Es wurden äquivalente Proteinmengen auf die Gele aufgetragen, die auf Grundlage eines BCA-Kits berechnet wurden. Während die CT-Proben Rac1-Banden zeigten, war das Signal in den cKO-Proben nur schwach. Die Ausschaltung auf Proteinebene spiegelte die mRNA-Expression wider. Als Haushaltsprotein wurde Gapdh verwendet.



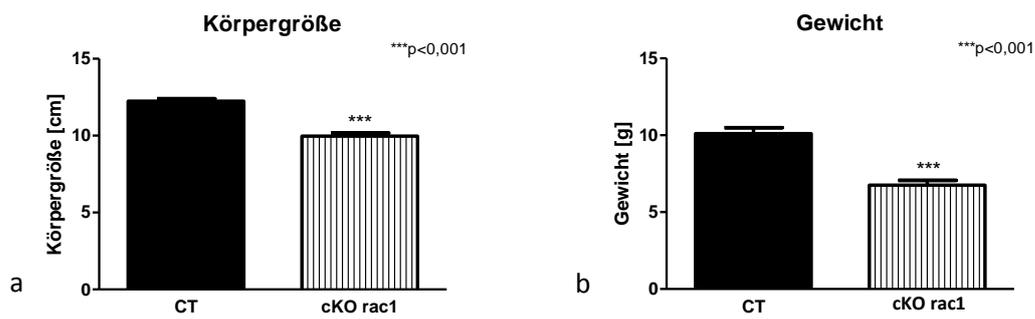
**Abb. 3.19: Ausschaltung von Rac1 in Osteoblasten.** a) Die relative mRNA-Expression von Rac1 in den cKO-Osteoblasten war signifikant um 37,1% vermindert. CT: n=4, cKO: n=5. b) Western Blot. In den Rac1-defizienten Zellen ist nur ein schwaches Signal detektierbar.

#### 3.3.2 Phänotyp der Rac1-Knockout-Mäuse

##### 3.3.2.1 Entwicklung der langen Knochen

Die Ausschaltung von Rac1 in einem frühen Stadium der Osteoblastendifferenzierung führte zu deutlichen Veränderungen im Phänotyp der Mäuse.

Die drei Wochen alten homozygoten cKO-Mäuse waren etwa um ein Drittel kleiner als die drei Wochen alten CT-Mäuse. CT-Mäuse hatten in diesem Alter eine durchschnittliche Größe von 12,2cm, während die cKO-Mäuse nur eine Größe von 9,9cm erreichten (Abb. 3.18a). Dementsprechend war auch das Körpergewicht der cKO-Tiere geringer (CT: 10,1±1,2g vs. cKO: 6,8±1,1g; p<0,05), (Abb. 3.18b).



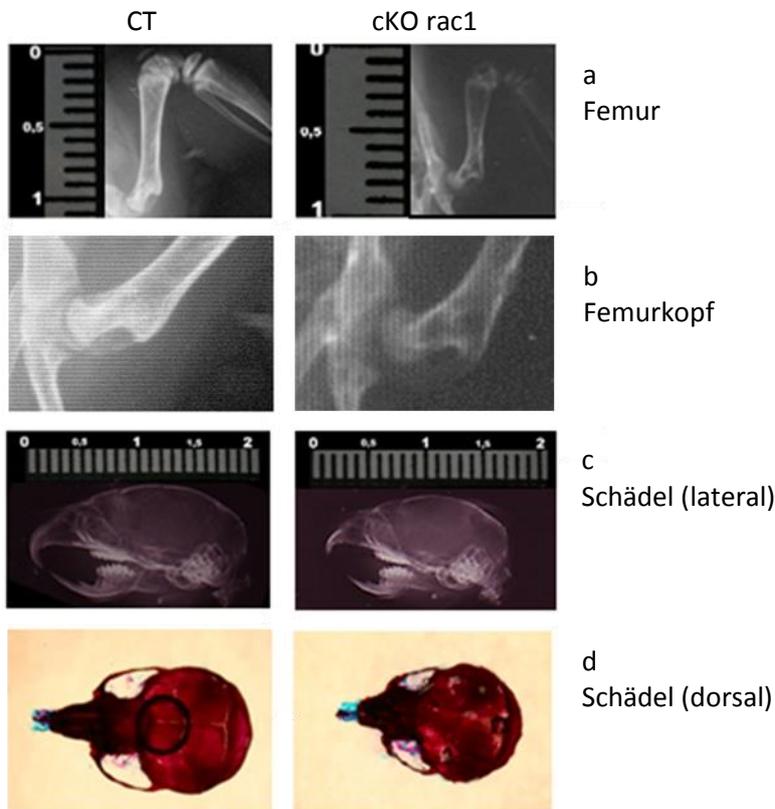
**Abb. 3.18: Größe und Gewicht der Mäuse.** a) Die cKO-Mäuse waren deutlich kleiner als die gleichaltrigen CT-Tiere. CT-Mäuse waren im Alter von drei Wochen 12,2cm groß, während die cKO-Mäuse nur eine Größe von 9,9cm erreichten. CT: n=13, cKO: n=6. b) Die cKO-Mäuse erreichten nur etwa zwei Drittel des Gewichts gesunder Tiere. CT: n=9, cKO: n=12

Auch hier interessierte uns das Wachstum langer und platter Knochen, weshalb die Extremitäten und Schädel vermessen wurden. Im Anhang (Abb. 2A) sind Röntgenaufnahmen der Mausskelette gezeigt, die die Größenverhältnisse hervorheben. In Abbildung 3.19a ist der Größenvergleich am Beispiel der Femura beider Versuchsgruppen dargestellt. Die Femura der CT-Tiere waren im Durchschnitt  $0,98 \pm 0,05$ cm lang und die der cKO-Tiere  $0,90 \pm 0,06$ cm ( $p < 0,05$ ). Die Knochen der cKO-Tiere erschienen kontrastärmer, d.h. sie waren weniger mineralisiert. Auffällig waren auch die Femurköpfe der cKO-Mäuse. Die Gelenkregion war schwächer ausgeprägt und der Winkel des Femurkopfes schien verändert (Abb. 3.19b).

Es musste untersucht werden, ob die Körperproportionen dieser cKO-Mäuse verändert sind. Die Messungen ergaben, dass die Verhältnisse Femur zu Tibia, wie auch Humerus zu Ulna bei cKO- und CT-Mäusen bei 0,69 bzw. CT: 0,93 und cKO: 0,86 ( $p = ns$ ) lagen. Die Proportionen zwischen den Extremitäten und der Körpergröße der cKO-Mäuse entsprachen denen gesunder Tiere. Verglich man die Fußlängen, zeigten sich Unterschiede. Das Verhältnis von Fuß zur Körpergröße war verschoben (CT:  $0,13 \pm 0,005$  vs. cKO:  $0,15 \pm 0,02$ ;  $p < 0,01$ ).

Die Ausprägung des Phänotyps der cKO-Tiere war nicht so einheitlich, wie es bei den Cdc42-cKO-Tieren beobachtet wurde. Eine geringe Anzahl von Mäusen wurde älter als vier Wochen. Der Großteil der cKO-Mäuse war jedoch nicht in der Lage, sich nach Absetzen von der Mutter selbstständig zu ernähren. Wie in den Röntgenaufnahmen gut sichtbar war, wiesen die Rac1-cKO-Mäuse genauso wie die Cdc42-cKO-Mäuse einen verkürzten Unter- und Oberkiefer auf. Auch die Zahnentwicklung war fehlerhaft. Häufig entwickelten die Rac1-cKO-Mäuse eine Fehlstellung der Zähne, sogenannte

Elefantenzähne, mit denen die Nahrungsaufnahme nur schwer möglich war (Abb. 3.19c, Anhang 4 (Abb. 2A)).



**Abb. 3.19: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung.** a) Röntgenbild zur Darstellung der Größe der Femura von CT- und cKO-Mäusen. b) Röntgenbild, Vergrößerung des Femurkopfes. Der Femurkopf der CT-Tiere war vollständig ausgebildet und kräftiger als bei den cKO-Tieren. c) Die laterale Aufnahme der Schädel zeigte die deutliche Verkürzung und die schwache Zahnentwicklung im Oberkiefer. d) Skelettfärbung zur Darstellung von Knochengewebe (rot). Die Fontanellen und Schädelnähte der cKO-Mäuse waren nicht vollständig verschlossen.

### 3.3.2.2 Entwicklung der Schädelknochen

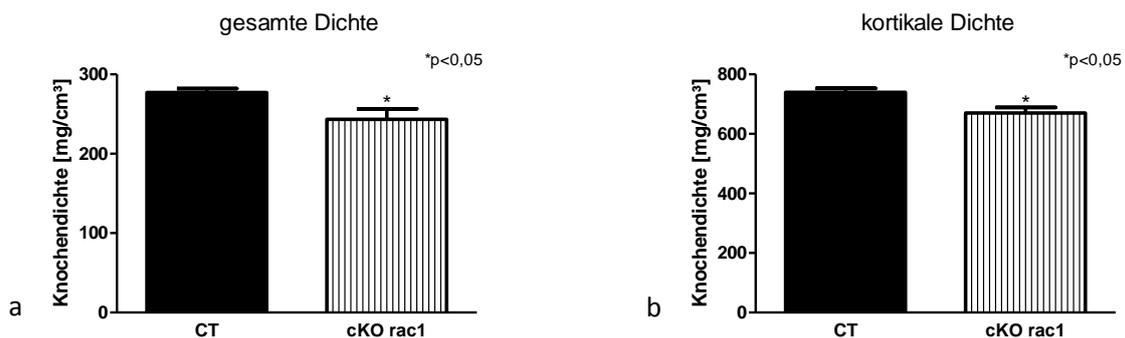
Die Entwicklung der Röhrenknochen (endochondrale Ossifikation) war durch die Ausschaltung von Rac1 in den Osteoblasten stark beeinträchtigt. Wie in den Skelettfärbungen der Schädel (Abb. 3.19d) zu erkennen, war auch die Entwicklung der Schädelknochen (intramembranöse Ossifikation) betroffen. Mit Hilfe der Skelettfärbung konnten Knochengewebe (rot) und Knorpelgewebe (blau) voneinander unterschieden werden. Es wurden offene Stellen in der Calvaria der cKO-Mäuse sichtbar. Das Zuwachsen der Schädelnähte sowie der Fontanellen war bei einer Rac1-Ausschaltung unvollständig bzw. verzögert.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die endochondrale als auch die intramembranöse Knochenbildung durch eine Ausschaltung von Rac1 spezifisch in Osteoblasten zu gravierenden Veränderungen in der Knochenentwicklung führten.

### 3.3.2.3 Knochendichte

Um die Ausschaltung von Rac1 in Osteoblasten weiter zu charakterisieren, mussten Untersuchungen direkt am Knochen erfolgen. Hierfür wurde zunächst bei drei Wochen alten Mäusen die Knochendichte der Femura ermittelt. Die Messung erfolgte *ex vivo*. Nach Tötung der Mäuse, wurden die Knochen frei präpariert und bis zur Verwendung in 4%igem PFA fixiert. Die Knochendichte wurde an zwei Stellen im Knochen gemessen. Die Messungen erfolgten in der Trabekelregion (bei 7,5% der Knochenlänge) und in einer trabekelfreien Region (bei 40% der Knochenlänge), sodass ausschließlich die Dichte des Kortex ermittelt werden konnte (Abb. 3.20a,b).

Die Knochendichte der Rac1-cKO-Mäuse war signifikant vermindert. Sowohl die gesamte Dichte (Trabekel und Kortex) als auch die kortikale Dichte waren reduziert (Abb. 3.20a,b). Die gesamte Knochendichte der cKO-Mäuse war um 17,1% im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert (CT:  $293,4 \pm 15,4 \text{ mg/cm}^3$  vs. cKO  $243,3 \pm 26,4 \text{ mg/cm}^3$ ;  $p < 0,05$ ). Die kortikale Knochendichte der Rac1-cKO-Mäuse war um 9,4% im Vergleich zu den CT-Mäusen ebenfalls reduziert (CT:  $739,4 \pm 26,8 \text{ mg/cm}^3$  vs. cKO  $670,2 \pm 37,6 \text{ mg/cm}^3$ ;  $p < 0,05$ ).

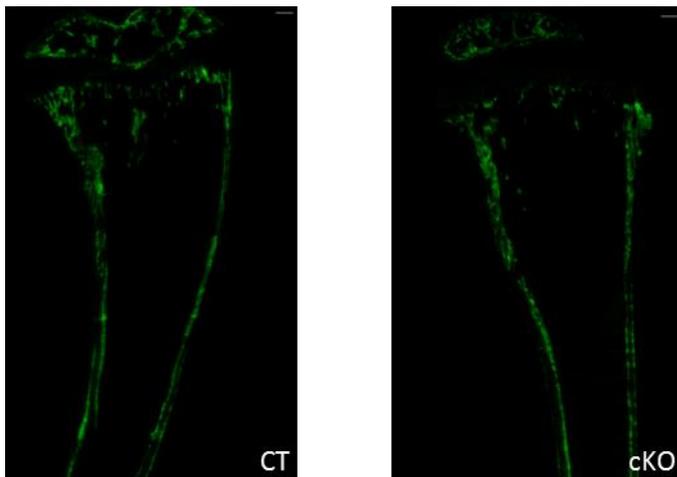


**Abb. 3.20: Periphere Computertomographie.** a) Die Gesamtknochendichte (Trabekel und Kortex) der cKO-Mäuse war deutlich vermindert. b) Gleiches zeigte sich, wenn man nur die kortikale Knochendichte betrachtete. Auch hier war die Dichte der Knochen der cKO-Mäuse reduziert. CT, cKO: n=4

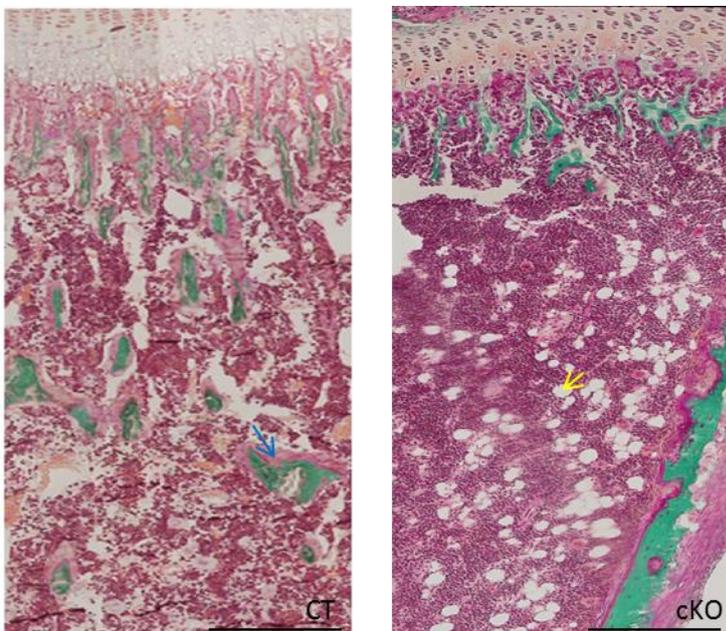
Diese Ergebnisse gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass die Ausschaltung der Rho GTPase Rac1 in den Osteoblasten massive Auswirkungen auf die Knochenentwicklung hatte. Das verminderte Wachstum, verbunden mit einer geringeren Knochendichte konnte unterschiedliche Gründe haben. Um diese zu ermitteln, betroffen konnten die Osteoblasten oder auch die Osteoklasten sein, mussten Knochenschnitte angefertigt, gefärbt und histomorphometrisch ausgewertet werden.

### 3.3.3 Histomorphometrie

Es wurden Tibia-Schnitte verwendet, die zuvor für die dynamische Histomorphometrie herangezogen wurden und mit der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Mineralisierter Knochen erscheint grün, die Zellen des Knochenmarks werden rötlich gefärbt. Die Stellen, an denen aktiv neues Knochengewebe gebildet wird, haben eine dunkelrosa Färbung. Dabei handelte es sich um Osteoid (neu gebildetes Knochengewebe, das noch nicht mineralisiert wurde und von den darüber liegenden aktiven Osteoblasten gebildet wurde).



**Abb. 3.21: Knochenschnitte der Tibiae, Kalzein-Färbung.** Das injizierte Kalzein hatte sich während des Knochenwachstums eingelagert und markierte so die Stellen, an denen aktiv Knochen aufgebaut wurde. Wie links im Bild zu sehen, war die Ausbildung der Trabekel in den Tibiae der cKO-Tiere deutlich vermindert. Balken: 100µm



**Abb. 3.22: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung.** Gezeigt sind Ausschnitte der Trabekelregion kurz unterhalb der Wachstumsfuge. Die CT-Mäuse wiesen deutliche Trabekelbildung auf, die von aktiven Osteoblasten ausgeht (blauer Pfeil), während bei den cKO-Tieren nur vereinzelt Trabekel auftraten. Die Adipozytendifferenzierung war hingegen im Knochenmark der cKO-Mäuse hochreguliert (gelber Pfeil). Balken: 100µm

Wie in den histologischen Schnitten zu erkennen war, bildeten die cKO-Mäuse weniger Trabekel aus (Abb. 3.22). Die Knochenfläche dieser cKO-Mäuse war verglichen mit der der Kontrolltiere um fast 40% vermindert. Der Grund für das verminderte Knochenwachstum blieb zunächst unklar, da die

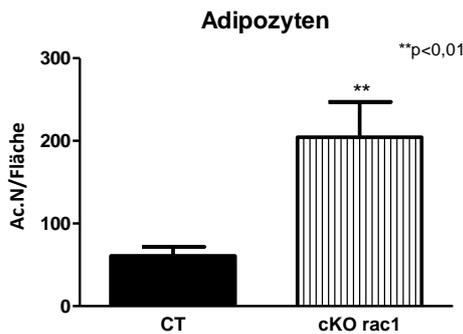
Anzahl der Osteoblasten in beiden Versuchsgruppen gleich war. Außerdem gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Osteoklastenanzahl im Knochen der Mäuse. Somit musste die Funktion der knochenauf- und abbauenden Zellen näher untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Menge an abgelagertem Osteoid pro Knochenoberfläche durch die Osteoblasten, als auch die entstandene Erosionsfläche pro Knochenoberfläche durch die Osteoklasten bei den cKO-Mäusen unverändert war. Interessant war, dass die mineralisierte Fläche (MS/BS), an der in den letzten drei Tagen vor der Tötung Knochenzuwachs stattgefunden hatte, der cKO-Mäuse größer war als bei den CT-Tieren (Kalzeinsignal, Abstand der beiden Kalzeinjektionen). Dieses Ergebnis passte auch zu den Beobachtungen, dass die Zeitspanne von Matrixablagerung bis zur Mineralisierung (MLT) sowie auch die Osteoidreifungszeit (OMT) bei den cKO-Tieren deutlich kürzer waren als bei den CT-Tieren. Die Dauer von Matrixablagerung bis zur Mineralisierung war hier um das Dreifache reduziert. Die Knochenbildungsrate (BFR/BS) der cKO-Mäuse war signifikant erhöht. Trotz gesteigerter Knochenbildungsrate war die Anzahl der Osteozyten in den cKO-Mäusen unverändert. Die genauen Daten sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Um die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse weiter zu verfolgen, waren *in vitro*-Versuche nötig.

Tabelle 3.4: Histomorphometrie

Parameter	Einheit	CT	cKO rac1	Signifikanz p
Knochenoberfläche (BS)	mm	20,43±5,27	12,35±0,87	0,0044*
Osteoid/Knochenoberfläche (Ob.S/BS)		0,62±0,04	0,59±0,16	0,5688
Anzahl d. Osteoblasten/ Knochenoberfläche (Ob.N/BS)		47,76±5,88	49,93±14,14	0,7013
Erosionsfläche/ Knochenoberfläche (Oc.S/BS)		0,040±0,01	0,040±0,01	0,9225
Anzahl der Osteoklasten/ Knochenoberfläche (Oc.N/BS)		1,12±0,27	1,22±0,19	0,4567
Mineralisierungsfläche/ Knochenoberfläche (MS/BS)		0,12±0,06	0,18±0,01	0,0386*
Knochenbildungsrate/ Knochenoberfläche (BFR/BS)	mm/y	0,08±0,04	0,13±0,05	0,0644
Knochenbildungsrate/Osteoid (BFR/OS)	mm/y	0,12±0,07	0,23±0,08	0,0227*
Zeit von Matrixablagerung bis Mineralisierung (MLT)	d	39,87±22,87	13,35±3,79	0,0193*
Osteoidreifungszeit (OMT)	γ	5,81±0,69	4,12±0,89	0,0025**
Anzahl d. Osteozyten/ Knochenoberfläche		7,27±0,82	6,85±1,14	0,4430

CT: n=5, cKO: n=4; \*p&lt;0,05; \*\*p&lt;0,01

Bei weiterer Betrachtung der Knochenschnitte fiel auf, dass im Knochenmark der cKO-Mäuse deutlich mehr Adipozyten vorhanden waren als das bei den Mäusen der Kontrollgruppe der Fall war (CT:  $60,8 \pm 30,2$  Ac.N vs. cKO:  $204,3 \pm 110,5$  Ac.N;  $p < 0,01$ ). Da Adipozyten sich genau wie Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln, könnte eine vermehrte Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten oder eine Transdifferenzierung der Rac1-defizienten Präosteoblasten zu eben diesen Zellen ursächlich sein.



**Abb. 3.23: Anzahl der Adipozyten/Fläche.**

Das Knochenmark der cKO-Mäuse wies 3,4x mehr Adipozyten auf als das der CT-Mäuse.

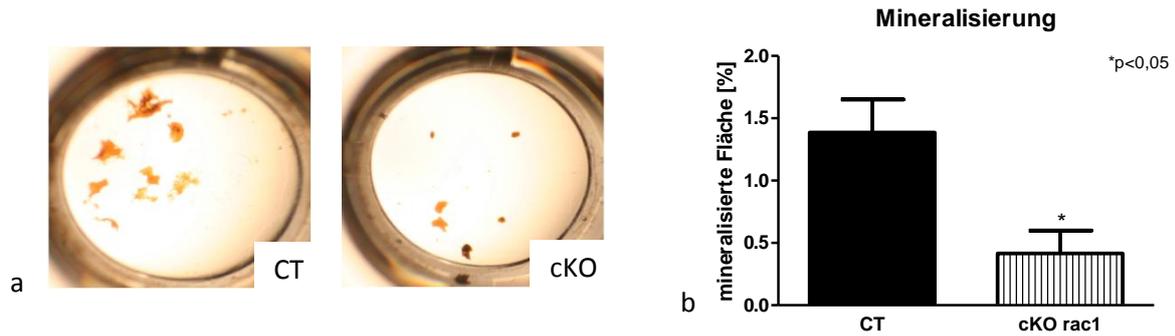
CT: n=5, cKO: n=4

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Rac1-cKO-Osteoblasten anfänglich nach Plan differenzierten. Es kommt dann zu Störungen in der Entwicklung, sodass die Osteoblasten eine Kompensation des Defizits durch gesteigerte Matrixablagerung vornehmen wollen oder rückwirkend mesenchymale Stammzellen den adipozytären Differenzierungsweg einschlagen bzw. Rac1-cKO-Präosteoblasten eine Transdifferenzierung zu Adipozyten einleiten.

### 3.3.4 In vitro-Versuche

#### 3.3.4.1 Mineralisierungsfähigkeit isolierter Osteoblasten

Es war zu erkennen, dass trotz hoher Knochenbildungsrate die Knochendichte der cKO-Mäuse deutlich unter dem Normalwert lag. Vermutlich war die Mineralisierungsfähigkeit (z.B. die Einlagerung von anorganischen Ionen oder die Ablagerung der Kollagenfibrillen) der cKO-Osteoblasten *in vivo* fehlerhaft. Um diese Unterschiede zu klären, wurden primäre Präosteoblasten aus der Calvaria von neugeborenen CT- und cKO-Mäusen isoliert und kultiviert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 90% erreichten, wurden die Osteoblasten auf Differenzierungsmedium umgestellt. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach etwa einer Woche bildeten sich in den Kulturschalen gut sichtbare hydroxyapatithaltige Knoten. Nach drei wöchiger Kultivierung wurde das Experiment beendet und die Knoten mit einer von Kossa-Färbung besser sichtbar gemacht. Die Fläche der Knoten in jeder Kulturschale wurde vermessen (ImageJ) und zur Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.24a,b).

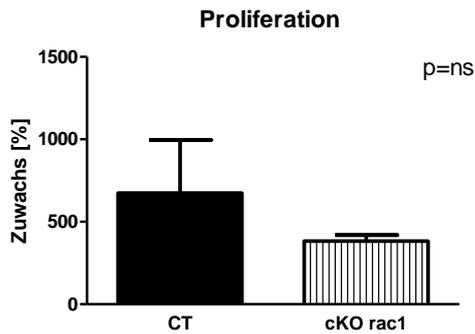


**Abb. 3.24: Hydroxyapatithaltige Knoten nach von Kossa-Färbung und deren Quantifizierung.** a) Die CT-Osteoblasten zeigten eine deutliche Knotenbildung als Zeichen der Differenzierungsfähigkeit. Die Ausschaltung von Rac1 in diesen Zellen zeigte, dass eine stark verminderte Mineralisierung stattfand. b) Quantifizierung der mineralisierten Knochenfläche durch CT- und cKO-Osteoblasten. CT, cKO: n=6

Abbildung 3.24a zeigt eindeutig, dass eine Störung in der Mineralisierungsfähigkeit der cKO-Osteoblasten vorlag. Die Mineralisierung durch die cKO-Osteoblasten war um fast 80% reduziert (Abb. 3.24b). Die Auswertung der Mineralisierungsfähigkeit erfolgte regelmäßig nach drei Wochen Kultivierung. Die Knotenbildung wurde über den gesamten Zeitraum dokumentiert. Von Beginn an konnten deutliche Unterschiede zwischen der CT- und cKO-Mineralisierung beobachtet werden. Die Defizite, die in den cKO-Kulturen vorlagen, konnten über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht aufgeholt werden (Anhang 5).

#### 3.3.4.2 Proliferations-Assay

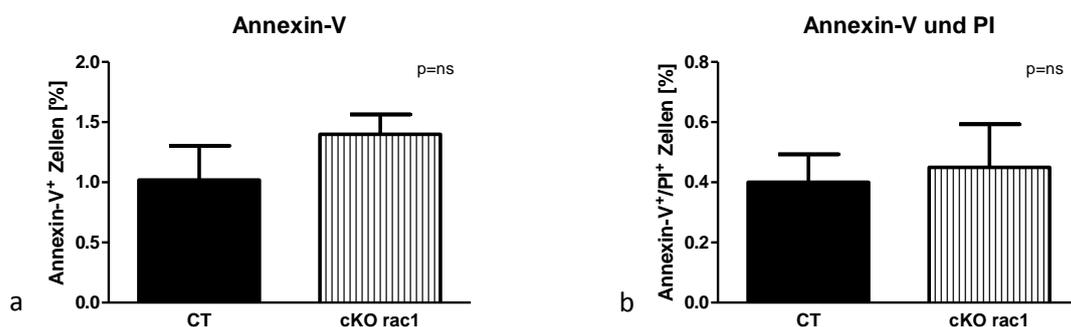
Wie die *in vivo*-Daten zeigten, war die Anzahl der Osteoblasten bei den CT- und cKO-Mäusen im Knochen gleich. Daraus konnten noch keine Rückschlüsse auf die Proliferation dieser Zellen gezogen werden. Um das Proliferationsvermögen zu beurteilen, wurden Präosteoblasten aus CT- und cKO-Tieren isoliert. Eine gleiche Anzahl an Zellen beider Versuchsgruppen wurde in Kulturschalen ausgesät und fünf Tage lang kultiviert. Die Auszählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, gab es in beiden Gruppen einen deutlichen Zuwachs an Zellen während der Beobachtungszeit, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen CT- und cKO-Kulturen festgestellt werden.



**Abb. 3.25: Proliferations-Assay.** Sowohl in den CT- als auch cKO-Kulturen war eine deutliche Zunahme an Zellen zu beobachten. Es waren aber keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. CT: n=9, cKO: n=11

### 3.3.4.3 Apoptose-Assay

Zur weiteren Charakterisierung der cKO-Osteoblasten wurde durchflusszytometrisch die Apoptoserate bestimmt. Für dieses Experiment wurden frische Präosteoblasten aus den Calvariae der CT- und cKO-Mäuse benötigt. Die Zellen regenerierten sich zunächst für einige Tage in Kulturschalen, bevor sie in die Versuche eingesetzt wurden. Mit Hilfe von Annexin-V wurden apoptotische Zellen durch Bindung an Phosphatidylserin der Zellmembran angefärbt. Propidiumiodid (PI) konnte in die DNA der Zellen interkalieren. Das war nur möglich, wenn sich die Zellen in einem nekrotischen oder spätapoptotischen Zustand befanden. Nekrotische und spätapoptotische Osteoblasten konnten aber mit diesen genannten Markern nicht unterschieden werden. In den Abbildungen 3.26a und 3.26b sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Den Diagrammen ist zu entnehmen, dass die cKO-Osteoblasten kein verändertes Apoptoseverhalten aufweisen. Sowohl der Anteil an frühapoptotischen (Annexin-V<sup>+</sup>) und spätapoptotischer (Annexin-V<sup>+</sup> und PI<sup>+</sup>) war in beiden Versuchsgruppen gleich.



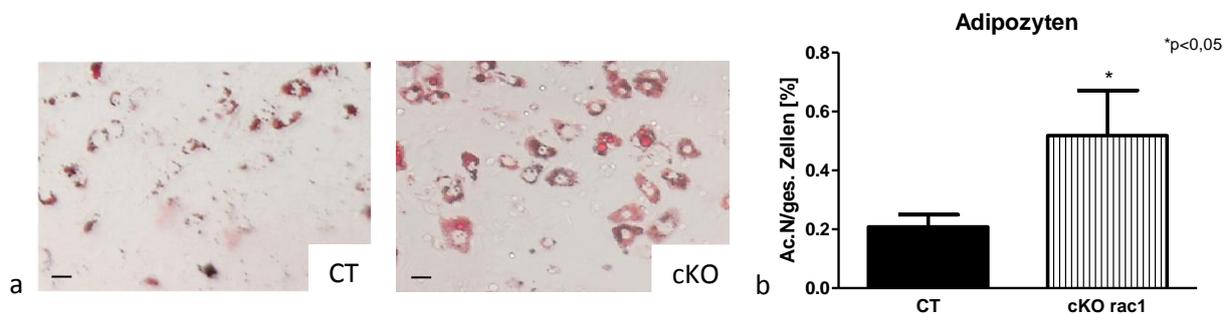
**Abb. 3.26: Apoptosenachweis bei isolierten Osteoblasten mittels Durchflusszytometrie.** a) Die Färbung der frühapoptotischen Zellen mit Annexin-V zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen CT- und cKO-Osteoblasten gab. b) Auch bei der Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidiumiodid war zu erkennen, dass das Apoptoseverhalten in beiden Versuchsgruppen gleich war. CT, cKO: n=4

Es wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob das tendenziell verminderte Proliferationsverhalten der cKO-Osteoblasten einen Einfluss auf die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen hat. Hier konnten keine Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (CT:  $0,09 \pm 0,03\%$  vs. cKO:  $0,08 \pm 0,02\%$ ;  $p=ns$ ; CT:  $n=12$ , cKO:  $n=10$ ).

Zusammenfassend ergaben die Daten, dass die Anzahl der Osteoblasten oder Osteoklasten nicht der Grund für das verminderte Knochenwachstum war. Eher war das Defizit auf eine fehlerhafte Differenzierung der Osteoblasten und der damit einhergehenden veränderten Mineralisierung zurückzuführen.

#### 3.3.4.4 Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen

Wie in den Knochenschnitten zu sehen war, war die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark der cKO-Mäuse stark erhöht. Um diese Beobachtung *in vitro* bestätigen zu können, wurden erneut Prä-Osteoblasten isoliert, zu reifen Osteoblasten differenziert und mit Oil Red O die entstandenen Adipozyten in der Kultur angefärbt. Wiederum waren in den cKO-Kulturen auffällig mehr Adipozyten zu sehen (Abb. 3.27a). Die Quantifizierung ergab, dass 2,6-mal mehr Adipozyten in den cKO-Kulturen gebildet wurden als in den CT-Kulturen (Abb. 3.27b).



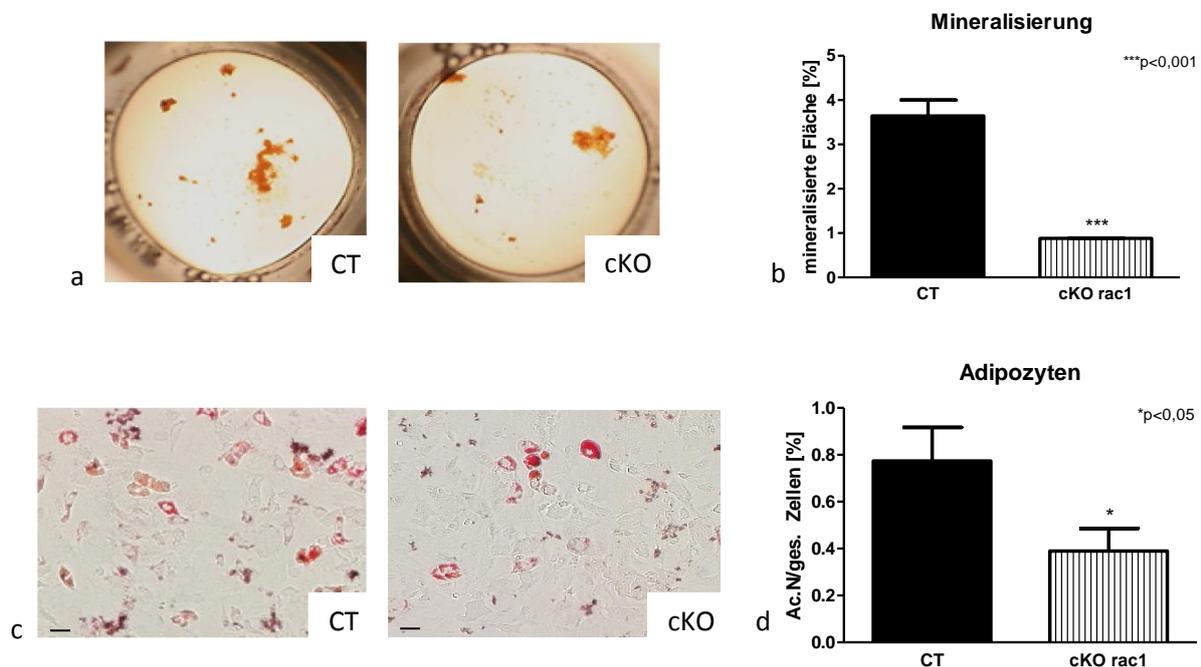
**Abb. 3.27: Adipozytenfärbung (Oil Red O) auf differenzierten Osteoblasten und Quantifizierung.** a) Adipozyten-Färbung. In den Bildausschnitten ist deutlich zu sehen, dass sich in den cKO-Kulturen mehr Adipozyten bildeten als in den CT-Kulturen. Balken: 50μm b) Die quantitative Auswertung zeigte einen 2,6-fachen Anstieg an Adipozyten in den cKO-Kulturen. CT, cKO:  $n=6$

In einem weiteren Teilversuch wurden isolierte Präosteoblasten beider Gruppen für drei Wochen mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Adipozytenanzahl zwischen CT- und cKO-Kulturen festgestellt werden (CT:  $0,726 \pm 1,16$  vs. cKO:  $0,824 \pm 1,16$ ;  $p=ns$ ; CT, cKO:  $n=6$ ). Die erhöhte Adipozytenanzahl kam demzufolge nur bei dem Versuch, reife Osteoblasten zu bilden, zustande. Das deutete darauf hin, dass eine Ausschaltung von Rac1 in Osteoblasten zu einer fehlerhaften Differenzierung führte.

Die bisherigen Ergebnisse gaben noch keine konkreten Hinweise auf eine Beteiligung des Knochenmarks auf die Adipozytenentwicklung. Sowohl *in vivo* als auch in den reinen cKO-Osteoblasten-Kulturen war die Anzahl der Adipozyten an der Gesamtzellzahl signifikant erhöht. Aus diesem Grund sollte die Auswirkung der Knochenmarkszellen auf die Osteoblasten *in vitro* näher untersucht werden.

### 3.3.4.5 Einfluss des Knochenmarks auf die Osteoblasten

Um das Verhalten der Osteoblasten auf Wildtyp-Knochenmark zu untersuchen, wurden sie zusammen mit Knochenmarkszellen kultiviert. Nach drei wöchiger Kultivierung mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium wurden von Kossa- und Oil Red O-Färbungen durchgeführt. Die Abbildungen 3.28a und 3.28b zeigen die Knotenbildung und die Quantifizierung der Mineralisierung. Die cKO-Kulturen wiesen eine um 75% verminderte Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten auf. Der Anteil an Adipozyten war sowohl in den CT- als auch in den cKO-Kulturen gering. Die Adipozyten waren in den Kulturschalen stellenweise in kleinen Gruppen aufgetreten. Entgegen den Erwartungen sank die Anzahl der Adipozyten in Anwesenheit von WT-Knochenmark in den cKO-Kulturen. In den CT-Kulturen zeigten sich doppelt so viele Adipozyten wie in den cKO-Kulturen (Abb. 3.28c,d).



**Abb. 3.28: Co-Kulturen, von Kossa- Färbung zur Detektion der Hydroxyapatit-Knoten und Oil Red O-Färbung zum Nachweis der Adipozyten.** a) von Kossa-Färbung, die cKO-Kulturen wiesen eine deutliche Verminderung der Mineralisierungsfähigkeit auf. b) Quantifizierung der gebildeten Knoten. CT: n=8, cKO: n=4. c) Oil Red O-Färbung, in Anwesenheit von WT-Knochenmarkszellen wurde die Adipozytendifferenzierung in den cKO-Kulturen reduziert, verglichen mit den CT-Kulturen. d) Quantifizierung der Adipozytenanzahl pro Gesamtzellzahl. CT: n=6, cKO: n=7

### 3.3.5 Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker

Bisher konnten wir mit Sicherheit sagen, dass in Abwesenheit von Rac1 die Mineralisierung durch die Osteoblasten beeinträchtigt war. Aus diesem Grund sollte bei allen weiteren Untersuchungen das Hauptaugenmerk auf die Mineralisierung und auf die damit verbundenen Veränderungen gelegt werden. Um abgelagerte Matrix mineralisieren zu können, mussten die Zellen ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht haben. Dieses wurde über verschiedene Faktoren auf mRNA-Ebene ermittelt. Marker, die frühe Stadien der Osteoblastendifferenzierung aufzeigten, waren Runx2 und Alkalische Phosphatase. Als später Marker diente Osteokalzin. Zusätzlich wurden Gene, wie *Wisp1* (stellvertretend für den  $\beta$ -Catenin-Signalweg) und *Vegf* auf ihre Expression untersucht. Beide wirken stimulierend auf die Osteoblastendifferenzierung.

Eine erhöhte mRNA-Expression an *Ppar $\gamma$*  und *C/ebp $\alpha$*  bzw.  $\beta$  sprach für eine Adipozyten-differenzierung. Reife Fettzellen konnten anhand von Ap2 identifiziert werden.

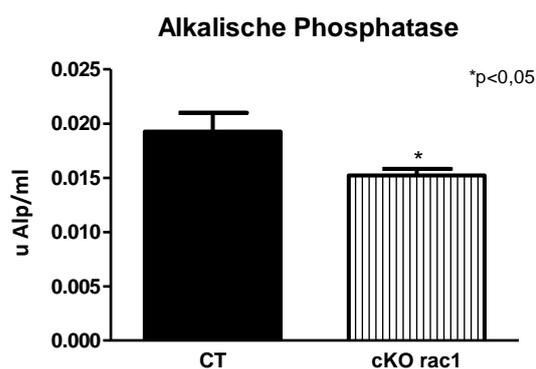
Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse zeigte, dass es bei den frühen Osteoblasten-Differenzierungsmarkern keine Unterschiede zwischen beiden genannten Versuchsgruppen gab. Dagegen war die mRNA-Expression von Osteokalzin trotz stärkerer Schwankungen signifikant vermindert (Tab. 3.5). Da das mRNA-Expressionsmuster nur erste Hinweise auf die Proteinsynthese lieferte, wurde zusätzlich die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Aktivität des Enzyms war im Medium der cKO-Osteoblasten-Kulturen um 21% vermindert, verglichen mit der Aktivität in den CT-Kulturen.

Der Wachstumsfaktor *Vegf*, der u.a. die Vaskularisierung der Knochen förderte und den Knochenaufbau stimulierte, war auf mRNA-Ebene deutlich hochreguliert.

Tabelle 3.5: Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	0,118±0,016	0,144±0,136	0,784
<i>Alpl</i>	0,029±0,023	0,038±0,015	0,449
<i>Oc</i>	12,62±9,08	3,408±3,17	0,044*
<i>Wisp1</i>	0,0015±0,003	0,0041±0,001	0,351
<i>Vegf</i>	0,012±0,006	0,023±0,007	0,0128*
<i>Sost</i>	0,008±0,006	0,004±0,004	0,266
<i>Opg</i>	12,96±11,16	6,186±4,098	0,193

CT, cKO: n=6; \*p<0,05



**Abb. 3.29: Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Medium.**

Das Enzym Alkalische Phosphatase diente der Bereitstellung des anorganischen Phosphats für die Mineralisierung der Osteoblasten. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung in der Enzymaktivität in den cKO-Osteoblasten. CT: n=18, cKO: n=19

In der nachfolgenden Tabelle 3.6 sind die untersuchten Adipozytenmarker dokumentiert. Frühe Differenzierungsmarker wie *Ppar $\gamma$*  und *C/ebp $\beta$*  waren in ihrer mRNA-Expression deutlich hochreguliert. Bei *Ap2* handelt es sich um ein Markergen, das in reifen Adipozyten exprimiert wird. Unsere Ergebnisse zeigten eine große Schwankungsbreite. Einen Grund dafür stellte möglicherweise die Dauer des Versuchs dar. Erste Adipozyten konnten nach 1,5-2 wöchiger Kultivierung beobachtet werden. Nach 3 Wochen wurden die Zellen bereits geerntet, sodass eine vollständige Ausdifferenzierung eventuell nur teilweise erreicht werden konnte.

Tabelle 3.6: Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu *Hprt* korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Ppar<math>\gamma</math></i>	0,858±0,154	1,203±0,361	0,037*
<i>C/ebp<math>\alpha</math></i>	0,124±0,044	0,238±0,144	0,172
<i>C/ebp<math>\beta</math></i>	1,153±0,475	2,045±0,62	0,019*
<i>Ap2</i>	12,96±11,16	6,186±4,098	0,193

CT, cKO: n=6; \*p<0,05

Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro* und *in vivo* gemachten Beobachtungen der erhöhten Fettzellbildung. Gesicherte Aussagen können jedoch erst nach Untersuchungen auf Proteinebene gemacht werden.

Die Expression der untersuchten Gene wurde zur Expression des Haushaltsgens *Hprt* korrigiert. Das Expressionsmuster der Osteoblasten- und Adipozytenmarkergene wurde ebenfalls in Co-Kulturen untersucht. Diese Ergebnisse spiegelten die *in vitro* und *in vivo*-Daten wider (Anhang 6 (Tab. 4C,D)).

### 3.3.6 Behandlung mit Parathormon

Die Gabe von Parathormon (PTH) erhöht die Osteoblastenaktivität, die Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen und das Zellüberleben (Dobnig und Turner, 1995). Die Wirkung des PTH wird u.a. über den Wnt-Signalweg vermittelt. Arbeiten an *Drosophila* zeigten, dass Rho GTPasen am nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt sind (Malliri und Collard, 2003). Außerdem wurde beobachtet, dass Rac1 an der Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin-Komplexes mitwirkt und so auch den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflusst (Fukata et al., 1999).

Fortführend war zu untersuchen, ob die Rac1-cKO-Osteoblasten ihre Defizite durch Addition von PTH überwinden können oder ob die anabole Wirkung von PTH Rac1 abhängig ist.

#### 3.3.6.1 Behandlung mit Parathormon *in vitro*

Um die Veränderungen, die Parathormon auf Osteoblasten ausübt, näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Frisch isolierten Präosteoblasten wurde PTH bzw. Vehikel (10mM Essigsäure mit 2% inaktiviertem Mausserum) in das Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden nach 24h geerntet. Aus den Zelllysaten wurde RNA isoliert, um die Expression verschiedener osteoblastenspezifischer Gene zu analysieren. In Tabelle 3.7 sind die untersuchten Gene dargestellt. Wie erwartet, stieg die mRNA-Expression an Alkalischer Phosphatase in der Kontrollgruppe bei Gabe von PTH signifikant an. Auch in der cKO-Gruppe war ein 50%iger Anstieg der mRNA-Expression zu verzeichnen. Dieser war wegen der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant. Die Wisp1-mRNA-Expression (*WNT1-inducible-signaling pathway protein 1*) zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme in beiden Versuchsgruppen. Bei den Kontrollen verdoppelte sich die Zunahme, bei den cKO-Osteoblasten war sie verdreifacht. Um das Gleichgewicht von Knochenaufbau und -abbau aufrecht zu erhalten, produzierten Osteoblasten Faktoren wie Opg, M-csf, Rankl und Sost, die die Osteklastendifferenzierung stimulierten. Während Opg bei PTH-Gabe in der CT-Gruppe herunterreguliert wurde, um so die Rank/Rankl-Interaktion zu ermöglichen, blieb Opg in der cKO-Gruppe unverändert. Sost, ein Inhibitor des Wnt-Signalwegs, blieb vor und nach PTH-Behandlung in beiden Gruppe konstant.

Tabelle 3.7: Osteoblastenmarker nach PTH-Behandlung (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT Vehikel	CT PTH	cKO Vehikel	cKO PTH
<b><i>Alpl</i></b>	0,20±0,11	0,80±0,29*	0,30±0,15	0,45±0,21
<b><i>Wisp1</i></b>	0,09±0,03	0,19±0,08*	0,09±0,02	0,28±0,13*
<b><i>Opg</i></b>	0,38±0,14	0,16±0,06*	0,33±0,04	0,31±0,16
<b><i>Sost</i></b>	0,003±0,001	0,007±0,003	0,007±0,004	0,023±0,022

CT, cKO: n=5; \*p&lt;0,05

\*signifikant im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen des gleichen Genotyps

Die verbesserte Differenzierung und Mineralisierung der cKO-Osteoblasten sollte auch *in vivo* untersucht werden. Insbesondere die *Opg*-mRNA-Expression regte zu der Überlegung an, ob die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten in Abwesenheit von *Rac1* negativ beeinflusst wird. Daher sollte in den folgenden Experimenten auch Augenmerk auf die knochenabbauenden Zellen gelegt werden.

### 3.3.6.2 Behandlung mit Parathormon *in vivo*

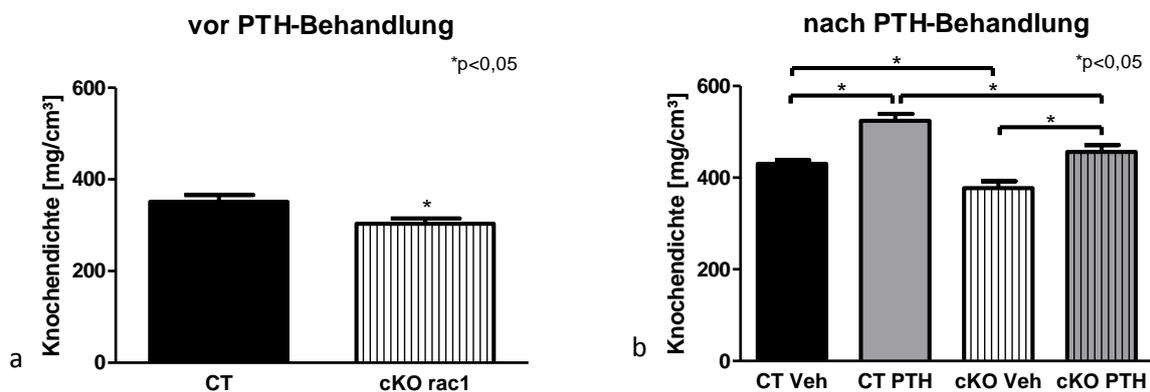
In folgenden Versuchen wurde CT- und cKO-Mäusen täglich über einen Zeitraum von vier Wochen Parathormon (80µg/d) subkutan appliziert. Zur Kontrolle wurde zwei weiteren Versuchstiergruppen, die jeweils aus CT- bzw. cKO-Mäusen bestanden, nur das Lösungsmittel injiziert. Die Behandlung der Mäuse begann im Alter von drei Wochen. Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurden die Knochendichten der Femura der Mäuse gemessen. Nach der PTH-Gabe und der Tötung der Mäuse wurden die Tibiae zusätzlich histomorphometrisch ausgewertet.

#### 3.3.6.2.1 Knochendichten der Parathormon-behandelten Mäuse

Die Messung der Knochendichte *in vivo* erfolgte vor Beginn der PTH- bzw. Vehikel-Behandlung und am Ende des Untersuchungszeitraums. Zur besseren Übersicht sind nur die Ergebnisse der Gesamtknochendichte dargestellt.

In Abbildung 3.30a ist die Gesamtknochendichte vor Beginn der PTH-Behandlung dokumentiert. Am Tag der Messung waren die Mäuse drei Wochen alt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Femurknochendichte der cKO-Mäuse um etwa 13,6% gegenüber den CT-Mäusen vermindert war. Auch nach vier wöchiger Vehikelbehandlung blieb dieses Verhältnis bestehen (Abb. 3.30b). Die Knochendichte der cKO-Mäuse blieb um 13,98% vermindert. Die Behandlung mit Parathormon

hingegen zeigte sowohl bei den CT- als auch bei den cKO-Mäusen deutliche Effekte. Interessanterweise war die prozentuale Knochendichtezunahme zwischen CT (Vehikel) vs. CT (PTH) und cKO (Vehikel) vs. cKO (PTH) gleich. In beiden Fällen lag die Zunahme der Knochendichte bei etwa 17%. Vergleich man die PTH-behandelten CT- und cKO-Tiere, blieb die Differenz von fast 15% bestehen. Dieses Defizit konnte durch die PTH-Gabe nicht aufgeholt werden. Diese Ergebnisse ließen erkennen, dass die Rac1-defizienten Osteoblasten auf PTH reagierten. Die Vermutung, dass der PTH-induzierte Signalweg durch Rac1 vermittelt wird, schien durch diese erste Auswertung widerlegt zu sein.

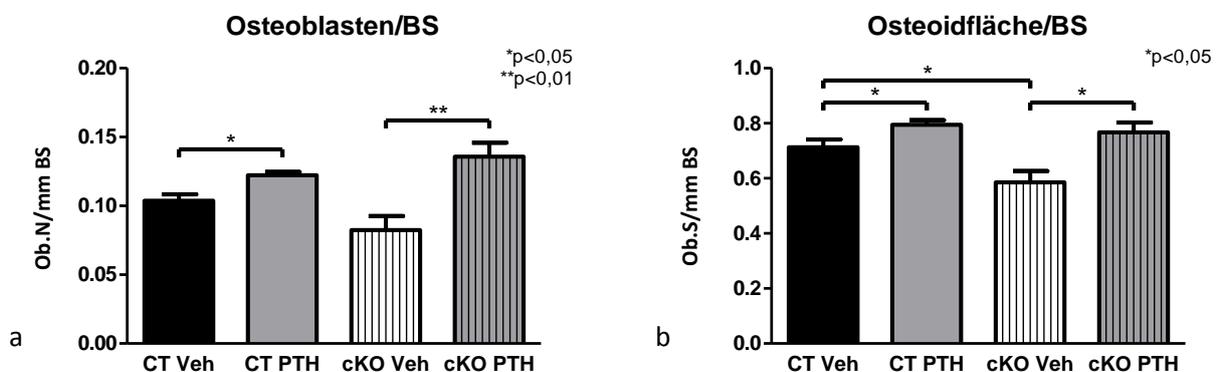


**Abb. 3.30: Periphere Computertomographie.** a) Gesamtknochendichte der Femura der CT- und cKO-Mäuse im Alter von drei Wochen. Die Knochendichte der cKO-Tiere war deutlich vermindert. CT: n=6, cKO: n=12. b) Gesamtknochendichte der Femura der CT- und cKO-Mäuse, die mit Parathormon bzw. Vehikel über vier Wochen behandelt wurden. Die PTH-Applikation führte zu einer signifikant erhöhten Knochendichte bei den CT- und cKO-Mäusen. Sowohl bei den CT- als auch bei den cKO-Tieren betrug der Zuwachs etwa 17%. CT Veh, cKO Veh, CT PTH, cKO PTH: n=12

In Tabelle 9A (Anhang 8) sind die Knochendichten der einzelnen Versuchstiergruppen im Vergleich dargestellt. Anhand des Knochendichtezuwachses war zu erkennen, dass sich die Knochen der CT- und cKO-Mäuse bei einer PTH-Behandlung gleich verhielten. Die Knochendichtezunahme der mit Vehikel behandelten CT-Mäuse betrug nach vier Wochen 17,9%, während es bei einer PTH-Behandlung 33,01% war. Gleiche Zuwachsraten fanden sich auch bei den cKO-Mäusen. Mäuse die Vehikel über diesen Zeitraum bekamen, wiesen einen Zuwachs von 19,7% auf und mit PTH 33,5%. Die cKO-Osteoblasten schienen unvermindert auf den Zusatz von Parathormon zu reagieren. Um weitere Aussagen über die Funktion der knochen auf- und abbauenden Zellen treffen zu können, mussten histologische Schnitte angefertigt und ausgewertet werden.

### 3.3.6.2.2 Histomorphometrische Auswertung von Knochenschnitten Parathormon-behandelter Mäuse

Die Auszählung der aktiv osteoidbildenden Zellen ergab, dass eine kontinuierliche PTH-Applikation deren Proliferation stimuliert. Bei den Kontrolltieren konnte eine Zunahme der Osteoblastenzahl von 17,7% beobachtet werden (CT Veh:  $0,104 \pm 0,012$  vs. CT PTH:  $0,122 \pm 0,006$  Ob.N/mm BS;  $p < 0,05$ ). Bei den cKO-Mäusen konnte ein noch stärkerer Effekt festgestellt werden. Die Osteoblastenzahl war bei Mäusen, die PTH erhielten, um etwa 35,5% erhöht (cKO Veh:  $0,089 \pm 0,025$  vs. cKO PTH:  $0,136 \pm 0,028$  Ob.N/mm BS;  $p < 0,01$ ). cKO-Mäuse, die mit PTH behandelt wurden, erreichten somit eine Osteoblastenzahl, wie es in gesunden Kontrolltieren der Fall war (Abb. 3.31a). Dieses Ergebnis wurde auch durch die Ausmessung der Osteoidfläche im Knochen bestätigt (Abb. 3.31b).



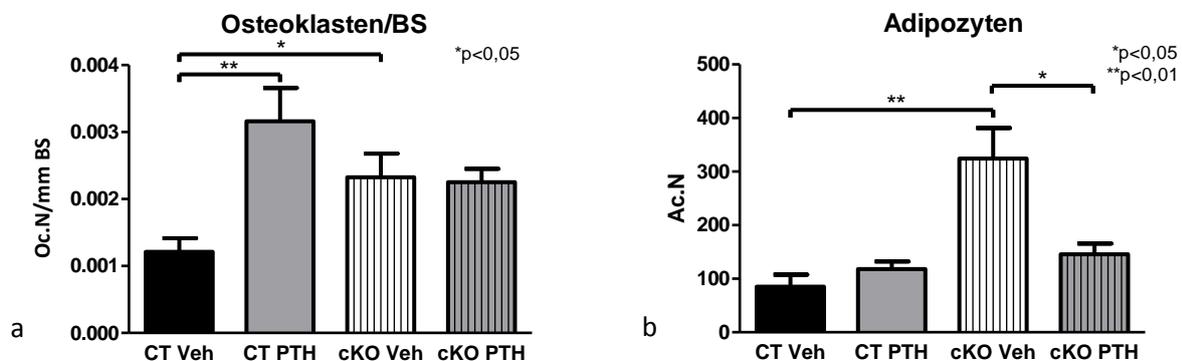
**Abb. 3.31: Histomorphometrische Auswertung der Knochenschnitte von Mäusen vor und nach der PTH-Behandlung.** a) Die Anzahl der Osteoblasten wurde durch die Gabe von PTH deutlich erhöht. Bei den cKO-Mäusen war die Erhöhung so enorm, dass das Kontrollniveau dadurch erreicht wurde. b) Auch die Osteoblastenaktivität, die durch die Ablage von Osteoid dargestellt ist, war in den PTH-behandelten Tieren signifikant erhöht. CT Veh: n=4, CT PTH: n=3, cKO Veh: n=3, cKO PTH: n=5

Während die bisherigen Ergebnisse für eine stärkere Osteoblastendifferenzierung und Aktivität sprachen, wurde jedoch die Knochenbildungsrate herunterreguliert (CT Veh:  $0,425 \pm 0,12$  vs. CT PTH:  $0,178 \pm 0,055$  mm/y;  $p < 0,05$ ; cKO Veh:  $0,313 \pm 0,045$  vs. cKO PTH:  $0,229 \pm 0,042$  mm/y;  $p < 0,05$ ). Ebenso war die Mineralisierungsfläche im Knochen der PTH-behandelten Tiere, verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren, verringert (CT Veh:  $0,543 \pm 0,09$  vs. CT PTH:  $0,299 \pm 0,033$  % MS/BS;  $p < 0,05$ ; cKO Veh:  $0,401 \pm 0,092$  vs. cKO PTH:  $0,341 \pm 0,079$  % MS/BS;  $p < 0,05$ ). Dieser Effekt war bei den CT-Mäusen stärker ausgeprägt.

Eine intermittierende Applikation von PTH förderte die Knochenbildung und stimulierte indirekt die Osteoklastendifferenzierung und damit deren Aktivität. Genau diese Wirkung war bei den CT-Tieren deutlich zu sehen (Abb. 3.32a). Die Anzahl der Osteoklasten war um das 2,5-fache erhöht (CT Veh:  $0,0012 \pm 0,0005$  vs. CT PTH:  $0,0032 \pm 0,0012$  Oc.N/mm BS;  $p < 0,05$ ). Bei den cKO-Mäusen blieb dieser

Effekt jedoch aus (cKO Veh:  $0,0023 \pm 0,001$  vs. cKO PTH:  $0,0023 \pm 0,0005$  Oc.N/mm BS;  $p=ns$ ). erinnert man sich an die Osteoklastenzahl bei drei Wochen alten Mäusen, fiel auf, dass die ausgewachsenen Mäuse insgesamt weniger Osteoklasten pro Knochenfläche besaßen. In Abbildung 3.32a kann man erkennen, dass adulte cKO-Tiere verglichen mit adulten CT-Tieren, trotzdem mehr Osteoklasten aufwiesen.

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die cKO-Osteoblasten über einen Rac1-unabhängigen Weg, der durch PTH vermittelt wurde, stimuliert werden konnten. Jedoch schienen sie nicht in der Lage zu sein ausreichend Signalmoleküle, wie z.B. Opg auszusenden, um die Osteoklastenzahl zu regulieren. Möglicherweise wurde Rac1 für die Kommunikation zwischen knochenbildenden und knochenabbauenden Zellen benötigt.



**Abb. 3.32: Histomorphometrische Auswertung, Anzahl der Osteoklasten und Adipozyten vor und nach der PTH-Behandlung.** a) Während bei den PTH-behandelten CT-Mäusen eine erhöhte Anzahl an knochenabbauenden Zellen gefunden wurde, blieb die Osteoklastenzahl bei den cKO-Mäusen unverändert, jedoch höher als bei den Vehikel-behandelten CT-Mäusen. b) Die Anzahl der Adipozyten war in den Vehikel-behandelten cKO-Mäusen überdurchschnittlich hoch. Durch die Gabe von PTH konnte die Differenzierung zu Fettzellen bis auf das Normalniveau herunter gefahren werden. CT Veh:  $n=4$ , CT PTH:  $n=3$ , cKO Veh:  $n=3$ , cKO PTH:  $n=5$

Ein weiteres Problem bei den cKO-Mäusen bestand in der hohen Anzahl an Adipozyten im Knochenmark. Durch die Gabe von PTH konnte auch dieser Zustand bei den cKO-Tieren behoben werden (Abb. 3.32b). Es wurde eine Abnahme an Fettzellen von über 50% beobachtet (cKO Veh:  $324,3 \pm 140,4$  vs. cKO PTH:  $145,7 \pm 51,3$  Ac.N;  $p < 0,05$ ). Auch dieses Ergebnis zeigte, dass durch einen Rac1-unabhängigen Weg die Osteoblasten mit PTH vermehrt proliferierten und sich differenzierten. Dies bedeutete, dass die Gabe von PTH verschiedene Defekte der cKO-Mäuse ausgleichen konnte und das Fehlen von Rac1 nur in Abwesenheit von PTH zu solch gravierenden Störungen der Knochenentwicklung führte.

Zur Veranschaulichung sind im Anhang 9 Masson-Goldner gefärbte Knochenschnitte der vier Versuchsgruppen dargestellt.

## TEIL 3

### 3.4 Projekt Doppel-Knockout Cdc42/Rac1

Nach den Untersuchungen der Einzel-Knockouts stellte sich die Frage was geschieht, wenn die Ausschaltung beider Gene unter die Kontrolle des Osterix-Promotors gebracht wird. Beeinflussen sich beide Faktoren gegenseitig, welcher Faktor ist dominanter in der Knochenentwicklung, gleicht der Phänotyp eher dem Cdc42- bzw. Rac1-Einzel-cKO und über welchen Signalweg kann die Knochenentwicklung aufrechterhalten werden? Diese und weitere Fragen sollten mit Hilfe der Doppel-Knockouts geklärt werden. Die folgenden Ergebnisse sind erste Anhaltspunkte und werden in der Promotion von Katrin Rau, Doktorandin unserer Arbeitsgruppe, weiter verfolgt.

Die Ausschaltung beider Gene bewegt sich in dem Rahmen, wie sie auch für die Einzel-cKO-Osteoblasten gezeigt wurde. Cdc42 ist auf mRNA-Ebene um 55,4% und Rac1 um 26,5% reduziert verglichen mit den CT-Zellen (CT:  $7,40 \pm 1,43$  vs. Cdc42 cKO:  $3,26 \pm 1,99$ ,  $p < 0,05$ ; CT:  $7,40 \pm 1,43$  vs. Rac1 cKO:  $5,44 \pm 0,51$ ,  $p < 0,05$ ; CT, Doppel-cKO:  $n=3$ ).

#### 3.4.1 Phänotyp der Knockout-Mäuse

Bei Doppel-cKO-Mäusen kam es, wie bei den Einzel-cKO-Mäusen, zu Minderwuchs. Die Doppel-cKO-Mäuse wiesen eine durchschnittliche Lebenserwartung von vier Wochen auf. Nach Absetzen von der Mutter waren die cKO-Mäuse nicht in der Lage, sich allein von Trockenfutter zu ernähren, was letztendlich zu deren frühen Tod beitrug. Als Grund kamen auch hier wieder die Zahnfehlstellung bzw. das Ausbleiben einer Zahnentwicklung, sowie die verkürzten Unter- und Oberkiefer in Frage. Eine Nahrungsaufnahme war so nur schwer möglich.

Die Größe und das Gewicht der drei Wochen alten cKO-Tiere wichen stark von den Normalbereichen ab.

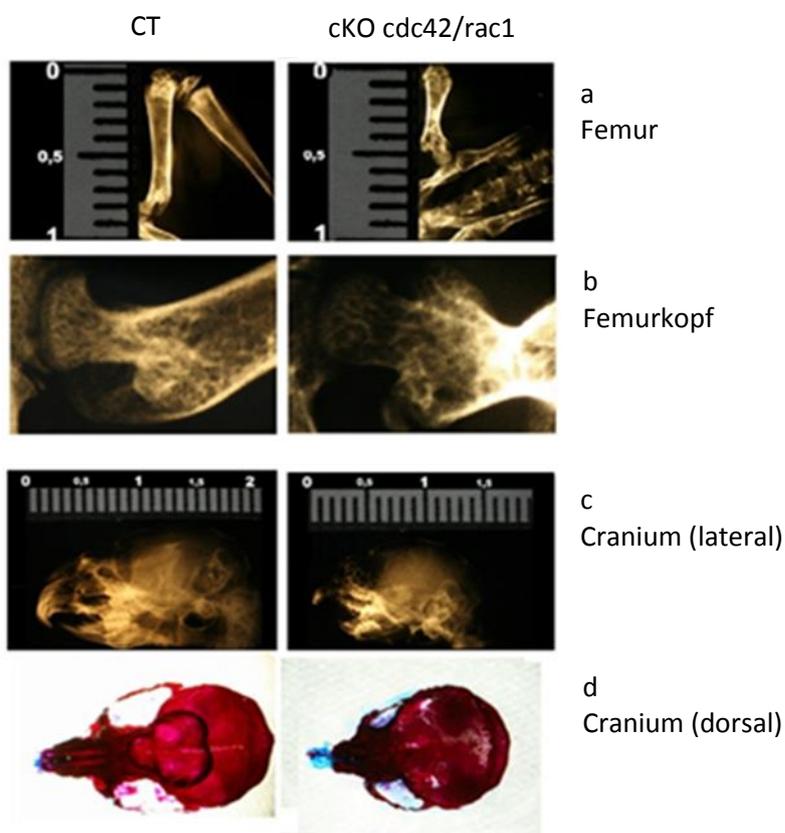
##### 3.4.1.1 Entwicklung der langen Knochen und der Schädelknochen

Wie in den folgenden Abbildungen zu sehen ist, wiesen die cKO-Mäuse deutliche Veränderungen der langen und der platten Knochen auf. In Abbildung 3.33a sind als Beispiel die Längen der Femura der CT- und cKO-Mäuse gleichen Alters gegenübergestellt. Die langen Knochen der cKO-Mäuse erreichten nur etwa die Hälfte der Normallänge (CT:  $0,97 \pm 0,05$ cm vs. cKO:  $0,81 \pm 0,12$ cm;  $p < 0,0001$ ). Die Proportionen von Femur zu Tibia und Humerus zu Ulna waren aber in beiden

Versuchstiergruppen gleich, so dass die Längen der Extremitäten nicht unverhältnismäßig zur Körpergröße wirkten.

Bei genauerer Betrachtung der Gelenke fiel auf, dass der Femurkopf der cKO-Mäuse deformiert war. Besonders auffällig waren die veränderten *Trochanteris majoris et minoris*. Zudem war die Ausbildung der Zug- und Drucktrabekel vermindert (Abb. 3.33b).

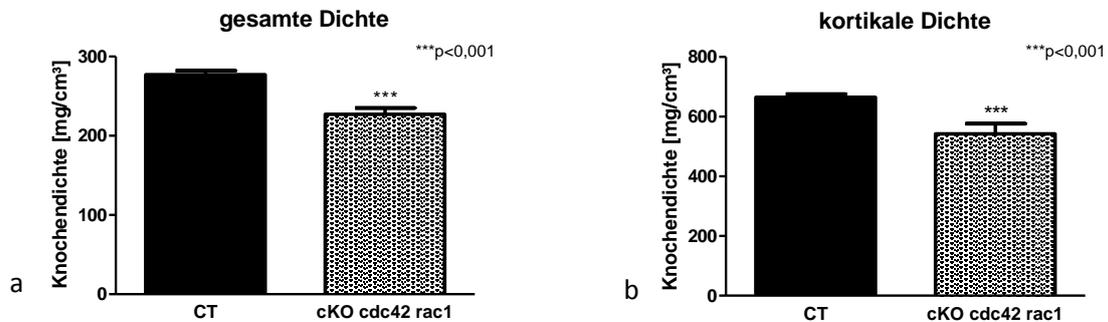
In den Abbildungen 3.33c und 3.33d sind die Schädel als Röntgenaufnahme und Skelettfärbung dargestellt. Beide Abbildungen machen deutlich, dass die Entwicklung des Craniums bei den cKO-Mäusen beeinträchtigt war. Die Schädeldecke erschien sehr dünn. Außerdem waren die Schädelnähte und Fontanellen nicht verschlossen. Auch die rundliche Kopfform war gut zu erkennen.



**Abb. 3.33: Röntgenaufnahmen und Skelettfärbung.** a) Die Röntgenaufnahmen zeigten am Beispiel des Femurs, dass die langen Knochen der cKO-Mäuse deutlich verkürzt waren. b) Zusätzlich waren auch Deformitäten im Hüftgelenk bei den cKO-Tieren zu erkennen. Die Form des Femurkopfes war verändert und die Ausbildung der Zug- und Drucktrabekel stark vermindert. c) Röntgenaufnahme der Schädel (lateral). Hier zeigte sich eine inkomplette Ausbildung der Schädeldecke sowie ein verkürzter Ober- und Unterkiefer bei den cKO-Mäusen. d) Skelettfärbung der Schädel (dorsal). Besonders auffällig waren die unverschlossenen Schädelnähte und Fontanellen der cKO-Mäuse.

#### 4.4.1.2 Knochendichte

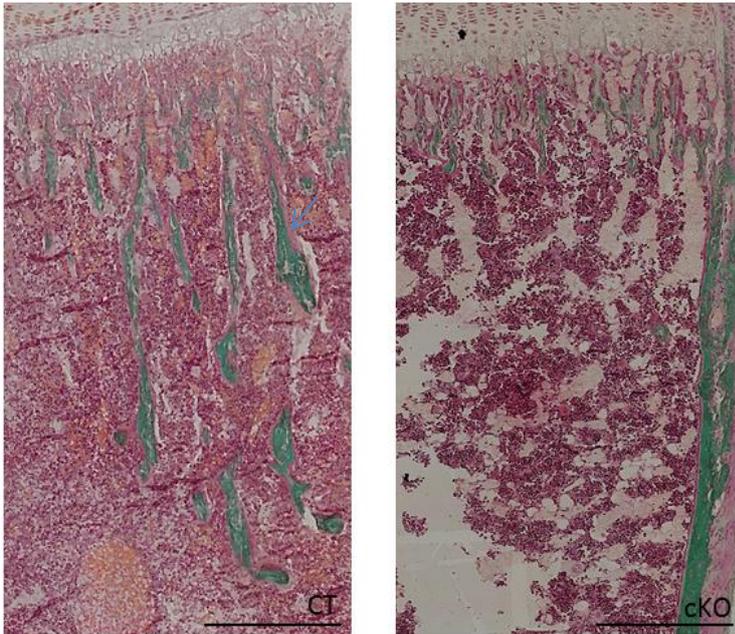
Die Ausschaltung der Rho GTPasen, Cdc42 und Rac1 mit Hilfe des Osterix-Promotors führte zu einer deutlichen Abnahme der Knochendichte. Sowohl die gesamte Knochendichte als auch die kortikale Knochendichte der drei Wochen alten Mäuse waren signifikant vermindert (Abb. 3.34a,b).



**Abb. 3.34: Periphere Computertomographie.** a) Die Gesamtknochendichte (Trabekel und Kortex) der cKO-Mäuse war um 18,1% vermindert. b) Gleiches zeigte sich, wenn nur die kortikale Knochendichte betrachtet wurde. Auch hier war die Dichte der Knochen der cKO-Mäuse vermindert (um 17,1%). CT, cKO: n=5

#### 4.4.2 Histomorphometrie

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass bei den cKO-Mäusen Mineralisierungsdefizite vorlagen. Um den Grund dafür feststellen zu können, wurden Schnitte der Tibiae angefertigt, gefärbt und histomorphometrisch ausgewertet. In Abbildung 3.35 wird schon auf den ersten Blick deutlich, dass wesentliche Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen bestanden. Während die CT-Mäuse zahlreiche Trabekel in der sekundären Spongiosa, die gesäumt sind von aktiven Osteoblasten, ausbildeten, fehlte die sekundäre Spongiosa in den cKO-Mäusen fast vollständig. Ebenfalls auffällig war das sehr inhomogen ausgebildete Knochenmark.



**Abb. 3.35: Knochenschnitte der Tibiae, Masson-Goldner-Färbung.** Es sind Ausschnitte der Trabekelregion kurz unterhalb der Wachstumsfuge dargestellt. Bei den CT-Mäusen ist eine ausgeprägte sekundäre Spongiosa zu sehen, die von aktiven Osteoblasten gesäumt ist (blauer Pfeil), während bei den cKO-Mäusen nur vereinzelt Trabekel auftraten. Zusätzlich wirkte das Knochenmark der cKO-Mäuse sehr inhomogen. Balken: 100µm

In Tabelle 3.8 sind die Daten der histomorphometrischen Auswertung zusammengestellt. Insgesamt war die Knochenoberfläche bei den cKO-Mäusen um 32% vermindert, verglichen mit gleichaltrigen CT-Mäusen, was unter anderem auf eine geringere Osteoblastenzahl zurückzuführen war. Die Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche war um 15% reduziert. Ob zusätzlich eine Funktionseinschränkung der Zellen vorlag, konnte anhand dieser Auswertungen noch nicht bestätigt werden. Betrachtete man die Bildungsraten des gesamten Knochens als auch die des Osteoids, sah man bei den cKO-Mäusen eine Erhöhung, die jedoch nicht signifikant war. Auch die Zeit von der Matrixablagerung bis zur Mineralisierung (MLT, *mineralizing lag time*) und die Osteoidreifungszeit (OMT, *osteoid maturation time*) waren in beiden Versuchsgruppen gleich. Der Tabelle ist weiterhin zu entnehmen, dass in den cKO-Tibiae weniger abbauende Knochenzellen vorhanden waren und somit auch die Resorptionsfläche im Vergleich mit den CT-Tibiae kleiner war.

Tabelle 3.8: Histomorphometrie

Parameter	Einheit	CT	cdc42 rac1 cKO	Signifikanz p
Knochenoberfläche (BS)	mm	23,29±3,12	15,88±3,45	0,0049**
Osteoid/Knochenoberfläche (Ob.S/BS)		0,64±0,08	0,61±0,12	0,6383
Anzahl d. Osteoblasten/ Knochenoberfläche (Ob.N/BS)		53,79±7,34	45,98±10,69	0,2011
Erosionsfläche/ Knochenoberfläche (Oc.S/BS)		0,069±0,019	0,058±0,031	0,4949
Anzahl d. Osteoklasten/ Knochenoberfläche (Oc.N/BS)		2,02±0,57	1,42±0,41	0,0745
Mineralisierungsfläche/ Knochenoberfläche (MS/BS)		0,066±0,022	0,102±0,039	0,1046
Knochenbildungsrate/ Knochenoberfläche (BFR/BS)	mm/y	0,092±0,03	0,161±0,1	0,1707
Knochenbildungsrate/ Osteoid (BFR/OS)	mm/y	0,14±0,04	0,27±0,17	0,1427
Zeit von Matrixablagerung bis Mineralisierung (MLT)	d	30,49±13,69	23,97±22,43	0,5856
Osteoidreifungszeit (OMT)	y	2,86±0,78	3,04±2,53	0,8828

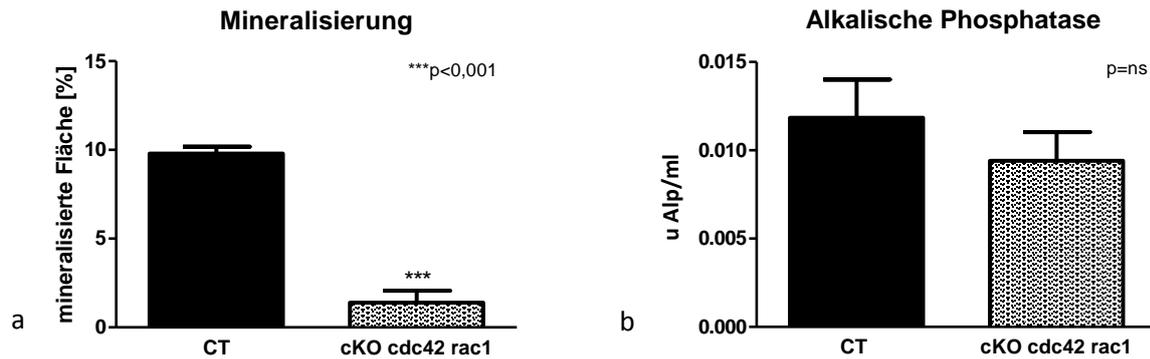
CT: n=4, cKO: n=5; \*\*p&lt;0,01

Interessanterweise unterschied sich die Zusammensetzung des Knochenmarks der Doppel-cKOs sowohl von den Cdc42- als auch den Rac1-Einzel-cKOs. Das Knochenmark wirkte sehr inhomogen. Es befanden sich große, flache, bikonkave Zellen in den Sinusoiden. Außerdem war die Anzahl an Adipozyten in beiden untersuchten Gruppen ähnlich (CT: 20,8±13,2 vs. cKO: 13,3±4,7 Ac.N; p=ns).

### 3.4.3 In vitro-Versuche

#### 3.4.3.1 Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit Cdc42/Rac1-ausgeschalteten Osteoblasten

Isolierte Präosteoblasten wurden *in vitro* auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht. In einem ersten Experiment wurden die Osteoblasten in Kulturschalen ausgesät und für drei Wochen mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium behandelt. Am Ende wurde die Mineralisierungsfähigkeit der Zellen mit Hilfe der von Kossa-Färbung verdeutlicht. Abbildung 3.36a zeigt, dass die Bildung hydroxyapatithaltiger Kristalle in Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 stark beeinträchtigt war. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase schien jedoch kaum beeinflusst worden zu sein (Abb. 3.36b).



**Abb. 3.36: Quantifizierung der von Kossa-Färbung und Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Medium.** a) Die Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten durch cKO-Osteoblasten war um 85% vermindert, verglichen mit den CT-Osteoblasten. CT: n=4, cKO: n=3. b) Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die essentiell für den Knochenaufbau ist, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen. CT: n=8, cKO: n=3

#### 3.4.3.2 Adipozytenfärbung auf differenzierten Osteoblasten-Kulturen

Die Oil Red O-Färbung zur Detektion von Adipozyten in den Osteoblasten-Kulturen und die anschließende Auswertung bestätigte die *in vivo* Ergebnisse. Ermittelt wurde die Anzahl der Adipozyten pro Gesamtzellzahl. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den CT- und Doppel-cKO-Kulturen (CT:  $0,373 \pm 0,2\%$  vs. cKO:  $0,282 \pm 0,2\%$ ; p=ns; CT, cKO: n=8)

#### 3.4.4 Nachweis wichtiger Osteoblasten- und Adipozytenmarker

Da die histomorphometrische Analyse und die von Kossa-Färbung die Vermutung aufkommen ließen, dass die verminderte Osteoblastenzahl und die eingeschränkte Mineralisierungsfähigkeit dieser Zellen verantwortlich für die schlechte Knochenbildung waren, sollte die Expression wichtiger osteoblastischer Marker auf mRNA-Ebene untersucht werden. Runx2 und die Alkalische Phosphatase dienten als frühe Differenzierungsmarker und Osteokalzin als ein später Differenzierungsmarker. Ppar $\gamma$  diente als Marker früher Adipozyten.

Tabelle 3.9: Osteoblasten- und Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO <i>cdc42/rac1</i>	Signifikanz p
<i>Runx</i>	0,52±0,27	0,46±0,06	0,687
<i>Alpl</i>	2,03±1,32	1,37±0,23	0,361
<i>Oc</i>	4,43±5,13	0,85±0,98	0,219
<i>Pparγ</i>	1,21±0,85	0,67±0,06	0,255

CT, cKO: n=3; p=ns

In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse dieser Analyse zusammengefasst. Die CT- und cKO-Osteoblasten verhielten sich hinsichtlich der mRNA-Expression essentieller Differenzierungsgene nahezu gleich. Es war lediglich eine Tendenz der verminderten Expression in den cKO-Osteoblasten zu beobachten. Auch *Pparγ*, ein essentieller Marker der Adipozytendifferenzierung, blieb unverändert.

Zur Beschreibung der *Cdc42/Rac1*-Ausschaltung in Präosteoblasten sind Wiederholungen der bisherigen Versuche sowie weitere Experimente notwendig.

### **3.5 Überblick über die wichtigsten Ergebnisse**

#### Cdc42

Die Ausschaltung von *Cdc42* in Präosteoblasten resultierte in einem Minderwuchs der Mäuse. Histologische Untersuchungen der langen Knochen zeigten, dass die Bildung von trabekulären Knochen stark beeinträchtigt war. Eine wichtige Ursache hierbei ist die verminderte Anzahl an Osteoblasten. *In vitro* wurden die cKO-Osteoblasten näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass diese Zellen vermehrt apoptotisch sind, verglichen mit den Kontrollzellen.

Zudem wurde im Knochenmark der cKO-Mäuse eine erhöhte Adipozytenanzahl gefunden. Diese Beobachtung bestätigte sich *in vitro*. Unsere Versuche zeigten, dass das Knochenmark weitestgehend an der Adipozytendifferenzierung unbeteiligt ist.

#### Rac1

Der Verlust von *Rac1* in frühen Stadien der Osteoblastenentwicklung hat ebenfalls einen Minderwuchs der Mäuse zur Folge. In den Knochenschnitten der Tibiae war nur eine schwache Ausbildung der sekundären Spongiosa vorhanden. Im Gegensatz zu den *Cdc42*-cKO-Mäusen spielt besonders die eingeschränkte Funktion der Osteoblasten eine bedeutende Rolle. Die Anzahl der

knochenbildenden Zellen war nicht vermindert. Die verminderte Mineralisierungsfähigkeit der cKO-Osteoblasten konnte auch *in vitro* mit Hilfe der von Kossa-Färbung bestätigt werden.

Auch in den Rac1-cKO-Mäusen war die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark erhöht.

Durch eine intermittierende Applikation von Parathormon konnten die cKO-Mäuse deutlich ihre Knochendichte erhöhen und Trabekel bilden. Der Zuwachs an Knochenmaterial glich dem der CT-Mäuse.

Interessanterweise bewirkte die Parathormon-Behandlung in den cKO-Tieren keine weitere Zunahme an Osteoklasten. So wurde eine Beteiligung von Rac1 an der Osteoblasten-Osteoklasten-Interaktion postuliert.

#### Cdc42/Rac1

Bei einem Verlust beider Rho GTPasen in Präosteoblasten zeigten die Mäuse ähnliche phänotypische Merkmale, wie sie bei den Cdc42-cKO-Mäusen beobachtet wurden. Ebenso war die Knochendichte, bedingt durch eine stark verminderte Trabekelbildung reduziert. Ein bedeutender Unterschied zu den Einzel-cKO-Mäusen (Cdc42 und Rac1) lag in der Anzahl an Adipozyten im Knochenmark. Es gab keine Unterschiede zwischen den Cdc42/Rac1-cKO und CT-Tieren.

## **4 DISKUSSION**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 in der Knochenentwicklung untersucht. Hierfür wurden Mäuse verwendet, bei denen mit Hilfe des Osterix-Promoters eines der beiden Gene spezifisch in Osteoblasten ausgeschaltet wurde. Im Zuge der Untersuchungen stellte sich heraus, dass eine ordnungsgemäße Expression dieser Rho GTPasen essentiell für eine gesunde Knochenentwicklung ist. Es machten sich sowohl auf makroskopischer als auch auf mikroskopischer Ebene Defizite in der Osteoblastenfunktion bei verminderter Genexpression und Proteinsynthese bemerkbar.

Für genauere Studien wurden histologische Untersuchungen an den Knochen vorgenommen. Ist die Synthese von Cdc42 oder Rac1 vermindert, ist die Ausbildung von Spongiosabälkchen (Trabekel) deutlich reduziert, was sich in einer verringerten Knochendichte widerspiegelt.

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden Osteoblasten aus der Schädeldecke der CT- und cKO-Mäuse isoliert. In Kultur wurden die Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen zu reifen Osteoblasten differenziert. Bereits während der Differenzierungsphase zeigten die cKO- Osteoblasten Schwierigkeiten bei der Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten. Das mRNA-Expressionsmuster ausgewählter Markergene sollte Hinweise auf eine Fehlregulierung in der Osteoblastenentwicklung bringen.

Der Verlust eines der beiden Gene in einem frühen Stadium der Osteoblastendifferenzierung führte zudem zu einer vermehrten Adipozytenbildung, was *in vitro* und *in vivo* beobachtet wurde.

In Folge der gewonnenen Erkenntnisse wurde mit beiden Versuchsgruppen (Cdc42- und Rac1-Einzel-cKO) auf unterschiedlichem Wege weiter verfahren. Im Cdc42-Projekt wurde das Hauptaugenmerk auf die vermehrte Adipozytendifferenzierung gelegt. Im Rac1-Projekt stand das Mineralisierungsdefizit der cKO-Osteoblasten im Vordergrund.

### **4.1 Ausschaltung der Rho GTPasen mit Hilfe des Osx-Promoters in Osteoblasten**

Während der embryonalen Entwicklung von Mäusen beginnt die Osterix (Osx)-Expression in der Calvaria und dem Perichondrium von langen Knochen etwa an Embryonaltag 13,5 und ist ab Embryonaltag 15,5 stabil in allen ossären Geweben zu finden. Osx wird ebenfalls in geringen Mengen in prä- und hypertrophen Chondrozyten gebildet (Nakashima et al., 2002; Sinha und Zhou, 2012). Sox9, Runx2 und Osx sind drei essentielle Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entscheidung spielen, welcher Differenzierungsweg, ausgehend von mesenchymalen Stammzellen, eingeschlagen wird. Sox9 und Runx2 werden in diesem Schritt zuerst exprimiert. Osx wird in Runx2-exprimierenden Progenitoren gebildet und leitet die weitere Osteoblastendifferenzierung ein (Wright

et al., 1995; Nakashima und de Crombrughe, 2003; Karsenty, 2001). Somit schien der *Osx*-Promoter für unsere Zwecke sehr gut geeignet zu sein. Wir generierten Mauslinien, in denen *Cdc42* bzw. *Rac1* mit einer Effizienz von 75 bzw. 40% spezifisch in Präosteoblasten ausgeschaltet wurden. Die Effizienz der Ausschaltung wurde jeweils auf mRNA-Ebene mittels qPCR und auf Protein-Ebene im Western Blot überprüft. Besonders in der *Rac1*-Mauslinie blieb die Ausschaltung unter unseren Erwartungen. Diese Tatsache musste in allen Ergebnissen berücksichtigt werden.

#### **4.2 Isolierung und Nachweis von Präosteoblasten**

Die für die *in vitro*-Versuche verwendeten Osteoblasten stammten aus den Schädeldecken neugeborener (24-72h alt) CT- und cKO-Mäuse (Carpenter et al., 1998). Trotz Säuberung der Calvariae ist eine Kontaminierung mit Fibroblasten sehr wahrscheinlich. Die Isolierung von Osteoblasten adulter Mäuse erfolgt meist aus den langen Knochen. Methoden zur Isolierung reiner Osteoblasten-Kulturen sind bisher nicht etabliert.

Osteokalzin wurde in unseren Versuchen als spezifischer Marker für Osteoblasten verwendet. Es wurde ebenso eine Expression von Osteokalzin in Osteozyten und hypertrophen Chondrozyten beschrieben (Sims et al., 2013). Da die Isolation aus platten Knochen, die auf intramembranösem Wege entstehen erfolgte, ist die erhöhte Osteokalzin-mRNA-Expression hauptsächlich auf die Osteoblasten zurückzuführen.

#### **4.3 Charakterisierung der *Cdc42*-cKO-Osteoblasten**

##### **4.3.1 Proliferation und Apoptose**

Bevor die Untersuchungen zur Funktion der CT- und cKO-Osteoblasten begannen, mussten allgemeine Eigenschaften der isolierten Zellen näher betrachtet werden. Hierfür wurden Experimente durchgeführt, die Aufschluss zur Proliferationsfähigkeit und zur Apoptoserate geben sollten. Für diese Versuche wurden frisch isolierte Präosteoblasten aus den Calvariae neugeborener Mäuse verwendet.

Diese Ergebnisse waren für die weitere Arbeit sehr wichtig, da die verminderte Knochenbildung bei *Cdc42*-Verlust in Präosteoblasten nicht zwingend auf eine geringere Funktionalität bzw. Mineralisierungsfähigkeit zurückgeführt werden konnte. Auch die Zellzahl spielte eine wichtige Rolle. Begonnen wurde mit Proliferations-Assays. Die Kultivierungszeit betrug fünf Tage, die Auswertung erfolgte manuell mit einer Neubauer-Zählkammer. Die Ergebnisse zeigten, dass es sowohl in der

Kontroll- als auch in der cKO-Gruppe zu einem deutlichen prozentuellen Zellzuwachs von etwa 800% kam. Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate konnten nicht festgestellt werden.

Die Apoptoserate der cKO-Osteoblasten war hingegen signifikant erhöht. Mit Hilfe einer Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung konnten früh- und spätapoptotische Zellen durchflusszytometrisch gezählt werden. In den cKO-Kulturen fanden sich etwa dreimal mehr frühapoptotische und doppelt so viele spätapoptotische Osteoblasten, verglichen mit den CT-Kulturen.

Für eine erhöhte Apoptoserate können verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden.

Wie einleitend beschrieben, ist Cdc42 u.a. an der Zellpolarisierung und der Ausbildung des Spindelapparats beteiligt. Eine fehlerhafte Chromosomenaufteilung und Zellteilung können die Apoptose induzieren. Möglicherweise war dies auch der Grund für die erhöhte Apoptoserate in unseren Versuchen. Es gibt bereits einige Veröffentlichungen, die die Rolle von Cdc42 bei der Zytokinese beschreiben.

RhoA gilt als die Rho GTPase, die die Zytokinese in tierischen Zellen kontrolliert. Jedoch sind auch andere Mitglieder dieser Proteinfamilie in diesen Prozess involviert. Cdc42 wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, in denen es eine wichtige Rolle in der Zellpolarisierung während der G<sub>1</sub>/S-Phase spielte (Johnson und Pringle, 1990). Während der Knospung akkumulierte aktiviertes Cdc42 an dieser Stelle (Richman et al., 2002). Es leitete die Ausbildung des Septinrings ein und rekrutierte weitere Faktoren, die für die Zytokinese notwendig waren. Eine Inhibierung von Cdc42 in kultivierten Zellen führte zu Fehlern im Zellzyklus, der Chromosomenorientierung während der Metaphase und zur Bildung multinukleärer Zellen mit ungleich verteiltem Chromosomensatz (Yasuda et al., 2004; Piekny et al., 2005). Dies führte letztendlich zum Zelltod. Zellzyklus-Analysen wären somit auch für unsere Versuche sehr interessant.

Di Cunto et al. veröffentlichten Untersuchungsreihen, deren Ergebnisse ebenfalls als mögliche Erklärungen für die erhöhte Apoptoserate in Frage kommen. Sie stellten Citron-K<sup>-/-</sup> (*Citron-kinase*) Neuronen her. Bei Citron-K handelt es sich um ein Zielmolekül aktivierter Rho GTPasen. Eine Ausschaltung dieses Enzyms führte zu einer massiven Zunahme apoptotischer Zellen. Die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen war deutlich erhöht. Eine Messung des DNA-Gehalts zeigte, dass die meisten Zellen tetraploid waren, was den apoptotischen Prozess initiierte (Di Cunto et al., 2000). Geletu et al. beschrieben einen weiteren Rho GTPase-abhängigen, antiapoptotischen Mechanismus. Darin förderten sowohl Cdc42 als auch Rac1 NFκB-vermittelt die IL-6-Transkription (Interleukin-6). IL-6 stimulierte über Cytokin-Rezeptoren an der Zelloberfläche, die Expression u.a von Bcl-xL, Survivin, Mcl-1, myc und Vegf. Gleichzeitig wurde die Expression von p53 inhibiert, was zusätzlich antiapoptotisch wirkte (Geletu et al., 2013).

Um weiterführende Aussagen über den Zustand des Zytoskeletts in den Cdc42-cKO-Osteoblasten treffen zu können, war eine Aktin-Tubulin-Färbung notwendig. Eine Unorganisiertheit im Zytoskelett der Cdc42-cKO-Osteoblasten könnte der Grund für Fehlregulierungen in deren Entwicklung sein. Die Zellmigration ist ein Prozess, der auf einer kontinuierlichen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts beruht. Unentwegt werden fokale Adhäsionsstellen auf- und abgebaut, die Zelle polarisiert, bildet Ausläufer und kontrahiert. Alle diese Schritte werden von Rho GTPasen, unter ihnen Cdc42, wesentlich mitbestimmt. Im Jahr 2005 zeigten Czuchra et al., dass Cdc42 allerdings nicht essentiell für die Filopodien- und Lamellipodienbildung ist (Czuchra et al., 2005).

#### 4.3.2 In Abwesenheit von Cdc42 ist die Differenzierung der Osteoblasten gestört

Osteoblasten, denen Cdc42 in frühen Differenzierungsstadien fehlte, fielen durch eine mangelnde Mineralisierung in Kultur auf, was mit Hilfe der von Kossa-Färbung gut sichtbar gemacht wurde. Nach einer drei wöchigen Differenzierungszeit war die Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten in den cKO-Kulturen um mehr als 60% reduziert, verglichen mit den CT-Kulturen. Die verringerte Fähigkeit zur Mineralisierung war über den gesamten Beobachtungszeitraum feststellbar. Die Entstehung erster Knoten erfolgte deutlich später in den cKO-Kulturen. Das Defizit konnte bis zum Versuchsende nicht kompensiert werden.

Weiterhin interessierte uns, welchen Einfluss das Knochenmark bei der Osteoblastendifferenzierung und der Mineralisierung spielte. Hierzu wurde den CT- und cKO-Osteoblasten Wildtyp-Knochenmark addiert. In den Co-Kulturen konnten ähnliche Ergebnisse wie in den reinen Osteoblastenkulturen beobachtet werden. Die Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten war in den cKO-Kulturen um etwa 43% vermindert, verglichen mit den CT-Kulturen. Die leichte Zunahme der Mineralisierung war den mesenchymalen Stammzellen geschuldet, die sich im Wildtyp-Knochenmark befanden. Dies wurde durch die Kultivierung reiner Knochenmarkszellen bestätigt.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Fähigkeit der Mineralisierung bei Cdc42-Ausschaltung in Präosteoblasten herabgesetzt war. Die Wichtigkeit von Cdc42 in diesem Prozess wurde auch dadurch deutlich, dass offensichtlich keine Kompensation erfolgte.

In welchem Entwicklungsschritt Cdc42 im Besonderen benötigt wurde, sollte über die Expression spezifischer Markergene untersucht werden. Jedes Entwicklungsstadium war durch ein spezifisches Expressionsmuster gekennzeichnet. Die Marker (Runx2, Alkalische Phosphatase und Osteokalzin) gaben auf mRNA-Ebene nur wenige Hinweise auf eine fehlerhafte Entwicklung. Jedoch zeigte die Aktivität der Alkalischen Phosphatase deutliche Defizite. Dieses Ergebnis sprach für eine Fehlregulierung in einem frühen bis mittleren Differenzierungsstadium der Osteoblasten (Abb. 3.16).

Eine Frage, die sich ergibt ist, warum eine unveränderte mRNA Menge die Proteinaktivität reduziert. Die Hauptaufgabe von Cdc42 besteht in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Dadurch kommt Cdc42 auch eine wichtige Funktion im Vesikeltransport und der Exozytose zu (Bu et al., 2010). So können beispielsweise in Vesikel eingeschlossene extrazelluläre Matrixproteine und  $\text{Ca}^{2+}$ -Phosphat-Kristalle nicht an die Zelloberfläche abgegeben (Anderson und Reynolds, 1973). Somit könnten extrazelluläre Matrixproteine für die Degradation markiert werden. Dies könnte für das extrazelluläre Matrixprotein Osteokalzin sowie für die an einen Lipidanker gebundene Alkalische Phosphatase zutreffen, wodurch deren Aktivität eingeschränkt wird. Proteinuntersuchungen in Zelllysaten und Medienüberständen könnten mit Hilfe von Western Blotting oder ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt werden. Ebenso können Färbungen auf Knochenschnitten oder Osteoblastenkulturen eventuelle Akkumulationen der Proteine im Zytoplasma anzeigen.

Dass Cdc42 direkt posttranskriptionelle und posttranslationelle Modifikationen vornimmt, die die Proteinsynthese hemmen bzw. die Proteinaktivität einschränken, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben.

#### 4.3.3 Eine gezielte Cdc42-Ausschaltung in Präosteoblasten beeinträchtigt die Knochenentwicklung

In den Mäusen bewirkte die osteoblastenspezifische Cdc42-Ausschaltung einen starken Minderwuchs. Drei Wochen alte CT-Mäuse waren etwa 12,2cm groß, cKO-Mäuse dagegen nur 9,2cm. Das entsprach einer Größenreduktion von 25%.

Zur weiteren Beurteilung der Knochenstruktur und -form wurden Röntgenaufnahmen angefertigt. Messungen der langen Knochen ergaben, dass die Knochen der cKO-Mäuse signifikant verkürzt waren, verglichen mit denen der CT-Mäuse. In den Röntgenbildern fiel ebenso auf, dass die Knochen, insbesondere die Femurköpfe der cKO-Tieren viel kontrastärmer erschienen. So war die Ausbildung der Zug- und Drucktrabekel deutlich reduziert (Abb. 3.4b). Aus diesem Grund folgten Knochendichtemessungen der Femura. Die Auswertung bestätigte die Beobachtungen auf den Röntgenbildern. Die Gesamtknochendichte (Kortex und Spongiosa) war in den cKO-Mäusen um über 20% vermindert, verglichen mit gleichaltrigen CT-Mäusen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine verminderte Cdc42-Synthese in Osteoblasten zu einer eingeschränkten Zellfunktion führte. Welche Art von Fehlregulierung vorlag, sollte histomorphometrisch näher untersucht werden. Auf diese Weise konnten verschiedene Parameter ausgewertet und in Zusammenhang gebracht werden. Bei der Betrachtung der cKO-Knochenschnitte fiel sofort die wenig entwickelte Spongiosafläche auf. Insgesamt ist die Fläche der Trabekel um 56% reduziert. Gleichzeitig war auch die Anzahl der knochenbildenden Zellen um fast 25% vermindert. *In vitro* konnte jedoch keine veränderte Zellzahl

festgestellt werden. Es war schwierig, genaue Ursachen dafür zu finden. Es mussten weitere Einflussfaktoren vorhanden sein, die *in vitro* nicht optimal nachempfunden werden konnten. Diese Versuche halfen jedoch aufzuzeigen, dass trotz gleicher Osteoblastenzellzahl die Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten vermindert war. So bestand *in vivo* vermutlich eine Kombination aus verminderter Zellzahl und eingeschränkter Osteoblastenfunktion, was die Knochenentwicklung beeinträchtigte.

Die Histomorphometrieergebnisse liefen weitere mögliche Ursachen für die geringe Osteoblastenzahl und Mineralisierung. In der Knochenmatrix der cKO-Mäuse waren signifikant mehr Osteozyten vorhanden als es in den CT-Mäusen der Fall war. Zudem konnte eine verkürzte Zeitspanne von Matrixablagerung bis zur Mineralisierung dokumentiert werden. Es ist denkbar, dass dieser Prozess zu einer verfrühten und vermehrten Osteozytendifferenzierung führt. Durch die schnelle Differenzierung, Matrixablagerung und Mineralisierung war eine diffuse Kollagenablagerung und somit unzureichende Mineralisierung wahrscheinlich. Dies hätte eine verminderte Knochendichte zur Folge. Interessanterweise waren die Knochenbildungsraten (*bone formation rate/bone surface* und *bone formation rate/osteoid surface*) der cKO-Mäusen mit 43% und 52% deutlich erhöht. Die Cdc42-defizienten Osteoblasten waren somit aktiver. Da sowohl die bildgebenden Verfahren, als auch die *in vitro*-Versuche für eine verminderte Knochenbildung sprachen, war es wahrscheinlich, dass die Matrixablagerung und anschließende Mineralisierung mangelhaft war.

Die Osteoblasten bestimmen die Form und Lage der Kollagenfibrillen. Die Bildung der Kollagenfibrillen erfolgt in Membraneinsenkungen der Zellen. Durch das Wandern der Zellen werden die Fibrillen in einer parallelen Anordnung abgelegt (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Ist durch die Abwesenheit von Cdc42 das Aktin-Zytoskelett stark in Mitleidenschaft gezogen, so kann die Matrixablagerung ungeordnet sein. Untersuchungen zur Matrixzusammensetzung wären aus diesem Grund angebracht, ebenso Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphatengehalts im Blut und im Knochen.

#### 4.3.4 Cdc42 beeinflusst die Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Zwei wichtige Signalwege, die zur Expression von Osteoblastendifferenzierungsmarkern führen, sind die Wnt- und Mapk-Wege. In beiden Signalwegen ist Cdc42 als ein *downstream*-Effektor beschrieben. Die Wnt-Signalwege sowie der Transkriptionsfaktor Atf4 (CREB, *activating transcription factor 4*) treten in reifen Osteoblasten auf, um die Funktion der Osteoblasten zu regulieren (Glass et al., 2005; Yang et al., 2004; Karsenty 2008). Ebenso sind die Mapk (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwege bedeutend für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. *In vitro*

Studien haben gezeigt, dass eine Inhibierung der p38- (Mapk14) und Erk- (Mapk1) MapKinasen zu Defekten während der frühen Osteoblastendifferenzierung führen. Die Jnk-Mapk (Mapk8) hingegen war essentiell für spätere Stadien der Differenzierung, was sich z.B. durch eine eingeschränkte Alkalische Phosphatase-Aktivität und Atf4-Expression ausdrückte (Suzuki et al., 2002; Matsuguchi et al., 2009).

Welche Rolle Mapk in den knochenbildenden Zellen spielten, versuchten Greenblatt et al. genauer zu verstehen. Sie generierten Mauslinien, bei denen Tak1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*), ein Mitglied der Map3k-Familie mit Hilfe des Osterix-Promoters spezifisch in Osteoblasten ausgeschaltet wurde. Es stellte sich heraus, dass Tak1 ein wichtiger Aktivator von Runx2 ist und somit wesentlich die Osteoblastenfunktion mitreguliert. Dieser Effekt wurde u.a. über p38 vermittelt. Die betroffenen Mäuse wiesen ähnliche Symptome (klavikuläre Hypoplasie, unverschlossene Fontanellen, cleidokraniale Dysplasie), wie bei einer humanen Haploinsuffizienz von RUNX2 auf (Greenblatt et al., 2010). Eine weitere wegweisende Arbeit zu diesem Thema kommt von Zou et al. Sie untersuchten in ähnlicher Weise die Rolle von Mlk3 (*mixed-lineage kinase 3*) während der Osteoblastendifferenzierung. Mlk3 gehört wie Tak1 zur Map3k-Familie und wirkt als *upstream*-Aktivator von Jnk, Erk und p38 (Tibbles et al., 1996; Chadee und Kyriakis, 2004). Sie zeigten, dass Fgd1 und Cdc42 zusammen Mlk3 aktivieren. Das Zusammenwirken aller drei Moleküle endete letztendlich in der Phosphorylierung und Aktivierung von Runx2. Der *Knockdown* von Mlk3 verhinderte die Osteoblastendifferenzierung. Zur Untersuchung, welcher Mechanismus die Ursache war, wurden verschiedene Mapk-Inhibitoren eingesetzt. Das Ergebnis war, dass sowohl der p38- als auch der Erk-Signalweg für die Mlk3-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von Runx2 benutzt wurden (Zou et al., 2011; Ge et al., 2007). Außerdem waren p38 und Erk unter osteogenen Kulturbedingungen auch in der Osx-Expression involviert (Celil et al., 2005).

Die von Zou et al. beschriebenen Defizite bei einem Mlk3-Verlust ähnelten in starkem Maße unseren Beobachtungen. In unseren Versuchen konzentrierten wir uns auf die Marker Runx2, Alkalische Phosphatase und Osteokalzin. Das Expressionsmuster dieser Gene veränderte sich bei Cdc24-Ausschaltung in einem frühen Osteoblastendifferenzierungsstadium nicht. Jedoch konnte *in vitro* eine signifikante Aktivitätseinbuße der Alkalischen Phosphatase gemessen werden. Die Aktivität sank um etwa 43% verglichen mit der Alp-Aktivität in CT-Osteoblasten. Das Enzym ist für die Knochenmineralisierung unerlässlich. Es stellt anorganisches Phosphat aus der Spaltung organischer Phosphate und Pyrophosphat zur Verfügung, welche die Mineralisierung hemmen würden (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012).

Unsere Daten könnten mit der Tatsache, dass Cdc42 Mapk-vermittelt die Osteoblasten in ihrer Entwicklung und Funktion beeinflusst, erklärbar sein. Im Anhang befindet sich eine Übersicht zu den Mapk-Kaskaden (Anhang 10).

#### 4.3.5 Die Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten führt zu einer vermehrten Adipozytendifferenzierung

Beim Betrachten der Knochenschnitte der cKO-Mäuse fiel auf, dass sich sehr viele Adipozyten im Knochenmark befanden. Adipozyten leiten sich, wie auch Osteoblasten, von mesenchymalen Stammzellen ab. So schien auch eine Transformation von Präosteoblasten zu Adipozyten möglich.

*In vitro*-Versuche sollten weitere Informationen liefern. Frisch isolierte CT- und cKO-Präosteoblasten wurden drei Wochen lang mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium behandelt. Anschließend sollte eine Oil Red O-Färbung die Fettzellen sichtbar machen. In den cKO-Kulturen waren etwa 45% mehr Adipozyten als in den CT-Kulturen zu finden. Ob eine Transformation stattgefunden hat, war mit diesem Versuch nur schwer zu beantworten. Zwischen den isolierten Osteoblasten befanden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch mesenchymale Stammzellen, die sich zu Adipozyten differenzieren konnten. Auch wenn dies der Fall war, zeigte sich in den cKO-Kulturen ein anormales Bild, da sich trotz Osteoblasteninduktion vermehrt Adipozyten bildeten. Bestärkt wurde diese Beobachtung durch eine signifikant erhöhte Expression von Ppar $\gamma$  und tendenziell erhöhte Expression von C/ebp $\alpha$ . Beide Moleküle sind essentiell in frühen Stadien der Adipozytenentwicklung. Wurden die frisch isolierten CT- und cKO-Osteoblasten mit Adipozyten-Differenzierungsmedium versorgt, so konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

Die Behandlung der CT- und cKO-Co-Kulturen mit Medium mit Adipozyten-stimulierenden Zusätzen führte insgesamt zu einer geringen Adipozytendifferenzierung. Es konnte lediglich ein prozentualer Anteil von 0,05-0,06% an Adipozyten an der Gesamtzellzahl gemessen werden. In der Literatur werden bei gleichem Vorgehen deutlich höhere Ausbeuten beschrieben, die sich etwa bei 30% bewegen (Sobh, 2014; Sinha et al., 2014). Somit bedarf das Differenzierungsmedium in unserem Versuchsaufbau weiterer Optimierung. Die Adipozytendifferenzierung kann zudem durch Thiazolidindione stimuliert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen verwenden den Vertreter Troglitazon, welcher über Ppar $\gamma$ -Stimulierung wirkt (Lambe und Tugwood, 1996; Takada et al., 2012). Eventuell könnte auch diese Methode angewendet werden.

Weiterhin fiel auf, dass sich die CT-Kulturen der Cdc42- und Rac1-Linien hinsichtlich der Adipozytendifferenzierung unterschieden. Zellkulturen, in denen Rac1-defiziente Osteoblasten

vorkamen, bildeten mehr Adipozyten bei Zugabe von Osteoblasten-Differenzierungsmedium. Hierbei stellt sich die Frage, welchen Einfluss allein die Cre-Rekombinase ausübt verglichen mit WT-Zellen.

Weiterhin interessierte uns, ob allein die cKO-Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen für die verstärkte Fettzellbildung verantwortlich waren. Es wurden Osteoblasten zusammen mit WT-Knochenmarkszellen kultiviert. So sollte überprüft werden, ob das Knochenmark eine regulierende Rolle einnimmt.

Die cKO-Co-Kulturen wiesen wiederum eine erhöhte Adipozytenanzahl auf, verglichen mit den CT-Co-Kulturen. Die Zunahme lag mit 48% so hoch wie in den reinen Osteoblastenkulturen. Zusätzlich wurden reine Knochenmarkszellen von CT- und cKO-Mäusen mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium behandelt. Beide Kulturen wiesen am Ende des Experiments eine ähnliche Anzahl an Fettzellen auf. Dieses Ergebnis zeigte, dass sich im Knochenmark der cKO-Mäuse befindliche mesenchymale Stammzellen nicht bevorzugt zu Adipozyten differenzierten.

Um zu bestätigen, dass Knochenmark keine regulierende Wirkung ausübt, wurden Transplantationsversuche durchgeführt. Knochenmark von CT- und cKO-Mäusen wurde subletal bestrahlten WT-Mäusen injiziert. Nach einer vier monatigen Regenerationsphase wurden die Mäuse getötet, Knochenschnitte angefertigt, gefärbt und ausgewertet. Bezüglich der Osteoblasten- und Adipozytenanzahl waren keine Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen zu erkennen. Das Knochenmark von cKO-Mäusen brachte nicht mehr Adipozyten in WT-Mäusen hervor.

Somit schien eine Transformation von Präosteoblasten zu Adipozyten am wahrscheinlichsten.

#### 4.3.6 Die Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten führt zur Überexpression adipozytärer Differenzierungsgene

Welcher genaue Mechanismus hinter einer Transformation steckt, musste in weiterer Arbeit noch untersucht werden. Trotz intensiver Forschung sind die genaue molekulare Regulation der Adipogenese, der Determinationsprozess und die Differenzierung noch unklar. *In vitro* konnten sich mesenchymale Stammzellen und Präadipozyten durch einen Hormoncocktail aus Insulin, Dexamethason und 1-Methyl-3-isobutanyl-xanthin zu reifen Fettzellen entwickeln. Für die Determination und Differenzierung sind besonders C/ebp $\alpha$  und  $\beta$  sowie Ppar $\gamma$  entscheidend (Rosen und MacDougald, 2006). Die Faktoren Ppar $\gamma$  und C/ebp $\alpha$  waren in den cKO-Kulturen deutlich erhöht. Sowohl die C/ebp- als auch die Ppar $\gamma$ -Aktivität werden über den kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg gesteuert.

Bennet et al. bewiesen mit ihren Versuchen, dass kanonisches Wnt10b im Knochenmark von Mäusen die trabekuläre Knochendichte und Festigkeit erhöht. Wnt10b wird in mesenchymalen

Progenitorzellen exprimiert und induziert wiederum die Expression der osteoblastischen Transkriptionsfaktoren Runx2, Dlx5 (*distal-less homebox 5*) und Osx. Gleichzeitig inhibiert es adipogene Transkriptionsfaktoren, wie C/ebp $\alpha$  und Ppar $\gamma$ . Transgene Mäuse, die Wnt10b im Knochenmark und Fettgewebe unter dem Fabp4 (*Ap2, fatty acid binding protein 4*)-Promoter produzieren, wiesen eine höhere Knochenmasse und -dichte auf und waren zudem resistent gegen eine Entmineralisierung bei Östrogenabfall im Alter und bei Diät-induzierter Adipositas (Bennett et al., 2005).

Für weitere Untersuchungen zur Rolle von Wnt10b in der Knochenentwicklung hat diese Arbeitsgruppe zusätzlich Mauslinien generiert, bei denen Wnt10b mit Hilfe des Osteokalzin-Promoters in reifen Osteoblasten ausgeschaltet wurde. Sie bestätigten ihre bisherigen Ergebnisse. Wnt10b stimulierte die Osteoblastenproliferation und Mineralisierung. Eine späte Ausschaltung hatte jedoch keinen Effekt auf die Präosteoblasten und die Osteoklastenaktivität. (Bennet et al., 2007). Der Verlust von Wnt10b *in vitro* verursachte eine Transdifferenzierung von Myozyten zu Adipozyten (Ross et al., 2000).

Eine weitere wegweisende Publikation kommt von Cawthorn et al. Sie zeigten, dass neben Wnt10b auch Wnt10a und Wnt6 in weißen Adipozyten (*in vivo* und *in vitro*) herunterreguliert sind. Besonders die *in vitro*-Ergebnisse zeigten eine bedeutende Rolle von Wnt6. Wnt6 beeinflusste, mehr noch als Wnt10a und Wnt10b die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Ein *Knockdown* dieses Gens bewirkte eine starke Zunahme der Adipozytendifferenzierung, während die Osteoblastogenese beeinträchtigt war. Weiterhin bewiesen sie, dass  $\beta$ -Catenin für den durch Wnt6 induzierten Signalweg unerlässlich ist (Cawthorn et al., 2012).

Ein Faktor, der neben Runx2 die osteoblastische Differenzierung einleitet, ist Wwtr1 (*WW domain containing transcription regulator 1*). Die Aktivierung dieses Proteins erfolgte u.a. durch die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1. Azzoli et al. kultivierten mesenchymale Stammzellen, in denen Wwtr1 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert wurde. Spezielle Färbungen zeigten eine eindeutige Zunahme an Adipozyten. In diesem Mechanismus diente Wwtr1 als Effektorprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs (Azzolin et al., 2012). In den Versuchsreihen dieser Arbeitsgruppe wurden keine Versuche zur Überexpression dieses Gens gezeigt. Nimmt man bei einer Überexpression den gegenteiligen Effekt an, dann könnte Wwtr1 die Osteoblastendifferenzierung verstärkt stimuliert und die Adipozytendifferenzierung inhibiert werden. In unserem Versuchsaufbau werden Cdc42-defiziente Präosteoblasten verwendet, wodurch eventuell die Aktivität von Wwtr1 gehemmt wird, was in einer erhöhten Adipozytenzahl resultieren könnte. Um auch diesem Gedanken weiter nachzugehen, müssten Analysen zur Expression dieses Gens und dessen Protein-Synthese untersucht werden.

Ebenfalls wird dem nicht-kanonischen Wnt5a eine bedeutende Rolle in der Determination von mesenchymalen Stammzellen zugeschrieben. Wnt5a führte zur Bildung eines Co-Repressor-Komplexes, der wiederum Ppar $\gamma$  inaktivierte. Der nicht-kanonische Signalweg schien somit die Ppar $\gamma$ -Funktion zu inhibieren und die Osteoblastogenese zu fördern (Takada et al., 2007b). In welchen Mechanismen Cdc42 beteiligt war, muss in weiteren Versuchen betrachtet werden.

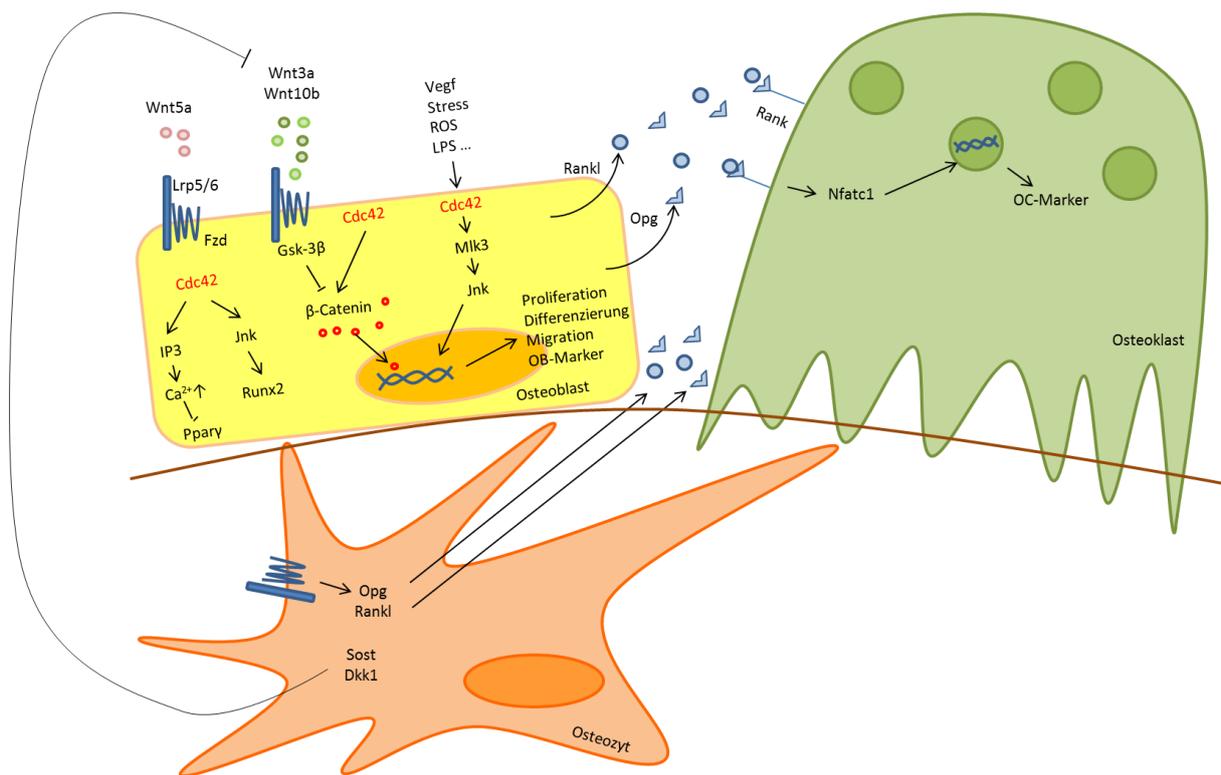
Savopoulos et al. beschreiben, dass es bei einer Transdifferenzierung zu einem Ungleichgewicht zwischen osteogenen und adipogenen Markern kommt. An diesem Prozess sind zahlreiche Faktoren beteiligt (Savopoulos et al., 2011; Takahashi, 2011). Den von uns untersuchten Faktoren Runx2 und Ppar $\gamma$  kommt eine außerordentliche Bedeutung zu. Beide Komponenten werden über die Wnt-Signalwege reguliert. Daher vermuteten wir eine Beteiligung der Cdc42-GTPase in diesen Kaskaden.

In den letzten Jahren wurde vermehrt Aufwand betrieben, um besonders die frühen Stadien der Adipogenese zu verstehen. Nishizuka et al. identifizierten TC10, eine Rho GTPase (Cdc42-Familie). Die Inhibierung der TCL/TC10 $\beta$ L-Expression in 3T3-L1-Zellen (Prädipozyten) verhinderte die zytoplasmatische Akkumulation von Triglyceriden und die Expression adipogener Gene (Imagawa et al., 1999; Nishizuka et al., 2003). So ergab sich eine weitere Theorie, der wir in weiteren Versuchen ebenfalls nachgehen müssen. Möglicherweise kann Cdc42 durch TCL/TC10 $\beta$ L (Rhoj) in genau diesem Mechanismus ersetzt werden.

#### 4.3.7 Bedeutung von Cdc42 für die Osteoblasten

Zusammenfassend gesehen spielte Cdc42 eine beträchtliche Rolle in allgemeinen Zellfunktionen, wie der Proliferation und Apoptose sowie auch bei speziellen Funktionen der Osteoblasten. Wie die Beteiligung der Rho GTPase in allgemeinen Funktionen aussieht, wird noch kontrovers diskutiert. Vermutlich ist die Wichtung der Beteiligung zelltypabhängig. Für die in unseren Versuchen verwendeten Osteoblasten konnte eine positive Wirkung von Cdc42 auf die Proliferation und Mitose beschrieben werden. Ein Verlust des Gens erhöhte hingegen die Apoptoserate dieser Zellen.

Wir konnten die Aussage treffen, dass Cdc42 eine bedeutende Rolle im Knochenaufbau und der Knochenentwicklung spielt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigten sich in Abwesenheit des Proteins Mineralisierungsdefizite. Da besonders die Wnt-Signalwege an diesen Prozessen beteiligt sind, wurde Cdc42 als Mediator betrachtet. In der Literatur existieren Hinweise aus verschiedenen Arbeitsgruppen, dass die Rho GTPase Cdc42 als Mediator in diesem Netzwerk mitwirkt. In der folgenden Abbildung 4.1 ist vereinfacht dargestellt, über welche Mechanismen Cdc42 die Knochenentwicklung mitbestimmt.



**Abb. 4.1: Übersichtsschema zur Funktion von Cdc42 beim Knochenumsatz.** Cdc42 ist im Wnt-Signalweg involviert. Es ist an der Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins beteiligt, was in der Genexpression wichtiger Osteoblastenmarker resultiert. Auch über andere Wege, wie z.B. den Jnk-Signalweg, werden diese Gene induziert. Gleichzeitig wirkt Cdc42 über  $IP_3$  hemmend auf die Bildung adipozytärer Marker wie Ppar $\gamma$ . Dieses Expressionsmuster in den Osteoblasten bestimmt die Funktion der Osteoklasten, sodass Cdc42 einen indirekten Einfluss auf diese Zellen ausübt. Dkk1 *dickkopf homolog 1*, Fzd *frizzled homolog*, Gsk-3 $\beta$  *glycogen synthase kinase 3 beta*,  $IP_3$  Inositoltriphosphat, Jnk *mitogen-activated protein kinase 8* (Mapk8), LPS Lipopolysaccharide, Lrp5/6 *low density lipoprotein receptor related protein 5,6*,  $MLK3$  *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11* (Map3k11), Nfatc1 *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1*, Opg Osteoprotegerin, Ppar $\gamma$  *peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$* , Rank/Rankl *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*, ROS reaktive Sauerstoffspezies, Runx2 *Runt-related transcription factor 2*, Sost *sclerostin*, Vegf *vascular endothelial growth factor*, Wnt5a,3a, 10b *wingless-type MMTV integration site family member 5a, 3a, 10b*. (die Skizze enthält u.a. auch Erkenntnisse von bereits genannten Forschungsgruppen, modifiziert nach Baron und Kneissel, 2013)

#### 4.4 Charakterisierung der Rac1-cKO-Osteoblasten

##### 4.4.1 Proliferation und Apoptose

Auch die Mäuse, bei denen Rac1 in Präosteoblasten ausgeschaltet wurde, litten an Minderwuchs. Dennoch unterschied sich ihr Phänotyp leicht von dem der Cdc42-cKO-Mäuse. Welche Fehlregulierung in diesem Fall dahinter steckte, sollte u.a. durch *in vitro*-Versuche mit isolierten Osteoblasten untersucht werden.

Rac1 ist an zahlreichen Zellprozessen beteiligt. Die Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose erfolgten mit frisch isolierten Präosteoblasten aus neugeborenen CT- und cKO-Mäusen.

Zu Bestimmung der Proliferationsrate wurden die isolierten Osteoblasten für fünf Tage kultiviert und zu Beginn, sowie am Ende des Experiments mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Unsere Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen CT- und cKO-Osteoblasten. Es war jedoch zu beobachten, dass die Proliferationsrate der cKO-Zellen tendenziell vermindert war. Die Vermutung einer erhöhten Apoptoserate der cKO-Osteoblasten bestätigte sich nicht. Durchflusszytometrisch konnte die Anzahl früh- und spätapoptotischer (Annexin V<sup>+</sup> bzw. Annexin V<sup>+</sup> und Propidiumiodid<sup>+</sup>) Zellen in der Kultur bestimmt werden. In beiden Versuchsgruppen war die Anzahl apoptotischer Zellen ähnlich. Es konnte aber eine tendenziell erhöhte Anzahl Annexin V<sup>+</sup>-Zellen in den cKO-Kulturen beobachtet werden. In Prostata-Krebszellen beispielsweise wurden die Rho GTPasen chemisch inhibiert, woraufhin die Zellmigration- und Proliferation sank und proapoptotische Moleküle induziert wurden (Zins et al., 2013).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass ein intaktes Zytoskelett Voraussetzung für eine erfolgreiche Mitose und Zytokinese ist. Für eine weitere aussagefähige Charakterisierung der cKO-Osteoblasten wäre eine Aktin-Tubulin-Färbung nötig. Mit diesen Ergebnissen kann die Beschaffenheit des Zytoskeletts näher betrachtet werden. Ebenso bieten sich Untersuchungen zum Zellzyklus an.

Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten eine Rolle von Rac1 im Zellzyklus. Der Verlust von Rac1 in fibroblastischen Zellen der Ratte führte zu einem G<sub>2</sub>/M-Phase-Arrest (Moore et al., 1997). Zudem zeigte sich, dass sich Rac1 im Nukleus während der späten G<sub>2</sub>-Phase anreicherte (Michaelson et al., 2008). In der Arbeit von Yan et al. wird dokumentiert, dass Rac1 eine essentielle Rolle im G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt spielt, wodurch das Zellüberleben gesichert wurde (Yan et al., 2012). Geht man von diesen Ereignissen auch in den isolierten Osteoblasten aus, so könnten diese Erkenntnisse die geringere Zellzahl nach Rac1-Ausschaltung *in vitro* erklären.

Es wäre noch zu prüfen, ob und welche Mechanismen *in vivo* zur Beibehaltung der Stabilität der Proliferationsrate beitragen. Ein weiterer Ansatzpunkt könnte die Detektion homologer, verwandter Proteine sein, die in der Lage sind Fehlregulierungen partiell zu kompensieren. In Frage kommen Rac2, Rac3 und RacG. Diese Faktoren wirken vorwiegend in anderen Geweben, könnten aber durch das Rac1-Defizit auch in Osteoblasten aktiv werden (Croke et al., 2011).

#### 4.4.2 In Abwesenheit von Rac1 ist die Funktion der Osteoblasten gestört

Die Ausschaltung von Rac1 in frühen Stadien der Osteoblastenentwicklung führte *in vitro* zu einer verminderten Bildung hydroxyapatithaltiger Knoten. Frisch isolierte Osteoblasten beider Versuchsgruppen wurden über drei Wochen mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium behandelt. Mit Hilfe der von Kossa-Färbung konnten die mineralisierten Knoten besser sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung ergab, dass die mineralisierte Fläche in den cKO-Kulturen um 80% vermindert war, verglichen mit den CT-Kulturen. Die Mineralisierung war demzufolge stark durch die reduzierte Rac1-Synthese beeinträchtigt.

Wieder interessierte uns, ob die Co-Kultur mit Wildtyp-Knochenmark eine verbesserte Mineralisierung durch cKO-Osteoblasten erreicht werden konnte. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass das Defizit durch äußere Faktoren nicht kompensiert wurde. Die mineralisierte Fläche in den cKO-Kulturen betrug weiterhin nur etwa 25% der der CT-Kulturen.

Analysen zum Expressionsmuster essentieller Differenzierungsgene sollten Hinweise zum Startpunkt der Fehlregulierung bei Rac1-Ausschaltung liefern. Mittels qPCR wurden die Expression von u.a. Runx2, Alkalischer Phosphatase (Alp) und Osteokalzin untersucht. Die Expression des späten Osteoblastenmarkers Osteokalzin war in cKO-Zellen deutlich vermindert. Die Expression der frühen Marker Runx2 und Alp blieb hingegen unverändert.

Wie auch nach Cdc42-Ausschaltung war die Aktivität der Alp in Rac1-cKO-Osteoblasten um 21% reduziert. Somit konnte auch für Rac1 eine Beteiligung in einem frühen bis mittleren Differenzierungsstadium postuliert werden. Da auch die Osteokalzin-Expression herunterreguliert war, war ebenfalls eine Rolle von Rac1 in der späten Osteoblastendifferenzierung zu vermuten. Gesicherte Aussagen können jedoch erst nach Untersuchungen auf Proteinebene gemacht werden.

Ursprünglich wurden Bmp (*bone morphogenic proteins*) als Induktoren der Knochenbildung identifiziert (Wozney et al., 1988). Über eine Signalkaskade aktivieren sie Smad-Proteine. Diese translozieren in phosphorylierter Form in den Nukleus, um die Transkription verschiedener Zielgene, u.a. Alp, Runx2 und Osteokalzin, zu regulieren (Miyazono, 2002). Bisher wurde gezeigt, dass die Funktion der Bmp durch die kleine GTPase RhoA und die Rho Kinase ROCK moduliert wird (Yoshikawa et al., 2009). Onishi et al. beobachteten, dass bei Rac1-Inhibierung in C2C12-Zellen, die Osteoblastendifferenzierung Bmp-2-abhängig ablaufen kann. Es kam trotz Rac1-Ausschaltung zu einer Alp-, Runx2- und Osteokalzin-Expression. In dem besagten Modell induzierte Bmp-2 die osteoblastische Differenzierung über den Smad-Signalweg. Gleichzeitig aber konnte Bmp-2 Rac1-vermittelt die Differenzierung knochenbildender Zellen supprimieren. Im Gegensatz zu RhoA hatte Rac1 keinen Effekt auf die Phosphorylierung der Smad-Proteine (Onishi et al., 2013). Somit könnte

Bmp-2 in unserem Modell Rac1-unabhängig essentielle Differenzierungsmarker induzieren und zur Defizitkompensierung beitragen.

Als wichtigster Signalweg in der Osteoblastendifferenzierung gilt der Wnt-Signalweg. Da Rac1 ebenfalls in diese Signalkaskaden involviert ist, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eine Rac1-Abwesenheit ursächlich für die Defizite der Knochenentwicklung war.

#### 4.4.3 Die Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten beeinträchtigt die Knochenentwicklung

*In vivo* stellte sich der Verlust von Rac1 in einem verminderten Knochenwachstum und verminderter Knochendichte dar. Mit Hilfe von Röntgenaufnahmen der CT- und cKO-Mäuse konnten Struktur und Form der Knochen verglichen werden. Die langen Knochen (Humerus, Ulna, Femur und Tibia) wurden vermessen. Das Längenwachstum war bei den cKO-Mäusen deutlich reduziert. Die Körperproportionen blieben aber unverändert.

In den Röntgenaufnahmen fiel zudem auf, dass die Knochen der cKO-Mäuse kontrastärmer erschienen und Zug- und Drucktrabekel nur schwach ausgeprägt waren, was auf eine geringe Knochendichte hindeutete. Zur Bestätigung dieser Beobachtungen wurden Knochendichtemessungen an den Femura der CT- und cKO-Mäuse *ex vivo* vorgenommen. Die Gesamtknochendichte (Kortex und Spongiosa) der Femura der cKO-Tiere war im Mittel um 17,1% verringert. Die Rac1-Ausschaltung hatte auf die kortikale Knochendichte eine weniger starke Auswirkung. Die Spongiosaregion unterlag einer starken Knochenremodellierung, sodass sich die Mineralisierungsprobleme besonders in diesem Bereich auswirkten.

Im Anschluss wurden die Tibiae beider Versuchsgruppen histomorphometrisch ausgewertet. Die bisherigen Ergebnisse konnten nach dem Ausmessen der Knochenfläche bestätigt werden. Die Trabekelfläche war in den drei Wochen alten cKO-Mäusen um 40% geringer als in gleichaltrigen CT-Mäusen.

Die Ursachensuche für die geringe Knochenfläche gestaltete sich sehr schwierig. Die Anzahl der Osteoblasten pro Osteoidfläche, sowie der Anteil der Osteoidfläche an der Knochenoberfläche wichen nicht von den ermittelten Werten der CT-Mäuse ab. Ebenso verhielt es sich für die Osteoklasten und ihre Erosionsfläche. Eine erhöhte Aktivität der knochenabbauenden Zellen konnte in cKO-Mäusen nicht beobachtet werden. Wie auch bei den Cdc42-cKO-Tieren, war die Knochenbildungsrate signifikant erhöht. Gleichzeitig waren die Dauer von Matrixablagerung bis zur Mineralisierung, sowie die Osteoidreifungszeit verkürzt. Diese Daten wiesen auf eine erhöhte Osteoblastenaktivität hin. Möglicherweise stellte dieser Prozess einen Kompensationsmechanismus dar. Aufgrund der raschen Matrixablagerung und Mineralisierung war das Ergebnis mangelhaft. Wie

bereits in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, ist eine geordnete und organisierte Kollagenablagerung wichtig für eine optimale Einlagerung anorganischer Ionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphat. Auch hier bietet sich die Untersuchung zur Matrixzusammensetzung und –ablagerung an.

#### 4.4.4 Die Ausschaltung von Rac1 in Präosteoblasten hat eine vermehrte Adipozytendifferenzierung zur Folge

Bei der genauen Betrachtung der Knochenschnitte der cKO-Mäuse fiel die hohe Zahl an Adipozyten im Knochenmark auf. Die quantitative Auswertung zeigte einen 3,4-fachen Anstieg der Adipozyten im Knochenmark der cKO-Tiere, verglichen mit den CT-Tieren.

Zur Bestätigung der Beobachtung wurden frisch isolierte Präosteoblasten beider Versuchsgruppen über einen Zeitraum von drei Wochen mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium behandelt. Am Ende des Versuchs wurden die Adipozyten mit der Oil Red O-Färbung sichtbar gemacht. Auch hier kam es zu einer verstärkten Bildung von Adipozyten in den cKO-Kulturen. Es konnte ein 2,6-facher Anstieg detektiert werden. Parallel wurden wichtige Adipozyten-Differenzierungsmarker auf mRNA-Ebene untersucht. Die frühen Differenzierungsgene Ppar $\gamma$ , C/ebp $\alpha$  und C/ebp $\beta$  waren in den cKO-Kulturen deutlich hochreguliert. Ein Marker für reife Adipozyten ist Ap2. Dieser Faktor zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Während der drei wöchigen Differenzierungsphase konnten erste Adipozyten nach etwa 1,5 Wochen beobachtet werden. Möglicherweise war die Reifungszeit der Fettzellen noch nicht abgeschlossen, sodass die Expression später Adipozytendifferenzierungsgene schwankte.

In einem weiteren Teilversuch wurde der Einfluss von Wildtyp-Knochenmark auf die CT- bzw. cKO-Osteoblasten untersucht. Anders als in den Cdc42-cKO-Co-Kulturen bewirkte das WT-Knochenmark eine Reduktion der Adipozytenbildung in den Rac1-cKO-Co-Kulturen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Substanzen Knochenmarkszellen (Blutvorläuferzellen, mesenchymale Stammzellen, Stromazellen) abgegeben wurden, die diese Entwicklung inhibierten. In weiteren Experimenten könnte die Wirksamkeit dieses konditionierten Mediums durch Addition auf reine cKO-Osteoblastenkulturen untersucht werden. Neben der Analyse des konditionierten Mediums wären auch *in vivo*-Versuche interessant. Um den Einfluss des Knochenmarks auf Osteoblasten zu studieren würden sich Transplantationsversuche, wie sie im Cdc42-Projekt beschrieben wurden, anbieten. So könnte das Knochenmark von drei Wochen alten CT- bzw. cKO-Mäusen in subletal bestrahlte WT-Mäuse über die laterale Schwanzvene injiziert werden. Interessanter wäre in diesem Fall jedoch die Variante, WT-Knochenmark in junge CT- bzw. cKO-Mäuse zu transplantieren. Entsprechend den *in vitro*-Versuchen, könnte das Knochenmark eine kompensatorische Rolle spielen und die

Adipozytenbildung hemmen. Welchen Einfluss dies wiederum auf mesenchymale Stammzellen oder Präosteoblasten hätte, müsste untersucht werden. Da Rac1 eine bedeutende Rolle in der Osteoblastenentwicklung und –funktion spielt, ist denkbar, dass bei einem Verlust dieser Rho GTPase der Knochenaufbau nicht merklich steigt.

Ein Problem stellt die frühe Sterblichkeit (etwa vier Wochen postnatal) der Rac1-cKO-Mäuse dar. Wie in Abschnitt 3.3.2. beschrieben erscheint die Rac1-cKO-Gruppe eher heterogen. Ein geringer Teil der cKO-Mäuse konnte das Erwachsenenalter erreichen. Die genaue Ursache hierfür ist bisher unbekannt. Eventuell ist es auf die geringe Ausschaltung (etwa 37%) zurückzuführen. Diese cKO-Mäuse könnten die subletale Bestrahlung und anschließende Transplantation von WT-Knochenmark überstehen. Eine Regenerationszeit von mehreren Monaten wäre aber vermutlich nicht möglich.

Wie bereits erwähnt wird hauptsächlich über den Wnt-Signalweg reguliert, welche Entwicklungsrichtung die mesenchymalen Stammzellen einschlagen. Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit Mediatoren dieser Kaskaden. Es wurde dargelegt, dass die Beteiligung von Rac1 am nicht-kanonischen Signalweg eine Schlüsselrolle einnimmt (Eaton et al., 1996, Habas et al., 2001 und 2003, Ishida-Takagishi et al., 2012). Eine Ausschaltung der Rho GTPase in Osteoblasten bewirkt ähnliche Effekte, wie es für heterozygote Wnt5a-cKO-Mäuse beschrieben ist: verminderte Osteoblastogenese, begleitet von einer erhöhten Adipogenese im Knochenmark. Normalerweise ist Wnt5a im Knochenmark von Mäusen hochexprimiert und wirkt als Repressor für den Adipozytendifferenzierungsmarker Ppar $\gamma$ . Takada et al. beschrieben außerdem eine Transdifferenzierung von Adipozytenprogenitoren zu osteoblastischen Zellen durch Wnt5a. Sie zeigten eine inhibierende Wirkung für die Ppar $\gamma$ -vermittelte Expression weiterer Adipozytenmarker, wie Ap2 (Takada et al., 2007a).

#### 4.4.5 Defizite, die durch den Verlust von Rac1 entstehen, können teilweise durch Parathormon kompensiert werden

Parathormon (PTH) wird pharmakologisch zum Knochenaufbau eingesetzt. Es wirkt effektiv bei der Behandlung von Osteoporose. Je nach Behandlungsmethode hat es einen anabolen oder katabolen Effekt. Eine intermittierende Gabe, so wie es in unserem Versuchsaufbau erfolgte, führt vor allem zum Knochenaufbau. Dieser Aufbau wird erreicht durch eine erhöhte Proliferationsrate der Osteoblastenprogenitoren, verminderte Apoptose und Reaktivierung der *bone-lining* Zellen zur Matrixsynthese (Jilka, 2007; Kim et al., 2012).

Aus diesem Grund wurden in einem Vorversuch frisch isolierte Präosteoblasten aus CT- und cKO-Mäusen für 24h mit PTH behandelt. Bereits diese kurze Inkubationszeit veränderte das

Expressionsmuster der Zellen deutlich. Wie erwartet war die Expression der Alkalischen Phosphatase in der CT-Kultur deutlich hochreguliert. Auch in den cKO-Kulturen war ein tendenzieller Anstieg zu verzeichnen. Weiterhin wurde die Expression von *Wisp1*, *Sost* und *Opg* untersucht (s.u.).

In unserem Versuchsaufbau sollten nun drei Wochen alte CT- und cKO-Mäuse mit PTH bzw. Vehikel (10mM Essigsäure mit 2% inaktiviertem Mausserum) über einen Zeitraum von vier Wochen behandelt werden.

Um Veränderungen der Knochendichten zu dokumentieren, wurden die Femura der Mäuse vor und nach dem Experiment *in vivo* gemessen. Interessanterweise verhielten sich die PTH-behandelten CT- und cKO-Mäuse sehr ähnlich. Die prozentuale Knochendichtezunahme zwischen CT (Vehikel) vs. CT (PTH) und cKO (Vehikel) vs. cKO (PTH) war gleich. In beiden Fällen lag die Zunahme der Knochendichte bei etwa 17%.

Innerhalb der vier Wochen wiesen die Vehikel-behandelten CT- und cKO-Mäuse einen Knochendichtezuwachs von 17% auf und die PTH-behandelten CT- und cKO-Mäuse einen Zuwachs von 33%. Allerdings erreichten die cKO-Mäuse nie das Niveau der gleichbehandelten CT-Mäuse.

Die histomorphometrischen Analysen ergaben einen signifikanten Anstieg an Osteoblasten in CT- und cKO-Mäusen nach PTH-Applikation. Die Zunahme der cKO-Osteoblasten übertraf sogar die der CT-Osteoblasten um das zweifache. Die gesteigerte Proliferation führte auch zur Vergrößerung der Knochenoberfläche. Die Spongiosafläche war in beiden Versuchsgruppen vergrößert, zahlreiche Trabekel wurden gebildet.

Es ist bekannt, dass PTH die Sekretion der Wnt-Antagonisten *Sost* (Sklerostin) und *Dkk1* durch Osteozyten blockt (Baron und Kneissel, 2013). In unseren *in vitro*-Versuchen konnte ebenso gezeigt werden, dass die Expression von *Sost* durch PTH nicht ansteigt. Hingegen wurde *Wisp1*, ein Mediator des Wnt-Signalwegs und Induktor osteoblastenspezifischer Gene, durch PTH in den CT- und cKO-Kulturen hochreguliert.

Gleichzeitig war die mineralisierte Fläche pro Knochenoberfläche in beiden Gruppen nach PTH-Behandlung vermindert. Möglicherweise waren durch die massive Matrixablagerung und Mineralisierung der Vorrat und die Aufnahme von anorganischen Ionen mit der Nahrung limitierend. Zudem stimulieren die Osteoblasten auch knochenabbauende Zellen, um ein Gleichgewicht in der Knochenremodellierung zu wahren.

Indirekt wirkt PTH positiv (über Rank/Rankl/Opg-System) auf die Osteoklastenentwicklung. Dieser Effekt zeigte sich deutlich beim Vergleich der sieben Wochen alten Mäuse, denen Vehikel bzw. PTH appliziert wurde. Vehikel-behandelte cKO-Tiere steigerten in dieser Zeit ihre Osteoklastenbildung. Trotz PTH-Behandlung blieben diese Werte konstant. Neben der erhöhten Anzahl knochenabbauender Zellen bei Vehikel-behandelten cKO-Mäusen unterschieden sich auch die

Ergebnisse der mRNA-Expression für Opg in den cKO-Mäusen von denen der CT-Mäuse. Opg, welches von Osteoblasten sezerniert wird und die Rank/Rankl-Interaktion unterbindet, war in den cKO-Tieren nach Vehikel- bzw. PTH-Gabe gleichbleibend hoch. Diese Situation würde die Osteoklastenentwicklung vermindern. Da die Zellzahl jedoch unverändert blieb, stellte sich die Frage, ob die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten beeinträchtigt war. Um diese Vermutung begründen zu können, müssen weitere Moleküle, wie Rank, Rankl und M-CSF auf ihre Präsenz und Wirkung geprüft werden.

Sowohl für PTH als auch für Rac1 ist die Beteiligung an den Wnt-Signalwegen beschrieben (Bergensstock und Partridge, 2007). Mit Hilfe weiterer Experimente kann der Überlegung einer PTH-induzierten Rac1-unabhängigen Kaskade, die die Osteogenese zur Folge hat, nachgegangen werden.

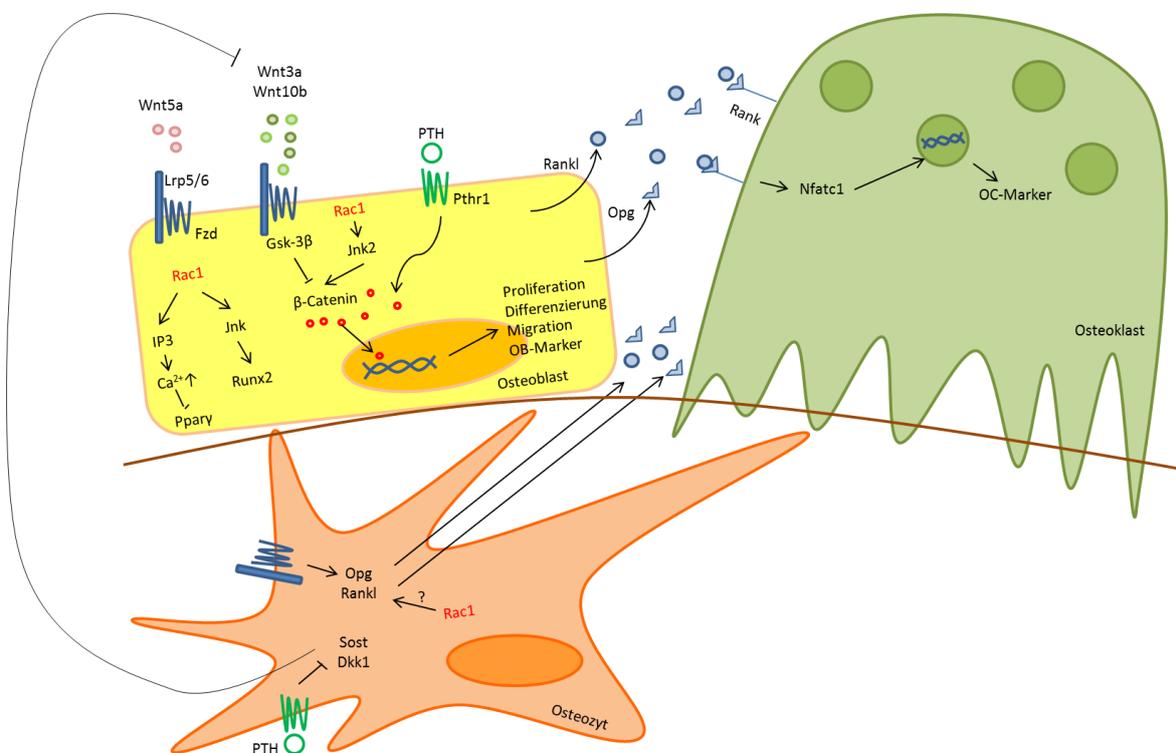
In unserem Versuchsaufbau wurden drei Wochen alte CT- und cKO-Mäuse verwendet. Das durchschnittliche Lebensalter der Rac1-cKO-Mäuse betrug vier Wochen. Wie eingangs erwähnt, war die Ausprägung des Phänotyps heterogen. Mäuse, deren Minderwuchs weniger stark ausgeprägt war, was verbunden war mit einer längeren Lebenserwartung, wurden für diese Versuche ausgewählt. Die genaue Ursache für den frühen Tod der cKO-Mäuse konnte nicht vollkommen geklärt werden.

Osteoblasten sind an der Bildung hämatopoetischer Stammzellnischen im Knochenmark beteiligt (Chesier et al., 1999; Schofield, 1978). Diese Nischen befinden sich vornehmlich in der Trabekelregion. So kann eine eingeschränkte Osteoblastenfunktion auch negativ auf die Hämatopoese wirken. Durch regelmäßige Applikation von PTH wurde die Trabekelregion der cKO-Mäuse deutlich vergrößert und dichter. Die erhöhte Osteoblastenaktivität könnte somit stimulierend auf die Hämatopoese wirken, was sich positiv auf die Lebenserwartung auswirkt. Mittels Durchflusszytometrie kann der Anteil ruhender und aktiver hämatopoetischer Stammzellen bestimmt werden. Diese Ergebnisse könnten durch Differenzialblutbilder ergänzt werden.

#### 4.4.6 Bedeutung von Rac1 für den Knochenumsatz

Rac1 greift in allgemeine, wie auch spezielle Zellprozesse der Osteoblasten ein. *In vivo* zeigten sich in cKO-Osteoblasten keine auffälligen Proliferationsstörungen. Jedoch waren Defizite in der Mineralisierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu beobachten. Offensichtlich waren Signalkaskaden, die in der Synthese von Differenzierungsmarkern und Matrixbestandteilen münden, durch den Verlust von Rac1 in Präosteoblasten beeinträchtigt. Da die Wnt-Signalwege die Hauptwege darstellen, die zum Knochenaufbau führen und bereits eine Beteiligung für Rac1 darin beschrieben wurde, werden Fehlregulationen in diesen Kaskaden vermutet. Rac1 kann über den kanonischen

Wnt-Signalweg wirken, in dem es  $\beta$ -Catenin stabilisiert.  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern, wo es zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren osteoblastenspezifische Gene aktiviert. Ebenso beeinflusst Rac1 den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, worüber z.B. Jnk-abhängig Runx2 gebildet wird. Unter normalen physiologischen Bedingungen und Abwesenheit von Rac1 in Osteoblasten, kam es zu deutlichen Funktionsstörungen der Zellen. Mit der Addition von Parathormon konnte die Mineralisierungsfähigkeit auf ein Kontrollniveau gesteigert werden. Gleichzeitig hätte die Applikation eine Zunahme der Osteoklastenzahl zur Folge, was aber ausblieb. Dieses Ergebnis deutete auf eine Beteiligung von Rac1 in der Kommunikation zwischen knochenauf- und abbauenden Zellen hin. Da unsere Ergebnisse ein verändertes Expressionsmuster für Opg hervorbrachten, bestand die Möglichkeit eines Einflusses von Rac1 auf das Opg/Rank/Rankl-System.



**Abb. 4.2: Übersichtsschema zur Funktion von Rac1 beim Knochenumsatz.** Rac1 ist im kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg involviert. Es ist an der Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins beteiligt, was in der Genexpression wichtiger Osteoblastenmarker resultiert. Weiterhin wirkt es über Jnk und  $IP_3$  stimulierend auf weitere osteoblastenspezifische Gene und hemmend auf adipozytäre Gene. Zusätzlich wird eine Funktion von Rac1 bei der Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, die das Rank/Rankl/Opg-System beinhaltet, vermutet. Dkk1 *dickkopf homolog 1*, Fzd *frizzled homolog*, Gsk-3 $\beta$  *glycogen synthase kinase 3 beta*,  $IP_3$  *Inositoltriphosphat*, Jnk2 *mitogen-activated protein kinase 9 (Mapk9)*, Lrp5/6 *low density lipoprotein receptor related protein 5,6*, *Map3k11*, Nfatc1 *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1*, Opg *Osteoprotegerin*, Ppar $\gamma$  *peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$* , PTH *Parathormon*, Pthr1 *parathyroid hormone 1 receptor*, Rank/Rankl *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*, Runx2 *Runt-related transcription factor 2*, Sost *sclerostin*, Wnt5a,3a, 10b *wingless-type MMTV integration site family member 5a, 3a, 10b*. (die Skizze enthält u.a. auch Erkenntnisse von bereits genannten Forschungsgruppen, modifiziert nach Baron und Kneissel, 2013)

#### **4.5 Charakterisierung der Cdc42/Rac1-cKO-Osteoblasten**

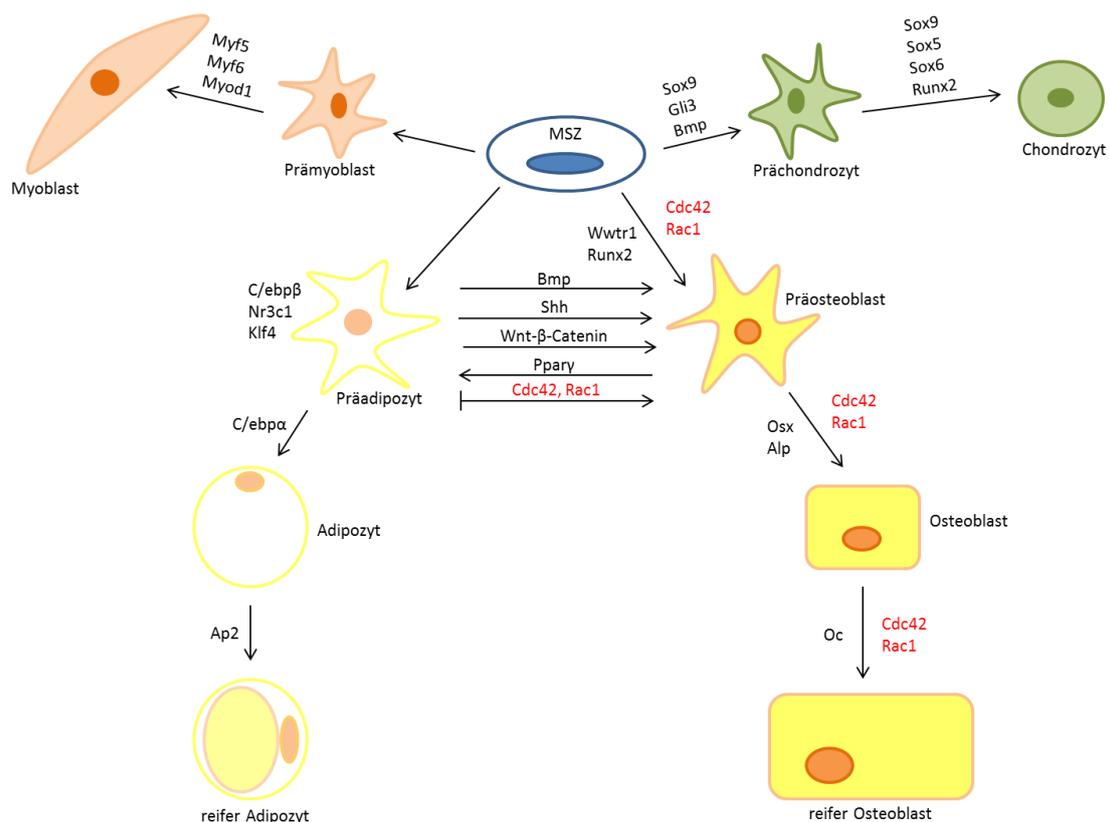
Um zu verstehen, in welcher Beziehung die untersuchten Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 stehen, wurden Doppel-cKO-Mäuse generiert. Wieder entstand eine Mauslinie die einen deutlichen Minderwuchs aufwies. Die cKO-Mäuse starben im Durchschnitt vier Wochen postnatal.

Phänotypisch betrachtet glichen die Cdc42/Rac1-cKO-Tiere eher den Cdc42-cKO-Tieren. Das betrifft sowohl den Körperbau, die Kopf- und Gesichtsform als auch die Femura der Mäuse. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigten sich in den Doppel-cKO-Gruppen Differenzierungs- bzw. Mineralisierungsdefizite der Osteoblasten. Wie auch in den Cdc42- und Rac1-Einzel-cKO-Tieren war die Knochendichte signifikant vermindert und in Kultur waren nur kleine Mineralisierungsherde zu beobachten. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass es hierbei nicht zu einer Addition der Symptome kommt und der Phänotyp nicht schwerwiegender erscheint. Es war also davon auszugehen, dass Cdc42- und Rac1-unabhängige Wege existieren, die einen Grundaufbau der Knochen gewährleisten. Zudem lag kein 100%iger Verlust des Proteins vor. Über diese Wege wurden osteoblastenspezifische Gene induziert, deren Expression sich nur geringfügig vom Normalzustand unterschied (Tab. 3.9). In der Literatur sind bisher keine Veröffentlichungen bekannt, in denen die Auswirkungen einer doppelten Ausschaltung dieser Gene beschrieben wurden. Interessant war die Tatsache, dass die Doppel-cKO-Mäuse eine sehr große Ähnlichkeit zu den Cdc42-cKO-Mäusen aufwiesen. Diese Erkenntnis deutete darauf hin, dass Cdc42 auf die Knochenentwicklung eine übergeordnete Rolle gegenüber Rac1 spielt. Diese Aussage muss jedoch vorsichtig betrachtet werden. Hierzu müssen weitere Experimente erfolgen. Interessant wären PTH-Applikationen in Cdc42-Einzel-cKO und doppel-cKO-Mäusen. Dafür ist jedoch ein abgewandelter Versuchsaufbau nötig, da die Überlebenszeit dieser Versuchstiergruppen stark eingeschränkt ist.

Der Verlust von Cdc42 hatte unseren Experimenten zufolge gravierende Auswirkungen auf die Knochenentstehung. Besonders in der frühen Osteoblastenentwicklung war Cdc42 notwendig. Ist diese Zellentwicklung fehlerhaft, so sind auch Funktion und alle darauffolgenden Prozesse beeinträchtigt. Für Rac1 konnte ebenso eine frühe Beteiligung in der Osteoblastendifferenzierung beschrieben werden. Möglicherweise übernahm diese Rho GTPase die führende Rolle in späteren Entwicklungsstadien, zu denen auch die Kommunikation zwischen knochenauf- und abbauenden Zellen zählt. Sowohl die Ausschaltung von Cdc42 als auch von Rac1 führte zu einer verminderten Aktivität der Alkalischen Phosphatase, hervorgerufen durch einen Mangel an diesem Enzym. Eventuell war dieses Stadium der Osteoblastenentwicklung durch die Aktivität beider Rho GTPasen geprägt. Es muss außerdem beachtet werden, dass die Ausschaltung von Cdc42 in Präosteoblasten effizienter war.

Es gab auch deutliche Unterschiede zwischen den Einzel- und Doppel-cKO-Mäusen. Im Knochenmark der Cdc42/Rac1-cKO-Mäuse glich die Zahl der Adipozyten der der CT-Tiere. Die Abwesenheit der beiden Proteine führte demnach nicht zu einer Transdifferenzierung von (Prä-) Osteoblasten zu Adipozyten. Auch der Differenzierungsmarker Ppar $\gamma$  war auf mRNA-Ebene nicht erhöht. Welcher Mechanismus zu diesem Resultat führte, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Wie bei den Einzel-cKO-Mäusen vermutet, könnten Isoformen beider Rho GTPasen stimuliert werden, um Entwicklungsdefekte der Knochen zu kompensieren. Wie eingangs beschrieben, existieren Isoformen, die gleiche oder ähnliche Funktionen haben wie die von uns untersuchten Rho GTPasen Cdc42 und Rac1. Diese Isoformen sind auch durch spezifische Aktivatoren stimulierbar und könnten somit Wirkungen entfalten, die in unseren Experimenten zum Tragen kommen könnten.

Abbildung 4.3 fasst die wichtigsten Einsatzstellen der der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 zusammen. Das Übersichtsbild soll zeigen, dass die Proteine in jedem Stadium der Osteoblastenentwicklung wirken. Sie fördern die Differenzierung knochenaufbauender Zellen aus mesenchymalen Stammzellen und unterdrücken gleichzeitig die Entwicklung anderer Zelllinien.



**Abb. 4.3: Einfluss von Cdc42 und Rac1 im osteoblastischen Differenzierungsweg.** Das Übersichtsbild zeigt die möglichen Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen. Der Fokus liegt auf der Osteoblastenentwicklung. Cdc42 und Rac1 werden sowohl in frühen als auch späten Stadien der Entwicklung benötigt. Sie fördern die Reifung dieser Zellen, indem sie als Mediatoren osteoblastenspezifische Gene induzieren und die Expression von Genen, die u.a. für die Adipozytenbildung gebraucht werden, hemmen. (Modifiziert nach Takada et al., 2009).

#### **4.6 Ausblick**

In unseren Versuchsreihen wurde erstmals die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 in Osteoblasten untersucht. Die Generierung von Einzel- und Doppel-Knockouts ermöglichte die Untersuchung zur Bedeutung der Rho GTPasen in Präosteoblasten. Der Verlust der Rho GTPasen hatte enorme Auswirkungen auf die Entwicklung der langen und platten Knochen der Versuchstiere. In meiner Dissertation steht die Charakterisierung der Osteoblasten hinsichtlich ihrer Differenzierung und Funktion im Vordergrund. Die Abwesenheit der Rho GTPasen führte zu Fehlregulierungen und Funktionsausfällen in den knochenbildenden Zellen. Die kombinierte Ausschaltung der Gene brachte aber auch andere nennenswerte Ergebnisse hervor. Als wichtigstes Beispiel dafür ist die gleiche Adipozytenanzahl im Knochenmark von CT- und cKO-Mäusen zu nennen. Mit diesem Hintergrund können zudem Untersuchungen zur Dominanz oder Interaktion dieser Proteine angestellt werden. Welche Mechanismen genau durch die Abwesenheit der Rho GTPasen gestört sind, muss geklärt werden. Von besonderer Bedeutung ist es, den Wnt-Signalweg und seine Mediatoren sowie die Effektormoleküle der Rho GTPasen zu untersuchen, um die Angriffspunkte von Cdc42 und Rac1 zu identifizieren. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Isoformen die Rolle der fehlenden Rho GTPasen partiell übernehmen können.

Fortführend wären auch Untersuchungen die Knochenmatrix betreffend interessant. Fragen zur Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, zur Kollagenstruktur und zu Problemen beim Übergang von Geflechtknochen zu Lamellenknochen wären zu klären. Eventuell geben auch Blutuntersuchungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt weiteren Aufschluss zur Knochenmineralisierung.

Die Ergebnisse warfen eine Reihe weiterer Fragen auf. So könnte der Einfluss des Knochenmarks auf die Osteoblasten näher untersucht werden. Das wäre besonders für das Rac1-Projekt wichtig, da die Co-Kultivierung von cKO-Osteoblasten mit Wildtyp-Knochenmark eine verminderte Adipozytendifferenzierung hervorbrachte. Ebenso stellt sich die Frage, warum der gleichzeitige Verlust von Cdc42 und Rac1 in Präosteoblasten keine vermehrte Adipozytendifferenzierung zur Folge hat.

Zur Erweiterung der bisherigen Ergebnisse könnten Cdc42 und Rac1 mit Hilfe des Col-Promoters (2,3kb  $\alpha_1(I)$  Kollagen-Promoter) ausgeschaltet werden. Dieser Promoter führt zu einer stringenten Expression der Cre-Rekombinase in reifen Osteoblasten und Osteozyten (Chung et al., 2006). Somit kann auch die Rolle der Rho GTPasen in reifen Osteoblasten untersucht werden.

Um die Rolle von Cdc42 und Rac1 in Osteoblasten besser verstehen zu können, sind weitere Experimente durchzuführen. Die vorliegende Abhandlung gibt erste interessante Hinweise auf die nähere Bedeutung der Rho GTPasen während der Knochenentwicklung.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

In der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 in der Knochenentwicklung dargestellt. Grundsätzlich gilt, dass beide Proteine für eine normale Knochenentwicklung notwendig sind.

Für beide Rho GTPasen sind Funktionen in Zellprozessen, wie der Proliferation, Migration, Polarisierung und Signalübertragung beschrieben. Wie sich ein Verlust eines dieser Gene auf Osteoblasten und die Ossifikation auswirkt, sollte untersucht werden. Hierfür verwendeten wir ein Mausmodell, in dem Cdc42 und/oder Rac1 mit Hilfe des *Osx* (Osterix)-Promoters ausgeschaltet wurde. Da der Promoter in der frühen Osteoblastenentwicklung aktiv ist, sind die Rho GTPasen bereits in Präosteoblasten nicht mehr vorhanden.

Durch die Ausschaltung einer bzw. beider Gene ergab sich ein sehr interessanter Phänotyp. Die konditionellen Knockout (cKO)-Mäuse sind wesentlich kleiner als ihre gleichaltrigen Artgenossen. Ein Großteil der cKO-Tiere starb bereits vier Wochen postnatal. Aus diesem Grund wurden alle Experimente mit drei Wochen alten Mäusen durchgeführt.

Um die Ursachen für den Minderwuchs der cKO-Tiere zu verstehen, wurden die Knochen zunächst genau untersucht. Knochendichtemessungen ergaben deutliche Verminderungen in allen cKO-Gruppen. Histomorphometrische Analysen zeigten, dass die Ausbildung der sekundären Spongiosa stark beeinträchtigt ist. Bei allen cKO-Mäusen war dies auf eine reduzierte Mineralisierungsfähigkeit der Osteoblasten zurückzuführen, bei den Cdc42-cKO-Mäusen wurde zudem eine geringere Osteoblastenzahl und erhöhte Apoptoserate festgestellt. *In vitro*-Versuche mit isolierten Präosteoblasten aus den Calvariae der cKO- und CT (Kontroll)-Tiere bestätigten diese Ergebnisse.

Weiterhin beobachteten wir, dass die Cdc42- und Rac1-cKO-Mäuse eine erhöhte Adipozytenzahl im Knochenmark aufwiesen, verglichen mit dem der CT-Tiere. Adipozyten leiten sich wie Osteoblasten von mesenchymalen Stammzellen ab. Da sich dieses Bild sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigte, postulierten wir eine Transdifferenzierung von Präosteoblasten zu Adipozyten. Eine wesentliche Beteiligung des Knochenmarks an diesem Prozess konnten wir durch Co-Kulturen und Transplantationsexperimente ausschließen. Vermutlich sind die Rho GTPasen an wichtigen Signalwegen beteiligt, die die osteogene Entwicklung fördern und die Differenzierung der mesenchymaler Stammzellen in eine andere Richtung unterbinden. Durch den Verlust eines der Faktoren scheint diese Kaskade gestört zu werden.

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

**A**arden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994): Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55(3):287-299.

Akiyama T, Kawasaki Y (2006): Wnt signaling and actin cytoskeleton. *Oncogene* 25(57):7538-7544.

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H (2004): PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113(6):846-855.

Altiock S, Xu M, Spiegelman BM (1997): PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* 11(5):1987-1998.

Anderson HC (1989): Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60:320-330.

Anderson HC, Reynolds JJ (1973): Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Dev Biol* 34(2):211-227.

Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S (2012): Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling. *Cell* 151(7):1443-1456.

**B**agrodia S, cerione RA (1999): Pak tot he future. *Trends Cell Biol* 9(9):350-355.

Baksh D, Boland GM, Tuan RS (2007): Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 101(5):1109-1024.

Baron R, Hesse E (2012): Update on Bone Anabolics in Osteoporosis Treatment: Rationale, Current Status, and Perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 97(2):311-325.

Baron R, Kneissel M (2013): WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19(2):179-192.

Bellido T, Saini V, Pajevic PD (2012): Effects of PTH on osteocyte function. *Bone* 54(2):250-257.

Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA (2005): Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9):3324-3329.

Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, gerin I, Sousa KM, Lane TF, Krishnan V, Henkenson KD, MacDougald OA (2007): Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22(12):1924-1932.

Bergenstock MK, Partridge NC (2007): Parathyroid hormone stimulation of noncanonical Wnt signaling in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1116:354-359.

- Bersenev A (2001): Experimental bone marrow transplantation 101. Hematopoietic (Stem Cell Assays, online).
- Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ (1946): A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164:321-329.
- Bishop AL, Hall A (2000): Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348(2):241-255.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH (2002): Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 364:329-341.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M (2006): Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 44(4):215-230.
- Bodine PV (2008): Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Res* 18(2):248-253.
- Bonewald LF (2007): Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 1116:281-290.
- Bu W, Lim KB, Yu YH, Chou AM, Sudhaharan T, Ahmed S (2010): Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS One* 5(8):e12153.
- Cardigan KM, Peifer M (2009): Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(2):a002881.
- Carpenter TO, Moltz KC, Ellis B, Andreoli M, McCarthy TL, Centrella M, Bryan D, Grundberg CM (1998): Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and Hyp mice. *Endocrinology* 139(1):35-43.
- Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G, MacDougald OA (2012): Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism. *Bone* 50(2):477-489.
- Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG (2005): Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* 95(3):518-528.
- Chadee DN, Kyriakis JM (2004): MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol* 6(8):770-776.
- Chang L, Adams RD, Saltiel AR (2002): The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(20):12835-12840.
- Chechier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999): In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3120-3125.
- Chen T, Zhang P, Fan W, Qian F, Pei L, Xu S, Zou Z, Ni B, Zhang Y (2014): Co-transplantation with mesenchymal stem cells expressing a SDF-1/HOXB4 fusion protein markedly improves hematopoietic stem cell engraftment and hematogenesis in irradiated mice. *Am J Transl Res* 6(6):691-702.

Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD (1989): Differentiation- induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* 3(9):1323-1335.

Chung DJ, Castro CH, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szenjfeld VL, Willecke K, Theis M, Civitelli R (2006): Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci* 119(20):4187-4198

Cory GO, Cramer R, Blanchoin L, Ridley AJ (2003): Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell* 11(5):1229-1239.

Croke M, Ross FP, Korhonen M, Williams DA, Zou W, Teitelbaum SL (2011): Rac deletion in osteoclasts causes severe osteopetrosis. *J Cell Sci* 124(22):3811-3821.

Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R, Rottner K, Brakebusch C (2005): Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell* 16(10):4473-4484.

**D**acquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G (2002): Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 224(2):245-251.

Di Cunto F, Imarisio S, Hirsch E, Broccoli V, Bulfone A, Migheli A, Atzori C, Turco E, Triolo R, Dotto GP, Silengo L, Altruda F (2000): Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron* 18(1):115-127.

Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R (1989): rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* 264(28):16378-16382.

Dobnig H, Turner RT (1995): Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of the bone lining cells. *Endocrinology* 136:3632-3638.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-754.

Duran-Struuck R, Dysko RC (2009): Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandary care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48(1):11-22.

**E**aton S, Wepf R, Simons K (1996): Roles for Rac1 and Cdc42 in planar and hair outgrowth in the wing of *Drosophila*. *J Cell Biol* 135(5):1277-1289.

Etienne-Manneville S, Hall A (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629-635.

Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Collard JG (2000): Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* 36(10):1269-1274.

**F**ahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F (2013): Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 50(5):345-348.

Ferron M, Lacombe J (2014): Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys* 561:137-146.

French DM, Kaul RJ, D'Souza AL, Crwoly CW, Bao M, Frantz GD, Filvaroff EH, Desnoyers L (2004): WISP-1 Is an Osteoblastic regulator Expressed During Skeletal Development and Fracture Repair. *Am J Pathol* 165(3):855-867.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3(4):393-403.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5):267-274.

Fukata M, Kuroda S, Nakagawa M, Kawajiri A, Itoh N, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Fajisawa H, Kikuchi A, Kaibuchi K (1999): Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem* 274(37):26044-26050.

Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S (2005): Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* 20(12):2245-2253.

**G**e C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT (2007): Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol* 176(5):709-718.

Geletu M, Guy S, Arulanadam R, Faracciz H, Raptis L (2013): Engaged for survival: From cadherin ligation to STAT3 activation. *JAK-STAT* 2(4):e27363.

Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo NM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G (2005): Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8(5):751-764.

Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarina M, Bertonecello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I (1999): Cathepsin L knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralisation. *J Bone Miner Res* 14(10):1654-1663.

Greenblatt MB, Shim JH, Zou W, Sitara D, Schweitzer M, Hu D, Lotinun S, Sano Y, Baron R, Park JM, Arthur S, Xie M, Schneider MD, Zhai B, Gygi S, Davis R, Glimcher LH (2010): The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone in mice. *J Clin Invest* 120(7):2457-2473.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998): Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* 78(3):783-809.

**H**abas R, Kato Y, He X (2001): Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107:843-854.

- Habas R, Dawid IB, He X (2003): Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17(2):295-309.
- Habener JF, Kronenberg HM (1978): Parathyroid hormone biosynthesis: structure and function of biosynthetic precursors. *Fed Proc* 37(12):3561-2566.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006): Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-396.
- Hall BK (1987): Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin Orthop Relat Res* 225:255-272.
- Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennström S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M et al. (1995): PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositol 3-kinase. *Curr Biol* 5(4):393-403.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer 9. Auflage: S.204f.
- Hock JM, Gera I (1992): Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 7(1):65-72
- Imagawa M, Tsuchiya T, Nishihara T (1999): Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 254(2):299-305.
- Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, Hashimoto T, Kato T, Wenig L, Matsumoto S, Asai M, Murakumo Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Takahashi M (2012): The Dishevelled-associated protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat Commun* 3:859
- Ito Y, Teitelbaum SL, Zou W, Theng Y, Johnson JF, Chappel J, Ross FP, Zhao H (2010): Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulation RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization. *J Clin Invest* 120(6):1981-1993.
- Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A (2008): Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 183(4):625-633.
- Jenny A (2010): Planar cell polarity signaling in the Drosophila eye. *Curr Top Dev Biol* 93:189-227
- Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS (2003): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem* 278(26):23270-7.
- Jilka RL (2007): Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40(6):1434-1446.
- Johnson DI, Pringle JR (1990): Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111(1):143-152.

- K**arsenty G (2001): Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* 142(7):2731-2733.
- Karsenty G (2008): Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Human Genet* 9:183-196.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24(5):1294-1301.
- Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, Baek WY, Kim JE, Kronenberg HM (2012): Intermittent PTH administration converts quiescent lining cells to activate osteoblasts. *J Bone Miner Res* 27(10):2075-2084.
- Kjoller L, Hall A (1999): Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253(1):166-179.
- Kohn AD, Moon RT (2005): Wnt and calcium signaling: beta-cateinin-independent pathways. *Cell Calcium* 38(3-4):439-446.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-764.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Morony S, Oliveira-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM (1999): OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397(6717):315-323.
- Kostenuik PJ, Shalhoub V (2001): Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 7(8):613-635.
- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000): The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16(7):279-283.
- L**ambe KG, Tugwood JD (1996): A human peroxysome-proliferation-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidindione drugs. *Eur J Biochem* 239(1):1-7.
- Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Capallo-Obermann H, Eggert K, Gehling UM, Rudolph C, Schlegelberger B, Cornils K, Zustin J, Spiess AN, Zander AR (2011): Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS One* 6(1):e14468.
- Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC (2000): Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20(23):8783-8792.
- Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lozinun S, Baron R, Ferrara N, Olsen BR (2012): Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *JCI* 122(9):3101-3113.

Long F (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(1):27-38.

Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012): Taschenlehrbuch Histologie. Thieme 4. Auflage: S. 164, 168

**M**ackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2007): Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *IJBVB* 40:46-62.

Maes C, Goossens S, Bartunkova S, Drogat B, Coenegrachts L, Stockmans I, Moermans K, Nyabi O, Haigh K, Naessens M, Haenebalcke L, Tuckermann JP, Tjwa M, Carmeliet P, Mandic V, David JP, Behrens A, Nagy A, Carmeliet G, Haigh JJ (2010): Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J* 29(2):424-441.

Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE (1999): Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 74(4):616-627.

Malliri A, Collard JG (2003): Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 15(5):583-589.

Maltais LJ, Blake JA, Eppig JT, Davisson MT (1997): Rules and guidelines for mouse gene nomenclature: a condensed version. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Genomics* 45(2):471-476.

Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T (2009): JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 24(3):398-410.

Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R, Kondo T, Endo I, Kido S (2012): Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J* 59(2):91-101.

McCarthy TL, Ji C, Chen Y, Kim KK, Imagawa M, Ito Y, Centrella M (2000): Runt Domain Factor (Runx)-dependent Effects on CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\delta$  Expression and Activity in Osteoblasts. *JBC* 275(28):21746-21753.

McGee-Lawrence ME, Ryan CZ, Carpio LR, Kakar S, Westendorf JJ, Kumar R (2013): Sclerostin Deficient Mice Rapidly Heal Bone Defects by Activating  $\beta$ -Catenin and Increasing Intramembranous Ossification. *Biochem Biophys Res Commun* 441(4): 886-890.

Michaelson D, Abidi W, Guardavaccaro D, Zhou M, Ahearn I, Pagano M, Philips MR (2008): Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division. *J Cell Biol* 181(3):485-496.

Miyazono K (2002): A new partner for inhibitory Smads. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(1):7-9.

Montagnani A (2014): Bone anabolics in osteoporosis: Actuality and perspectives. *World J Orthop* 5(3):247-254.

Montanez E, Piwko-Czuchra A, Bauer M, Li S, Yurchenco P, Fässler R (2007): Analysis of Integrin Functions in Peri-Implantation Embryos, Hematopoietic System, and Skin. *Methods Enzymol* 426:239-89.

Moore KA, Sethi R, Doanes AM, Johnson TM, Pracyk JB, Kirby M, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1997). Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *Biochem J* 326(1):17-20.

Morrison RF, Farmer SR (2000): Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 130(12):3116S-3121S.

Murphy GA, Solski PA, Jillian SA, Pérez de la Ossa P, D'Eustachio P, Der CJ, Rush MG (1999): Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* 18(26):3831-3845.

Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ (2009): Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66(2):236-253.

**N**akashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.

Nakashima K, Crombrughe B (2003): Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* 19(8):458-466.

Nishida S, Yamaguchi A, Tanizawa T, Enso N, Mashiba T, Uchiyama Y, Suda T, Yoshiki S, Takahashi HE (1994): Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *15(6):717-723.*

Nishizuka M, Arimoto E, Tsuchiya T, Nishihara T, Imagawa M (2003): Crucial role of TCL/TC10beta L, a subfamily of Rho GTPase, in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 278(17):15279-15284.

Nobes CD, Hall A (1995): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81(1):53-62.

**O**lson MF, Ashworth A, Hall A (1995): An Essential Role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression Through G1. *Science* 269:1270-1272.

Onishi M, Fujita Y, Yoshikawa H, Yamashita T (2013): Inhibition of Rac1 promotes BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis* 4:e698.

Orimo H (2010): The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77(1):4-12.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997): Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-771.

**P**airault J, Green H (1979): A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10):5138-5142.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610.

Pechak DG, Kujawa MJ, Caplan AI (1986): Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs. *Bone* 7(6):441-458.

Piekny A, Werner M, Glotzer M (2005): Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* 15(12):651-658.

Peters E, Boudin E, Van Hul W (2008): Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys* 473(2):112-116.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Morrman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.

**Q**uelch KJ, Melick RA, Bingham PJ, Mercuri SM (1983): Chemical composition of human bone. *Arch Oral Biol* 28(8):665-674.

**R**awadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003): BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by Wnt autocrine loop. *Bone* 33(10):1842-1853.

Richman TJ, Sawyer MM, Johnson DI (2002): *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot Cell* 1(3):458-468.

Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Apaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Williams DA (1999): Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* 10(2):183-196.

Rodan GA, Nado M (1991): Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1(2):85-98.

Roodman GD (1999): Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27(8):1229-1241.

Rosen ED, MacDougald OA (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12):885-896.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999): PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4(4):611-617.

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA (2000): Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 289(5481):950-953.

Rosert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B (1995): Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol* 129(5):1421-1432.

Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005): GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2):167-180.

Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH (2000): The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:459-489.

Sahai E, Marshall CJ (2002): RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2(2):133-142.

Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE (2004): Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004(1):24-34.

Savopoulos C, Dokos C, Kaiafa G, Hatzitolios A (2011): Adipogenesis and osteoblastogenesis: trans-differentiation in the pathophysiology of bone disorders. *Hippokratia* 15(1):18-21.

Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N (2009): Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 23:265-277.

Schmidt A, Hall A (2002): Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.

Shows TB, McAlpine PJ, Boucheix C, Collins FS, Conneally PM, Frézal J, Gershowitz H, Goodfellow PN, Hall JG, Issitt P, Jones CA, Knowles BB, Lewis M, McKusick VA, Meisler M, Morton NE, Rubenstein P, Schanfield MS, Schmickel RD, Skolnick MH, Spence MA, Sutherland GR, Traver M, Van Cong N, Willard HF, et al. (1987): Guidelines for human gene nomenclature. An international system for human gene nomenclature (ISGN, 1987). *Cytogenet Cell Genet* 46(1-4):11-28.

Sims NA, White CP, Sunn KL, Thomas GP, Drummond ML, Morrison NA, Eisman JA, Gardiner EM (1997): Human and murine osteocalcin gene expression: conserved tissue restricted expression and divergent responses to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in vivo. *Mol Endocrinol* 11(11):1698-1708.

Sims NA, Gooi JH (2008): Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 19(5):444-451.

Sinha KM, Zhou X (2012): Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem* 114(5):975-984.

Sinha P, Aarnisalo P, Chubb R, Ono N, Fulzele K, Selig M, Saeed H, Chen M, Weinstein LS, Pajevic PD, Kronenberg HM, Wu JY (2014): Loss of Gs $\alpha$  early in the osteoblast lineage favors adipogenic differentiation of mesenchymal progenitors and committed osteoblast precursors. *J Bone Miner Res* 29(11):2414-2426.

Sobh MA (2014): Adipogenesis of Sprague Dawely rats mesenchmal stem cells: a morphological, immunophenotyping and gene expression follow-up study. *Anat Cell Biol* 47(2):83-90.

Stains JP, Civitelli R (2005): Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75(1):72-80.

Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ (1995): Rapidly forming apatitic in an osteoblastic cell line. *J Biol Chem* 270(16):9420-9428.

Strutt DI, Weber U, Mlodzik M (1997): The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signaling. *Nature* 387(6630):292-295.

Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A, Katsuki M (1998): Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17(26):3427-3433.

Sul HS (2009): Minireview\_ Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* 23(11):1717-1725.

Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, Caverzasio J (2002): Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* 30(1):91-98.

**T**akada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S (2007a): A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9(11):1273-1285.

Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S (2007b): Suppression of PPAR Transactivation Switches Cell Fate of Bone Marrow Stem Cells from Adipocytes into Osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116:182-195.

Takada I, Kouzemenko AP, Kato S (2009): Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat rev Rheumatol* 5(8):442-447.

Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S (2012): A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9(11):1273-1285.

Takahashi T (2011): Overexpression of Runx2 and MKP-1 stimulates transdifferentiation of 3T3-L1 preadipocytes into bone-forming osteoblasts in vitro. *Calcif Tissue Int* 88(4):336-347.

Tam CS, Heersche JN, Murray TM, Parsons JA (1982): Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110(2):506-512.

Tang QQ, Lane MD (2012): Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715-736.

Tang SY, Alliston T (2013): Regulation of postnatal bone homeostasis by TGFβ. *Bonekey Rep* 2:255.

Teitelbaum SL (2000): Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 289(5484):1504-1508.

Teitelbaum SL, Ross FP (2003): Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev* 4(8):638-649.

Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR, Lassam NJ (1996): MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathway via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J* 15(24):7026-7035.

Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ (1996): CCAAT7enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev* 10(7):804-815.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Soiegelman BM (1994): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8(10):1224-1234.

**U**sdin TB, Wang T, Hoare SR, Mezey E, Palkovits M (2000): New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol* 21(4):349-383.

**V**alencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C (1991): The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30(19):4637-4648.

Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB (2002): Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 17(5):907-914.

**W**alsh MC, Choi Y (2014): Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 5(511):1-11.

Wang Y, Li YP, Paulson C, Shao JZ, Zhang X, Wu M, Chen W (2014): Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19:379-407.

Wennerberg K, Der CJ (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117(8):1301-1312.

Werner E (2004): GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 117(2):143-153.

Wimpenny DI, Moroz A (2007): On allosteric control model of bone turnover cycle containing osteocyte regulation loop. *Biosystems* 90(2):295-308.

Wojcicka A, Bassett JHD, Williams GR (2012): Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta* 1830(7):3979-3986.

Wong GL (1984): Paracrine interactions in bone-secreted products of osteoblasts permit osteoclasts to respond to parathyroid hormone. *J Biol Chem* 259(7):4019-4022.

Woods A, Wang G, Dupuis H, Shao Z, Beier F (2007): Rac1 signaling stimulates N-Cadherin expression, mesenchymal condensation, and chondrogenesis. *J Biol Chem* 282(32):23500-23508.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *242(4885):1528-1534.*

Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, koopman P (1995): The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9(1):15-20.

Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F (2008): Rac1 activation and subsequent  $\beta$ -Catenin phosphorylation controls nuclear localization of  $\beta$ -Catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133(2):340-353.

**Y**an Y, Greer PM, Cao PT, Kolb RH, Cowan KH (2012): RAC1 GTPase plays an important role in  $\gamma$ -irradiation induced G2/M checkpoint activation. *Breast Cancer Res* 14(2):R60.

Yang FC, Atkinson SJ, Gu Y, Borneo JB, Roberts AW, Zheng Y, Pennington J, Williams DA (2001): Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *PNAS* 98(10):5614-5618

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G (2004): ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117(3):387-398.

Yang L, Zheng Y (2007): Cdc42: a signal coordinator in hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Cycle* 6(12):1445-1450.

Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Terada Y, Ishizaki T, Narumiya S (2004): Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* 428(6984):767-771.

Yoshikawa H, Yoshioka K, Nakase T, Itoh K (2009): Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP-2 by Rho kinase inhibitor: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 467(12):3087-3095.

Yu K, Mo D, Wu M, Chen H, Chen L, Li M, Chen Y (2014): Activating transcription factor 4 regulates adipocyte differentiation via altering the coordinate expression of CCATT/enhancer binding protein  $\beta$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *FEBS J* 281(10):2399-2409.

**Z**ins K, Lucas T, Reichl P, Abraham D, Aharinejad S (2013): A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice. *PLoS One* 8(9):e74924.

Zou W, Greenblatt MB, Shim JH, Kant S, Zhai B, Lotinun S, Brady N, Hu DZ, Gygi SP, Baron R, Davis RJ, Jones D, Glimcher LH (2011): MLK3 regulates bone development downstream of the facio-genital dysplasia protein FGD1 in mice. *J Clin Invest* 121(11):4383-4392.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2):211-228.

## 7 ANHANG

## Anhang 1:

Tabelle 1A: Zusammenfassung untersuchter Faktoren

Protein	Beschreibung	Genlokalisierung		Funktion	Referenz
		human	murin		
ALP	<i>alkaline phosphatase</i>	Chr 1	Chr 4	Knochenentwicklung, endochondrale Ossifikation, Dephosphorylierung, Osteoblastendifferenzierung	Stanford et al., 1995 Orimo, 2010 Lüllmann-Rauch u. Paulsen, 2012
AP2 (FABP4)	<i>fatty acid binding protein 4</i>	Chr 8	Chr 3	Adipozytendifferenzierung	Gregoire et al., 1998
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>	Chr 1	Chr 4	Zytoskelett-Organisation, Zellpolarität, Proteinlokalisierung, Zell-Zell-Adhäsion-Migration, DNA-Replikation, Zytokine u.v.m	Cory et al., 2003 Bu et al., 2010 Jaffe et al., 2008
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/enhancer binding protein, alpha</i>	Chr 19	Chr 7	positive Regulation der Adipozyten- und Osteoblastendifferenzierung, Organentwicklung	Christy et al., 1989 Morrison u. Farmer, 2000
C/EBP $\beta$	<i>CCAAT/enhancer binding protein, beta</i>	Chr 20	Chr 2	positive Regulation der Adipozyten- und Osteoblastendifferenzierung, Immunantwort	Christy et al., 1989 Yu et al., 2014
DLK1 (PREF-1)	<i>delta-like 1 homolog</i>	Chr 14	Chr 12	Zellendifferenzierung, Notch-Signalweg	Sul, 2009
OC (BGLAP)	<i>osteocalcin</i>	Chr 1	Chr 3	Knochenentwicklung, Mineralisierung, Osteoblastendifferenzierung, Antwort auf Vit. D, K und Östrogen	Rodan u. Noda, 1991 Ferron u. Lacombe, 2014
OPG	<i>osteoprotegerin</i>	Chr 8	Chr 14	Skelettentwicklung, negative Regulation der Knochenresorption, Apoptose	Kostenuik u. Shalhoub, 2001
OSX	<i>Sp7 transcription factor</i>	Chr 12	Chr 15	Osteoblastendifferenzierung, Stammzellendifferenzierung	Sinha u. Zhou, 2012
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	Chr 3	Chr 6	Lipidhomöostase, Adipozytendifferenzierung, Cholesteroll- und Fettsäuretransport, Blutdruckregulation	Jeon et al., 2003 Akune et al., 2004 Rosen et al., 1999

RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	Chr 7	Chr 5	WNT-Signalweg, Knochenresorption, Zelladhäsion, Proliferation, Migration, Zytoskelett-Organisation, Apoptose	Michaelson et al., 2008 Wu et al., 2008 Fukuda et al., 2005 Schlessinger et al., 2009
RANK (TNFRSF11A)	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a</i>	Chr 18	Chr 1	Osteoklastendifferenzierung, Ossifikation, Proliferation	Walsh u. Choi, 2014 Kong et al., 1999
RANKL (TNFSF11)	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i>	Chr 13	Chr 14	Knochenresorption, Ca <sup>2+</sup> -Haushalt, Osteoklastendifferenzierung und -proliferation, Immunantwort	Walsh u. Choi, 2014 Ito et al., 2010 Kong et al., 1999
RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	Chr 6	Chr 17	Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung, endochondrale Ossifikation	McCarthy et al., 2000 Lee et al., 2000
SOST	<i>sclerostin</i>	Chr 17	Chr 11	Ossifikation, negative Regulation des WNT-Signalweg, negative Regulation des BMP ( <i>bone morphogenic protein</i> )-Signalwegs	McGee-Lawrence et al., 2013
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	Chr 6	Chr 17	Angiogenese, Zellantwort auf Hypoxie, Arterienmorphogenese, Endothelzell-Chemotaxis, Organentwicklung, Zelladhäsion, Proliferation, Migration	Liu et al., 2012 Maes et al., 2010
WISP1	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 1</i>	Chr 8	Chr 15	WNT-Signalweg, Zelladhäsion, Zellwachstum	French et al., 2004

## Anhang 2

Tabelle 2A: Sequenzen der verwendeten qPCR-Primer

Gen (murin)	fwd-Primer	rev-Primer	Probe
<i>Alpl</i>	cggatcctgaccaaaaacc	tcatgatgtccgtggtaaat	31
<i>Cdc42</i>	acaacaaacaaattcccatcg	ttgccctgcagtatcaaaaa	22
<i>C/ebp <math>\alpha</math></i>	gaccagaaagctgagttgtgag	ccacaaagcccagaaaccta	94
<i>C/ebp <math>\beta</math></i>	tgatgcaatccggatcaa	cacgtgtgttcgctcagtc	102
<i>Hprt</i>	tcctcctcagaccgctttt	cctggttcatcatcgctaattc	95
<i>Oc</i>	agactccggcgctactctt	ctcgtcacaagcagggttaag	32
<i>Opg</i>	atgaacaagtggctgtgctg	taggtgccaggagcacattt	17
<i>Ppar <math>\gamma</math></i>	gaaagacaacggacaaatcacc	gggggtgatatgtttgaacttg	7
<i>Rac1</i>	tcatgtgactaatgctgcctcta	agaacctcacagacccaag	21
<i>Runx2</i>	cagatgacatccccatccat	ggtggcagtgatcatcatctg	22
<i>Sost</i>	tcccagcccagtagagacc	agggtagaaagacccccatc	95
<i>Vegf-A</i>	gcagcttgagttaaacgaacg	ggttcccgaaccctgag	64
<i>Wispl</i>	tggacatccaactacacatcaag	aagttcgtggcctcctctg	76
<i>Ap2 (Fabp4)</i>	ggatggaaagtcgaccacaa	tggaaagtcacgcctttcata	31

\*Probe-Nummer wird von Roche (Mannheim) vergeben. Bei den Sonden (Probes) handelt es sich um kurze (8-9 Nukleotide) Sequenzen an deren 5' Ende ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3' Ende ein Quencher gebunden ist. Die Sonden binden spezifisch an die ausgewählten Gensequenzen. Taq DNA-Polymerasen verlängern die gebundenen Primer entsprechend der vorgegebenen DNA-Sequenz. Durch die 5'3'Exonuklease-Aktivität des Enzyms wird die die Sonde hydrolysiert. Im intakten Zustand der Sonde wird die Fluoreszenz des Farbstoffs supprimiert. Wird der Farbstoff jedoch freigesetzt, kann eine Fluoreszenz detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zum amplifizierten Produkt.

## Anhang 3

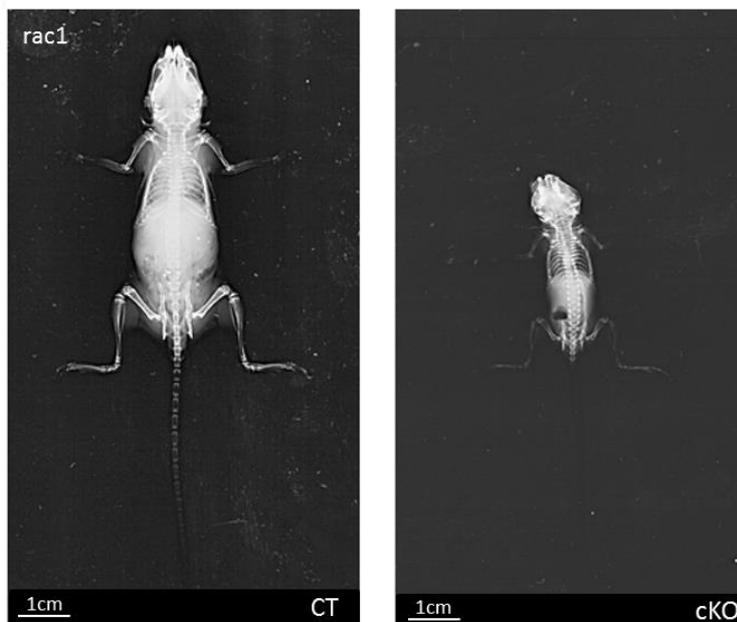
Tabelle 3A: verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Beschreibung	Verdünnung	Verwendung
Antikörper für Western Blot				
Cdc42(11A11)	Cell Signaling #2466	anti-Maus, aus Kaninchen, monoklonal, IgG	1:1000	Primär-AK Western Blot
Rac1	Millipore #07-1464	anti-Maus, aus Kaninchen, polyklonal	1:500	Primär-AK Western Blot
GAPDH	Sigma	anti-Maus, aus Kaninchen, polyklonal	1:10000	Primär-AK Western Blot
HRP	Dianova #111-035-045	anti-Kaninchen, aus Ziege	1:5000	Sekundär-AK Western Blot
Antikörper für Durchflusszytometrie				
Annexin V (Alexa 647)	Biologend #640911		1:100	Apoptose
CD5 (FITC)	Biologend #100605	Klon: 53-7.3	1:100	Lineage (HSZ)
CD11b (FITC)	Biologend #101205	Klon: M1/70	1:1600	Monozyten
CD16/32 (PE)	Biologend #101307	Klon: 93	1:100	HSZ
CD34 (Alexa 700)	Biologend	Klon: RAM34	1:50	HSZ
CD45 (APC-Cy7)	Biologend #103115	Klon: 30-F11	1:400	Leukozyten
CD45R (FITC)	Biologend #103205	Klon: RA3-6B2	1:200	Lineage (Leukozyten)
CD71 (PE-Cy7)	Biologend #113811	Klon: R17217	1:200	HSZ
CD117 (APC-Cy7)	Biologend #105825	Klon: 2B8	1:100	c-Kit (HSZ)
CD127 (APC)	Biologend #135011	Klon: A7R34	1:50	HSZ
Ly6G (FITC)	Biologend #108405	Klon: RB6-8C6	1:1600	Lineage (Granulozyten)
CD127 (APC)	Biologend #135011	Klon: A7R34	1:50	HSZ
Sca-1 (Pe-Cy7)	Biologend #122513	Klon: E13-161.7	1:200	HSZ / MSZ
Ter119 (FITC)	Biologend #116205	Klon: Ter-119	1:200	Erythroblasten

## Anhang 4



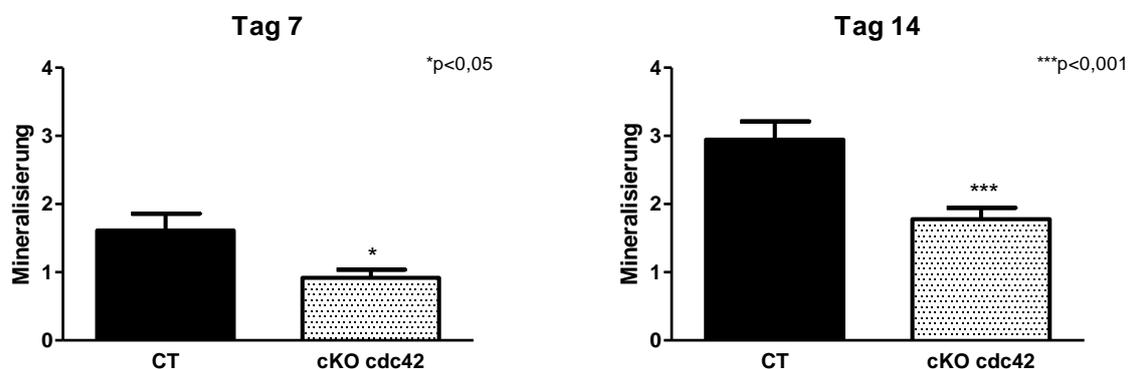
**Abb. 1A: Röntgenaufnahmen (Cdc42).** CT-Mäuse (links) und Cdc42-cKO-Mäuse (rechts).



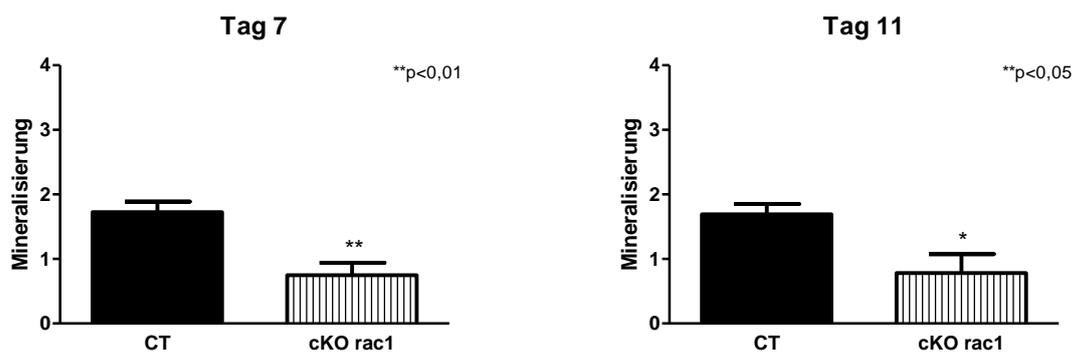
**Abb. 2A: Röntgenaufnahmen (Rac1).** CT-Mäuse (links) und Rac1-cKO-Mäuse (rechts).

## Anhang 5

## Cdc42: Beurteilung der Mineralisierung



## Rac1: Beurteilung der Mineralisierung



**Abb. 3A: Verlauf der Mineralisierung.** Schon im Verlauf der Differenzierungsphase zeigten die ausgeschalteten Osteoblasten eine weniger stark ausgeprägte Mineralisierung, verglichen mit den CT-Zellen. Dieser Unterschied bestand über den gesamten Beobachtungszeitraum und wurde am Ende des Versuchs mit Hilfe der von Kossa-Färbung und deren Auswertung bestätigt werden (CT, cKO: n=6)

## Anhang 6

Tabelle 4A: Cdc42, Co-Kulturen, Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO cdc42	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	4,763±3,107	5,155±3,158	0,876
<i>Alpl</i>	6,655±4,681	9,985±4,858	0,254
<i>Oc</i>	919,9±533,3	1681,0±1434,4	0,251
<i>Wisp1</i>	3,273±1,417	4,952±3,059	0,251
<i>Vegf</i>	1,691±0,933	3,130±1,642	0,092
<i>Sost</i>	0,991±0,613	0,895±0,547	0,780
<i>Opg</i>	12,232±8,061	18,998±9,109	0,203

CT, cKO: n=6; p=ns

Tabelle 4B: Cdc42, Co-Kulturen, Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO cdc42	Signifikanz p
<i>Pparγ</i>	86,559±58,948	128,533±66,941	0,276
<i>C/ebpa</i>	37,757±10,632	97,913±39,282	0,005**
<i>C/ebpβ</i>	0,768±0,122	0,858±0,147	0,272
<i>Ap2</i>	5,781±3,051	7,524±6,389	0,560

CT, cKO: n=6; \*\*p&lt;0,01

Tabelle 4C: Rac1, Co-Kulturen, Osteoblastenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	0,118±0,158	0,144±0,136	0,784
<i>Alpl</i>	0,026±0,022	0,038±0,015	0,282
<i>Oc</i>	10,619±9,488	3,408±3,169	0,108
<i>Wisp1</i>	0,002±0,003	0,004±0,001	0,351
<i>Vegf</i>	0,012±0,006	0,023±0,007	0,013*
<i>Sost</i>	0,007±0,006	0,003±0,004	0,303
<i>Opg</i>	12,957±11,162	6,186±4,095	0,193

CT, cKO: n=6; \*p&lt;0,05

Tabelle 4D: Rac1, Co-Kulturen, Adipozytenmarker (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Pparγ</i>	0,895±0,165	1,144±0,353	0,148
<i>C/ebpα</i>	0,142±0,047	0,216±0,140	0,251
<i>C/ebpβ</i>	1,153±0,475	2,045±0,620	0,019*
<i>Ap2</i>	12,957±11,162	6,186±4,098	0,193

CT, cKO: n=6; \*p&lt;0,05

## Anhang 7

Tabelle 5A: Cdc42, reine Osteoblastenkultur zu Adipozyten differenziert (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO cdc42	Signifikanz p
<i>Alpl</i>	0,01±0,001	0,01±0,001	0,914
<i>Oc</i>	0,025±0,005	0,039±0,008	0,195
<i>Wisp1</i>	0,026±0,007	0,025±0,004	0,947
<i>Pparγ</i>	0,235±0,027	0,183±0,02	0,156
<i>C/ebpα</i>	0,089±0,008	0,113±0,014	0,154
<i>C/ebpβ</i>	1,702±0,249	1,957±0,089	0,355
<i>Ap2</i>	0,419±0,023	0,356±0,016	0,042*

CT, cKO: n=6; \*p&lt;0,05

Tabelle 5B: Cdc42, Co-Kultur zu Adipozyten differenziert (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO cdc42	Signifikanz p
<i>Alpl</i>	0,012±0,034	0,14±0,038	0,630
<i>Oc</i>	0,03±0,007	0,054±0,012	0,326
<i>Wisp1</i>	0,058±0,019	0,078±0,012	0,385
<i>Pparγ</i>	0,222±0,029	0,31±0,062	0,236
<i>C/ebpa</i>	0,087±0,018	0,098±0,027	0,753
<i>C/ebpβ</i>	0,876±0,048	0,884±0,156	0,952
<i>Ap2</i>	0,612±0,074	0,762±0,21	0,542

CT, cKO: n=6; p=ns

Tabelle 5C: Rac1, reine Osteoblastenkultur zu Adipozyten differenziert (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	0,06±0,014	0,03±0,014	0,168
<i>Alpl</i>	0,018±0,004	0,012±0,001	0,116
<i>Oc</i>	0,031±0,006	0,011±0,002	0,008*
<i>Pparγ</i>	0,33±0,021	0,363±0,037	0,446
<i>C/ebpa</i>	0,103±0,015	0,090±0,011	0,501
<i>C/ebpβ</i>	1,166±0,204	0,595±0,065	0,03*
<i>Ap2</i>	0,404±0,044	0,492±0,051	0,221

CT, cKO: n=6; \*p&lt;0,05

Tabelle 5D: Rac1, Co-Kultur zu Adipozyten differenziert (relative mRNA-Expression, zu Hprt korrigiert)

Gen	CT	cKO rac1	Signifikanz p
<i>Runx2</i>	0,011±0,004	0,006±0,001	0,242
<i>Alpl</i>	0,011±0,002	0,011±0,005	0,996
<i>Oc</i>	0,023±0,009	0,009±0,001	0,152
<i>Pparγ</i>	0,1877±0,016	0,302±0,093	0,246
<i>C/ebpa</i>	0,2139±0,028	0,254±0,037	0,401
<i>C/ebpβ</i>	1,93±0,365	2,619±0,701	0,419
<i>Ap2</i>	0,601±0,095	0,461±0,046	0,189

CT, cKO: n=6; p=ns

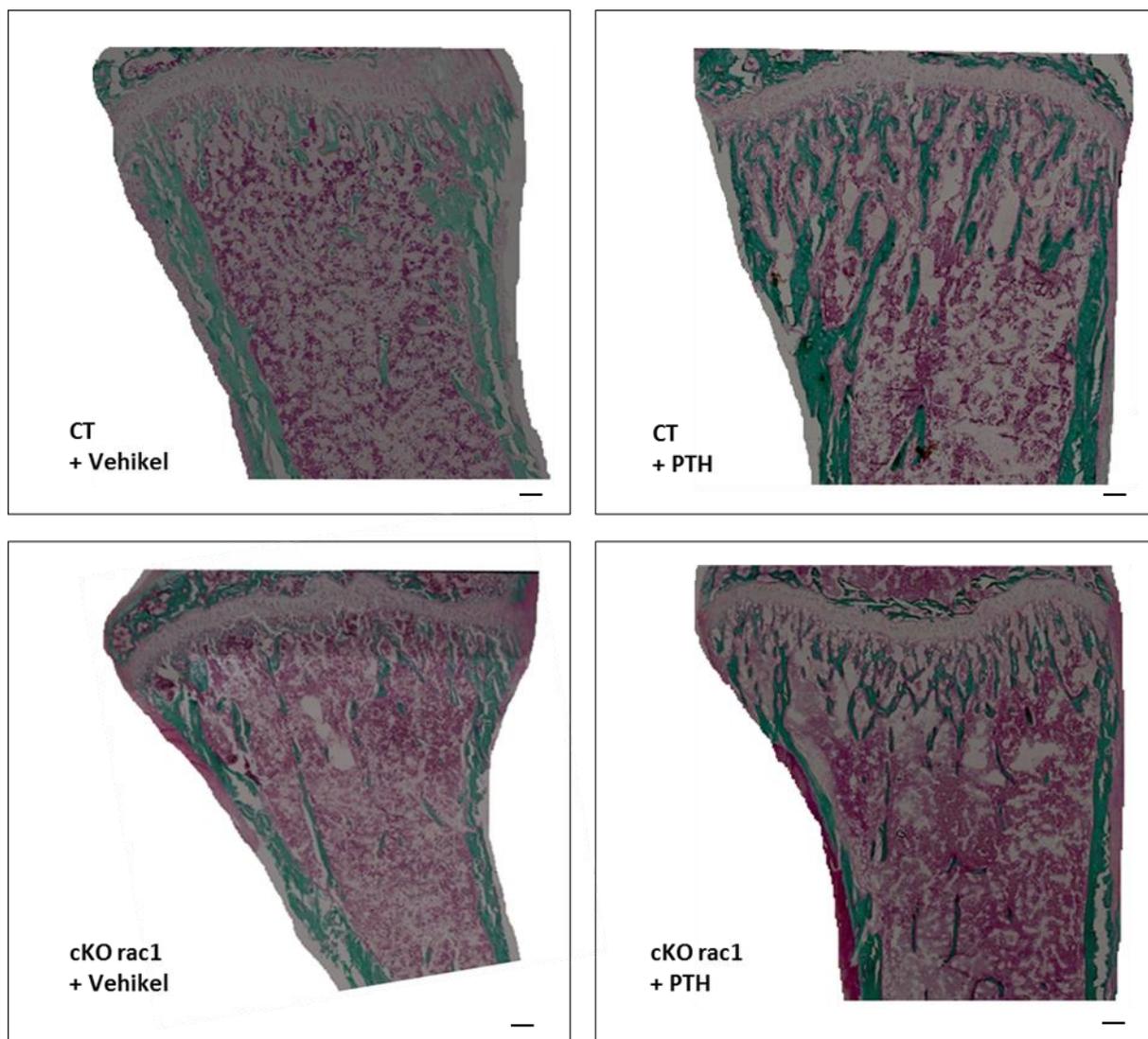
## Anhang 8

Tabelle 9A: vergleichende Übersicht der Knochendichten vor und nach PTH- bzw. Vehikel-Behandlung

Parameter	Knochendichte [mg/cm <sup>3</sup> ]	Knochendichtedifferenz [%]
CT vs. cKO vor Behandlung	351±37,2 vs. 303,1±52,2	- 13,6*
CT vs. cKO nach Vehikelbehandlung	430,1±35,5 vs. 377,3±68,2	-13,98***
CT vs. cKO nach PTH-Behandlung	524±73,2 vs. 456,2±76,7	-14,9***
CT (Vehikel) vs. CT (PTH)	430,1±35,5 vs. 524±73,2	17,9***
cKO (Vehikel) vs. cKO (PTH)	377,3±68,2 vs. 456,2±76,7	17,3***
CT (vor Behandlung) vs. CT (nach Vehikelbehandlung)	351±37,2 vs. 430,1±35,5	18,4***
CT (vor Behandlung) vs. CT (nach PTH-Behandlung)	351±37,2 vs. 524±73,2	33,01***
cKO (vor Behandlung) vs. cKO (nach Vehikelbehandlung)	303,1±52,2 vs. 377,3±68,2	19,7***
cKO (vor Behandlung) vs. cKO (nach PTH-Behandlung)	303,1±52,2 vs. 456,2±76,7	33,5***

CT Veh, cKO Veh, CT PTH, cKO PTH: n=12; \*p&lt;0,05; \*\*\*p&lt;0,001

## Anhang 9



**Abb. 6A: Knochenschnitte der Tibiae nach PTH- bzw. Vehikel-Behandlung (Masson-Goldner-Färbung).** Nach vier wöchiger Vehikel- bzw. PTH-Behandlung wurden die CT- und Rac1-cKO-Mäuse getötet, die Tibiae entnommen und die Knochenschnitte angefärbt. Nach PTH-Gabe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Knochenbildung in den CT- und cKO-Gruppen. Balken: 100µm



## **IV PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE**

### Publikationen

Altrock E, Sens C, **Wuerfel C**, Vasel M, Kawelke N, Dooley S, Sottile J, Nakchbandi IA (2014): Inhibition of fibronectin deposition improves experimental liver fibrosis. J Hepatol

**Wuerfel C**, Rau K, Sens C, Brakebusch C, Aszodi A, Nakchbandi IA: The Rho GTPases Cdc42 and Rac1 are involved in the communication between osteoblasts and adipocytes. (in Vorbereitung)

**Wuerfel C**, Jacobi C, Kaiser E, Schröder J: The fibronectin isoforms are involved in the process of neurodegeneration. (in Vorbereitung)

### Kongressbeiträge

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 03/2012 Vortrag | DGE, Mannheim<br>„Cdc42 kontrolliert die Osteoblastendifferenzierung“<br><b>Würfel C</b> , Aszodi A, Nakchbandi IA   |
| 03/2012 Vortrag | Osteologie, Basel<br>„Cdc42 ist für die Funktion von Osteoblasten unerlässlich“<br><b>Würfel C</b> , Aszodi A, Nakchbandi IA   |
| 09/2012 Poster  | Translationale Immunologie, Belgrad<br>“Cdc42 in osteoblasts modulates erythropoietic cell differentiation“<br><b>Würfel C</b> , Nakchbandi IA   |
| 03/2013 Poster  | Osteologie, Weimar<br>„Cdc42 reguliert die Osteoblastendifferenzierung und garantiert somit eine normale Knochenentwicklung“<br><b>Würfel C</b> , Nakchbandi IA<br>Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Osteologie (DGO) |
| 03/2013 Poster  | Osteologie, Weimar<br>„Rac1 reguliert die Osteoblastenfunktion, ohne die anabolische Wirkung des PTH zu beeinflussen“<br><b>Würfel C</b> , Sens C, Nakchbandi IA   |

- 03/2013 Vortrag Osteologie, Weimar  
„Die EDA-Isoform des Fibronektins stimuliert die Differenzierung von Osteoblasten über Rac-1 und  $\beta$ -Catenin“  
Sens C, **Würfel C**, Nakchbandi IA
- 10/2013 Poster ASBMR, Baltimore  
„The Presence of Either Cdc42 or Rac1 is required for the Crosstalk between Osteoblasts and Adipocytes“  
**Wuerfel C**, Sens C, Hoffmann C, Nakchbandi IA
- 10/2013 Poster ASBMR, Baltimore  
„Two Fibronectin Isoforms Exert Opposite Effects on Osteoblast Differentiation and Affect the Interaction of the Integrin-Wnt Signaling Cascades“  
Sens C, **Wuerfel C**, Nakchbandi IA
- 03/2014 Poster Osteologie, München  
„Die Rho GTPasen cdc42 und rac1 sind an der Kommunikation zwischen Osteoblasten und Adipozyten beteiligt“  
**Würfel C**, Sens C, Hoffmann C, Nakchbandi IA  
Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Osteologie (DGO)
- 03/2014 Vortrag Osteologie, München  
„Das Integrin  $\beta$ 3 ist ein wichtiger Regulator der Osteoblastendifferenzierung“  
Sens C, **Würfel C**, Bentmann A, Nakchbandi IA
- 03/2014 Vortrag Osteologie, München  
„Untersuchungen zu EDA-Fibronectin-vermittelten Signalkaskaden in Osteoblasten“  
Sens C, **Würfel C**, Nakchbandi IA

**V DANKSAGUNG**

*„Zusammenkommen ist ein Beginn,  
Zusammenbleiben ist ein Fortschritt,  
Zusammenarbeiten ist ein Erfolg“  
(Henry Ford)*

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Inaam Nakchbandi für die Vergabe des überaus interessanten Themas. Für die stets vorhandene Unterstützung, Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei allen aufkommenden Fragen bin ich ihr sehr dankbar. Ich habe mich von Anfang an in der Arbeitsgruppe außerordentlich wohl gefühlt und habe mir in dieser Zeit ein breitgefächertes Wissen aneignen können. Vielen Dank auch dafür, dass ich die Möglichkeit bekam, an Kongressen im In- und Ausland teilnehmen zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gary Sawers für die freundliche Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen. Ebenso seinem Interesse an diesem Thema, sowie den wertvollen Tipps zum Erstellen und Einreichen meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Martin Staeger. Er war bereit, das zweite Gutachten für meine Arbeit anzufertigen. Seine überaus kompetente Beratung bei fachlichen Fragen war für mich eine große Hilfe.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Kollegen Nina Kawelke, Matthäus Vassel, Anja von Au, Carla Sens, Sabrina Kraft, Stephanie Rosznagl, Eva Altmann, Katrin Rau und Verena Klemis. Wenn mir bei einigen Tätigkeiten das Herz bis zum Hals schlug, seid ihr immer als Retter eingesprungen. Ihr wart für mich nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die immer Ratschläge parat hatten und für die Erlaubnis zur Mitbenutzung von Reagenzien und Laborgeräten. Mein besonderer Dank gilt dabei Christiane Brenner, die mich nicht nur in fachlichen Fragen unterstützte.

Vielen Dank dem Labor Hänsch dafür, dass ich über den Zeitraum von mehreren Monaten das Mikroskop in ihrem Labor benutzen durfte.

Danke an das Tierhaus für die Betreuung der Mäuse.

Ein großer Dank geht an meine besten Freunde Dani, Micha, Martin und Cyrill, die immer für mich da waren. Ihr habt mich unterstützt, getröstet und wieder angefeuert, wenn ich mal nicht weiter wusste.

Am meisten danke ich meiner Familie. Ohne eure Hilfe wäre ich nie so weit gekommen. Danke für eure Unterstützung und euer Verständnis, das ihr mir all die Jahre entgegenbracht habt. Ich bin sehr glücklich, stets auf euch zählen zu können.

## VI LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Carina Würfel  
Geburtstag und -ort: 03.10.1985 in Sömmerda  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig  
Wohnsitz: Theodor-Heuss-Straße 31  
69221 Dossenheim

### Ausbildung

seit 10/2013 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

01/2010 – 10/2013 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Nakchbandi am Institut für Immunologie und Serologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Thema: „Die Rolle der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Knochenentwicklung“

10/2004 – 11/2009 Studium der Biologie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ch. Kramm

Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung der mesenchymalen-epithelialen Transition in humanen Gliomen“

1998 – 2004 Friedrich von Hardenberg - Gymnasium, Greußen

1996 – 1998 Albert Schweitzer - Gymnasium, Sömmerda

1994 – 1996 Grundschule, Kindelbrück

1992 – 1994 Grundschule, Günstedt

## **VII EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg, den

---

Carina Würfel