

**Aus der Experimentellen und Klinischen Osteologie
der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg**

Leiter: Professor Dr. med. Franz Jakob

Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

Die Rolle von Parathormon und Kollagenasen im Knochenumbau

Untersuchungen am Tiermodell

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Anja Widdermann, geb. Maier

aus Ellwangen (Jagst)

Würzburg, November 2004

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Eberhard Blind

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 2007

Die Promovendin ist Ärztin

meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Zusammensetzung des Knochens	1
1.1.1 Die Extrazelluläre Knochenmatrix	1
1.1.2 Die Knochen bildenden Zellen	2
1.1.3 Die Knochen resorbierenden Zellen und ihre Funktion	6
1.2 Knochenbildung und Knochenumbauvorgänge	10
1.2.1 Desmale Ossifikation	10
1.2.2 Chondrale Ossifikation	11
1.2.3 Knochenumbau	13
1.3 Die Regulation des Kalziumhaushalts	15
1.3.1 Vitamin D-Hormon	16
1.3.2 Kalzitonin	19
1.3.3 Parathormon (PTH), Parathormon related-peptide (PTHrP) und ihre Rezeptoren	19
1.3.4 Zusammenspiel der Kalzium regulierenden Hormone	22
1.4 Jansens Metaphysäre Chondrodysplasie – Krankheit und Tiermodell	23
1.4.1 Erbkrankheit des Menschen	23
1.4.2 Übertragung aufs Tiermodell (CL2)	25
1.5 Kollagenasen – Tiermodell mit Mutation in Kollagen I α 1	27
2. Fragestellung	29
3. Material	30
3.1 Mäusezucht/ Histologie	30
3.1.1 Tiere	30
3.1.2 Reagenzien	30
3.1.3 Geräte	30
3.1.4 Lösungen	31
3.2 Genotypisierung	31
3.2.1 Reagenzien	31
3.2.2 Geräte	31
3.2.3 Lösungen	32
3.3 Transformation und Plasmid-Präparation	32
3.3.1 Reagenzien	32
3.3.2 Geräte	33
3.3.3 Lösungen	33
3.4 In situ-Hybridisierung	33
3.4.1 Reagenzien	33
3.4.2 Geräte	34
3.4.2 Lösungen	34

4. Methoden	35
4.1 Mäusezucht und Auswahl der Experimentmäuse	35
4.2 Anfertigung der Gewebsschnitte/ Färbungen	36
4.3 Genotypisierung	38
4.3.1 DNA-Gewinnung und Extraktion	38
4.3.2 Herstellung der radioaktiv markierten Probe	38
4.3.3 Southern Blot	39
4.4 Transformation und Plasmid-Präparation	42
4.5 In situ-Hybridisierung	44
4.5.1 Herstellung der Riboprobe	44
4.5.2 Vorbehandlung vor der Hybridisierung	44
4.5.3 Hybridisierung	45
4.5.4 Post-Hybridisierung	45
4.5.5 Detektion des radioaktiven Signals	46
5. Ergebnisse	48
5.1 Genotypisierung	48
5.1.1 Southern Blot	48
5.1.2 Auswahl der Mäuse für die weiteren Experimente	49
5.1.3 Nachweis der Kollagenresistenz	50
5.2 Phänotyp der Mäuse (makroskopisch)	50
5.3 Darstellung des Knochenaufbaus in der H.E.-Färbung	53
5.3.1 Tibia	53
5.3.2 Knochen des Hinterfußes	54
5.3.3 Schädelknochen	63
5.3.4 Zähne	63
5.4 In situ-Hybridisierung	66
5.5 Histomorphometrie des Knochens	72
6. Diskussion	77
7. Zusammenfassung	89
8. Literaturverzeichnis	91

Danksagung

Lebenslauf

1. Einführung

1.1 Zusammensetzung des Knochens

Knochen wird zusammen mit Knorpelgewebe zum skelettbildenden Bindegewebe gezählt. Er übt im Organismus verschiedene Aufgaben aus: Durch Muskelansätze können mit seiner Hilfe Bewegungen ausgeführt werden, er schützt mit seiner festen Beschaffenheit die inneren Organe vor äußeren Einflüssen, und schließlich dient das Knochengewebe als Reservoir für Calcium- und Phosphationen, mit deren Hilfe die Homöostase aufrecht erhalten wird. Zwei Hauptbestandteile machen die Knochenstruktur aus: Die Knochenzellen und die Extrazelluläre Knochenmatrix.

1.1.1 Die Extrazelluläre Knochenmatrix

Organische (35%) und anorganische (65%) Substanzen bauen gemeinsam die Knochenmatrix auf. Zu den anorganischen Bestandteilen gehören an erster Stelle Hydroxylapatitkristalle, $(3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)(\text{OH})_2$, des weiteren finden sich Magnesium, Kalium, Chlor, Eisen und Karbonat. Die organischen Knochenanteile bestehen zu 90% aus Typ I-Kollagen, zu 10% aus nicht-kollagenartigen Proteinen, darunter mit abnehmendem Anteil Osteonectin, Osteocalcin, Sialoprotein, Phosphoproteine, Glykoproteine, Proteoglykane, Albumin und weitere Proteine, welche überwiegend von Knochenzellen synthetisiert werden (Gorski J.P., 1998).

Zu bestimmten Zeiten der Knochenbildung kommen zusätzlich Spuren von Typ III-, Typ V- und Typ X-Kollagen im Knochen vor (Baron R., 1999).

Typ I-Kollagen wird von Osteoblasten, Odontoblasten und Fibroblasten gebildet (Rossert J. et al., 2000). Es stellt ein Heterotrimer dar, welches aus zwei identischen α_1 -Ketten und einer genetisch verschiedenen α_2 -Kette aufgebaut ist. Die drei Ketten, überwiegend aus den Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin bestehend, lagern sich mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Trippelhelix zusammen (Petrides P.E., 1998). Durch die geordnete Zusammenlagerung der einzelnen Kollagenfaserbündel entsteht die typische Struktur des Lamellenknochens. Während der Knochenentwicklung und im Zuge der Knochenbruchheilung, also wenn neuer Knochen schnell gebildet werden muss, werden die einzelnen Kollagenfasern ohne die sonst übliche Orientierung nebeneinander gelagert. Dabei entsteht Geflechtknochen (Kadler K.E. et al., 1996).

Der Kollagenabbau erfolgt durch Kollagenasen, die aufgrund ihres Zink-Bestandteiles auch als Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnet werden. Sie werden unter anderem von Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen und Tumorzellen gebildet und als inaktive Proenzyme sezerniert. Die MMP-Expression wird durch verschiedenen Zytokine positiv und negativ kontrolliert. Die Proenzyme werden mit Hilfe von Proteasen (z.B. Plasmin) aktiviert, beziehungsweise durch spezifische Gewebsinhibitoren (specific tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) inhibiert (Ries C., Petrides P.E., 1995).

Die aktivierten MMPs spalten das Kollagenmolekül in zwei Fragmente, welche durch weitere proteolytische Enzyme abgebaut werden.

1.1.2 Die Knochen bildenden Zellen

Das Knochenmark beherbergt zwei verschiedene Arten von Stammzellen: Hämatopoetische Stammzellen, aus welchen sich Osteoklasten entwickeln, und nicht-hämatopoetische Stammzellen als Ursprung für verschiedene gewebsspezifische Zellen wie beispielsweise Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und Adipozyten. Es ist derzeit Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen herauszufinden, von welchen Faktoren die Differenzierung der Stammzelle in die eine oder andere Richtung abhängt, beziehungsweise ob die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung noch zu einem Wechsel in eine andere Zelllinie in der Lage sind (Bianco P. et al., 2001).

Wie alle Zellen durchlaufen die werdenden Osteoblasten ausgehend von den pluripotenten Stammzellen verschiedene Stufen der Differenzierung. Die einzelnen Stadien sind dadurch gekennzeichnet, dass jeweils verschiedene Oberflächenantigene exprimiert und somit durch spezifische Antikörper erkannt werden (Bruder S.P. et al., 1998; Joyner C.J. et al., 1997). Es ist bis heute nicht geklärt, aufgrund welcher Einflüsse sich die ursprünglichen Stammzellen zu multipotenten Stroma-Mesenchymzellen entwickeln. Diese Zellen sind im Vergleich zum Vorgänger durch eine enorme Proliferation gekennzeichnet und können sich unter der Kontrolle verschiedener Faktoren zu determinierten Osteoprogenitorzellen differenzieren (Aubin J.E., 1998).

Aus der Osteoprogenitorzelle entwickelt sich unter den Einflüssen von PTH/PTHrP, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Glucocorticoiden, Prostaglandinen und verschiedenen Zytokinen der Prä-Osteoblast, die direkte Vorstufe des Osteoblasten. Er ist im Knochen überwiegend in unmittelbarer Nähe zu reifen Osteoblasten lokalisiert. In diesem Stadium ist zum ersten Mal die

Aktivität der Alkalischen Phosphatase messbar. Definitionsgemäß ist die Zelle vollständig zum Osteoblasten ausgereift, sobald sie mit der Biosynthese und der Organisation der Extrazellulären Knochenmatrix beginnt (Lian J.B., 1999).

Osteoblasten weisen typischerweise eine kubische Form auf und befinden sich überwiegend in Zellhaufen entlang der Knochenoberfläche. Gemäß ihrer Hauptaufgabe der Proteinsekretion beinhalten Osteoblasten einen großen Nukleus und ein basophiles Zytoplasma mit stark ausgeprägtem Golgi-Apparat und rauhem Endoplasmatischem Retikulum.

Selbst innerhalb der Osteoblasten-Fraktion können noch verschiedene Reifegrade beschrieben werden. Kollagen I und Alkalische Phosphatase werden während der aktiven Sekretionsphase angereichert. Wenn im zweiten Schritt die sezernierte Knochenmatrix, das Osteoid, mineralisiert wird, werden zusätzliche spezifische Marker wie Osteocalcin und Bone Sialoprotein exprimiert – eine Eigenschaft, die man sich bei der Darstellung von Zellen mit der In-situ-Hybridisierung zu nutze macht.

Das Endstadium der Knochen-bildenden Zellen stellen die Osteozyten dar. Es handelt sich dabei um Osteoblasten, welche im Rahmen der Mineralisierungsvorgänge in der Knochenmatrix eingemauert werden. Durch lange Zellfortsätze stehen sie untereinander und mit den Osteoblasten in Verbindung. Durch dieses System können Informationen über verschiedene Reize und zellbiologische Faktoren ausgetauscht werden.

Je älter der Osteozyt ist und je tiefer eingemauert er sich innerhalb der Matrix befindet, desto weniger proteinbildende Zellorganellen weist er auf. Schließlich wird die Zelle im Zuge der Knochenresorption phagozytiert und abgebaut oder der programmierte Zelltod wird eingeleitet.

Neben weiteren Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren (vergleiche Abbildung) spielen der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (core binding factor α 1) und der Wachstumsfaktor Ihh (Indian Hedgehog) eine Schlüsselrolle in der osteogenen Entwicklung (Ducy P. et al., 1997; Ducy P., 2000). In Osteoprogenitorzellen nur schwach, verstärkt sich die Expression von Cbfa1 während der osteoblastären Differenzierung, um in Osteozyten wieder herunterreguliert zu sein. Er fördert das Commitment der Mesenchymalen Stammzelle zur osteogenen Zellreihe bei gleichzeitiger Inhibition der adipozytären Differenzierung. Im weiteren Verlauf beeinflusst er positiv die Osteoblastendifferenzierung zum reifen Osteoblasten und kontrolliert die Produktion von Knochenmatrix-Proteinen in reifen Osteoblasten (Komori T., 2000).

Im Gegensatz zu Cbfa1 scheint der Wachstumsfaktor Ihh nur die osteoblastäre Differenzierung im Rahmen der Chondralen Ossifikation zu beeinflussen. In Ihh-defizienten Mäusen konnten keine Osteoblasten in Knochen entdeckt werden, welche auf chondralem Weg

entstanden sind, jedoch waren sie in Schädelknochen, Clavicula und Mandibula vorhanden (St-Jacques B. et al., 1999). Es wird vermutet, dass es sich dabei um einen direkten Effekt von Ihh auf die Osteoblasten handelt und nicht um eine Folge der fehlenden Chondrozytendifferenzierung (Karsenty G., 1999).

Vor wenigen Jahren wurde mit hCYR61 (human cysteine-rich) ein neues Protein entdeckt, dessen Produktion in Osteoblasten durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert wird (Schütze N. et al., 1998). Es gehört zur Familie der CCN-Proteine (CYR61, CTGF, NOV). Seine bis dato bekannten sechs Mitglieder sind in die Regulation von Adhäsion, Migration, Differenzierung und Überleben von Zellen involviert und tragen zur Regulation verschiedener biologischer Prozesse wie Angiogenese, Chondrogenese und Tumorgenese bei (Lau L.F., Lam S.C., 1999). Neuere Erkenntnisse sprechen dafür, dass hCYR61 einerseits die Differenzierung der Osteoblasten beeinflusst, andererseits als extrazelluläres Molekül in die Kommunikation von Osteoblasten mit anderen Zellen eingreifen könnte (Lechner A. et al., 2000).

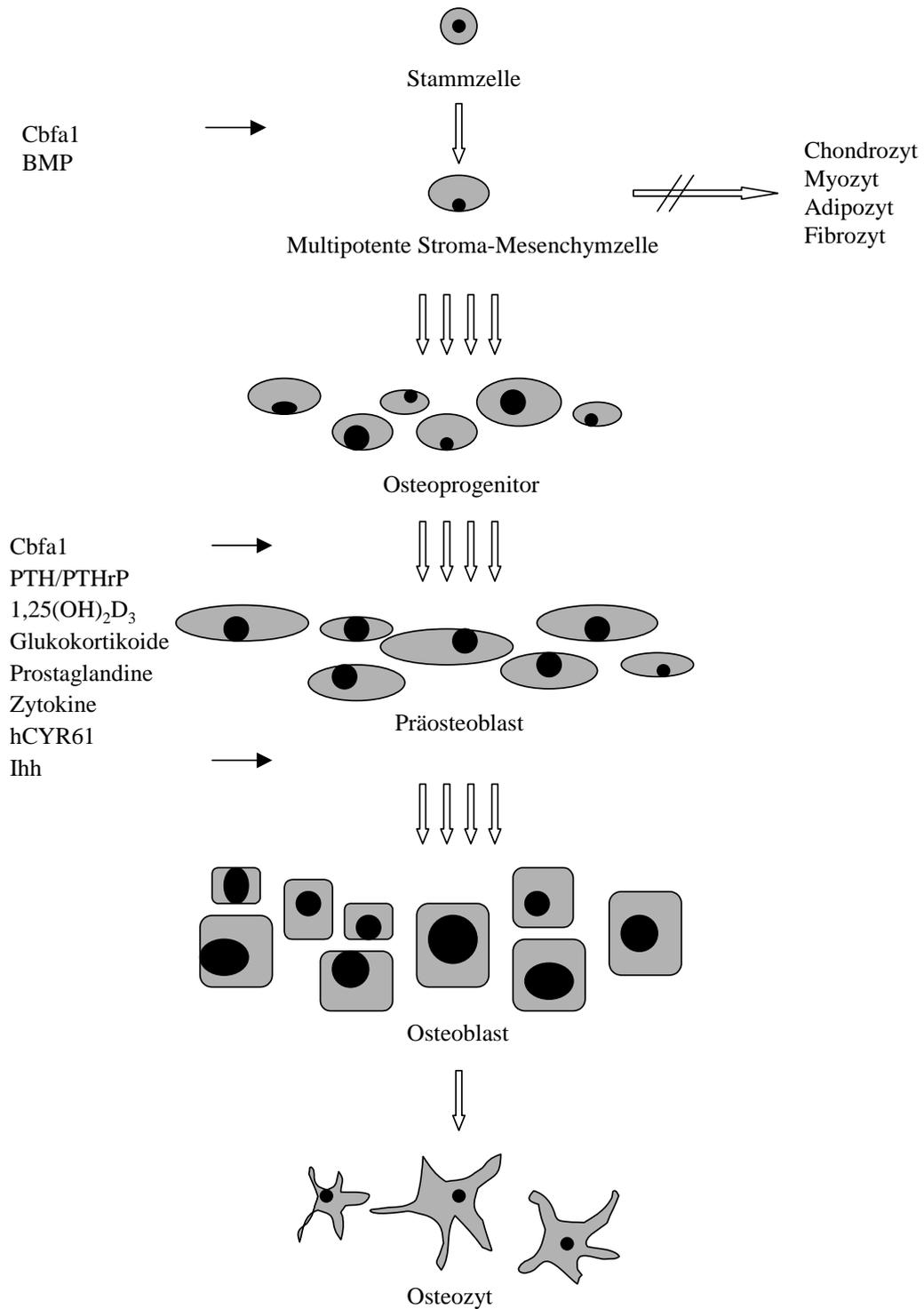


Abb. 1.1 Osteogene Zelldifferenzierung und wichtige Einflussfaktoren

1.1.3 Die Knochen resorbierenden Zellen und ihre Funktion

Osteoklasten entwickeln sich wie die Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Reihe aus hämatopoetischen Stammzellen. Der Transkriptionsfaktor PU.1 fördert die Differenzierung in Richtung Makrophage/ Osteoklast (Tondravi M.M. et al., 1997). Die Weiterentwicklung in die eine oder andere Richtung mit entsprechender Expression von Markern erfolgt schon relativ früh, jedoch können sich Monozyten und Makrophagen unter besonderen Bedingungen auch noch zu einem späteren Zeitpunkt in Osteoklasten verwandeln (Baron R., 1999). Spezifische Marker für Osteoklasten und deren Vorläufer sind die Expression von MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) und TRAP (tartrate resistant acid phosphatase).

Für die Differenzierung der Osteoklasten in Abgrenzung zu den Makrophagen werden c-Fos und NF κ B als weitere Transkriptionsfaktoren benötigt. Das Fehlen einer dieser Faktoren führt zu einem Mangel an Osteoklasten und in dessen Folge zu Osteopetrose (Grigoriadis A.E. et al., 1994; Franzoso G. et al., 1997).

Erst seit neuerer Zeit weiß man, dass für die vollständige Reifung der Knochenresorbierenden Zellen in erster Linie zwei Moleküle verantwortlich sind, welche von Zellen der Osteoblastenreihe gebildet werden: M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und RANK-Ligand (receptor activator of NF- κ B (nuclear factor kappa B) ligand), auch unter den Namen OPGL (osteoprotegerin-ligand) und TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) bekannt.

In vitro kann allein durch die Zugabe dieser zwei Moleküle zu einer reinen Makrophagen-Zellpopulation Osteoklastogenese erreicht werden (Lacey D.L. et al., 1998).

M-CSF bindet auf der Oberfläche von Makrophagen und Osteoklasten-Vorläufern an seinen Rezeptor c-Fms und gewährleistet Überleben und Proliferation der Zellen (Teitelbaum S., 2000).

Bei RANK-Ligand handelt es sich um ein von Knochenmarksstromazellen, Osteoblasten und T-Lymphozyten gebildetes membranständiges Peptid, welches in eine lösliche Form überführt werden kann (Hofbauer L.C., Heufelder A.E., 2001). Sein Rezeptor RANK befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklasten und Osteoklasten-Vorläuferzellen. Beide Moleküle werden zur TNF-Familie (tumor necrosis factor) gezählt und stimulieren durch die Kontaktaufnahme von Osteoblast und Osteoklast, bzw. Osteoklast-Vorläufer eine Kaskade von Ereignissen, die zur Osteoklastendifferenzierung führt (Suda T. et al., 1999; Burgess T.L. et al., 1999). OPG (Osteoprotegerin), der Gegenspieler von RANK, wird innerhalb des Knochens von Zellen der

osteoblastären Reihe in hohen Konzentrationen produziert und sezerniert. Er wirkt kompetitiv als Rezeptorantagonist („decoy receptor“) am membranständigen und sezernierten RANK-Ligand und hemmt damit die Differenzierung und Fusion von Osteoklastenvorläufern (Dunstan C.R. et al., 1997; Hsu H. et al., 1999; Hofbauer L.C. et al., 2000).

Bestätigung erhielten diese neuen Ergebnisse durch zahlreiche Tiermodelle: OPG-Knock-out-Mäuse entwickeln durch die verstärkte Osteoklastogenese eine frühe Osteoporose (Bucay N. et al., 1998; Mizuno A. et al., 1998), Tiere mit einer Überexpression von OPG sind osteopetrotisch (Simonet W. et al., 1997). Damit übereinstimmend führt das Fehlen von RANK-Ligand oder RANK bei Mäusen ebenfalls zu einer schweren Osteopetrose (Kong Y.Y. et al., 1999).

In vitro- und In vivo-Untersuchungen haben gezeigt, dass Parathormon die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten über das RANK/RANK-Ligand-System erhöht (Liu B.Y. et al., 1998, Itoh K. et al., 2000). Ebenso inhibieren $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PGE_2 und Interleukin-11 die Produktion von OPG und stimulieren die von RANK-Ligand (Aubin J.E., Bonnellye E., 2000).

TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6) stellt einen Faktor mit positivem Einfluss auf die fortgeschrittene Osteoklastogenese dar. Er bindet an die zytoplasmatische RANK-Domäne. In seiner Abwesenheit werden die entsprechenden Mäuse ebenfalls osteopetrotisch (Kaji K., 2001).

Die durch Fusion mehrerer Zellen entstandenen osteoklastären Riesenzellen enthalten bis zu 20 Nuklei innerhalb einer Zelle. Das Zytoplasma weist zahlreiche Vakuolen (für lysosomale Enzyme), einen ausgeprägten Golgi-Apparat und viele Mitochondrien auf.

Als unverkennbares Merkmal des aktiven Osteoklasten schlägt sich die Plasmamembran auf einer Zellseite zu vielen Schlingen zusammen, der „ruffled border“, die wiederum durch die „sealing zone“ abgegrenzt wird (Baron R., 1999). Die aufgeworfene Zellmembran ist essentiell für die Resorptionsfähigkeit des Osteoklasten. C-Src-defiziente Mäuse, welche die „ruffled membrane“ nicht ausbilden können, sind trotz vorhandener reifer Osteoklasten nicht in der Lage, Knochen zu resorbieren (Boyce B.F. et al., 1992).

Die aktiven Zellen befinden sich entweder einzeln oder in Gruppen von bis zu fünf Zellen innerhalb des kalzifizierten Knochens in sogenannten Howship'schen Lakunen, Knochenausparungen, welche sie zuvor selbst durch Resorption gebildet haben.

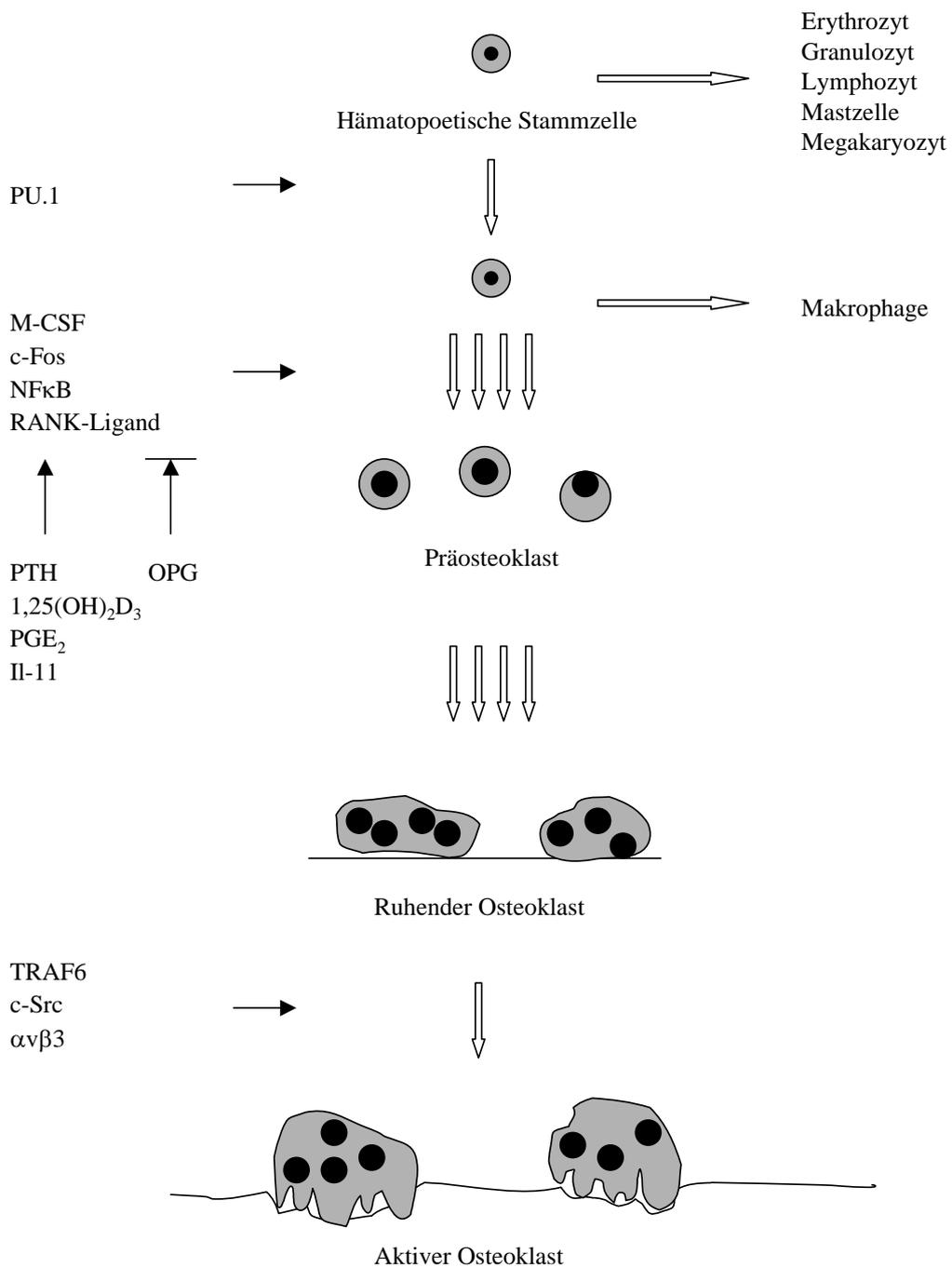


Abb 1.2 Einflüsse auf die osteoklastäre Zelldifferenzierung

Die einzelnen Schritte der Knochenresorption stellt man sich derzeit folgendermaßen vor:

Der aktive Osteoklast bildet bei seiner Annäherung an die Knochenoberfläche die typische, zentral gelegene „ruffled border“ aus. Kontraktile Proteine der „sealing zone“ umschließen die aufgeworfene Membran und sorgen über Integrin-Rezeptoren ($\alpha v \beta 3$) für ein festes Anhaften der Zelle an die Matrix (McHugh K.P. et al., 2000). Durch diesen Mechanismus ent-

steht zwischen dem Osteoklasten und der Knochenoberfläche ein abgeschlossener Raum, in welchem die Resorptionsschritte vorgenommen werden können. Protonenpumpen im Bereich der gefalteten Plasmamembran lassen in dem isolierten Kompartiment ein saures Milieu von ca. pH 4,5 entstehen. Gleichzeitig werden lysosomale Enzyme wie TRAP (tartrate resistant acid phosphatase), Kathepsin K, Kollagenase und Gelatinase sezerniert (Baron R., 1999).

Durch den niedrigen pH-Wert werden die Kristalle aufgelöst, die Matrix wird freigelegt. Nun können Enzyme, allen voran Kathepsin K, unter optimalen sauren Bedingungen die verschiedenen Komponenten der Knochenmatrix degradieren (Gowen M. et al., 1999). Welche exakte Rolle dabei die Metalloproteinasen spielen, ist noch sehr unklar (Teitelbaum S., 2000). Das abgebaute Knochenmaterial wird anschließend von der Zelle endozytiert und auf der nicht-resorbierenden Seite wieder freigesetzt (Nesbitt S.A., Horton M.A., 1997).

Der Osteoklast kann sich von der Resorptionsstelle entfernen und in einem anderen Bereich mit dem gleichen Vorgang beginnen.

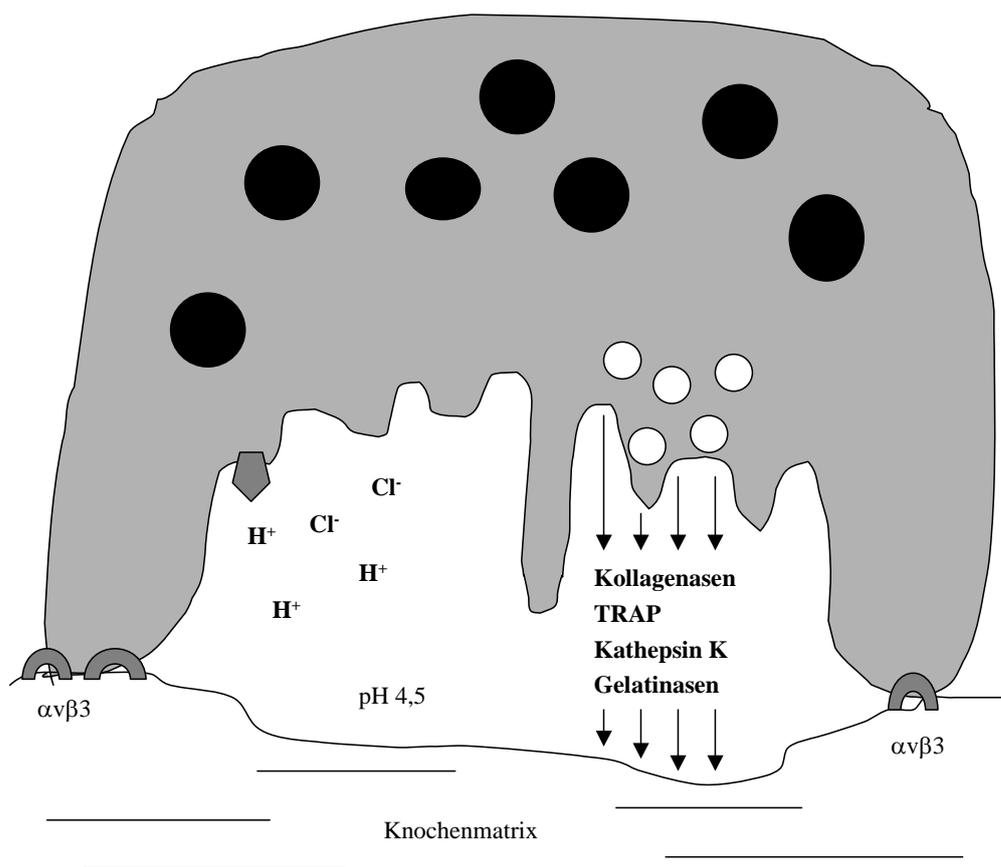


Abb. 1.3 Knochenresorption durch Osteoklasten

Der ausgediente Osteoklast wird der Apoptose unterworfen. Bis zum heutigen Stand ist noch unklar, welches die adäquaten Signale für deren Einleitung sind (Roodman G.D., 1999).

Seit wenigen Jahren hat man mit den Bisphosphonaten Medikamente zur Verfügung, welche den Knochenabbau durch die Osteoklasten hemmen. Sie werden unter anderem in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt (Lieberman U.A. et al., 1995; Black D.M. et al., 1996).

1.2 Knochenbildung und Knochenumbauvorgänge

Knochengewebe kann sich auf direktem oder indirektem Weg entwickeln (Olsen B.R et al., 2000). Bei ersterem, der desmalen Ossifikation, wird der Knochen direkt aus Bindegewebe oder Mesenchym gebildet, bei letzterem, der chondralen Ossifikation, über den Umweg eines knorpeligen Vorstadiums. In beiden Fällen entsteht als primäres Knochengewebe Geflechtknochen, welcher erst in einem späteren Schritt unter höherer funktioneller Beanspruchung in einen sekundären Lamellenknochen umgebaut wird. Ohne den Transkriptionsfaktor Cbfa1, welcher für die Osteoblastendifferenzierung benötigt wird, kann weder desmale noch chondrale Osteogenese stattfinden (Otto F. et al., 1997; Komori T. et al., 1997).

1.2.1 Desmale Ossifikation

Typischerweise findet diese Art der Ossifikation im Bereich der Schädel- und Gesichtsknochen statt. Mesenchymale Zellen, die späteren Osteoblasten, kondensieren an den Stellen, an welchen sich die Knochen entwickeln werden und beginnen mit der Sekretion osteoblastenspezifischer Proteine. Zuerst wird die Knochengrundsubstanz, das Osteoid gebildet, anschließend Typ I Kollagen, welches im Osteoid zu Kollagenfibrillen aggregiert. Die Mineralisierung der Grundsubstanz erfolgt durch Einlagerung von Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatitkristallen. Der auf diese Weise entstandene Bindegewebsknochen wird sekundär durch "modeling und remodeling" zu seiner endgültigen Form umgebaut (Rodan G.A., 2001; Rahn B.A., 1994).

1.2.2 Chondrale Ossifikation

Bei der chondralen Ossifikation wird zuerst ein Knorpelmodell gebildet, welches dann in einem zweiten Schritt in Knochen umgewandelt wird (Wagner E.F., Karsenty G., 2001). Die knorpelige Anlage entsteht dem Bindegewebsknochen ähnlich durch Kondensation mesenchymaler Zellen, die sich in diesem Fall zu matrixproduzierenden Chondrozyten (Expression von Typ II Kollagen, Typ IX Kollagen, Typ XI Kollagen) differenzieren. Für die Kondensation und somit für die Chondrogenese wird der Transkriptionsfaktor Sox9 benötigt (Bi W. et al., 1999; de Crombrughe et al., 2001). Die anschließende Umwandlung der knorpeligen Anlage in Knochengewebe findet in der Schaftmitte langer Röhrenknochen als perichondrale, in kurzen Knochen und im Bereich der Epiphysen langer Röhrenknochen als enchondrale Ossifikation statt.

Bei der perichondralen Ossifikation der Diaphysen wird um den knorpeligen Schaft herum nach Art der desmalen Knochenbildung direkt aus dem Bindegewebe (Perichondrium) eine Knochenmanschette gebildet. Durch Anbau weiterer Faserknochenbälkchen kann der Knochen in die Breite wachsen. Gleichzeitig werden die Chondrozyten unter der Knochenmanschette allmählich durch primäres Knochenmark ersetzt.

Im Vergleich dazu findet die enchondrale Ossifikation in der epiphysären Wachstumszone, also zwischen Diaphyse und Epiphyse statt (Rodan G.A., 2001). Dieser Bereich wird nach der Anordnung der verschiedenen Zellen bezeichnet. In der Proliferationszone teilen sich Chondrozyten und ordnen sich säulenartig an, weshalb diese Zone Säulenknorpel genannt wird. Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Chondrozytenproliferation. Als Wachstumsfaktor wirkt beispielsweise IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Die dabei entstehenden Tochterzellen differenzieren zu großblasig aufgetriebenen hypertrophen Chondrozyten (Zone des Blasenknorpels/ Hypertrophie). Ein charakteristisches Merkmal dieser Zellen ist die Expression von Typ X Kollagen und die gleichzeitig erniedrigte Expression von Typ II Kollagen (Karsenty G. et al., 2001). Die neu gebildete Matrix beginnt anschließend zu mineralisieren. FGFs (fibroblast growth factor) und PTHrP (Parathyroid hormone related peptide) unter der Kontrolle von Ihh (Indian hedgehog) üben einen negativen Einfluss auf die Chondrozytendifferenzierung aus (Chung U. et al., 2001; Burke D. et al., 1998; Karaplis A.C., Deckelbaum R.A., 1998), wobei die Regulation durch PTHrP in mehreren Schritten stattfindet (Kobayashi T. et al., 2002). Dahingegen scheint der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (core binding factor A)

positiv in die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten einzuwirken (Takeda S. et al., 2001; Ueta C. et al., 2001). Unter der überwiegenden Kontrolle von VEGF (vascular endothelial growth factor) und Metalloproteinasen (MMP9/ Gelatinase B) wird der Knorpel durch einspritzende Kapillaren vaskularisiert (Vu T.H. et al., 1998; Haigh et al., 2000). Weiterhin ist MMP9 auch in die Rekrutierung von Osteoklasten aus der Monozyten/ Makrophagen-Reihe während der Knochenentwicklung involviert (Engsig et al., 2000). In der nun folgenden Zone (Eröffnungszone) werden die großblasigen Zellen unter Apoptose eröffnet und aufgelöst. Die zuletzt anschließende Ossifikationszone ist dadurch gekennzeichnet, dass zum einen Chondroklasten Knorpelüberreste resorbieren, zum anderen zu Osteoblasten differenzierte mesenchymale Vorläuferzellen an der Knorpeloberfläche mit der Ablagerung der extrazellulären Knochenmatrix beginnen. Diese besteht überwiegend aus Typ I Kollagen. Als Vorlage für die Knochenablagerung dient die degradierte Knorpelmatrix.

Vergleichbar mit den Vorgängen der desmalen Ossifikation entsteht auch hier zuerst primärer Geflechtknochen. Dieser wird später durch Lamellenknochen ersetzt.

Die Tibia stellt einen langen Röhrenknochen dar, bei dem die hier geschilderten Vorgänge während der enchondralen Ossifikation exemplarisch studiert werden können.

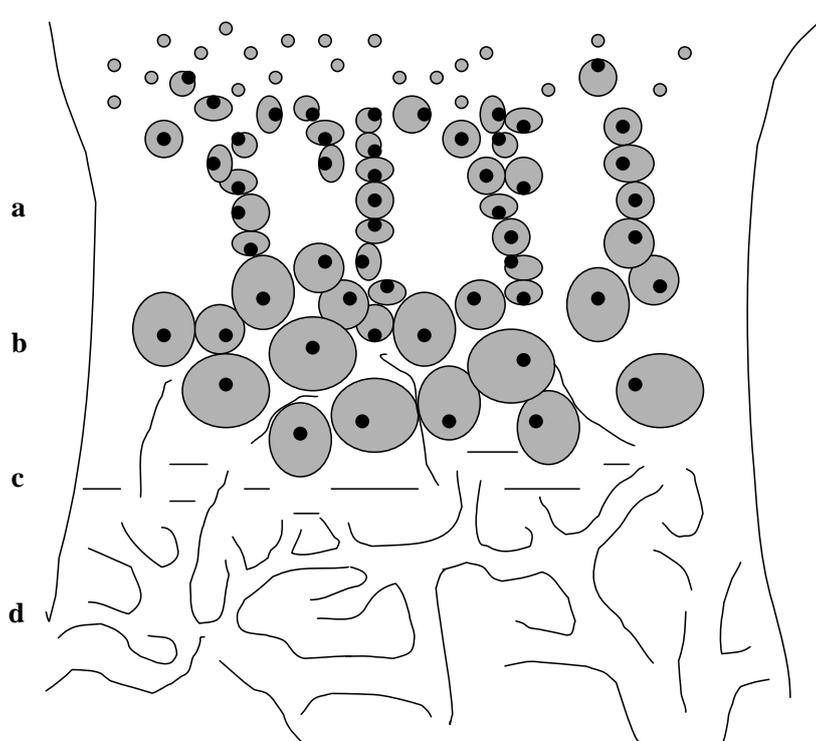


Abb. 1.4 Enchondrale Ossifikation, Tibia. Schematische Darstellung der Wachstumszone. **a:** Proliferationszone/ Zone des Säulenknorpels. **b:** Hypertrophie/ Zone des Blasenknorpels. **c:** Eröffnungszone. **d:** Ossifikationszone.

1.2.3 Knochenumbau

Sowohl während des Wachstums als auch im Erwachsenenalter finden Knochenanbau und Knochenresorption nebeneinander statt. Ein Übergewicht in einem der beiden Schenkel würde im einen Fall zu extrem massivem, der Osteopetrose vergleichbarem Knochen, im anderen zu Knochenverlust, beziehungsweise osteoporotischem Erscheinungsbild führen. Zusätzlich tragen die Umbauvorgänge zur Kalziumhomöostase des Blutes bei. Diese Art des "Remodeling" wird einerseits durch genetische Vorgaben, andererseits durch mechanische Beanspruchungen während des Lebens reguliert.

Nur zwei verschiedene Zellarten scheinen daran beteiligt zu sein: Osteoblasten leisten mit einer Anbaugeschwindigkeit von 1-2 $\mu\text{m}/24\text{ h}$ deutlich weniger als Osteoklasten, welche bis zu 60 $\mu\text{m}/24\text{ h}$ an Knochen resorbieren (Rahn B.A., 1994).

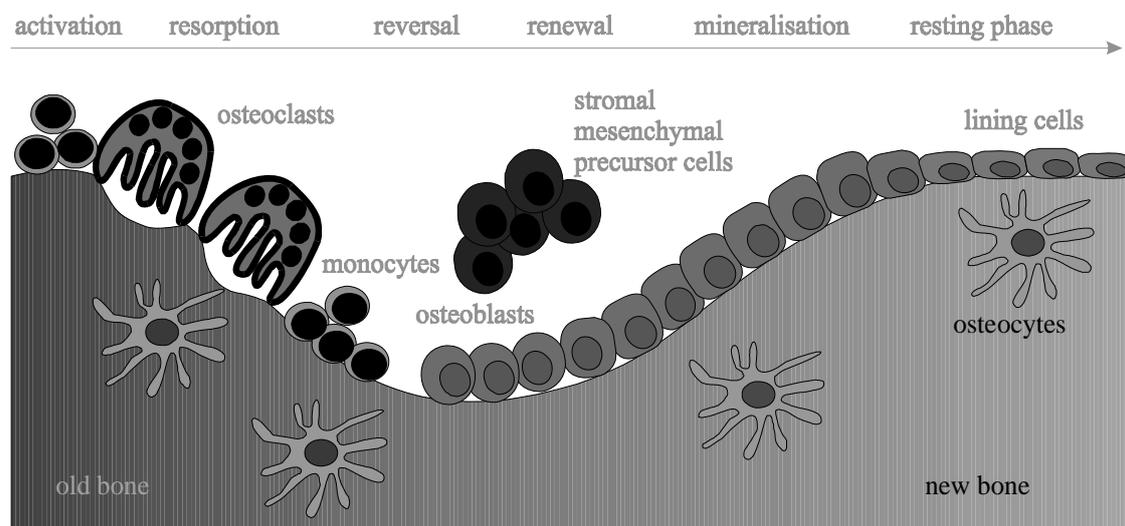


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Knochenumbauvorgänge (mit freundlicher Genehmigung von F. Jakob, Würzburg).

Selbstverständlich werden Trabekularknochen und Kortikalis dem Remodeling unterworfen. Obwohl der Anteil an kompaktem Knochen 80% des gesamten Skeletts ausmacht, beträgt dessen Knochenoberfläche nur etwa ein Fünftel der Oberfläche des Trabekularknochens (Raisz L.G. et al., 1998). Da Remodeling an exponierten Knochenbereichen stattfindet, verwundert es nicht, dass auch die Remodeling-Rate des Trabekularknochens die der Kortikalis um ein Vielfaches übertrifft (Rodan G.A., 2001).

In der Spongiosa findet das Remodeling an der dem Knochenmark anliegenden Oberfläche statt, in der Kompakta in zylindrischen Einheiten, welche radiär um zentral verlaufende Havers'sche Kanäle angeordnet sind (Parfitt A.M., 1994).

Ein solcher kleiner Schauplatz des Remodelings wird als "bone remodeling unit" (BRU) oder auch "bone multicellular unit" (BMU) bezeichnet. Nach den derzeitigen Erkenntnissen initiieren Osteoblasten, "lining cells", den Zyklus (Hauge E.M. et al., 2001). Eine Möglichkeit ist die Sezernierung von Kollagenasen nach Parathormonstimulation (siehe unten). Diese Enzyme entfernen eine dünne Schutzschicht an der Knochenoberfläche und machen den Knochen somit für resorbierende Osteoklasten verletzlich (Partridge N.C. et al., 1996). Osteoklasten benötigen für die Resorption einer BRU etwa drei bis vier Wochen. Die daran anschließende Neubildung an die Stelle des resorbierten Knochens dauert jedoch drei bis vier Monate. Die beschriebenen Vorgänge benötigen einerseits eine intensive Kommunikation zwischen den Zellen der Osteoblasten- und der Osteoklastenlinie, andererseits einen regelmäßigen Nachschub neuer Zellen. Vermutlich spielt das System um RANK/ RANK-Ligand/ OPG (vgl. Kapitel Knochenzellen) hierbei eine entscheidende Rolle. Auch IGF (Insulin like growth factor) und TGF- β (Transforming growth factor) stehen im Verdacht, die Kopplung ("coupling") von Resorption mit stets daran anschließender Knochenbildung zu vermitteln (Mohan S. et al., 1995; Bonewald L.F., Mundy G.R., 1990).

Verschiedene Hormone und Faktoren greifen regulierend in das Remodeling ein: Parathormon stimuliert bei chronischer Gabe Knochenresorption, in intermittierenden Dosen jedoch Knochenbildung (Uzawa T. et al., 1995). Calcitonin wirkt in erster Linie direkt inhibitorisch auf Osteoklasten (Martin T.J. et al., 1995). Wachstumshormon (GH) erhöht die IGF-I-Konzentration (Insulin like growth factor) im Blut. Beide Faktoren wirken in geringem Maße positiv auf Knochen-Remodeling (Beshyah S.A. et al., 1995). Glukokortikosteroide inhibieren auf lange Sicht gesehen Knochenformation. Desweiteren greifen Östrogene und Androgene in komplexer Weise in den Knochenumbau ein.

Vor wenigen Jahren wurde ein Hormon entdeckt, Leptin, welches in Adipozyten gebildet wird und eine Gewichts- und Appetit-regulierende Wirkung ausübt. Im Rahmen einer Adipositas kommt Leptin im Plasma vermindert vor (Ioffe E. et al., 1998). Da bereits früher ein Zusammenhang zwischen erhöhtem BMI (body mass index) und erhöhter BMD (bone mineral density) beobachtet worden war (Felson D.T. et al., 1993), wurde nun der direkte Effekt Leptins auf Knochenbildung untersucht (Ducy P. et al., 2000; Karsenty G., 2000). Tatsächlich erreichten sowohl Mäuse mit einem Leptinmangel als auch solche mit einer Defizienz des

Leptin-Rezeptors, jeweils adipös, eine erhöhte Knochenmasse aufgrund verstärkter Knochenbildung. Somit wurde Leptin als ein wichtiges Stimulans der Knochenresorption identifiziert. Neben den systemisch vorkommenden Hormonen kennt man jedoch auch einige lokale Regulatoren des Remodelings (Raisz L.G., 1988). Dazu gehören verschiedene Zytokine, TGF α (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor) und Prostaglandine. In den meisten Fällen werden diese Faktoren von Knochenzellen produziert und vermitteln die Wirkung von systemischen Hormonen.

Schließlich konnte eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren im Knochen entdeckt werden. Für diese Faktoren, darunter beispielsweise IGF-I, IGF-II (insulin like growth factor), TGF β (transforming growth factor), BMP (bone morphogenetic protein), FGF (fibroblast growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor), wurde ebenfalls eine Expression in Knochenzellen nachgewiesen (Canalis E., 1994). Alle diese Faktoren regulieren in unterschiedlicher und teilweise sehr komplexer Weise die Funktion oder Bereitstellung der verschiedenen Knochenzellen.

Abgesehen von den verschiedenen bereits genannten Faktoren beeinflussen auch mechanische Kräfte das Remodeling. An den Stellen im Knochen, auf die eine erhöhte Belastung einwirkt, wird die Knochenbildung vorangetrieben. Dahingegen wird Knochen in weniger belasteten Bereichen resorbiert (Mosekilde L., 1990). Als typisches Beispiel für diesen Prozess soll hier die Immobilisierung von Patienten angeführt werden, bei der es zu verstärkter Knochenresorption und abgeschwächter Knochenbildung kommt, was insgesamt zu einem Knochenverlust führt. Der Initialpunkt, so wird spekuliert, könnte in diesem Fall eine Mikrofraktur des Knochens sein (Mori S., Burr D.B., 1993). Wie die mechanischen Kräfte in biochemische Signale umgesetzt werden, darüber darf noch spekuliert werden; stretch-sensitive Ionenkanäle und Integrine stehen unter anderem zur Diskussion (Rawlinson S.C. et al., 1996; Schmidt C. et al., 1998).

1.3 Die Regulation des Kalziumhaushalts

Der Kalzium- und Phosphathaushalt des Menschen wird in erster Linie durch die Leistung dreier Organe bestimmt: Im Darm werden die Mineralstoffe absorbiert, in der Niere ausgeschieden, und schließlich dient der Knochen als großes Lager, aus dem die Ionen bei Bedarf freigesetzt werden können.

Verschiedene Hormone regulieren das Zusammenspiel dieser Organe und sind somit für die Mineralstoffhomöostase verantwortlich. Fällt einer der Regulatoren aus oder wird ein Organ insuffizient, gerät das System aus dem Gleichgewicht und führt zu einer entsprechenden Erkrankung.

1.3.1 Vitamin D-Hormon

Zu Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit dem Vitamin D eine Substanz entdeckt, mit der man die weit verbreitete Krankheit Rachitis wirksam behandeln konnte. Erst einige Jahrzehnte später erkannte man nach der Identifizierung des intrazellulären Vitamin-D-Rezeptors als typischen Steroidhormonrezeptor, dass die Substanz vielmehr zu den Hormonen als zu den Vitaminen zu zählen war.

Ein Teil der Vorläufer des Vitamin-D-Hormons wird direkt als Vitamin D₃ über die Nahrung aufgenommen, der Hauptanteil wird jedoch aus den in der Haut gelegenen Speichern für 7-Dehydrocholesterol vom Körper selbst gebildet.

7-Dehydrocholesterol wird in Keratinozyten der menschlichen Epidermis gespeichert und unter Sonneneinwirkung (UV-B) zuerst zu Prävitamin D₃, anschließend zu Vitamin D₃, dem Cholecalciferol, umgewandelt (Holick M.F., 1987). Dieser photochemische Vorgang wird durch die Wellenlänge des UV-Lichtes, den Breitengrad, die Dauer der Sonnenlichtexposition, das (Auf-) Tragen von Haut-bedeckender Kleidung und Sonnencremes und das Alter des Menschen beeinflusst (Jakob F., 1999).

Kinder und junge Erwachsene in unseren Breitengraden sind unter normalen Umständen in der Lage, durch die tägliche Bildung und Speicherung von Cholecalciferol im Frühjahr, Sommer und Herbst die in den Wintermonaten aufgrund der ungünstigen Einstrahlung entstehende Vitamin D₃-Mangelproduktion auszugleichen (Holick M.F., 1999).

Von der Haut gelangt das biologisch inerte Cholecalciferol in den Blutkreislauf, wo es, gebunden an das Vitamin D-bindende Protein (DBP), dem systemischen Stoffwechsel zur Verfügung steht.

In der Leber wird Vitamin D₃ durch weitgehend unregulierte Hydroxylierung an C₂₅ zu 25(OH)-Vitamin D₃ umgewandelt. Auch diese Substanz ist noch biologisch unwirksam und wird zur Niere transportiert. Die 1 α -Hydroxylase der Niere stellt das Schlüsselenzym in der Bereitstellung von biologisch wirksamem Vitamin D₃-Hormon dar. Sie hydroxyliert in den proximalen Tubuluszellen 25(OH)-Vitamin D₃ zum hormonell aktiven 1,25(OH)₂-

Cholecalciferol (auch unter den Namen 1,25-Dihydroxyvitamin D, Vitamin D-Hormon oder Calcitriol bekannt; Bringhurst F.R. et al., 1998).

In den letzten Jahren wurde immer wieder beschrieben, dass noch weitere Zellen wie beispielsweise Keratinozyten, Monozyten und Knochenzellen 1α -Hydroxylase exprimieren und $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 produzieren können (Dusso A.S. et al., 1991). Die extrarenale Aktivierung zu $1,25(\text{OH})_2$ -Cholecalciferol trägt jedoch nicht in größerem Maße zur Kalziumhomöostase bei, sondern könnte viel eher eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation spielen.

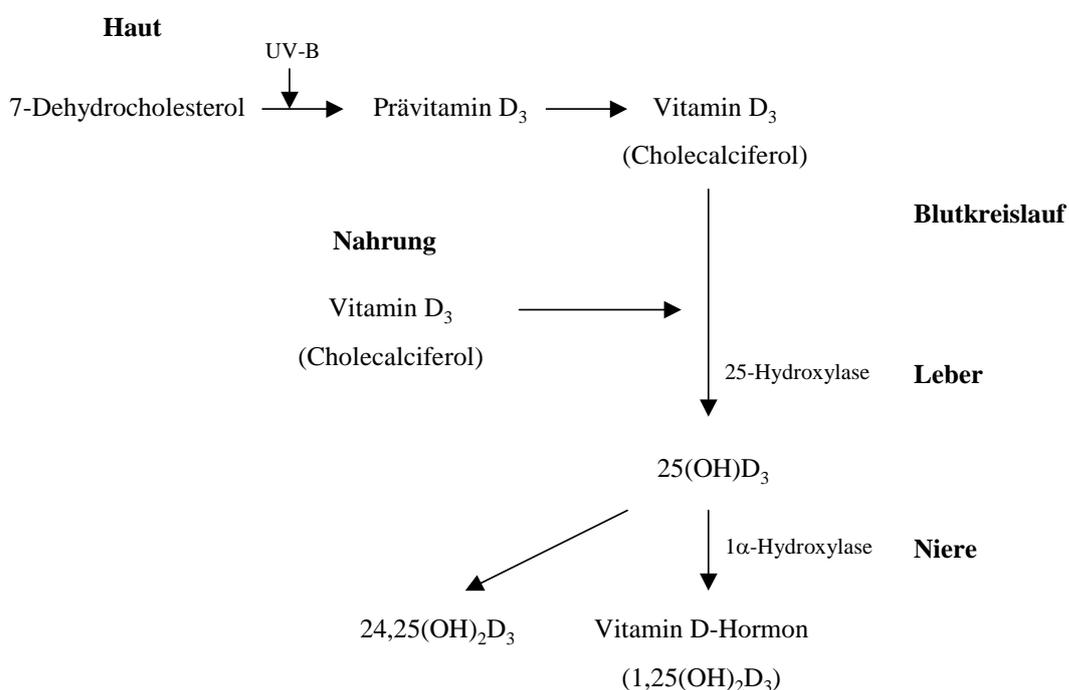


Abb. 1.6 Der Vitamin D-Stoffwechsel des Menschen

Der klassische Vitamin D-Hormon-Rezeptor stellt einen typischen Vertreter der Steroidhormonrezeptoren dar (Ozono K. et al., 1991). Das freie $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 wird von der Zielzelle aufgenommen und interagiert mit dem nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR). Dieser Komplex assoziiert mit dem Retinsäure-Rezeptor (RXR) zum Heterodimer, welches mit einem spezifischen Vitamin D-responsiven Element (VDRE) innerhalb der DNA reagiert (Holick M.F., 1999). Folge dieser Interaktion ist die Transkription der Vitamin D-responsiven Gene und damit die Synthese von messenger RNA (mRNA) für eine Vielzahl von Proteinen, die für den Knochenstoffwechsel von essentieller Bedeutung sind.

Neben dem intrazellulären Vitamin D-Hormon-Rezeptor gibt es möglicherweise noch einen weiteren, membranständigen Rezeptor, welcher im Darm die schnellen Effekte (Kalziumaufnahme) des Vitamin D-Hormons vermittelt (Jakob F., 1999).

Seine Hauptwirkung entfaltet das Vitamin D-Hormon im Dünndarm durch die Bindung an den klassischen Rezeptor. Es erhöht die Kalziumaufnahme in die Enterozyten, den Transport durch das Zytoplasma und gibt es schließlich über die basolaterale Membran in die Blutzirkulation ab (Wasserman R.H., Fullmer C.S., 1995).

Im Knochen fördert Vitamin D-Hormon die Kalziumfreisetzung bei erniedrigtem Kalziumgehalt des Blutes. Einerseits beeinflusst es die Differenzierung der monozytären Stammzelle zum reifen Osteoklasten. Andererseits wird der Vitamin D-Rezeptor auch in Zellen der Osteoblastenlinie gefunden (Holick M.F., 1999). Seine Aktivierung führt zur Expression von Osteocalcin, Osteopontin, Alkalischer Phosphatase, hCYR61 (Schütze N. et al., 1998) und Zytokinen, welche wiederum einen Einfluss auf die Osteoklastenaktivität ausüben.

Hauptsächlich in den Nieren kontrolliert Vitamin D-Hormon durch die Expression der 24-Hydroxylase über einen feed-back-Mechanismus seinen eigenen Abbau zum 1,24,25(OH)₃-Vitamin D. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es außerdem direkt in die tubuläre Reabsorption oder Exkretion von Kalzium und Phosphat eingreift.

Außer in diesen drei Organen, welche in erster Linie für die Vitamin D-vermittelte Regulierung des Kalziumhaushalts verantwortlich sind, wurde die Expression des nukleären VDR in anderen Geweben/ Zellen nachgewiesen, wo er seine Wirkung auf verschiedene Zellmechanismen ausübt.

Beispielsweise wird in VDR-exprimierenden Tumorzellen die Proliferationsaktivität durch die Exposition von Vitamin D-Hormon vermindert (Studzinski G.P. et al., 1993).

Die Antwort auf 1,25(OH)₂-Cholecalciferol in aktivierten T-Lymphozyten besteht in einer verminderten Produktion von Interleukin 2.

In der Haut inhibiert 1,25(OH)₂-Cholecalciferol die Proliferation der Keratinozyten und induziert ihre Enddifferenzierung (Bikle D.D. et al., 2001).

Diese antiproliferativen und immunogenen Wirkungen von Vitamin D-Hormon werden teilweise mit der Behandlung der Psoriasis vulgaris bereits erfolgreich therapeutisch ausgenutzt (Holick, M.F., 1994; 1995), teilweise bieten sie Hoffnung für zukünftige Behandlungsstrategien bei Krebserkrankungen.

1.3.2 Kalzitonin

Das Peptidhormon Kalzitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben. Neben Kalzitonin entsteht aus dem Kalzitonin-Gen durch unterschiedliches Splicing ein zweites Produkt, das „Calcitonin gene-related peptide“ (CGRP). Dieses spielt bei der Vasodilatation eine Rolle, seine Bedeutung für den Knochenhaushalt ist ungewiss (Deftos L.J. et al., 1999).

Kalzitonin bindet an einen G-Protein-gekoppelten membranständigen Rezeptor, welcher in der Niere, dem Gehirn und von Osteoklasten exprimiert wird. Dadurch wird der Signalweg über die Adenylatzyklase oder alternativ über die Phospholipase C eingeleitet (Bringhurst F.R. et al., 1998). Als Folge der Rezeptorbindung kommt es innerhalb weniger Minuten nach Kalzitoningabe zu einer Inhibition der Knochenresorption durch Osteoklasten. Zusätzlich zur Verminderung der Osteoklastenaktivität werden Kalzitonin von verschiedenen Autoren auch andere Effekte (antiinflammatorisch, antihypertensiv, neurotransmissiv, urikosurisch,...) zugesprochen, die noch näher untersucht werden müssen.

Aufgrund seiner Hauptwirkung wird Kalzitonin seit einigen Jahren erfolgreich in der Therapie von Krankheiten eingesetzt, bei welchen eine erhöhte Knochenresorption in einer Hyperkalzämie resultiert (Sexton P.M et al., 1999) und ganz besonders als Antiresorptivum bei Osteoporose.

1.3.3 Parathormon (PTH), Parathormon related-peptide (PTHrP) und ihre Rezeptoren

Neben den bereits beschriebenen Hormonen nimmt Parathormon eine äußerst wichtige Stellung in der Regulation des Kalziummetabolismus ein.

Das aus 84 Aminosäuren bestehende Peptid wird von den Nebenschilddrüsen als Prä-Pro-PTH gebildet (Habener J.F., Kronenberg H.M., 1978). Der längere Precursor verliert auf seinem Weg durch die Zelle die Signalsequenzen (insgesamt 31 Aminosäuren), wird als reifes PTH (1-84) in Sekretionsvesikel verpackt und auf ein adäquates Signal hin in den Blutkreislauf sezerniert (Jüppner H.W. et al., 2001). Die Parathormonsynthese wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Phosphat kontrolliert, die Sekretion durch den Kalziumgehalt des Blutes (Brent G.A. et al., 1988; Silver J. et al., 1994).

Die Hauptaufgabe des PTHs liegt in der Aufrechterhaltung der Normokalzämie im Zusammenspiel mit den anderen Kalzium-regulierenden Hormonen. Dementsprechend resultiert eine Dysfunktion der Glandulae parathyroideae in Hyper- oder Hypokalzämie.

Parathormonausschüttung bewirkt im Knochen eine Freisetzung von Kalzium und Phosphat. In diesen Vorgang sind mit Osteoblasten, Osteoklasten und Stromazellen verschiedene Knochenzellen involviert.

In Osteoblasten beeinflusst PTH die zelluläre metabolische Aktivität, Ionentransport, die Zellbeschaffenheit und die Sekretion verschiedener Proteasen (Jüppner H.W., 2001). Je nach Art der Dosierung (kontinuierlich oder intermittierend) kann Parathormongabe zu verminderter oder vermehrter Knochenmasse führen (Hock J.M., Gera I., 1992; Neer R.M. et al., 2001).

Manche Autoren berichteten von direkten PTH-Wirkungen auf Osteoklasten (Ferrier J. et al., 1986; Teti A. et al., 1991). Es setzt sich jedoch immer mehr die Ansicht durch, dass Osteoklasten selbst keine Parathormonrezeptoren exprimieren und die Hormonwirkung indirekt über Osteoblasten vermittelt wird (Wong G.L., 1984; Chambers T.J. et al., 1984).

Für die Kommunikation (coupling) der beiden Zelllinien ist zum einen das RANK/ RANK-Ligand-System wichtig. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass Parathormon Osteoblasten zur Sekretion verschiedener Enzyme, unter anderem Kollagenase 3, veranlasst (Partridge N.C. et al., 1996). Dies wird vermutlich benötigt, um den mineralisierten Knochen für die anschließende Resorption durch Osteoklasten vorzubereiten.

In der Niere fördert PTH die Wiederaufnahme von Kalzium, inhibiert die Reabsorption von Phosphat und stimuliert die Aktivität der 1α -Hydroxylase (Lau K., Bourdeau J.E., 1995). Die renale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion wird angeregt und somit indirekt die intestinale Kalziumaufnahme gesteigert.

Seinen Hauptrezeptor (PTH/PTHrP-Rezeptor) teilt Parathormon mit einem nahe verwandten Peptid, dem PTH-related protein (Schipani E. et al., 1993). Dieses wurde erstmals im Rahmen von Krebserkrankungen als Verursacher der paraneoplastischen Hyperkalzämie identifiziert (Suva L.J. et al., 1987), welche im Blut der Patienten alle für den Hyperparathyreoidismus typischen Laborwerte, jedoch normale bis niedrige PTH-Spiegel aufweist (Burtis W.J. et al., 1990). PTHrP kommt aufgrund alternativen RNA-Splittings in drei Isoformen mit 139, 141 und 173 Aminosäuren vor, deren Sequenzen bis zur Aminosäure 131 identisch sind.

Man ist immer noch im Ungewissen über seine kalziumregulierende Rolle im gesunden Menschen. Die alleinige Produktion von PTHrP ist jedenfalls nicht in der Lage, bei Patienten mit Hypoparathyreoidismus eine Normokalzämie aufrechtzuerhalten.

Aufgrund der verstreuten Expression von PTHrP in verschiedenen fetalen und adulten Geweben (Ikeda K. et al., 1988) und seiner sehr niedrigen Konzentration im Blut wird ihm eine Hauptaufgabe als autokriner/ parokriner Faktor zugeschrieben. Bis heute ist sein Mitwirken unter anderem bekannt bei der Chondrozytenproliferation und -differenzierung in der Wachstumszone des Knochens (Vortkamp A. et al., 1996; Weir E.C. et al., 1996), bei der Relaxation von glatter Muskulatur (Thiede M.A. et al., 1990; Yamamoto M. et al., 1992), beim Kalziumtransport durch die mütterliche Plazenta und bei der Laktation durch Kalziumumlagerung von Knochen in die Muttermilch (Kovacs C.S., Kronenberg H.M., 1997).

Der PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1R) gehört wie der strukturell ähnliche Kalzitinin-Rezeptor zu einer speziellen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Das relativ lange N-terminale Ende des insgesamt 585 Aminosäuren umfassenden Rezeptorproteins befindet sich extrazellulär, das kürzere C-terminale intrazellulär. Dazwischen durchziehen sieben hydrophobe Helices die Zellmembran.

Obwohl der Aminosäureaufbau von PTH und PTHrP sehr verschieden ist, weisen die beiden Peptide eine annähernd gleiche Affinität zur Bindungsstelle auf (Jüppner H. et al., 1991).

Nach der Bindung von PTH (1-34) oder PTHrP (1-36) an den Rezeptor können über das angekoppelte G-Protein (Guanylnukleotide-binding protein) mindestens zwei verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Einerseits kommt es zur Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase mit folgender Erhöhung des intrazellulären cAMPs (cyclic adenosin monophosphate). Andererseits wird die ebenfalls membranständige Phospholipase C aktiviert, welche aus Phosphatidylinositol das Inositol(1,4,5)trisphosphat (IP₃) als intrazellulären Messenger freisetzt (Abou-Samra A.B. et al., 1992).

In der Niere und im Knochen wirkt PTH als Haupt-Agonist am PTH1-Rezeptor. In anderen nicht-kalziumregulierenden Geweben, in welchen seine Expression nachgewiesen werden konnte - in Chondrozyten der Wachstumsfuge, im Gehirn, Leber, Lunge, Herz, Haut und Hoden - wird er vorzugsweise durch PTHrP aktiviert.

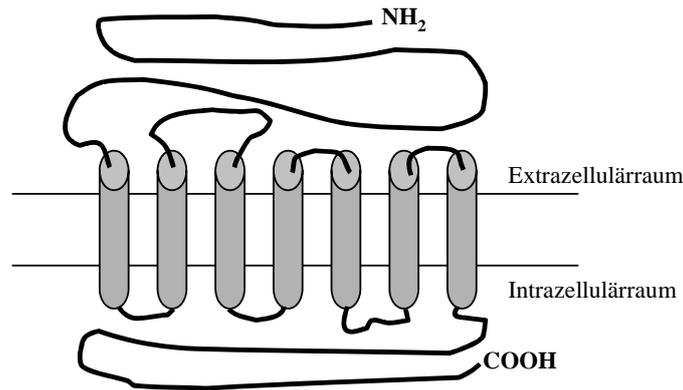


Abb. 1.7 Der PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1R)

Es bestand bereits sehr früh die Vermutung, dass neben dem PTH1R noch andere Rezeptoren für PTH, beziehungsweise PTHrP existieren könnten. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren zwei neue, ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entdeckt.

Einer dieser Rezeptoren, der PTH2-Rezeptor, wird durch das hypothalamische Peptid TIP39 (tubular infundibular peptide of 39 amino acids) und durch Parathormon aktiviert (Usdin T.B. et al., 2000; Hoare S.R. et al., 1999), nicht jedoch durch PTHrP (Usdin T.B. et al., 1995). Ein weiterer neu entdeckter Rezeptor, der PTH3-Rezeptor, scheint eine stärkere Antwort auf PTHrP als auf zu PTH zu haben (Rubin D.A., Jüppner H., 1999).

Die Funktionen dieser Rezeptoren konnten bisher erst teilweise aufgedeckt werden (Dobolyi A. et al., 2002).

1.3.4 Zusammenspiel der Kalzium-regulierenden Hormone

Nur durch das äußerst fein aufeinander abgestimmte Zusammenspiel der verschiedenen Hormone kann die Mineralstoffhomöostase, und insbesondere die Kalziumhomöostase aufrechterhalten werden. In die Regulation sind mehrere Feedback-Mechanismen eingebaut, die gefährliche hyper- und hypokalzämische Zustände im gesunden Menschen weitgehend verhindern.

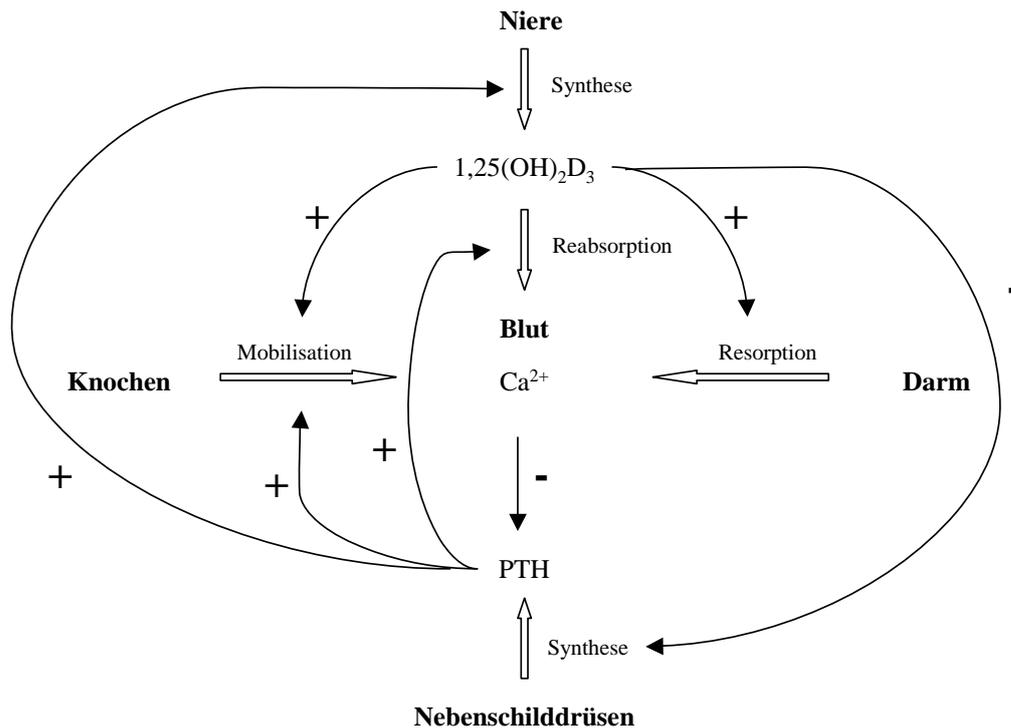


Abb. 1.8 Regulation der Kalziumhomöostase durch die wichtigsten Kalzium-regulierenden Hormone

1.4 Jansens Metaphysäre Chondrodysplasie – Krankheit und Tiermodell

1.4.1 Erbkrankheit des Menschen

Im Jahre 1934 wurde von M. Jansen zum ersten Mal eine Krankheit am Menschen beschrieben, welche sich insbesondere durch Abnormalitäten in der Chondralen Osteogenese und durch Hyperkalzämie auszeichnet (Jansen M., 1934). Wie später nachgewiesen wurde, wird die Krankheit über einen autosomal dominanten Modus vererbt (Charrow J., Podznanski A.K., 1984). Die meisten Fälle dieses seltenen Krankheitsbildes treten sporadisch auf. Die betroffenen Kinder, welche oft das Erwachsenenalter nicht erreichen, fallen größtenteils bereits in den ersten Lebensmonaten durch vielfältige Entwicklungsstörungen auf. Sie sind extrem disproportioniert kleinwüchsig mit kurzen, vor allem unteren Extremitäten, krummen Beinen, Mikrognathie, prominenten Augen und Wangen und Malposition der Zähne (Gram P.B. et al., 1959; De Haas W.H.D. et al., 1969; Jüppner H., Schipani E., 1997; Calvi L.M., Schipani E., 2000).

Radiologisch fallen zahlreiche Mandibularzysten auf, außerdem rachitiforme Veränderungen in den Metaphysen der langen Röhrenknochen, die im Gegensatz zur Rachitis hier zusätzlich

die Metacarpalia und Metatarsalia betreffen (Frame B., Poznanski A.K., 1980; Silverthorn K.G. et al., 1987). In den langen Röhrenknochen findet sich unregelmäßig angeordnet teilweise kalzifizierter Knorpel, der in den diaphysären Bereich hineinragt. Die Schädelbasis und -kalotte sind sklerotisch. Während der ersten Lebensmonate entwickeln die Patienten eine sehr starke, jedoch asymptomatische Hyperkalzämie (Rao D.S. et al., 1979; Kruse K., Schütz C., 1993). Als typische Begleiterscheinungen werden eine Hypophosphatämie und vermehrte Zirkulation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beobachtet. Dennoch liegen die Werte für Parathormon und Parathormon-related-peptide im sehr niedrigen oder nicht mehr messbaren Bereich. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum und die Osteocalcin-Konzentration sind erhöht, was eine verstärkte Aktivität der Osteoblasten widerspiegelt. Eine Intelligenzminderung wurde in keinem der bisherigen Fälle beschrieben. Nach der Pubertät verbessern sich die Abnormalitäten im Bereich der Wachstumsfugen, die Knorpelmassen in den Metaphysen verschwinden, die Knochen bilden allmählich normaleres Trabekulernetzwerk aus, obwohl viele der Deformitäten bestehen bleiben. Zur gleichen Zeit verbessern sich die Blutkalziumwerte. Sie bleiben jedoch während des gesamten Lebens immer erhöht.

Die Pathogenese des M. Jansen war lange Zeit unklar, bis im Jahre 1995 zum ersten Mal Mutationen des PTH/PTHrP-Rezeptors beschrieben wurden (Schipani E. et al., 1995). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten bei verschiedenen an M. Jansen erkrankten Patienten insgesamt drei Mutationen identifiziert werden, deren häufigste ein Nukleotidaustausch in Exon M2 des Rezeptorgens ist: H223R (Arginin anstelle von Histidin). Die Folge dieser Mutationen ist ein Liganden-unabhängiger, konstitutiv aktiver PTH/PTHrP-Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung des cAMP-Signalweges (Schipani E. et al., 1996; Parfitt A.M., 1996; Schipani E. et al., 1999). Die basale cAMP-Anhäufung ist dabei im Vergleich zum Normwert je nach Mutation um ein Vier- bis Achtfaches erhöht. Die Mutationen scheinen dahingegen keinen Effekt auf die basale Inositoltriphosphatproduktion über den Phospholipase C-Signalweg zu haben (Schipani E. et al., 1999). Da der PTH/PTHrP-Rezeptor vor allem in der Niere, im Knochen und in der metaphysären Wachstumsfuge exprimiert wird, erklärt dies die typischen, dem Hyperparathyreoidismus ähnlichen Charakteristika der an M. Jansen erkrankten Patienten.

Eine weitere Bestätigung der Pathogenese ist das Erscheinungsbild transgener Mäuse, welche den menschlichen PTH/PTHrP-Rezeptor mit der H223R-Mutation unter der Kontrolle des $\alpha 1(\text{II})$ -Promotors der Ratte exprimieren (Schipani E. et al., 1997). Diese spezifische Expression des mutierten Rezeptors in der Schicht der proliferierenden Chondrozyten verzögert ihre Differenzierung in hypertrophische Chondrozyten und führt somit zu einem abgeschwächten Knochenlängenwachstum.

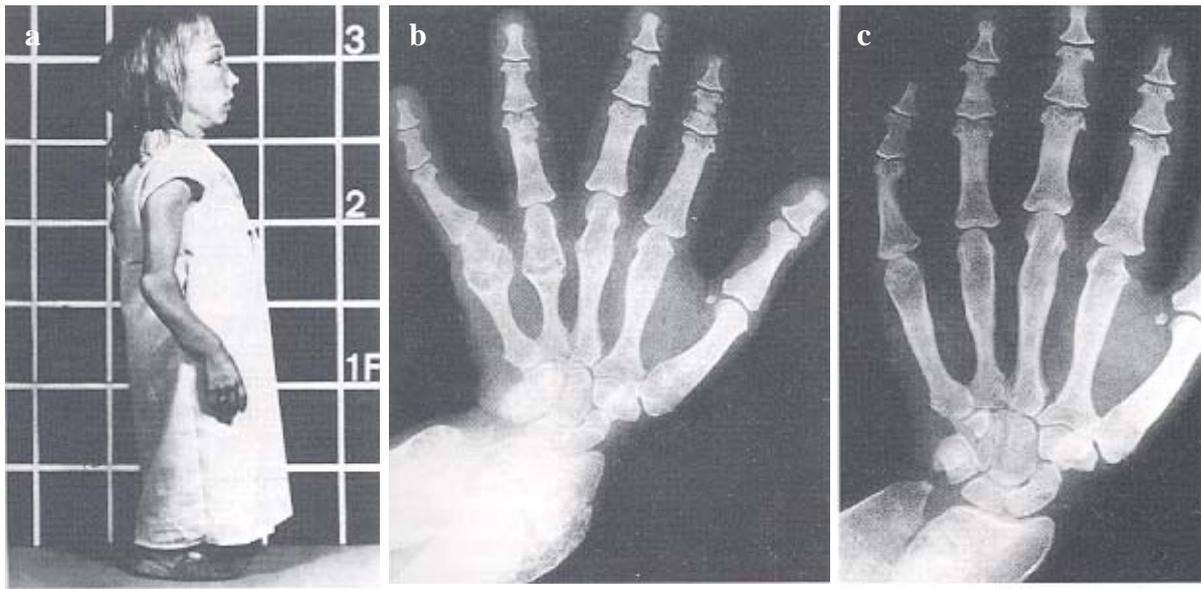


Abb. 1.9a: Patientin mit Jansens metaphysärer Chondrodysplasie im Alter von 22 Jahren. **b-c:** Röntgenaufnahme der linken Hand eines Patienten mit Jansens metaphysärer Chondrodysplasie im Alter von zehn (**b**), bzw 22 Jahren (**c**) (mit freundlicher Genehmigung von E. Schipani, Boston).

1.4.2 Übertragung aufs Tiermodell (CL2)

Es ist bekannt, dass ein Überschuss an Parathormon (bei Hyperparathyreoidismus oder auch durch kontinuierliche Verabreichung von Parathormon erzeugt) zu einer erhöhten Anzahl von Osteoklasten, starkem Knochenumbau und Verminderung der Kortikalis im Knochen führt (Parisien M. et al, 1990; Dobnig H., Turner R.T., 1997). Auf der anderen Seite vergrößert eine intermittierende Verabreichung von Parathormon die Trabekularknochenmasse durch verstärkte Knochenbildung (Dempster D.W. et al., 1993; Uzawa T. et al., 1995). Ebenso weisen Patienten mit mildem Hyperparathyreoidismus eine Zunahme der Trabekularknochenmasse auf (Parisien M. et al, 1990).

Mithilfe eines transgenen Tiermodelles sollte die Rolle des PTH/PTHrP-Rezeptors in der Vermittlung der verschiedenen Parathormonwirkungen in vivo getestet werden. Unter der Kontrolle des 2.3kb-Fragments des murinen $\alpha 1(I)$ -Kollagenpromotors konnten Mäuse erzeugt werden, welche einen der bei M. Jansen mutierten PTH/PTHrP-Rezeptoren, HKrk-H223R (Schipani E. et al, 1995) ausschließlich in Zellen der Osteblastenreihe exprimieren (Rossert J. et al., 1995; Calvi L.M. et al., 2001). Im zweiten Versuchsansatz (CL2), welcher im Folgenden näher beschrieben wird, lag das Transgen in vielfältiger Kopie vor. Das Expressions-

muster des Transgens in diesen mutierten Mäusen stimmte in den knöchernen Strukturen weitgehend mit der Expression des nativen PTH/PTHrP-Rezeptors im Wildtyp überein.

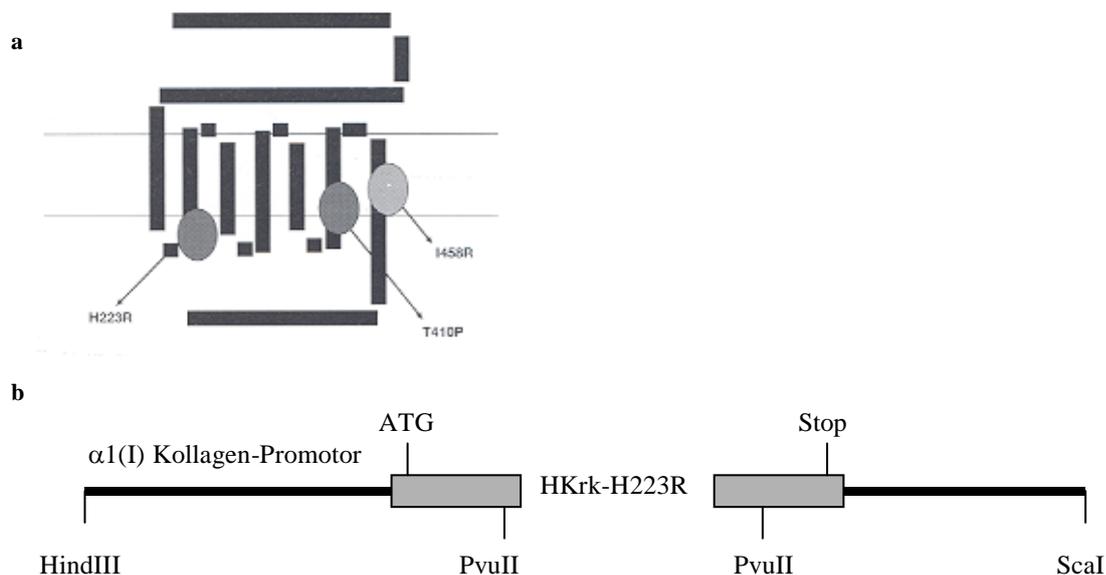


Abb. 1.10a: Schematische Darstellung der bisher identifizierten PTH/PTHrP-Rezeptor-Mutationen bei Jansens metatphysärer Chondrodysplasie (mit freundlicher Genehmigung von E. Schipani, Boston). **b:** Konstrukt des Transgenes mit Anfangs- und Stop-Codon sowie Schnittstellen für Restriktionsenzyme (modifiziert nach E. Schipani, Boston).

Zum Zeitpunkt der Geburt konnten die transgenen Mäuse phänotypisch nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern unterschieden werden. Ab einem Alter von etwa zwei Wochen waren heterozygote Tiere der CL2-Linie bereits deutlich kleiner als der Wildtyp. Auffällig waren die sehr kurzen Extremitäten, des weiteren zeigten sich abnormal lange Zähne, welche in allen Fällen durchgebrochen waren (Calvi L.M. et al., 2001). Es gab keine Unterschiede im Serumkalziumgehalt, Parathormon war in den transgenen Mäusen geringfügig erniedrigt. Die histologische Analyse ergab eine vermehrte irregulär angeordnete Trabekularsubstanz im metatphysären Bereich der langen Röhrenknochen, welche bis in die Diaphyse und in die Knochenmarkshöhle hineinreichte. Dies wurde ab dem Alter von einer Woche beobachtet, erreichte einen Höhepunkt vierzehn Tage nach der Geburt und persistierte bis ins Erwachsenenalter. Sowohl Anzahl als auch Volumen der Trabekulae waren vermehrt. Dynamische histomorphometrische Untersuchungen und In-situ-Hybridisierungen bestätigten die deutlich erhöhte Anzahl und Funktion von Osteoblasten, beziehungsweise Osteoblasten-Vorläuferzellen. Die Proliferationsrate der Osteoblasten war in den CL2-Mäusen deutlich erhöht, zur gleichen Zeit war die Anzahl apoptotischer Osteoblasten erniedrigt. Im Vergleich zum Wildtyp beobachtete man eine dramatische Zunahme an TRAP-positiven multinukleären Zellen. Im

Alter von vier Wochen wurde in den CL2-Mäusen eine erhöhte Porosität der Kortikalis unter der Anwesenheit vieler Osteoklastenzellen beobachtet. Zwölf Wochen nach Geburt hatte sie deutlich an Dicke abgenommen. Die Proliferationsrate der Osteoblasten war in diesem Kompartiment im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Marker für Osteoblasten wurden im Periosteum vermindert exprimiert, nicht jedoch im Endosteum. Die Untersuchung der Schädeldecke ergab erhöhte Umbauaktivitäten im endostealen Bereich. Die Dicke der Kalvarien war im Vergleich zum Wildtyp unverändert, jedoch war der Schädelknochen poröser und enthielt anteilig am Gesamtvolumen mehr Knochenmarkraum.

Das Gesamtergebnis dieser Vorgänge war eine Zunahme an Trabekularknochen, verbunden mit einer gleichzeitigen Abnahme der Kortikalisdicke. Mit diesem Tiermodell wurde der PTH/PTHrP-Rezeptor als wichtiger Vermittler von Parathormon induzierten Knochenauf- und Knochenabbauvorgängen identifiziert.

1.5 Kollagenasen – Tiermodell mit Mutation in KollagenI α 1

Es ist heute immer noch nicht vollständig aufgeklärt, über welchen Weg Parathormon Knochenresorption einleitet. Interessanterweise befinden sich keine PTH/PTHrP-Rezeptoren auf Osteoklasten, sondern nur auf Mesenchymzellen der Osteoblastenreihe und auf Stromazellen im Knochenmark (Potts J.T., Jr., Jüppner H., 1997). So müssen in die Vermittlung der Parathormonwirkung weitere Faktoren zwischengeschaltet sein, welche eine Kontaktaufnahme von Zellen der Osteoblastenreihe mit Osteoklasten ermöglichen. Neben RANK, RANK-Ligand und Osteoprotegerin wird bereits seit längerem Kollagenase 3 (MMP-13), ein Mitglied der Matrix-Metalloproteinasen, mit Parathormon induzierter Knochenresorption in Zusammenhang gebracht (Sakamoto S. et al., 1984; Birkedal-Hansen H. et al., 1993). Dieses Enzym wird nach Stimulation durch Parathormon von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert (Scott D.K. et al., 1991; Gack S. et al., 1995; Selvamurugan N. et al., 2000).

Eine mögliche Vorstellung ist, dass Osteoblasten zu einem Zeitpunkt Kollagen zum Aufbau der Extrazellulärmatrix produzieren, zu einem anderen Zeitpunkt jedoch Kollagenasen, welche die Knochenmatrix so bearbeiten, dass anschließend Osteoklasten "andocken" und den Knochen mithilfe anderer Mechanismen resorbieren können (Chambers T.J. et al., 1985; Blair H.C. et al., 1993; Bossard M.J. et al., 1996; Holliday L. et al., 1997).

Das im Folgenden beschriebene Tiermodell wurde entworfen, um die Aufgabe der Metalloproteinasen in Knochenumbauvorgängen näher zu beleuchten (Zhao W. et al., 1999; 2000).

Die verwendeten Mäuse ($\text{Col1}\alpha 1^{\text{tml Jae}}$) hatten eine Mutation im Kol I α 1-Gen, welches eine Aminosäuresubstitution in der $\alpha 1(\text{I})$ -Kette von Typ I Kollagen zur Folge hat. Diese Mutation verleiht Kollagen I eine Resistenz gegenüber Kollagenaseabbau in der Helix-Domäne (Wu H. et al., 1990; Liu X. et al., 1995). Es wurde nun über drei Tage hinweg viermal täglich Parathormon (1-34) über jeweils eine Kalvarienhälfte der mutierten Maus (rr) und des Wildtyps (++) subkutan injiziert, anschließend wurden die Knochen histologisch untersucht und miteinander verglichen. In-situ-Hybridisierungen zeigten, dass in beiden Tiergruppen nach Parathormoninjektion Kollagenasebildung in Osteoblasten und in Fibroblasten des Periosteums induziert wurde.

Wie erwartet wurde bei den mit Parathormon behandelten Knochen des Wildtyps (++) im Alter von vier, sechs und vierzig Wochen verstärkte Knochenresorption und ein vergrößerter Knochenmarksraum als beim unbehandelten Wildtypknochen (++) beobachtet. Osteoklasten waren zahlreich vorhanden. Im Gegensatz dazu war zu ähnlichen Zeitpunkten bei den mutierten (rr)-Mäusen die Resorptionsantwort auf Parathormongabe deutlich abgeschwächt oder gar nicht vorhanden, und es konnten nur wenige Osteoklasten identifiziert werden. Somit erschien der mit Parathormon behandelte Knochen der (rr)-Maus beinahe unverändert gegenüber dem unbehandelten. Zusätzlich wurde die Fähigkeit der verschiedenen Tiere gemessen, auf intraperitoneale Parathormoninjektion mit Hyperkalzämie zu reagieren. Im Wildtyp (++) stieg der Blutkalziumgehalt nach Injektion stark an und war auch nach zehn Stunden noch deutlich erhöht. Dahingegen war der Kalziumanstieg in der (rr)-Maus deutlich abgeschwächt und nach drei Stunden schon wieder auf dem Ausgangsniveau angelangt.

Zusammenfassend läßt sich aus diesem Tiermodell ableiten, dass Kollagen I-Spaltung durch Kollagenasen wichtig für Parathormon-induzierte Knochenresorption ist.

2. Fragestellung

Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden zwei bereits charakterisierte Tiermodelle miteinander kombiniert (CL2-Transgen und Kollagen I-Mutation).

Dadurch konnte ein neuartiges Modell entwickelt werden, welches zum einen den konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor selektiv in Osteoblasten exprimiert und die anabolen und katabolen Teileffekte des Parathormones in sich vereinigt, zum anderen durch die eingeführte Kollagen I-Mutation eine Resistenz gegen Abbau durch Metalloproteinasen aufweist. Die Kollagendegradierung durch Kollagenasen wird nach den bisherigen Erkenntnissen als Initialpunkt für Knochenresorption betrachtet.

Mit Hilfe dieses Tiermodells sollte *in vivo* untersucht werden, inwiefern Kollagenspaltung durch Kollagenasen für den CL2-Phänotyp eine Rolle spielt, das heißt in welchem Maße Kollagenasen in die Wirkung von Parathormon bei Knochenumbauvorgängen involviert sind.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Effekte des Parathormons in verschiedenen Knochenkompartimenten in direktem Zusammenhang mit der Kollagenaseaktivität stünden.

Schließlich könnte ein besseres Verständnis der anabolen und katabolen Parathormonwirkung und der zugrundeliegenden Mechanismen therapeutische Konsequenzen beim Einsatz von Parathormon im Rahmen der Osteoporosetherapie nach sich ziehen.

3. Material

3.1 Mäusezucht/ Histologie

3.1.1 Tiere

Mäuse der Linie FVB/ N (männlich, hemizygot für eine mutierte humane PTH/PTHrP-Rezeptor-cDNA, eingeführt durch ein 2,3 kb-Fragment des Kollagen 1 α 1-Promoters, E. Schipani, Boston), Mäuse der Linie C57BL/ 6 (weiblich, homozygot für Coll1a1-Mutation (rr), S.M. Krane, Boston), Futter: The Richmond standard® (PMI Nutrition International, Brentwood, MO, U.S.).

3.1.2 Reagenzien

Isofluran: IsoFlo® (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, U.S.), Calcein (Sigma, St. Louis, MO, U.S.), Demeclocycline (Sigma), Formamid (fisher scientific, Fair lawn, NJ, U.S.), EDTA (Sigma), Xylenes (fisher scientific), Hämatoxylin (fisher scientific), Eosin Y (fisher scientific), Phloxin B (fisher scientific), Ethylalkohol (AAPER Alcohol and chemical Co., Shelbyville, KY, U.S.), TRAP-Färbung: Leukocyte Acid Phosphatase (Sigma), Methylgreen (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.), Mountant Medium: Cytoseal™XYL (Stephens scientific, Kalamazoo, MI, U.S.), NaCl (fisher scientific), KCl (fisher scientific), Na₂HPO₄ x 7 H₂O (fisher scientific), KH₂PO₄ (fisher scientific), Formaldehyd (Acros, NJ, U.S.), Gel/mount™ (Biomedex, Foster City, CA, U.S.).

3.1.3 Geräte

1 ml Syringe tuberculin B-D® (Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ, U.S.), Precision Glide® Needle 27,5G (Becton Dickinson & Co), Mikrotom Leica RM 2025 (Nussloch, GER), Processor: Hypercenter XP (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, U.S.), Warmhalteplatte für Objektträger (fisher scientific), Histo centre 2 (Thermo Shandon), Waage: Brainweigh®B300D (Ohans scale corp., NJ, U.S.), pH-Meter: Accumet basic AB15 (fisher scientific).

3.1.4 Lösungen

10 x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2 g KH₂PO₄, 900 ml H₂O, pH auf 7,3 eingestellt.

10% PBS gepuffertes Formalin: 100 ml 37% Formaldehyd, 100 ml 10 x PBS (pH 7,2), 800 ml ddH₂O, pH auf 7,0 eingestellt.

20% EDTA in H₂O: 200 g EDTA auf 1 l H₂O aufgefüllt, pH auf 7,5 eingestellt.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 Reagenzien

Tris-free base (fisher scientific), Sodium dodecyl sulfate SDS (fisher scientific), Proteinase K (Roche, Basel, CH), Isopropanol (fisher scientific), Phenol (fisher scientific), Chloroform (fisher scientific), Natriumacetat (fisher scientific), PstI incl. Puffer Nr. 3 (New England Biolab, Beverly, MA, U.S.), EcoRI incl. Puffer H (Promega, Madison, WI, U.S.), Standardmarker BSTEII (New England Biolab), Agarose (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.), Ethidiumbromid (Sigma), Dialyseschlauch (Gibco Life Techn., Gaithersburg, MD, U.S.), Labeling Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, U.S.), ³²P (New England Nuclear/ PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, U.S.), Sephadex Säulen (Amersham Biosciences), Szintillationsflüssigkeit Scinti Verse® (fisher scientific), PvuII konz. (Boehringer Mannheim, GER), SphI konz. incl. Puffer M (Roche), Orange G (Sigma), Natriumcitrat (fisher scientific), Hybridisierungsflüssigkeit Quick Hyb (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.), Lachssperma-DNA (Sigma), sonstige Reagenzien wie oben.

3.2.2 Geräte

Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg, GER), Zentrifuge 5415D (Eppendorf), Fisher Vortex Genie 2 (fisher scientific), Szintillationszähler LS60001C (Beckman Coulter, U.S.), Wasserbad Isotemp 202 (fisher scientific), Elektrophorese System (fisher scientific), UV-Licht-Photographie Multimage™ Light Cabinet und Alpha Imager™ 2200 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, U.S.), Chromatographiepapier (Whatman, Newton, MA, U.S.), Nitrozellulosemembran (Osmonics, Minnetonka, MN, U.S.), Ofen (National Appliance Company,

Portland, OR, U.S.), Hybridisierungskubator Model 1000 (Robbins Scientific Corp., Sunnyvale, CA, U.S.), Schüttler Sucroagator (Boots-Celltech Diagnostic limited), Film Biomax MS (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, U.S.), sonstige Geräte wie oben.

3.2.3 Lösungen

Lyse-Puffer: 100 ml 1 M Tris-Puffer pH 8,0, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 20 ml 10% SDS-Lösung, 40 ml 5 M NaCl, 830 ml ddH₂O.

1 M Tris-Puffer pH 8,0: 121,4 g Tris, mit ddH₂O auf 800 ml auffüllen, pH auf 8,0 einstellen.

TAE-Puffer: 242 g Tris base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, in ddH₂O lösen und auf 5 l auffüllen.

TE-Puffer: 500 µl 1 M Tris pH 7,5, 100 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 50 ml ddH₂O.

Denaturierungslösung: 50 ml 10 M NaOH, 303 ml 5 M NaCl, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt (Raumtemperatur).

Neutralisierungslösung: 300 ml 5 M NaCl, 121,14 g Tris, pH-Wert auf 7,0 einstellen und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt (auf 60°C aufgewärmt).

20x SSC-Lösung: 701,2 g NaCl, 352,8 g Natriumcitrat, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Waschlösung I: 100 ml 20x SSC, 10 ml 10% SDS, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Waschlösung II: 25 ml 20x SSC, 10 ml 10% SDS, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Sonstige Lösungen wie oben.

3.3 Transformation und Plasmid-Präparation

3.3.1 Reagenzien

Zellen MAX Efficiency® DH5αTM Competent Cells (Life technologies, Grand Island, NY, U.S.) Hefeextrakt (Difco/ Beckton Dickinson, Le pont de Claix, F), Bactor Trypton (Difco/ Beckton Dickinson), KCl (fisher scientific), MgCl₂ (fisher scientific), MgSO₄ (fisher scientific), Glukose (Life technologies), Trypton Peptid (Difco/ Beckton Dickinson), Ampicillin (fisher scientific), BactoTM Agar (Difco/ Beckton Dickinson), NaOH (fisher scientific), KOAc (fisher scientific), CsCl (fisher scientific), 1-Butanol saturated with 1 M NaCl (fisher scientific), Glycerol (fisher scientific), Restriktionsendonukleasen XhoI, XbaI, BamHI, HindIII,

PstI, AvrII, SmaI, ClaI incl. entsprechende Puffer 1-4 (New England Biolab), sonstige Reagenzien wie oben.

3.3.2 Geräte

Elektroporation Gene pulser (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.), Incubator shaker (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ, U.S.), Sterilisator Amsco Eagle Series (Steris, Mentor, OH, U.S.), Induction drive centrifuge J-6M (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.), Seih Tuch softwipe cheese cloth (American fiber and fishing Inc., Albemarle, NC, U.S.), Versiegelungsgerät (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, Michigan, U.S.), Ultrazentrifuge L8-55M (Beckman Coulter), 10 ml Spritze und 19 G Nadel (Beckton Dickinson), Savant Speed vac concentrator (Global Medical Instrumentation, Albertville, MN, U.S.), Photometer (Beckman Coulter), sonstige Geräte wie oben.

3.3.3 Lösungen

SOC-Medium: 5 g 0,5% Hefeextrakt, 20 g 2% Bacto Trypton, 0,58 g 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 g 10 mM MgCl₂, 2,46 g 10 mM MgSO₄, 3,6 g 20 mM Glukose.

LB-Medium: 10 g Trypton Peptid, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt, nach der Autoklavierung pro liter LB-Medium 500 µg Ampicillin zugefügt.

LB-Medium-Agar-Platten: 10 g Trypton Peptid, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Bacto Agar, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt, Autoklavierung, Zufügen von 500 µg Ampicillin und Ausgießen in Petrischalen.

Lösung I: 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Glukose.

Lösung II: 0,2 M NaOH, 1% SDS.

Lösung III: 150 ml Essigsäure, 294,5 g KOAc.

3.4 In situ-Hybridisierung

3.4.1 Reagenzien

pGEM®-3Z Vector (Promega, Madison, WI, U.S.), 5 x TSC-Puffer (Promega), 100mM DDT (Promega), jeweils 10 mM rATP, rCTP, rGTP (Promega), DEPC Diethylpyrocarbonat (Fluka Chemie AG, Buchs, CH), ³⁵S-UTP (New England Nuclear), Rnasin (Promega), T-3 RNA-

Polymerase (Ambion, Austin, TX, U.S.), T-7 RNA Polymerase (Promega), SP-6 RNA Polymerase (Promega), RQ1 Rnase free DNase (Promega), Sephadex-Säulen mini Quick Spin™ RNA Columns (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, U.S.), Paraformaldehyd 96% (Acros, NJ, U.S.), RNase away (Molecular Bioproducts Inc., San Diego, CA, U.S.), Proteinase K (Roche), HCl (fisher scientific), TEA Triethanolamin (Sigma), Acetic Anhydrid (Sigma), Formamid (fisher scientific), Denhardt's solution (Amersham Biosciences), Dithiothreitol (Sigma), Photoemulsion (Eastman Kodak Company), Entwickler und Fixans EDF/ EDP photochemicals (Eastman Kodak company), sonstige Reagenzien wie oben.

3.4.2 Geräte

Parafilm® (American National Can, Menasha, WI, U.S.), Biomax single emulsion (Eastman Kodak), Audioradiography Cassette FBAC1417 (fisher scientific), sonstige Geräte wie oben.

3.4.3 Lösungen

4% Paraformaldehyd/ PBS-Lösung: 540 ml auf 60°C aufgewärmtes ddH₂O, 600 µl 10 M NaOH, 24 g Paraformaldehydpulver zufügen und auf der Wärmeplatte zur Lösung bringen, dann 60 ml 10x PBS, 600 µl DEPC, pH auf 7,2 eingestellt.

Hybridisierungslösung: 25 ml 50% Formamid, 10 mM TrisCl pH 7,6, 200 µg/ ml tRNA, 1 x Denhardt's Lösung, 10 % Dextransulfat, 600 mM NaCl, 0,25% SDS, 5,25 ml ddH₂O.

Sonstige Lösungen wie oben.

4. Methoden

4.1 Mäusezucht und Auswahl der Experimentmäuse

Die Mäuse der durchgeführten Experimente entstammten zwei verschiedenen Linien: Bei den transgenen Mäusen mit dem mutierten PTH/PTHrP-Rezeptor (H223R) handelte es sich um Nachkommen der Linie FVB/ N, dahingegen stammten die Mäuse mit der Mutation in Kollagen I α 1 aus der Linie C57BL/ 6.

Aufgrund der phänotypischen Ausprägungen der verschiedenen Mutationen wurden für die Untersuchung der Fragestellung Nachkommen gebildet, welche heterozygot für das CL2-Transgen waren, jedoch die Kollagen I- Mutation in beiden Allelen vorliegen hatten (CL2+/rr). Als geeignete Kontrollen sollten solche Tiere innerhalb desselben Wurfes gelten, welche das Transgen exprimierten, jedoch die Kollagen I-Mutation nicht aufwiesen (CL2+/-), solche, welche negativ für das Transgen waren, jedoch homozygot in Bezug auf die Kollagen I-Mutation (CL2-/rr) und schließlich reine Wildtypen ohne Mutation (CL2/-/-). Wenn möglich wurden jeweils gleichgeschlechtliche Tiere miteinander verglichen, ganz besonders ab einem Alter von über 20 Tagen.

Da weibliche CL2-transgene Mäuse nur unzureichend Nachkommen zeugen können, bzw. diese sehr früh postnatal versterben und außerdem auch noch entsprechende Kontrollmäuse benötigt wurden, blieb als mögliche Genkonstellation des Experimentelternpaares nur folgende: Vater (CL2+/r-), Mutter (CL2-/r-). Die erste Zeit wurde damit verbracht, Nachkommen für geeignete Elternteile zu zeugen. Die neugeborenen Mäuse verblieben postpartal für etwa drei Wochen bei ihrer Mutter. Nach zwei Wochen wurden sie unter Isofluran-Anästhesie durch Metallklammern am Ohrknorpel markiert, und ein Stück Schwanz zur Genotypisierung wurde entnommen. Im Alter von sechs Wochen erreichten die Jungen ihre Fertilität und konnten bei geeigneter Genkombination für die weitere Kreuzung verwendet werden.

Für die beschriebenen Experimente wurden die Mäuse im Alter von zwei bis vier Wochen durch kraniale Dislokation getötet.

Um eine dynamische Knochenhistomorphometrie durchführen zu können, wurden einem Teil der Mäuse vor der Tötung im Alter von vier Wochen zuvor zwei verschiedene Fluorochromlösungen intraperitoneal injiziert.

Sieben Tage vor Tötung erfolgte die Injektion von Calcein (20 mg/ kg Körpergewicht); zwei Tage vor Tötung wurde Demeclocycline (20 mg/ kg Körpergewicht) injiziert.

Mit Hilfe dieser Fluorochrome konnten später die Mineralisierungsrate als Parameter für die Osteoblastenfunktion und die Knochenbildungsrate für die gesamten Vorgänge durch Osteoblasten und Osteoklasten ausgemessen werden. Die Tötung und Präparation dieser Individuen fand zum Schutz der Fluorochrome unter bestmöglichem Lichtausschluss statt. Die für die Knochenmorphometrie bestimmten Objekte wurden, in Aluminiumfolie eingeschlagen, zur Auswertung ins Labor von R. Chiusaroli/ R. Baron (Yale University; CT) geschickt.

4.2 Anfertigung der Gewebsschnitte/ Färbungen

Die Maus wurde mit Isofluran anästhesiert und durch kraniale Dislokation getötet. Das Körperfell wurde entfernt und das Peritoneum großflächig eröffnet, um ein möglichst gutes Eindringen der Fixationslösung in sämtliche Körperbereiche zu ermöglichen. Als Fixans diente 10%iges, mit PBS gepuffertes Formalin. Die Maus verblieb vollständig bedeckt für ein bis zwei Tage in der Lösung.

Anschließend wurde je nach Gewebeart weiterverfahren: Bereits kalzifizierter Knochen (grundsätzlich bei postnatalen Objekten) musste vor der Anfertigung von Paraffinschnitten entkalzifiziert werden. Dies geschah über zwei Wochen hinweg in 20%iger EDTA-Lösung (pH 7,5), die regelmäßig ausgetauscht wurde. Wenn der Knochen nach frühestens 12 Tagen fühlbar weich geworden war, wurde unter mikroskopischer Betrachtung möglichst viel überflüssiges Weichteilgewebe entfernt. Im Fall der unteren Extremität sollten dabei Kniegelenk mit Femuranschnitt, die Tibia in ihrer gesamten Ausdehnung, anliegende Fibula, Fußgelenk und Fußwurzelknochen erhalten bleiben. Um nach dem Dekalzifizierungsvorgang Schnitte der Schädeldecke anzufertigen, wurde dem Kopf transversal, 3 mm parallel zur Sutura coronaria mit einer Rasierklinge ein 4 mm dickes Stück des Os parietale mit darunterliegenden Weichteilen entnommen. Andere Gewebe wie Leber oder Milz, die nicht dekalzifiziert werden müssen, konnten direkt dem Processing zugeführt werden.

Beim Processing (maschinell) wurde das Gewebe durch Spülung in verschiedenen Alkoholkonzentrationen dehydriert, mit Xylene als organisches Lösungsmittel gespült und mit Paraffin infiltriert. Im Anschluß daran konnte es in Paraffin eingebettet werden.

Mit dem Mikrotom wurden die Objekte 5 µm dick geschnitten und auf Objektträger gebracht. Besonderen Wert wurde darauf gelegt, dass die Tibia mit beiden anschließenden Gelenken als Längsschnitt dargestellt wurde, um später bestmögliche Vergleiche zwischen den einzelnen Schnitten ziehen zu können. Pro Gewebe wurden bis zu 50 Schnitte angefertigt.

Je nach Weiterbehandlung fand eine Hitzefixierung bei 65°C für 15-60 min statt. Die bei der Schnittführung entstandene Wasserschicht zwischen Paraffinschnitt und Objektträger verdunstete dabei.

Einige Schnitte aus jeder Gewebereihe wurden routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dafür wurde folgendes Protokoll verwendet: Zur Deparaffinierung: 3 x 2 min Inkubation in Xylene; 3 x 2 min in 100% Ethanol; 2 min in ddH₂O; anschließende Färbung: 2 min in Hämatoxylin; im warmen Leitungswasser bis zur Blaufärbung abspülen; in ddH₂O spülen; 2 min in 70% Ethanol; 30 s in Eosin-Phloxin; 3 x 2 min in 100% Ethanol; 3 x 2 min in Xylene; mit Deckgläsern deckeln.

Die TRAP-Färbung (tartrate resistant acid phosphatase) wurde folgendermaßen durchgeführt: Zur Vorbereitung der ersten Lösung wurden 0,5 ml Fast Red-Garnet GBC Basislösung mit 0,5 ml Natriumnitritlösung gemischt. Nach zwei Minuten wurden 45 ml 37°C warmes ddH₂O, 0,5 ml Naphthol AS-BI Phosphorsäurelösung, 2,0 ml Acetatlösung und 1,0 ml Tartratlösung hinzugefügt. Es folgte die Equilibrierung bei 37°C für 10 min. Nachdem die Schnitte für 30 s im Citratfixans fixiert worden waren, wurden sie mit ddH₂O abgespült und dann 1 Stunde unter Lichtabschluss in der zubereiteten Lösung inkubiert. Währenddessen wurde die zweite Lösung vorbereitet: In weiteren Behältern wurden dafür 0,5 ml FBB Alkalische Lösung mit 0,5 ml Natriumnitritlösung gemischt, anschließend 2 min stehen gelassen. Danach wurden auf 37°C vorgewärmte 45 ml ddH₂O, 0,5 ml Naphthol AS-BI Phosphorsäurelösung, 2 ml Acetatlösung und 1,0 ml Tartrat hinzugefügt. Auch hier erfolgte die Equilibrierung bei 37°C für 10 min. Nach einstündiger Inkubation in der ersten Lösung wurden die Schnitte für eine weitere Stunde in dieser zweiten Lösung inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger mehrmals mit ddH₂O gespült. Als Kontrolle wurden parallel dazu Schnitte mit den gleichen Lösungen, jedoch unter Weglassen des Tartrats gefärbt, welche wie erwartet eine unspezifische Anfärbung verschiedenster Enzyme vorwiesen. Zur besseren Kontrastierung wurden die Schnitte teilweise mit Methylgrün gegengefärbt.

4.3 Genotypisierung

4.3.1 DNA-Gewinnung und Extraktion

Zur Gewinnung der DNA wurde den Mäusen unter Isofluran-Narkose ein ca. 2 cm langes Stück Schwanz abgeschnitten. Über Nacht wurde der Schwanz in einer Lösung aus 700 µl Lyse-Puffer und 5 µl Proteinase K bei 55°C verdaut.

Am folgenden Tag wurden die ungelösten Bestandteile (Haut, Knorpel,...) abzentrifugiert, der Überstand in neue Tubes gefüllt. Durch Hinzufügen von Isopropanol und eventuell kurzem Aufbewahren auf Eis erreichte man die Präzipitation der DNA. Diese wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze in eine neue Tube übertragen und bei 37°C in 500 µl ddH₂O gelöst. Mehrere Schritte des Mischens und Zentrifugierens mit Phenol/ Chloroform-Lösung sorgten für die Reinigung der DNA. Abschließend wurden die Phenolreste durch reines Chloroform vollständig entfernt. Nach diesem letzten Reinigungsschritt präzipitiert die DNA erneut durch das Hinzufügen von 50 µl Natriumacetat und ca. 1 ml Isopropanol. Der Überstand nach Zentrifugation wurde entfernt, das Pellet mit 70% Ethanol gespült und getrocknet. Je nach gewünschter Konzentration und vorhandener DNA-Menge wurde es später in 50 oder 100 µl ddH₂O resuspendiert.

4.3.2 Herstellung der radioaktiv markierten Probe

Die DNA-Fragmente (cold probe), welche als Templates für die Herstellung der radioaktiv markierten Probe benutzt wurden, werden als Insert in Plasmiden aufbewahrt, aus denen sie gelegentlich neu gewonnen werden mussten. Für den Verdau mit Restriktionsenzymen wurden folgende Verhältnisse verwendet: Für PstI-Probe: 10 µl DNA, 5 µl PstI-Enzym, 5 µl Puffer "3", 30 µl ddH₂O. Für die SphI-Probe: 10 µl DNA, 5 µl Enzym EcoRI, 5 µl Promega Puffer "H", 30 µl ddH₂O. Der Verdau fand bei 37°C für mindestens vier Stunden statt. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 500 µl erweitert, die Fragmente in verschiedenen Phenol/ Chloroform-Abstufungen aufgereinigt und präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gespült und in 70 µl ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurde der Verdau auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Gel-Elektrophorese konnte das Insert unter UV-Beleuchtung (Ethidiumbromid!) ausgeschnitten, in Dialyse-Tubes gefüllt und bei 100 V in 1x TAE-Puffer elektrolutiert werden. Es folgte die Präzipitation mittels Natriumacetat und Iso-

propanol, anschließend die Spülung mit 70%igem Ethanol. Zur Kontrolle, dass es sich um das richtige Fragment handelte, wurde ein kleines Probevolumen mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Vergleich zu einem Standardmarker wie BSTE-II konnte somit die Größe bestimmt werden.

Zum "Labeln" der Probe (radioaktive Markierung) wurden 3 µl der aufgetauten Template-DNA auf ein Volumen von 5 µl verdünnt. Zu Beginn wurde die DNA zusammen mit 2,5 µl Primer-Lösung fünf Minuten lang gekocht und dadurch die DNA denaturiert. Anschließend wurden bei Raumtemperatur nacheinander folgende Substanzen hinzugefügt: 5 µl Labelling Puffer (enthält verschiedene Nukleotide), 1 µl Klenow Polymerase, 9 µl ddH₂O. Nach kurzem Vermischen und Zentrifugieren wurden 2,5 µl der mit ³²P radioaktiv markierten Cytidintriphosphatnukleotide, dCTP-³²P hinzugegeben. Während der zehnmütigen Inkubation bei 37°C wurde der komplementäre DNA-Strang mit eingebauten radioaktiven dCTPs gebildet. Die Reaktion wurde mithilfe von 2,5 µl 0,2 M EDTA zum Stillstand gebracht. EDTA bildet dabei Komplexe mit Metallionen, welche für die Enzymaktivität benötigt werden. Zur Verdünnung der relativ stark konzentrierten Probe wurden 25 µl TE-Puffer hinzugefügt. Als letzter Schritt wurde die Probe durch eine Sephadex-Säule zentrifugiert, um die ungebundenen Nukleotide zu entfernen. Anhand eines kleinen Probevolumens konnte der Szintillationszähler die Stärke der Radioaktivität in der neugebildeten Probe bestimmen.

4.3.3 Southern Blot

Zur Restriktion der extrahierten DNA wurde die in Wasser gelöste DNA für ca. 6-8 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wurden folgende Verhältnisse für den Verdau angesetzt:

Für die Bestimmung des Jansen-Transgenes: 10 µl der resuspendierten DNA, 2 µl Restriktionsenzym PvuII, 5 µl Puffer M, 33 µl ddH₂O (Gesamtvolumen 50 µl).

Für die Bestimmung der Kollagen-Mutation: 10 µl der resuspendierten DNA, 1 µl Restriktionsenzym SphI, 3 µl Puffer M, 16 µl ddH₂O (Gesamtvolumen 30 µl).

In der Zwischenzeit wurden zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels 300 ml TAE-Puffer (1x) und 3 g Agarose-Pulver erhitzt und in eine entsprechende Form mit 2 mm dicken Kämmen (beziehungsweise 1 mm dicken Kämmen für den SphI-Blot) ausgegossen. Zur späteren Anfärbung der Banden im UV-Licht wurden dem noch flüssigen Gel 10 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Als das Gel nach etwa einer Stunde gehärtet und die DNA außerdem verdaut war, wurde eine Elektrophoresekammer mit 2 l TAE-Puffer (1x) und 10 µl Ethidiumbromid ge-

füllt, das Gel in die Kammer gesetzt und die Kämme entfernt. Bevor die verdaute DNA auf das Gel aufgetragen werden konnte, wurden den einzelnen Proben ca. 3-5 µl Orange G (1/10 des Gesamtvolumens) zur Färbung und als Laufmittel zugesetzt. Das Gel wurde nun mit 40 µl der Jansen-Transgen-DNA, bzw. 30 µl der KollagenI-Mutations-DNA geladen. Als Standardmarker wurden 10 µl BSTE-II verwendet. Meistens über Nacht (ca. 8-12 Stunden) wurde die restringierte DNA bei 18 mA/ 32 V elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

Am nächsten Tag wurde das Gel aus der Box entfernt und eine UV-Licht-Photographie angefertigt. Hiermit konnte die Menge und die Restriktion der DNA eingeschätzt werden. Außerdem diente es zur Größenbestimmung der einzelnen Banden durch Vergleich mit einem geeigneten photographierten Maßstab.

Zur Denaturierung der im Gel verteilten DNA wurde dieses eine Stunde mit Denaturierungslösung gespült, mit ddH₂O abgewaschen und für 60-90 min in Neutralisierungslösung geschwenkt.

Als nächster Schritt wurde der Transfervorgang (Blotting) vorbereitet: Über einen großen Glasbehälter (gefüllt mit 20x SSC) wurde eine Glasplatte gelegt, überspannt mit zwei Schichten Chromatographiepapier, welches zuvor in 20x SSC angefeuchtet worden war. Das Gel wurde von der Neutralisierungslösung direkt mit der Kopfseite nach unten auf das Papier gebracht. Darauf wurde eine in dH₂O und 20x SSC getauchte Nitrozellulosemembran gelegt. Die Nitrozellulosemembran enthält Aminogruppen mit positiver Ladung. Deshalb wird die aufgrund seiner Phosphatgruppen negativ geladene DNA auf die Membran transferiert. Weitere Schichten von angefeuchtem Chromatographiepapier folgten. Den Abschluß bildeten ein hoher Stapel saugfähige Papiertücher und eine Glasplatte mit ca. 500 g Masse zur Kompression. Zu den Seiten hin wurde die Membran mit Plastikfolie abgedichtet. Bei den einzelnen Schritten wurde größten Wert darauf gelegt, nie Luftblasen zu erzeugen, bzw. diese zu eliminieren. Der anschließende Transfer der DNA in die Membran erfolgte über Nacht (mind. 12 h).

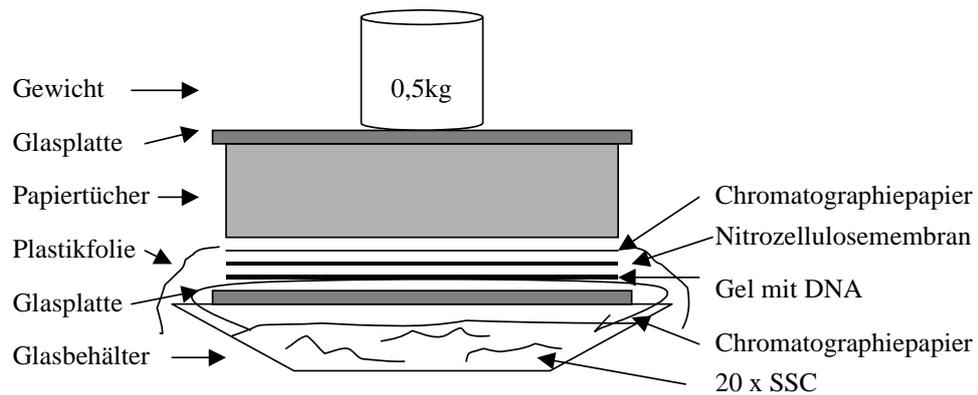


Abb. 4.1 Aufbau des Southern Blots. DNA-Transfer.

Am folgenden Tag wurde die Lage der Geltaschen zur späteren Orientierung auf der Membran markiert, diese anschließend bei 80°C für mind. 2 h gebacken, um die transferierte DNA auf der Membran langfristig zu fixieren.

Im nächsten Schritt wurde die Membran mit Hilfe von dH₂O an die Wände einer Hybridisierungstube geklebt, anschließend ca. 14-15 ml Quick-Hyb-Lösung hinzugefügt. Durch die darin enthaltenen Wirkstoffe wurde einerseits der unspezifische Hintergrund erniedrig (Denhardt's Lösung), andererseits konnte durch Dextransulfat eine Viskositäts-erhöhung und "Aufdehnung" der DNA-Stränge erreicht werden. Die Prähybridisierung zur Verminderung unspezifischer Bindungen fand für mind. 10 min im auf 68°C vorgewärmten Hybridisierungsin- kubator statt. Gleichzeitig wurde die notwendige Menge der radioaktiv markierten Probe (10⁶ counts/ ml Quick-Hyb) mit 100 µl Lachssperma zehn Minuten lang gekocht, kurz auf Eis aufbewahrt und anschließend zur Membran in der Tube hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte unter ständiger Rotation für mind. 1 h bei 68°C im Hybridisierungsin- kubator.

Danach wurde der nicht gebundene Anteil der Probe durch sanftes Waschen (jeweils 30-45 min) in verschieden stark konzentrierten Waschlösungen von der Membran entfernt. Je nach gewünschter Sauberkeit konnte mit der Temperatur, Dauer und Salzgehalt des Waschvor- ganges gespielt werden.

Die nun auf der Membran radioaktiv markierten Banden wurden auf einem einfach be- schichteten Röntgenfilm dargestellt. Je nach der zu erwartenden Stärke des Signals wurde der Film bei -80°C zwischen sechs Stunden und sieben Tagen belichtet.

Durch Vergleich mit dem Standardmarker in der UV-Photographie konnte auf dem Röntgenfilm die Größe der dargestellten Banden/ Fragmente bestimmt und so auf den Genotyp der Maus geschlossen werden.

4.4 Transformation und Plasmid-Präparation

Die Transformation der gewünschten DNA erfolgte entweder durch Heat Shock oder mit Hilfe der Elektroporation.

Zur Heat Shock-Transformation wurden bereits kompetente Zellen unter Kältebedingungen mit der zu transfizierenden DNA zusammengebracht. Sie wurden 45 s lang bei 42°C hitzgeschockt, anschließend wieder auf Eis gebracht und dem SOC-Medium zugeführt.

Alternativ dazu wurde gelegentlich bei besonders empfindlicher DNA die Transformation mittels Elektroporation durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurden 1-5 µl Plasmid-DNA zu 100 µl der Zellen zugefügt und das Gemisch in eine Elektroporation-Küvette gefüllt. Das Gerät pulste für ca. 5-8 s unter den Einstellungen 2,5 kV, 25 µF, 400 Ohm. Sofort nach Beendigung der Elektroporation wurden die Zellen dem SOC-Medium zugeführt.

Nach diesem Schritt wurde für die jeweils erhaltenen neu transformierten Zellen nach gleichem Muster weiterverfahren: Zuerst wurden sie eine Stunde lang bei 37°C inkubiert, anschließend wurden LB-Medium-Agar-Platten mit jeweils 150 µl der stufenweise verdünnten, transformierten DNA beimpft. Die Platten enthielten neben dem Nährboden Ampicillin, gegen welches die erfolgreich transformierten Zellen durch einen entsprechenden Genabschnitt resistent waren und sich somit ungehindert vermehren konnten. Über Nacht bildeten sich einzelne Zellklone, die am nächsten Tag geerntet werden konnten.

Diese Zellen wurden für die nun folgende Plasmid-Präparation verwendet. Ampicillin enthaltendes LB-Nährmedium wurde mit einem einzelnen Zellklon beimpft und anschließend bei ca. 10 ml Gesamtmenge zuerst für eine Stunde, dann über Nacht in 1 l Medium bei 37°C im Schüttler zur Vermehrung der Zellen inkubiert. Am nächsten Tag konnten die reichlich vermehrten Zellen durch Zentrifugation (4,2 Rotor; 4200 rpm; 4°C; 20 min) gewonnen werden.

Die Lyse erfolgte durch den Zusatz alkalischer Substanzen: Zuerst wurden die Zellen in 40 ml der "Lösung I" resuspendiert, danach wurde unter leichtem Schwenken 80 ml frisch zubereitete "Lösung II" hinzugegeben. Sobald die Flüssigkeit klar und viskös war, wurde "Lösung III" hinzugefügt, diesmal bis zur kompletten Vermischung kräftig geschüttelt und anschließend 20 min lang zentrifugiert (4,2 Rotor; 4200 rpm; 4°C). Der Überstand wurde

durch mehrere Lagen eines Seihtuches gefiltert, anschließend wurde Isopropanol zur Präzipitation hinzugefügt und die Flüssigkeit für kurze Zeit bei -20°C aufbewahrt. Zur Gewinnung der Nukleinsäuren wurde erneut zentrifugiert (4,2 Rotor; 4200 rpm; 4°C ; 15 min). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet mit 70% Ethanol gespült, getrocknet und in 7,5 ml TE resuspendiert.

Da sich unter den so extrahierten Nukleinsäuren neben der plasmidischen DNA auch noch die chromosomale Zell-DNA befand, wurde mit dem folgenden Verfahren der Equilibriumzentrifugation im Cäsiumbromid/Ethidiumbromid-Gradienten die DNA gereinigt: Dazu wurden dem resuspendierten Pellet 9,5 g CsCl beigefügt und durch leichtes Anwärmen in Lösung gebracht. Nach Hinzufügen von 1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Mischung in kleinere Plastikzentrifugentubes umgefüllt, der Deckel versiegelt und 48 h lang ultrazentrifugiert (25°C ; 55000 rpm). Unter Betrachtung im UV-Licht konnten nun verschiedene Banden wahrgenommen werden: Bei der oberen Bande handelt es sich um die chromosomale, lineare DNA, welche durch verstärkte Bindung von Ethidiumbromid schwerer ist und sich somit im Gradienten von der plasmidischen, zirkulären DNA entfernt. Die untere Bande besteht aus der gewünschten zirkulär geschlossenen Plasmid-DNA. Sie wurde mit Hilfe einer Spritze vorsichtig aufgezogen und in frische Tubes gefüllt.

Im nächsten Schritt musste das Ethidiumbromid wieder entfernt werden. Dies geschah durch mehrmaliges Mischen und Abpipettieren von 1-Butanol (gesättigt mit 1 M NaCl). Das Cäsiumbromid wurde über Nacht durch Dialyse in 4-5 l TE entfernt. Anschließend konnte die fertig aufgereinigte Plasmid-DNA mit Isopropanol und 3 M Natriumacetat durch Zentrifugation präzipitiert werden. Das Pellet wurde erneut mit 70% Ethanol gespült, getrocknet und in 0,5-1 ml TE gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt (10 μl Plasmid-DNA in 1 ml TE gegen TE; Quotient aus Extinktion bei 260 nm und Extinktion bei 280 nm als Indikator für die Reinheit der DNA).

Zur Kontrolle der Plasmid-Präparation wurden Verdaus mit Restriktionsenzymen durchgeführt und die Fragmente mit bekannten Daten verglichen.

4.5 *In situ*-Hybridisierung

4.5.1 Herstellung der Riboprobes

Die sense-DNA, welche für die Herstellung der radioaktiv markierten Riboprobes (anti-sense) verwendet wurde, wird als Plasmid (ringförmig) bei -80°C aufbewahrt und musste deshalb in einem ersten Schritt linearisiert werden. Dafür wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: Kollagen Typ I - Linearisierung mit Enzym HindIII; Osteocalcin/ Bone gla protein - Linearisierung mit Enzym XbaI; Alkalische Phosphatase - HindIII; Kollagenase 3 - HindIII; Osteopontin - EcoRI; PTH1 rec/ R15B - BamHI; TRAP - ClaI; Kollagenase 4 - BamHI. Die DNA wurde mit den entsprechenden Enzymen unter Zugabe von geeignetem Puffer und Wasser verdaut. Zur Aufreinigung erfolgte die Extraktion mit Phenol/ Chloroform, anschließende Präzipitation, Spülung und Resuspendierung in ddH₂O (vgl. Kapitel DNA-Gewinnung und Extraktion). Zur Kontrolle wurde eine kleine Probe elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

Für jede einzelne der anzufertigenden Riboprobes wurden folgende Mengen zusammenpipettiert: 2,0 µl 5x TSC-Puffer; 1,0 µl 100 mM DTT; je 0,5 µl rATP, rCTP, rGTP; 3,0 µl in DEPC resuspendierte ³⁵S-UTP; 0,5 µl Rnasin; 1,0 µl der entsprechenden Plasmid-DNA; 1,0 µl Polymerase (je nach Plasmid T3, T7 oder Sp6). Das Gesamtvolumen von 10 µl wurde bei 37°C zuerst für eine Stunde, nach Hinzufügen von weiteren 1,0 µl Polymerase für eine weitere Stunde inkubiert. Nach Ablauf der zweiten Stunde wurden 0,5 µ Rnasin und 0,5 µl DNase hinzugefügt und erneut für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der Polymerase wurde danach durch Hinzufügen von 7 µl 0,5 M EDTA, 14 µl 5x NTE und 38 µl DEPC gestoppt. Die Zentrifugation durch Sephadex-Säulen entfernte nicht gebundene Nukleotide. Im Szintillationszähler wurde die Stärke der Radioaktivität der hergestellten Probe gemessen. Diese wurde dann bis zur einmaligen Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

4.5.2 Vorbehandlung vor der Hybridisierung

Um einen optimalen Hybridisierungsgang zu ermöglichen, müssen die Gewebsschnitte mit Hilfe verschiedener Lösungen vorbehandelt werden. Dazu gehört die Fixierung mit Paraformaldehyd und die "Durchlöcherung" der Zellwand mit Hilfe von Proteinase K.

Da es sich bei RNA um eine sehr empfindliche Struktur handelt, wurden alle verwendeten Behälter direkt vor ihrem Gebrauch mit einer speziellen Lösung (RNase away) ausgespült, um eventuell vorhandene RNase zu entfernen. Aus diesem Grunde wurden auch die einzelnen Lösungen erst direkt vor dem Gebrauch zubereitet.

Die auf den Objektträgern getrockneten Schnitte wurden deparaffiniert und rehydriert: 3 x 5 min in Xylene, 3 x 1 min in 100% Ethanol, 5 min in PBS. Anschließend wurden die Gewebsschnitte der Reihe nach in folgenden Lösungen bei Raumtemperatur inkubiert: 15 min in 4% Paraformaldehyd/ PBS- Lösung; 5 min in PBS; 15 min in 10 µg/ ml Proteinase K/ PBS; 10 min in 4% Paraformaldehyd/ PBS- Lösung; 5 min in PBS; 10 min in 0,2 N HCl; 5 min in PBS; 10 min in 0,1 M Triethanolamin (pH 7,5) + Acetic Anhydrid; 5 min in PBS; 5 min in 70% Ethanol; 5 min in 95% Ethanol. Abschließend wurden die so vorbereiteten Gewebsschnitte luftgetrocknet und standen für den folgenden Hybridisierungsvorgang zur Verfügung.

4.5.3 Hybridisierung

Zur Hybridisierung der zellulären RNA im Gewebe mit den angefertigten Riboprobes wurde Hybridisierungslösung hergestellt, welche aliquotiert bei -20°C für längere Zeit aufbewahrt werden kann.

Durch Erwärmen der Hybridisierungslösung wurde das enthaltene SDS verflüssigt. Anschließend wurden für die einzelnen Schnitte folgende Proportionen zusammenpipetiert: 100 µl Hybridisierungslösung; 5 µl 1 M DTT; je nach Radioaktivität ca. 5 µl Riboprobe (Verhältnis: 10⁶ cpm/ µl). Um die Riboprobe zu denaturieren, erfolgte eine dreiminütige Inkubation bei 85°C. Sofort im Anschluss daran wurde das zu hybridisierende Gewebe je nach Größe mit ca. 80 µl der erhitzten Lösung vollständig bedeckt und mit einem Parafilmstreifen luftblasenfrei verschlossen. Mit den weiteren Schnitten/ Probes wurde entsprechend verfahren. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 55°C in einer feuchten Kammer statt (50% Formamid).

4.5.4 Post-Hybridisierung

In mehreren Waschvorgängen mit niedrig konzentrierten Salzlösungen wurde die ungebundene Riboprobe entfernt. Dabei wurden auch die Anteile der Probe entfernt, welche aufgrund eines nur teilweise komplementären Transkripts äußerst schwach ans Gewebe gebunden waren.

Zur schonenden Entfernung des Parafilmstreifens wurden die Objektträger vorsichtig bei Raumtemperatur in 1x SSC plaziert. Sobald sich der Parafilm vollständig gelöst hatte, durchliefen die Schnitte nacheinander folgende Lösungen: 5 min in 2x SSC, 50% Formamid, 52°C; 5 min in 2x SSC, 50% Formamid, 52°C; 1 min in 2x SSC, Raumtemperatur; 1 min in 2x SSC, RT; 30 min in 2x SSC, 30 µg/ml RNase A, 37°C; 1 min in 2x SSC, RT; 1 min in 2x SSC, RT; 5 min in 2x SSC, 50% Formamid, 52°C; 3 min in 70% Ethanol, 0,1x SSC, RT; 3 min in 80% Ethanol, 0,1x SSC, RT; 3 min in 95% Ethanol, 0,1x SSC, RT; kurzes Spülen in dH₂O; 1 min in 70% Ethanol, RT; Lufttrocknung.

Um eine grobe Einschätzung der Signalstärke vornehmen zu können, wurden im Anschluss daran Röntgenfilme unterschiedlich lange (mehrere Stunden bis mehrere Tage) bei Raumtemperatur belichtet. Für die Dauer der endgültigen autoradiographischen Belichtung durch Photoemulsion wurde die für die Röntgenaufnahme optimale Belichtungszeit mit dem Faktor drei multipliziert.

4.5.5 Detektion des radioaktiven Signals

Mit Hilfe der Autoradiographie kann das radioaktive Signal im Gewebe direkt (in situ) dargestellt werden. Selbstverständlich mussten die nun folgenden Schritte unter absolutem Lichtabschluss in der Dunkelkammer erfolgen.

Die Photoemulsion und 20% Glycerol wurden bei 45°C 45 min lang vorgewärmt, anschließend vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasenbildung miteinander vermischt und im 45°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Objektträger mit dem hybridisierten Gewebe wurden nun einzeln dreimal in die Photoemulsionslösung getunkt und für mehrere Minuten zum Abfließen überschüssiger Flüssigkeit auf einer entsprechenden Vorrichtung plaziert. Sie wurden dann in Boxen einsortiert, in welchen sich Dessikant zur Entfeuchtung befand. Diese Boxen wurden in mehrere Schichten Aluminiumfolie eingeschlagen (Lichtausschluss) und zum Antrocknen der Flüssigkeit für 24 Stunden bei Raumtemperatur, danach entsprechend der festgelegten Zeit bei 4°C gelagert. Dabei wurden die Behälter die gesamte Zeit über immer in derselben Orientierung senkrecht gelagert, um ein ungewolltes Fließen der Emulsion in verschiedene Richtungen zu vermeiden.

Vor der Entwicklung (meistens etwa drei bis acht Tage später) wurden die Boxen für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. In der Dunkelkammer wurden die Objektträger herausgenommen und zuerst für 2 min in Lösung entwickelt, dann 4 min lang fixiert.

Nach der Spülung in dH₂O wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt: 2 min in Hämatoxylin; 4-5x Spülen mit dH₂O; 3 min in Eosin; 1 min in 70% Ethanol; 3x 1 min in 100% Ethanol; 3x 1 min in Xylene. Die fertigen Schnitte wurden gedeckelt.

Mit Hilfe von 70%igem Ethanol wurde die störende Photoemulsion vorsichtig von der Rückseite der Objektträger entfernt.

5. Ergebnisse

5.1 Genotypisierung

5.1.1 Southern Blot

Anhand der Southern Blot- Methode wurden die Mäuse genotypisiert. Die Darstellung des Transgens (CL2+) mithilfe der Probe PstI gelang problemlos, da das Transgen in den entsprechenden Tieren in vielfacher Kopie vorliegt. In der Röntgenfilmdarstellung konnte bei den transgenen Mäusen eine sehr starke und deutliche Bande nachgewiesen werden, die sich bei einer Fragmentgröße von 1,2 kb befand. Beim Wildtyp fehlte diese Bande.

Schwieriger gestaltete sich die Bestimmung der Genotypen bezüglich der Kollagen I-Mutation. Hierbei war es äußerst wichtig, zwischen homozygoten und heterozygoten Mäusen unterscheiden zu können. Die dargestellte Bande des Wildtyps befand sich bei einer Fragmentgröße von 9 kb, die der Mutation bei 3 kb. Entsprechend wurden bei einer heterozygoten Maus beide Banden dargestellt.

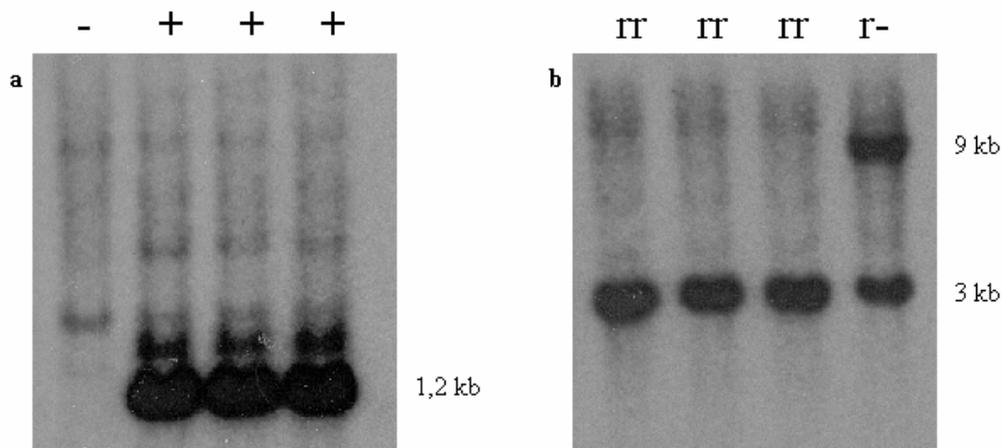


Abb. 5.1 Southern Blot-Analyse zur Genotypisierung. **a:** Identifizierung der transgenen Mäuse (CL2). Die Bande für das Transgen (CL2+) befindet sich bei 1,2 kb. **b:** Identifizierung der Kollagen I-Mutation (r). Bei einer Größe von 3 kb erscheint die Bande der Mutation (r), die des Wildtyps (-) zeigt sich bei 9 kb.

5.1.2 Auswahl der Mäuse für die weiteren Experimente

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum aus der erforderlichen Elterngeneration ca. 15 Würfe mit jeweils zwischen vier und 13 Nachkommen geboren. Aus dieser Tochtergeneration wurden aufgrund des Genotyps und des Geschlechts die Mäuse für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die folgende Übersicht zeigt beispielhaft die Auswahl aus den verschiedenen Würfen.

Wurf 1c); geboren am 01.12.00; getötet im Alter von zwei Wochen:

CL1129m	(CL2+/r-)	CL1130m	(CL2-/-)
CL1131m	(CL2+/-)	CL1132m	(CL2+/rr)
CL1133w	(CL2+/r-)	CL1134w	(CL2+/rr)
CL1135w	(CL2+/r-)	CL1136w	(CL2-/-)

Wurf 1d); geboren am 24.01.01; getötet im Alter von vier Wochen nach Fluorochrominj.:

CL1190f	(CL2+/rr)	CL1191f	(CL2-/-)
CL1192f	(CL2-/r-)	CL1193f	(CL2-/r-)
CL1194m	(CL2-/-)	CL1195m	(CL2+/r+)
CL1196m	(CL2+/-)	CL1197m	(CL2-/r-)

Wurf 1g); geboren am 04.02.01; getötet im Alter von vier Wochen nach Fluorochrominj.:

CL1221m	(CL2+/rr)	CL1222m	(CL2+/-)
CL1223m	(CL2+/r-)	CL1224w	(CL2+/r-)
CL1225m	(CL2-/rr)	CL1226w	(CL2+/r-)

Wurf 1h); geboren am 14.02.01; getötet im Alter von zwei Wochen:

CL1241m	(CL2-/rr)	CL1242f	(CL2+/r-)
CL1243m	(CL2-/r-)	CL1244m	(CL2+/r-)
CL1245m	(CL2+/r-)	CL1246f	(CL2+/-)
CL1247f	(CL2+/rr)	CL1248m	(CL2+/r-)
CL1249f	(CL2+/r-)		

m: männlich; w: weiblich; **fett**: für genauere Untersuchungen ausgewählte Tiere

5.1.3 Nachweis der Kollagenresistenz

Da in dem Experiment Tiere aus zwei verschiedenen Mäuserassen gekreuzt wurden, sollte erneut die Resistenz des mutierten Kollagens für Kollagenaseaktivität nachgewiesen werden. Hierfür wurde Kollagen aus Schwänzen extrahiert und mit rekombinanter muriner Kollagenase 3 enzymatisch verdaut.

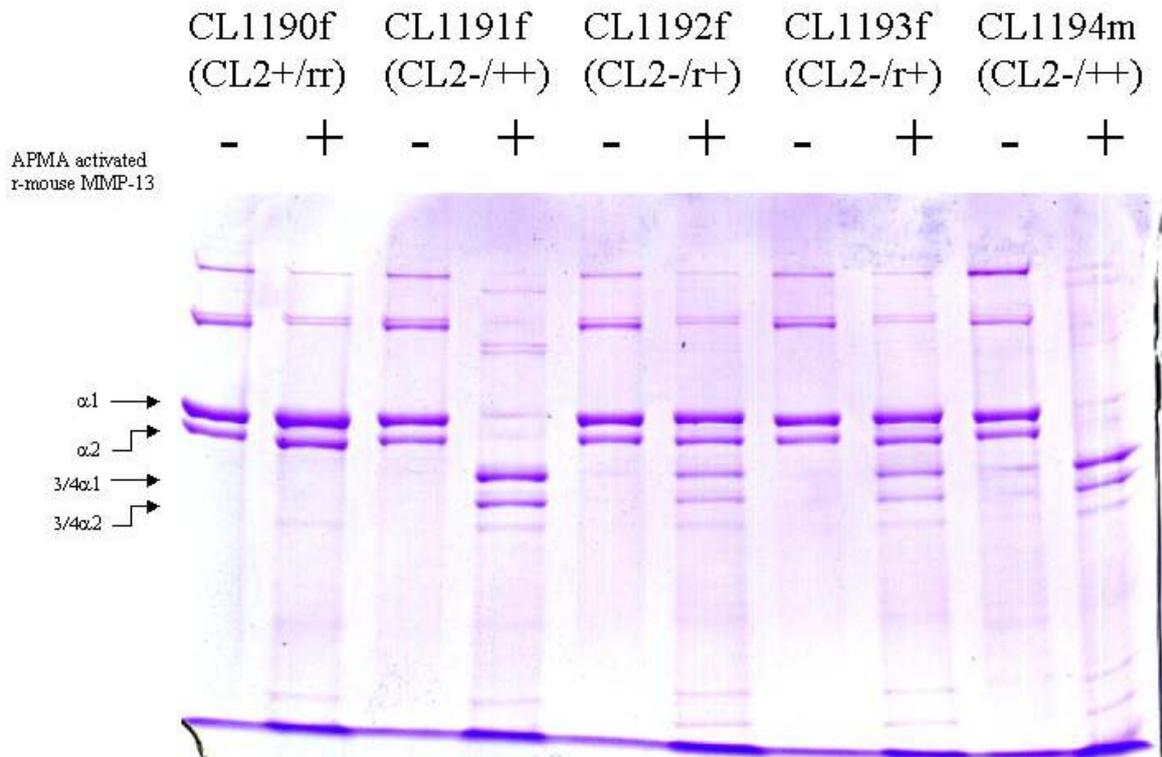


Abb. 5.2 Kollagenverdau durch Kollagenasen. Zu beachten: Die hier verwendeten +-Zeichen entsprechen dem Fehlen der Kollagen-Mutation (entsprechend dem Zeichen - im fortlaufenden Text) (mit freundlicher Genehmigung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um S.M.Krane, Boston).

5.2 Phänotyp der Mäuse (makroskopisch)

Die neu gewonnenen Mäuse mit der doppelten Mutation (CL2+/rr) waren lebensfähig. Bereits im Alter von etwa 14 Tagen und noch stärker im weiteren Verlauf zeigten die einzelnen Mäuse jedoch makroskopisch deutliche Größenunterschiede. Es ist bekannt, dass die transgenen Mäuse (CL2+) im Vergleich zum Wildtyp kleiner und schwächlicher sind. Im Vergleich der verschiedenen Genkombinationen erwiesen sich bei diesen Experimenten diejenigen Mäuse innerhalb desselben Wurfes regelmäßig als die kleinsten, welche sowohl das

Transgen vorliegen hatten, als auch homozygot für die Kollagen I-Mutation waren (CL2+/rr). Konsistent mit allen bis dato erhaltenen Ergebnissen kann man die Rangordnung der Größen folgendermaßen beschreiben. Der reine Wildtyp (CL2-/-) war etwa gleich groß wie (CL2-/r-). Eventuell leicht kleiner oder auch von der gleichen Größe erschien (CL2-/rr). Die transgene Maus (CL2+/-) fiel im Vergleich dazu deutlich kleiner aus (in Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen zum CL2-Transgen). Als nächstkleineres Tier folgte (CL2+/r-). Schließlich zeichnete sich die Experimentmaus (CL2+/rr) durch die mit Abstand geringste Größe aller Tiere aus. Neben den Extremitäten manifestierte sich der Genotyp auch in der Größe des Kopfumfanges.

Die Größen der einzelnen Mäuse variierten minimal entsprechend den natürlicherweise vorhandenen geschlechtsspezifischen Unterschieden. Diese Variationen lagen jedoch in einem Rahmen, wie es auch beim Wildtyp vorkommt. Insgesamt waren die Größenunterschiede so beträchtlich, dass man in den meisten Fällen durch rein makroskopische Betrachtung der Mäuse genotypisch zumindest zwischen dem CL2-Wildtyp (CL2-), der transgenen Maus (CL2+) und der doppelten Mutation (CL2+/rr) differenzieren konnte.

Die Ursache für die Größenunterschiede schien überwiegend in den verkürzten Extremitäten zu liegen.

Röntgenaufnahmen der Tibia verschiedener Tiere bestätigten die signifikanten Größenunterschiede. Weiterhin zeigten sie eine vermehrte Strahlendichte im Bereich der Metaphysen der rr-Mäuse.

a





Abb. 5.3 Beispiele für die Größenunterschiede. **a:** Auf der linken Seite ein männlicher reiner Wildtyp ($CL2^{-/-}$), rechts eine männliche Maus mit der doppelten Mutation ($CL2^{+/rr}$). **b:** Am linken Bildrand der reine männliche Wildtyp ($CL2^{-/-}$), in der Mitte ein transgenes Weibchen ($CL2^{+/-}$), auf der rechten Seite ein Männchen mit der doppelten Mutation ($CL2^{+/rr}$).



Abb. 5.4 Röntgenaufnahmen der Tibia. **a:** Wildtyp ($CL2^{-/-}$). **b:** $CL2^{-/rr}$. **c:** $CL2^{+/-}$. **d:** $CL2^{+/rr}$

Da das CL2-Transgen auch in starkem Maße in Odontoblasten exprimiert wird, wurden die Zähne (besonders die Inzisoren) makroskopisch miteinander verglichen. Die Experimentmäuse mit der doppelten Mutation ($CL2^{+/rr}$) zeigten, ähnlich wie von den transgenen Mäusen ($CL2^{+/-}$) her bekannt, abnormal große und lange Inzisoren. Im Vergleich zum Wildtyp wirkten sie gelblich verfärbt und unregelmäßig in ihrer Konsistenz. Bei allen Tieren waren sie durchgebrochen.

5.3 Darstellung des Knochenaufbaus in der H.E.-Färbung

5.3.1 Tibia

In der Hämatoxilin-Eosin-Färbung der Tibia ließ sich in der Experimentmaus (CL2+/rr) im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) und zur transgenen Maus (CL2+/-) eine deutliche Zunahme an Trabekularknochen nachweisen.

Bereits im Alter von zwei Wochen befand sich verstärkt Substantia spongiosa in der Metaphyse. Sie reichte ausgehend von der Wachstumsfuge sehr weit in den diaphysären Bereich hinein, so dass die Knochenmarkshöhle dadurch deutlich verkleinert war. Die zahlreichen Knochenbälkchen wuchsen in dichter Anordnung ohne erkennbares Muster ins Lumen vor. Insgesamt nahm die Menge an Trabekularknochen ausgehend vom Wildtyp über die transgene Maus (CL2+/-) bis hin zur Experimentmaus (CL2+/rr) stetig zu. Die Kontrollmaus mit der alleinigen Kollagen I-Mutation (CL2-/-) verhielt sich dahingegen in diesem Alter histologisch wie der Wildtyp.

Das sekundäre Ossifikationszentrum erschien in der Experimentmaus (CL2+/rr) verkleinert und dichter mit Knochenbälkchen durchsetzt als im Wildtyp (CL2-/-) und in der transgenen Maus (CL2+/-). Das in den beiden letztgenannten spärlich vorhandene Knochenmark in der Epiphyse war in der Experimentmaus (CL2+/rr) vollständig verschwunden.

Ein herausragender Unterschied in der Charakterisierung der transgenen Maus (CL2+/-) im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) war die Abnahme des Kortikalknochens gewesen. In der Experimentmaus (CL2+/rr) schien dieser ähnlich dünn auszufallen. Aufgrund der weit in die Knochenmarkshöhle hineinragenden und das Lumen begrenzenden Trabekulae fiel es jedoch äußerst schwer, Kortikalis als solche auf längerer Strecke von Trabekularknochen abzugrenzen.

Mit zunehmendem Alter verstärkten sich die beschriebenen Merkmale. Im Alter von vier Wochen waren die Trabekulae in den Experimentmäusen (CL2+/rr) bereits so weit vorgewachsen, dass sie das gesamte Knochenmarkslumen ausfüllten. Die Tibia bestand in ihrer ganzen Länge nur noch aus Substantia spongiosa. In ihrer gesamten Ausdehnung und durch die Betrachtung unzähliger Längsschnitte kontrolliert, konnte keine geschlossene Knochenmarkshöhle, sondern nur noch einzelne kleine Knochenmarksinseln zwischen den Trabekulae identifiziert werden.

Das sekundäre Ossifikationszentrum war ebenfalls mit Substantia spongiosa gefüllt und wirkte leicht komprimiert. Über die Dicke der Kortikalis ließ sich im Alter von vier Wochen endgültig keine Aussage mehr machen, jedoch reichten die Knochen trabekel bis an den seitlichen Rand der Diaphyse heran.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren setzten sich die im Alter von zwei Wochen beschriebenen Beobachtungen somit fort. Der Unterschied zwischen den Experimenttieren (CL2+/rr) und den transgenen Mäusen (CL2+/-) war bei vier Wochen alten Tieren um so deutlicher, als dass der Phänotyp der transgenen Mäuse (CL2+/-) wie bekannt in diesem Alter relativ schwach ausgeprägt ist. Erneut ließen die Mäuse mit der alleinigen Kollagen I-Mutation (CL2-/rr) keine offensichtlichen Unterschiede im Knochenaufbau der Tibia im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) erkennen.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Experimente durch zusätzliche Untersuchungen bei heterozygoten Mäusen ergänzt. Transgene Tiere, welche heterozygot für die Kollagen I-Mutation waren (CL2+/r-), wiesen im Alter von vier Wochen ebenfalls mehr trabekulären Knochen auf als die rein transgenen Mäuse, jedoch war bei ihnen die Knochenmarkshöhle nie komplett obliteriert wie bei den Experimentmäusen (CL2+/rr). Das Vorliegen eines mutierten Allels reichte somit bereits teilweise für die beschriebenen Veränderungen aus.

5.3.2 Knochen des Hinterfußes

Das histologische Bild der Fußwurzelknochen entsprach qualitativ demjenigen der Tibia.

Im Alter von zwei Wochen bestanden beispielsweise Talus und Kalkaneus des Wildtyps (CL2-/-) jeweils aus einer sehr dicken äußeren Schicht Substantia compacta, welche eine Knochenmarkshöhle mit vielen Fettzellen einschloss. Im Vergleich dazu war das Knochenmarkslumen in der transgenen Maus (CL2+/-) wie zu erwarten deutlich verringert und mit Knochenbälkchen durchzogen. Es waren jedoch noch einige größere Knochenmarksbereiche vorhanden. In der doppelt mutierten Maus (CL2+/rr) war die Knochenmarkshöhle bereits zwei Wochen nach Geburt durch die starke Vermehrung des Trabekularknochens vollständig obliteriert.

Schnitte der vier Wochen alten Mäuse bestätigten diese Ergebnisse. Es fiel dabei das extreme Ausmaß der Substantia spongiosa in der Experimentmaus (CL2+/rr) auf, welche bis an die Knochengrenzen reichte und für kompakten Knochen keinen Raum mehr zu lassen schien. Die Histologie weiterer Fußknochen zeichnete sich durch entsprechende Befunde aus.

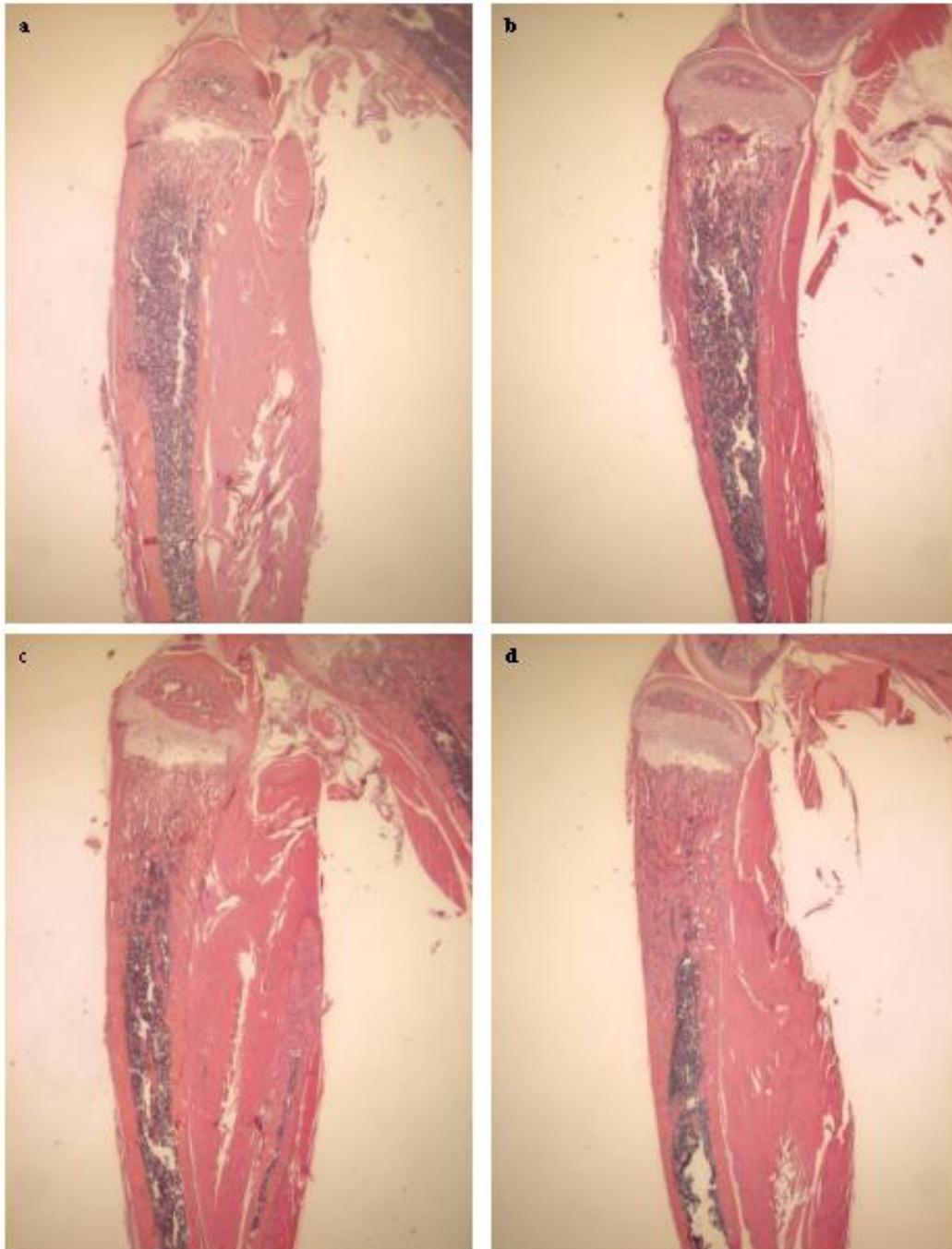


Abb. 5.5 H.E.-Färbung der proximalen Tibia zwei Wochen alter Mäuse in 1,25 facher Vergrößerung. Dargestellt sind histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+rr) (d).

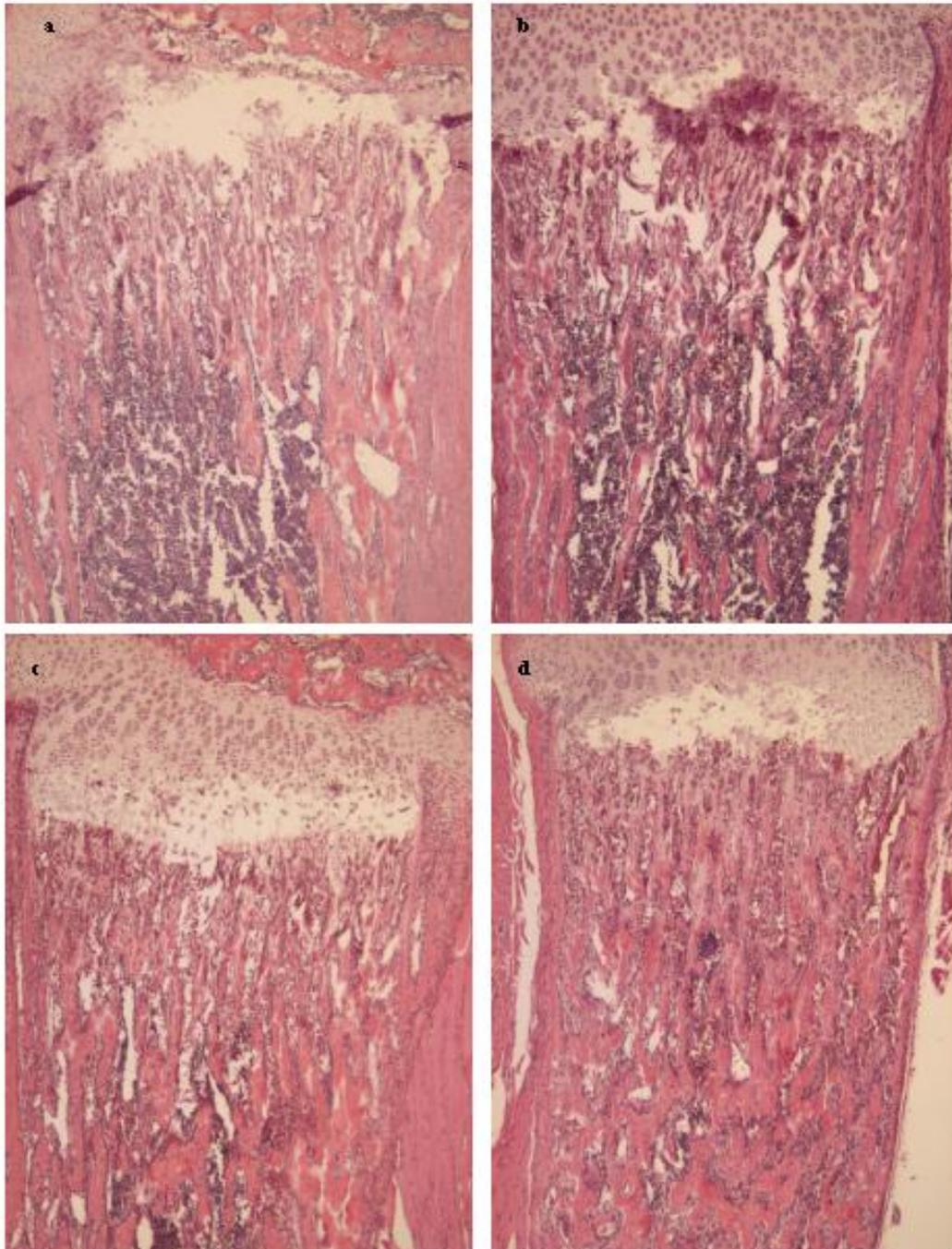


Abb. 5.6 H.E.-Färbung der proximalen Tibia zwei Wochen alter Mäuse in 5 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2^{-/-}) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2^{-rr}) (b), der transgenen Maus (CL2^{+/-}) (c) und der Experimentmaus (CL2^{+/rr}) (d).

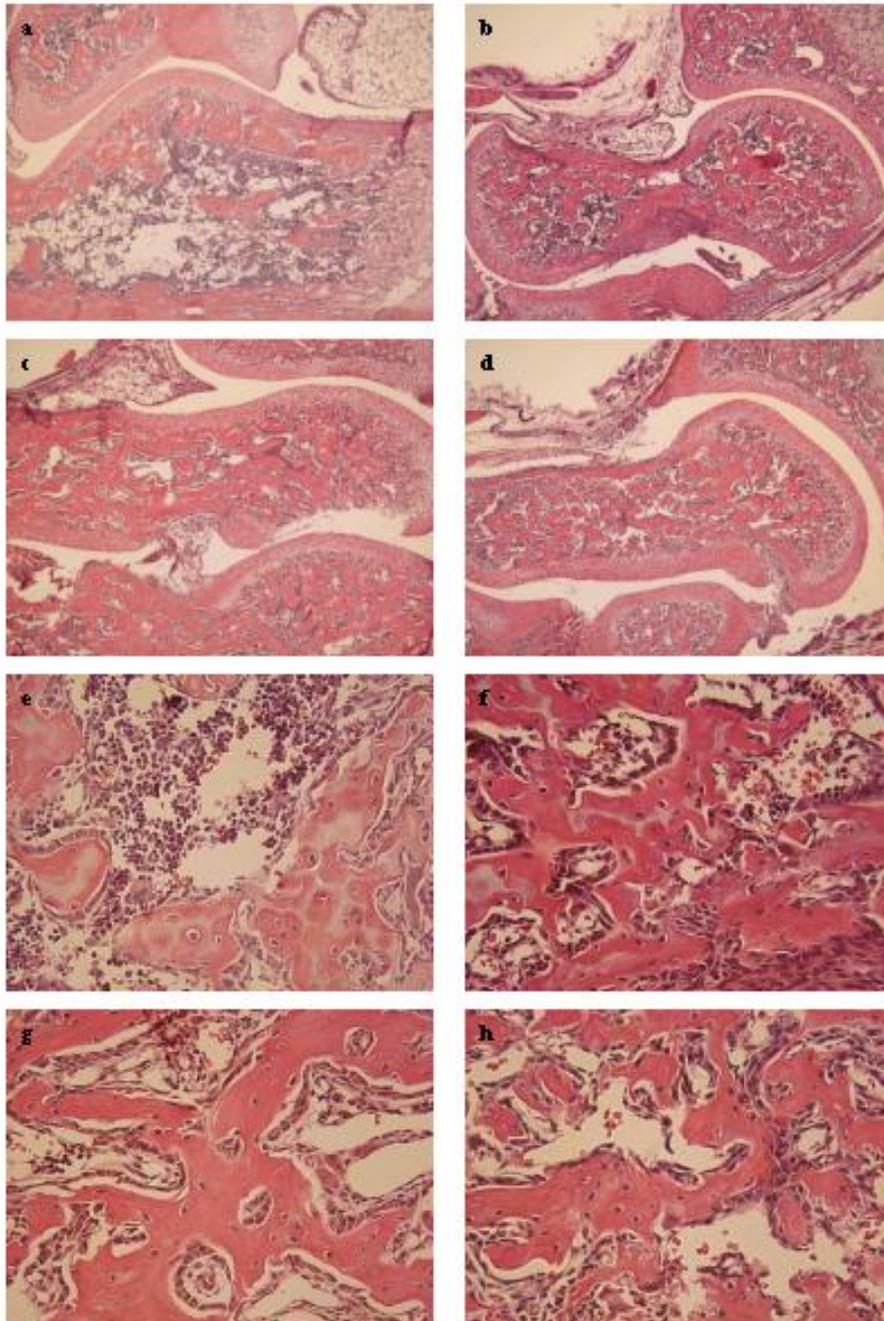


Abb. 5.7 H.E.-Färbung der Fußknochen (Talus/ Kalkaneus) zwei Wochen alter Mäuse in 5 facher (**a-d**) und 25 facher (**e-h**) Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (**a** und **e**), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (**b** und **f**), der transgenen Maus (CL2+/-) (**c** und **g**) und der Experimentmaus (CL2+/rr) (**d** und **h**).

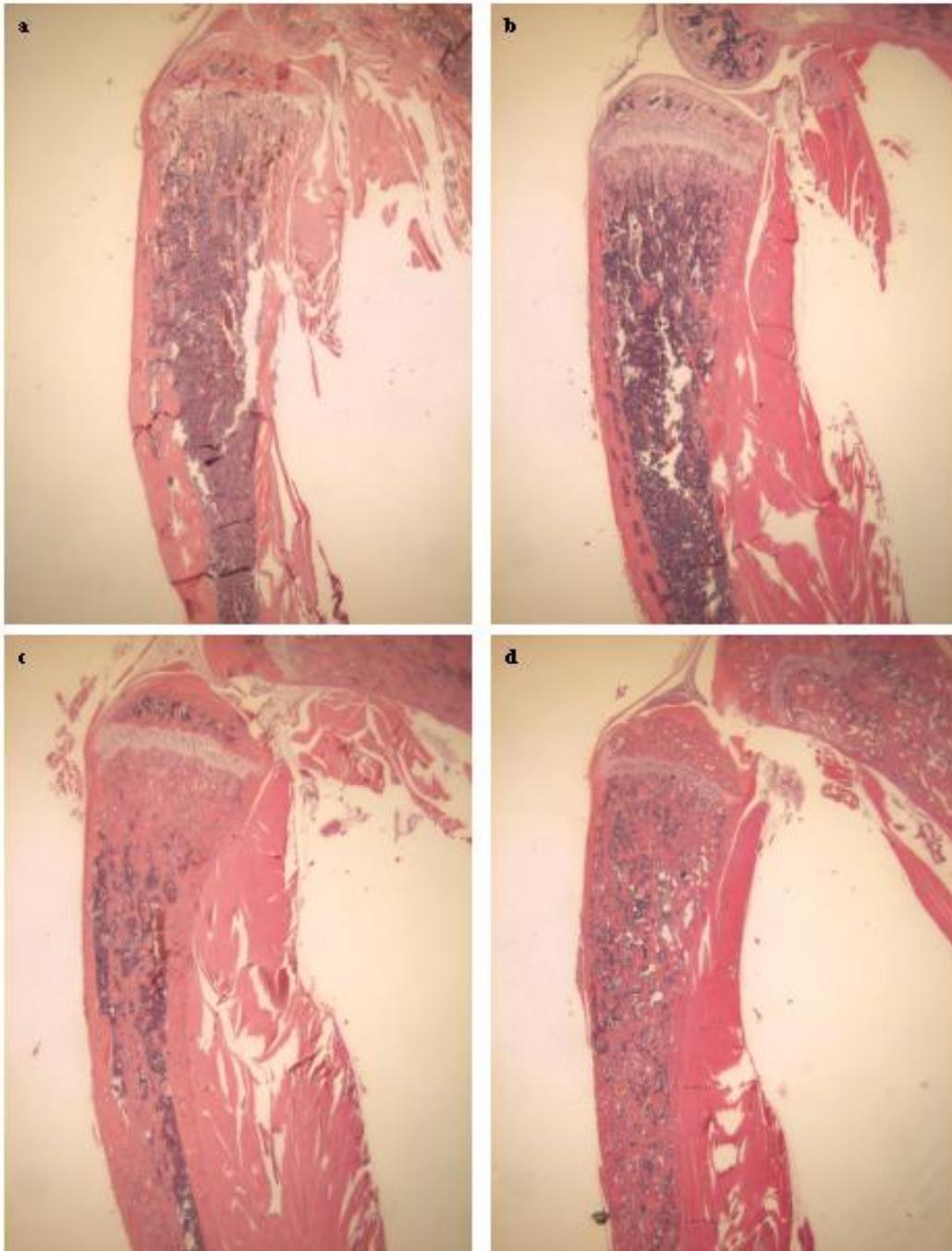


Abb. 5.8 H.E.-Färbung der proximalen Tibia vier Wochen alter Mäuse in 1,25 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+/rr) (d).

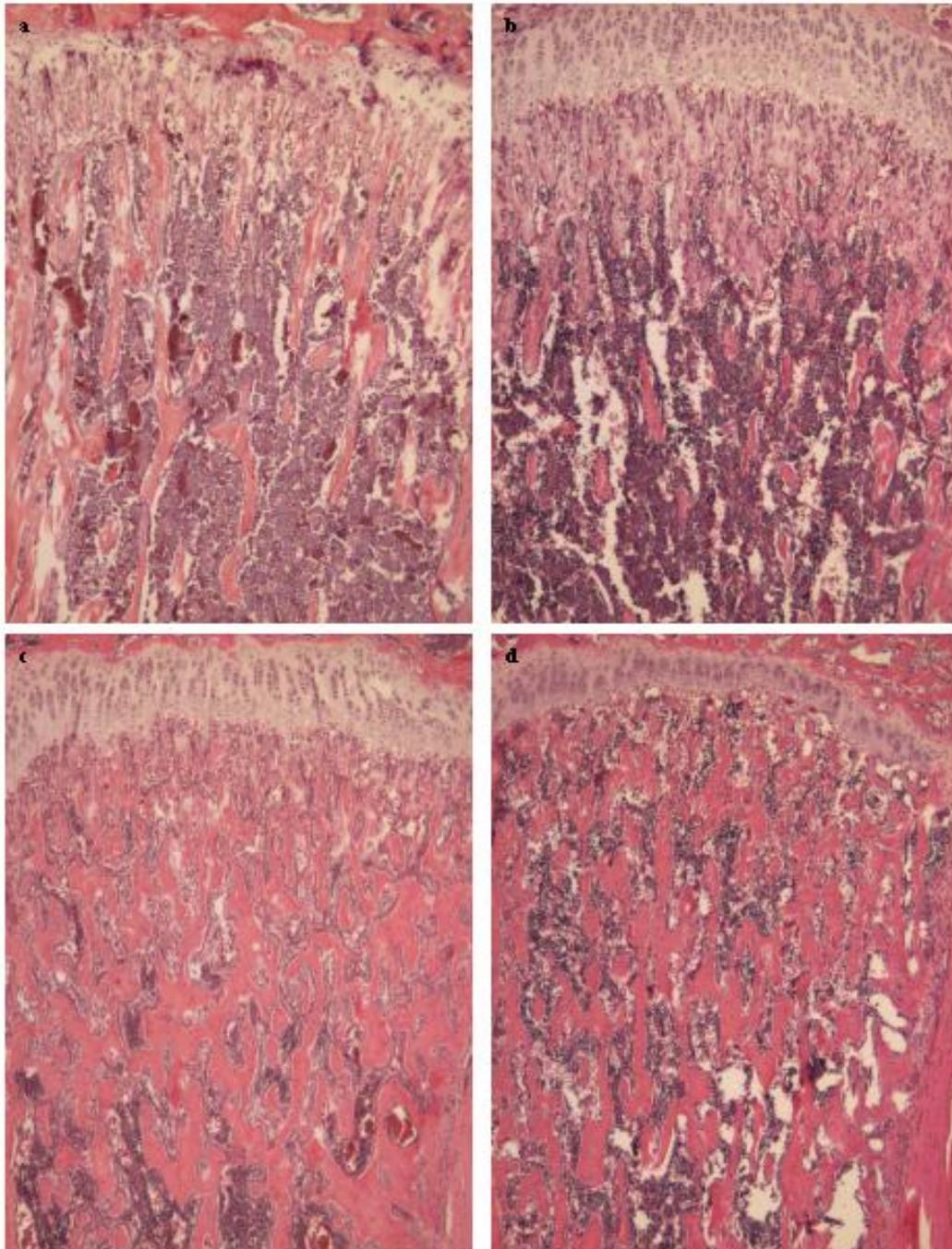


Abb. 5.9 H.E.-Färbung der proximalen Tibia vier Wochen alter Mäuse in 5 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+/rr) (d).

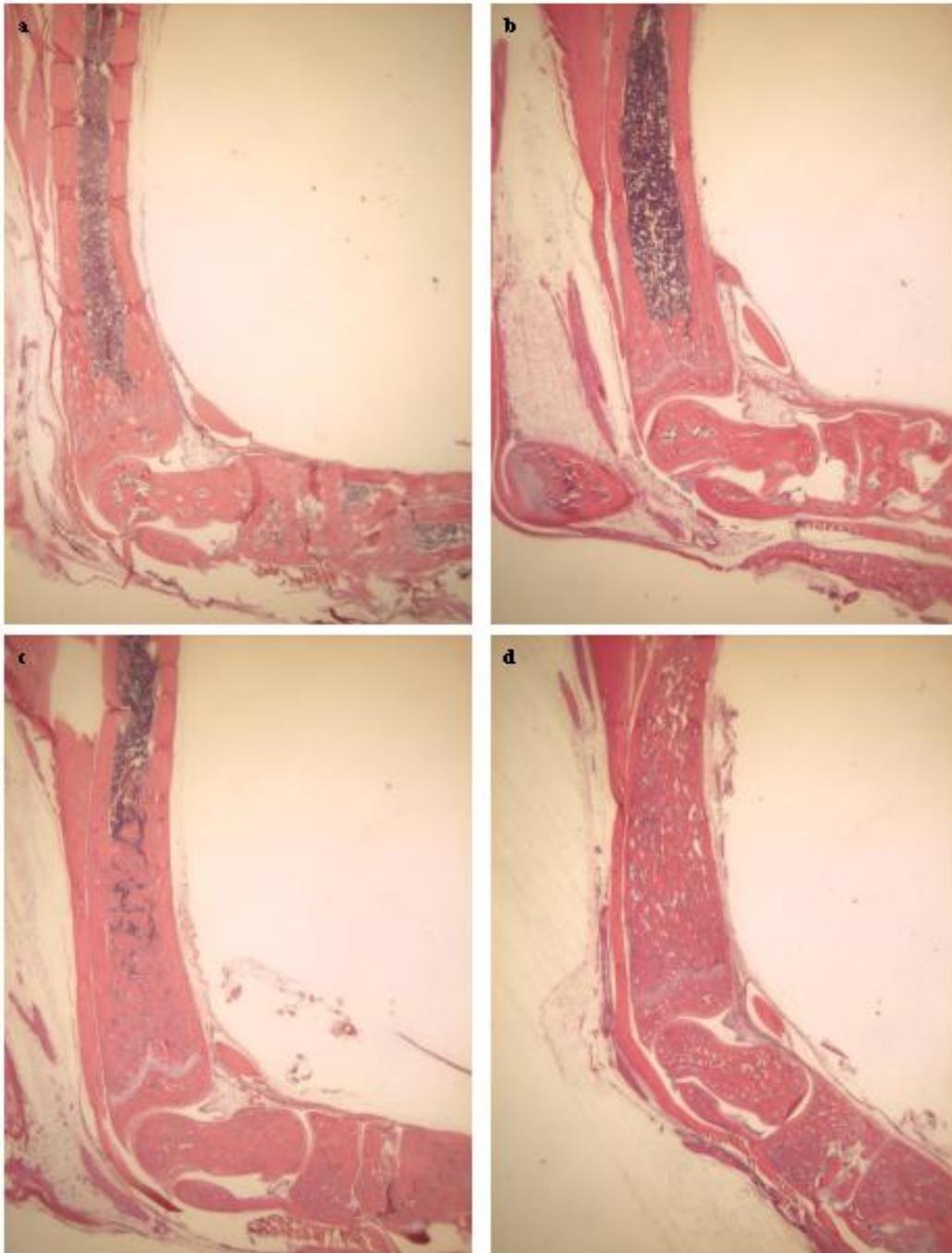


Abb. 5.10 H.E.-Färbung der distalen Tibia mit Sprunggelenk und Fußwurzelknochen vier Wochen alter Mäuse in 1,25 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2^{-/-}) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2^{-tr}) (b), der transgenen Maus (CL2^{+/-}) (c) und der Experimentmaus (CL2^{+tr}) (d).

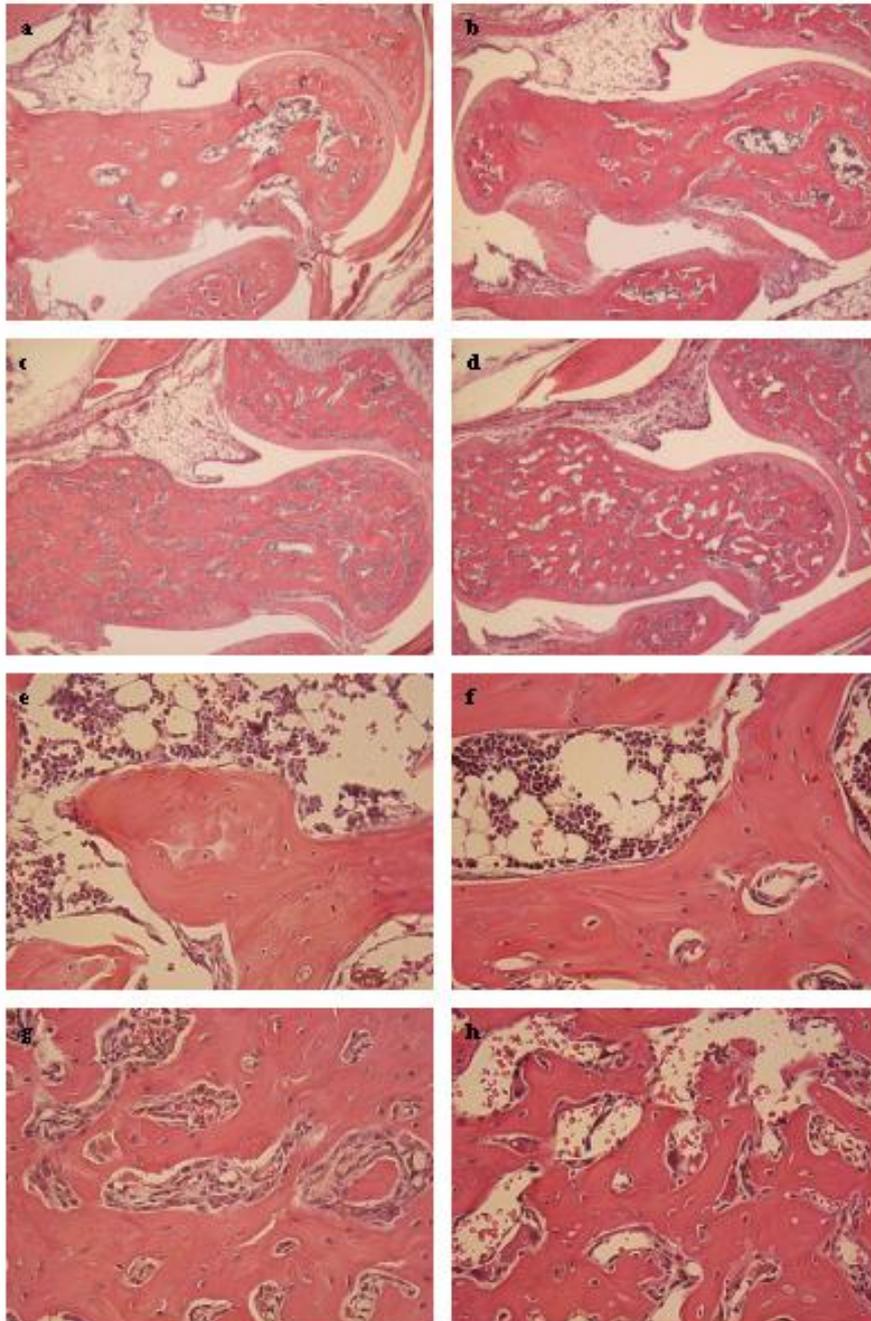


Abb. 5.11 H.E.-Färbung des Talus vier Wochen alter Mäuse in 5 facher (**a-d**) und 25 facher (**e-h**) Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2^{-/-}) (**a** und **e**), der Kollagen I-Mutation (CL2^{-/rr}) (**b-f**), der transgenen Maus (CL2^{+/-}) (**c-g**) und der Experimentmaus (CL2^{+/rr}) (**d** und **h**).

Da in den langen Röhrenknochen offensichtlich nur noch stark eingeschränkt Blutbildung stattfinden konnte, wurden Leber und Milz als mögliche Orte Extramedullärer Hämatopoese untersucht. Bereits makroskopisch erschienen die beiden Organe der doppelt mutierten Tiere (CL2+/rr) vergrößert. In der H.E.-Färbung ließen sich sowohl in der Leber als auch in der Milz Bereiche mit Hämatopoese nachweisen.

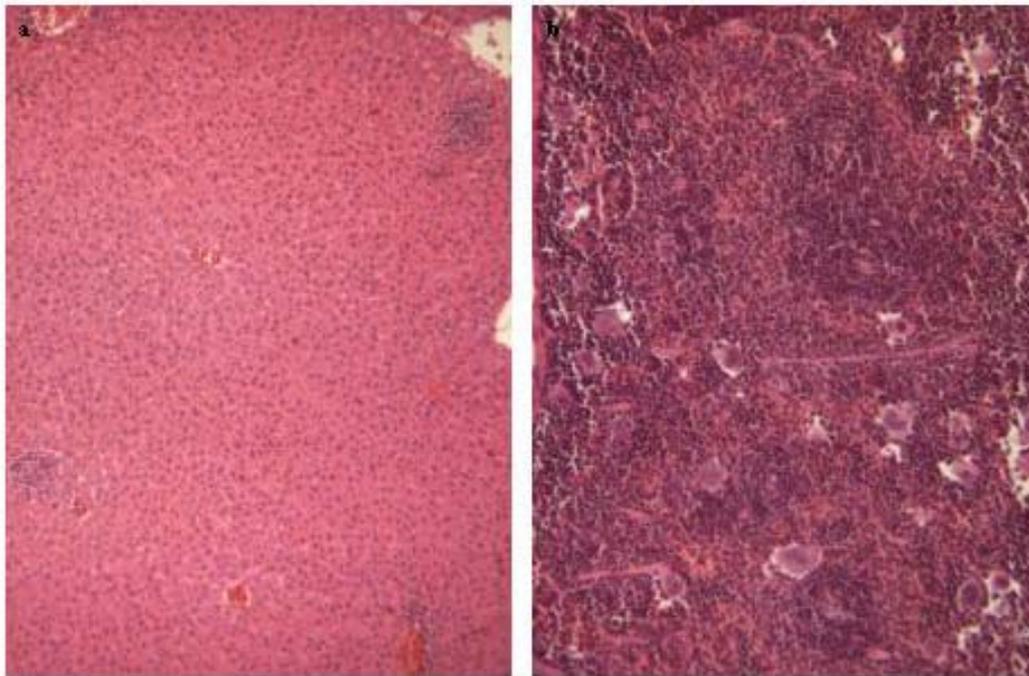


Abb. 5.12 H.E.-Färbung der Leber in 10 facher (**a**) und der Milz in 15 facher (**b**) Vergrößerung einer Experimentmaus (CL2+/rr) im Alter von vier Wochen mit Extramedullärer Blutbildung.

5.3.3 Schädelknochen

Als Beispiel für desmale Ossifikation wurden Schnitte der Ossa parietalia angefärbt.

Die bereits beschriebene und hier nachvollziehbare Zunahme an Knochenporosität der transgenen Mäuse (CL2+/-) ließ sich für die Experimentmäuse (CL2+/rr) nicht steigern. Die Schädelknochen wirkten vielmehr kompakter und in ihrem Gesamtdurchmesser etwa gleich dünn wie die der transgenen Maus. Die beiden Knochenblätter waren im medialen Bereich nicht nur durch Knochenmark, sondern durch mit Knochenbälkchen durchsetzte Knochenmarksbereiche voneinander getrennt. Dadurch wurde die Struktur des Schädelknochenaufbaus aufgelockert.

Da es jedoch sehr schwierig ist, Schädelknochen immer im exakt identischen Winkel zu schneiden, kann hierbei ein schnittechnisch bedingter Artefakt nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5.3.4 Zähne

Da bereits von den transgenen Mäusen (CL2+/-) Zahnabnormalitäten bekannt waren, stellte sich die interessante Frage, ob diese auch in den Experimentmäusen (CL2+/rr) präsent waren. Tatsächlich zeichneten sich sowohl Molaren als auch Inzisoren durch vergleichbar ungeordnete Strukturen aus. Die Schichten des Amelins und Dentins gingen teilweise unstrukturiert ineinander über, beziehungsweise fehlten vollständig.

Sehr auffällig war die riesenhafte Ausdehnung der Zähne in der doppelt mutierten Maus (CL2+/rr). Die wohl kaum mehr in den Rahmen eines Schnittartefakts zu zählende Zahnvergrößerung ragte um so mehr ins Auge des Betrachters, als dass die Köpfe der Experimentmäuse, entsprechend dem oben beschriebenen Phänotyp, kleiner als die des Wildtyps (CL2/-) und der transgenen Maus (CL2+/-) waren.

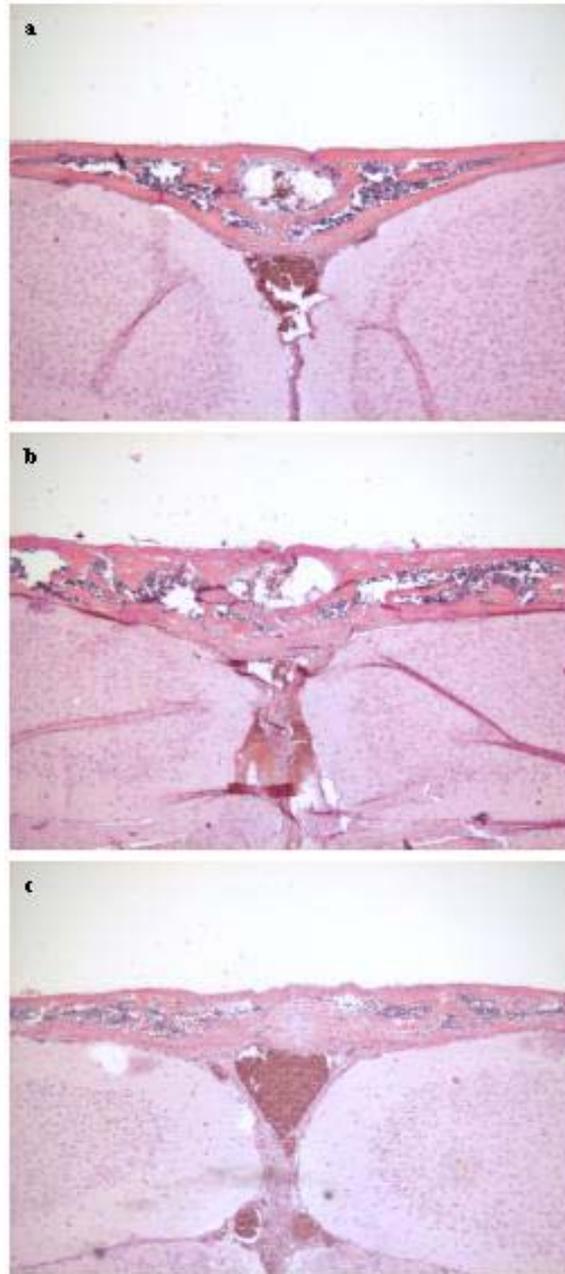


Abb. 5.13 H.E.-Färbung der Schädelknochen zwei Wochen alter Mäuse in 5 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der transgenen Maus (CL2+/-) (b) und der Experimentmaus (CL2+/rr) (c).

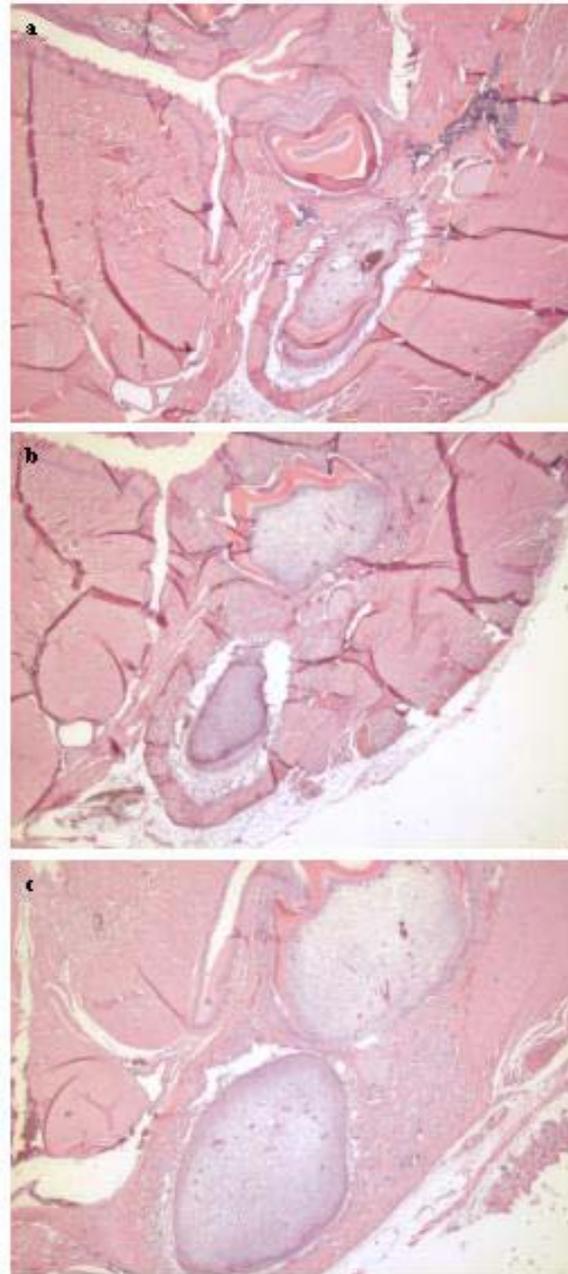


Abb. 5.14 H.E.-Färbung der Zähne (Inzisor und Molar links) zwei Wochen alter Mäuse in 2,8 facher Vergrößerung. Histologische Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der transgenen Maus (CL2+/-) (b) und der Experimentmaus (CL2+/tr) (c).

5.4 In-situ-Hybridisierung

Es wurden In-situ-Hybridisierungen der Tibia angefertigt, um die einzelnen Zellen differenzieren zu können und um ihre Lokalisation innerhalb des Knochens zu beschreiben.

Die ersten Versuche wurden mit insgesamt acht verschiedenen ³⁵S-markierten cRNA-Nukleotidverbindungen durchgeführt, welche spezifisch Zellen der Osteoblasten-, beziehungsweise der Osteoklastenlinie identifizieren konnten. Dabei wurden die unten beschriebenen Ergebnisse alle mehr oder weniger deutlich bestätigt. Trotzdem wurden die Experimente später aus technischen Gründen auf vier repräsentative und gut zu beurteilende Marker reduziert: Osteocalcin und Kollagen I wurden als Marker für Osteoblasten verwendet, wobei die Osteocalcin-positiven Zellen als vollständig ausgereifte Osteoblasten betrachtet werden können. Als Osteoklastenmarker fungierten TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) (reife Osteoklasten) und Kollagenase 4 (MMP9).

In den In situ-Hybridisierungen mit Osteocalcin und Kollagen I als radioaktiv markierte cRNA-Sonde fiel das Signal in den genotypisch verschiedenen zwei bis vier Wochen alten Mäusen annähernd gleich stark aus. Absolut wirkte es in den Experimentmäusen (CL2+/rr) im Vergleich zum Wildtyp (CL2/-/-) und zur transgenen Maus (CL2+/-/-) zwar vor allem in der Tibia und auch im Talus leicht verstärkt, dies spiegelte jedoch eher die Zunahme der Trabekulae und die Obliteration der Knochenmarkshöhle wider. Bezogen auf das vorhandene Knochenvolumen schien die relative Zahl der Osteoblasten in den Experimentmäusen verglichen mit dem Wildtyp eher abgenommen denn zugenommen zu haben.

Anders verhielt es sich in den Experimenten zur Identifizierung der Knochen-resorbierenden Zellen (TRAP und Kollagenase 4 als Marker).

In den Experimentmäusen (CL2+/rr) konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche Signalverstärkung in allen untersuchten Knochen beobachtet werden. Zum einen nahm die absolute Zahl an Zellen der Osteoklastenlinie zu, zum anderen verstärkte sich zusätzlich die Intensität des Signals. Erneut bestätigte die großzügige Verteilung der radioaktiv markierten Zellen innerhalb der Knochen die extreme Ausdehnung der Knochensubstanz in den Experimenttieren (CL2+/rr). Aber auch bezogen auf das Knochenvolumen wiesen die Tiere, sowohl im Vergleich zum Wildtyp also auch zu den transgenen Mäusen (CL2+/-/-), eine deutliche Zunahme der TRAP- und Kollagenase 4-positiven Zellen vor, welche sich auf der gesamten Knochenoberfläche, also im Trabekularknochen und im Bereich der Kortikalis niederschlug.

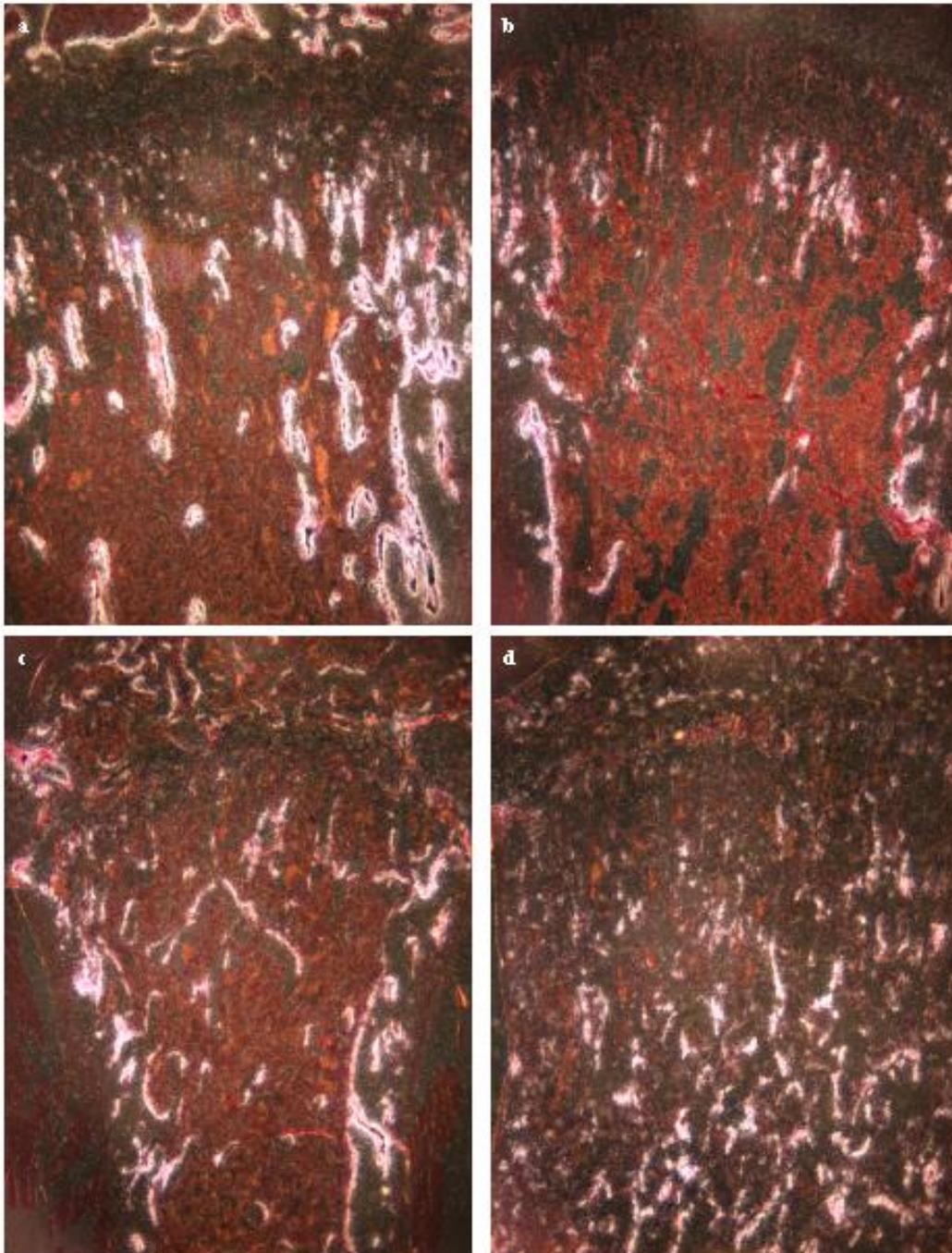


Abb. 5.15 In situ-Hybridisierung mit ³⁵S-markierter Osteocalcin-cRNA in einem Ausschnitt der proximalen Tibia vier Wochen alter Mäuse. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen in Dunkelfeldmikroskopie in 5 facher Vergrößerung. Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+rr) (d).

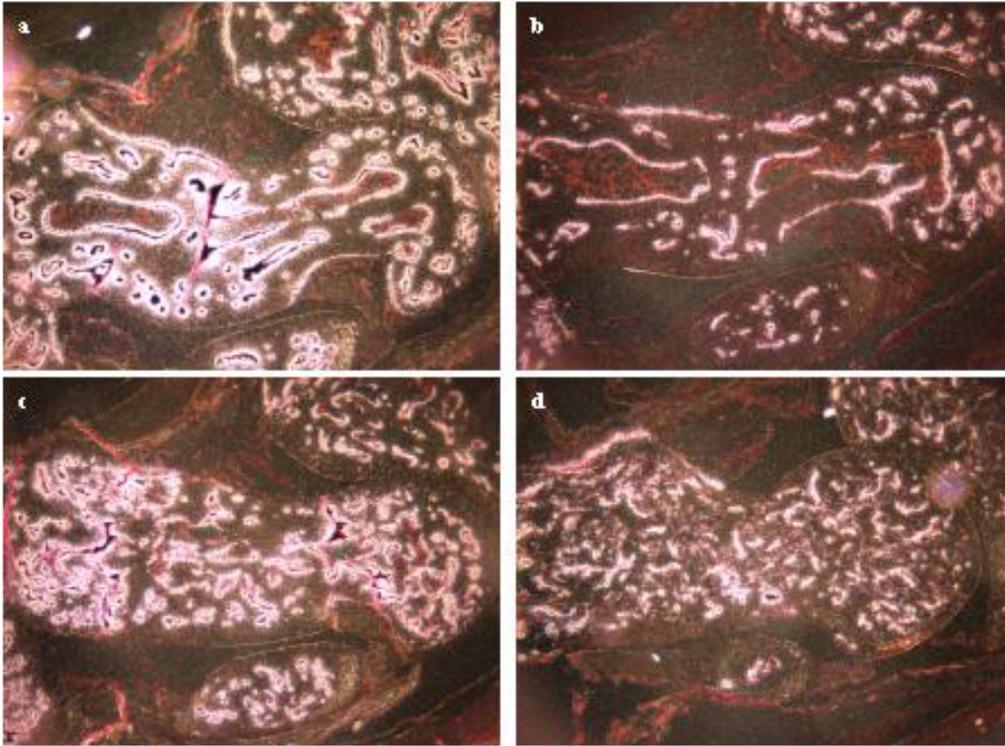


Abb. 5.16 In situ-Hybridisierung mit ^{35}S -markierter Osteocalcin-cRNA des Talus vier Wochen alter Mäuse. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen in Dunkelfeldmikroskopie in 5 facher Vergrößerung. Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+rr) (d).

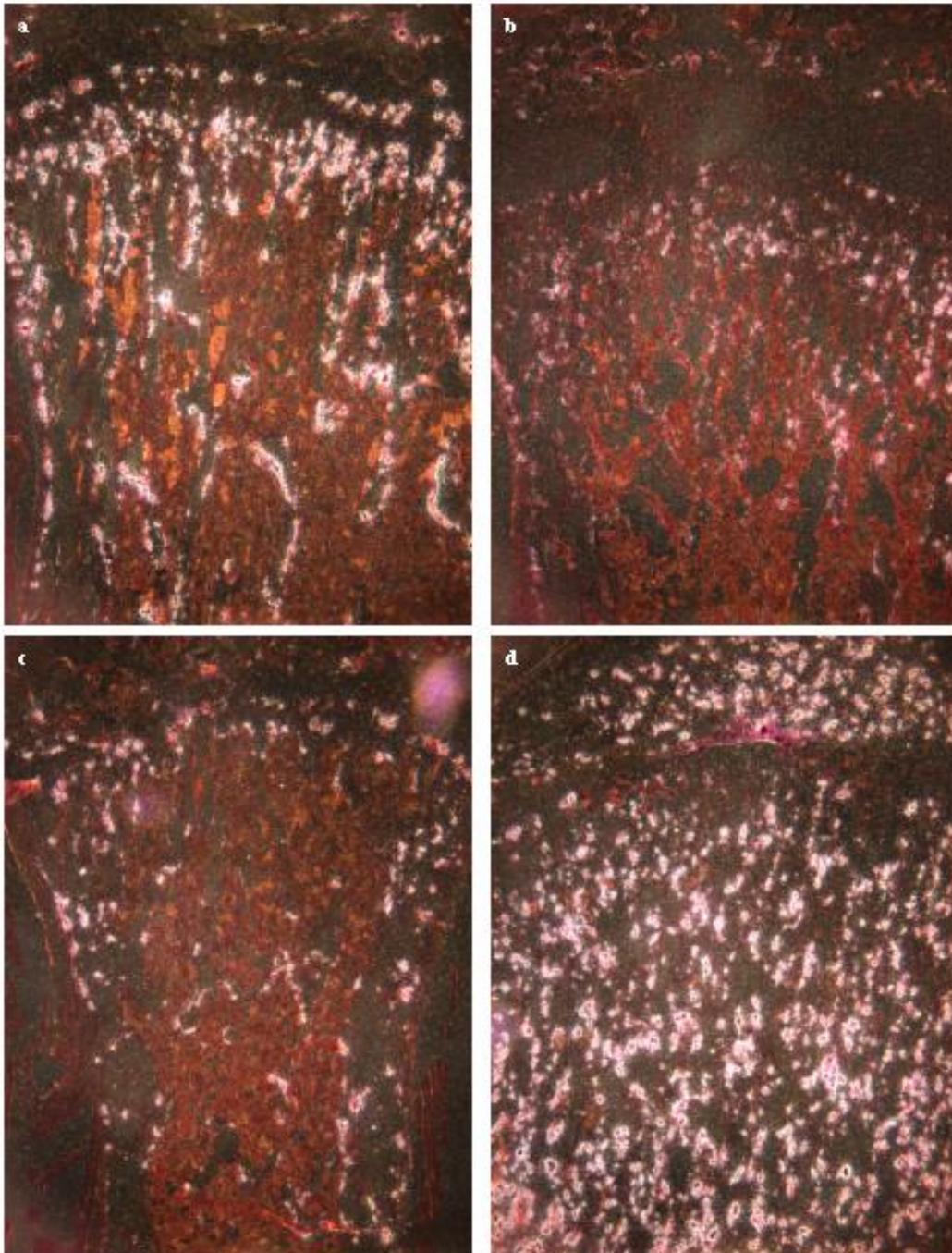


Abb. 5.17 In situ-Hybridisierung mit ³⁵S-markierter TRAP-cRNA in einem Ausschnitt der proximalen Tibia vier Wochen alter Mäuse. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen in Dunkelfeldmikroskopie in 5 facher Vergrößerung. Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (a), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (b), der transgenen Maus (CL2+/-) (c) und der Experimentmaus (CL2+rr) (d).

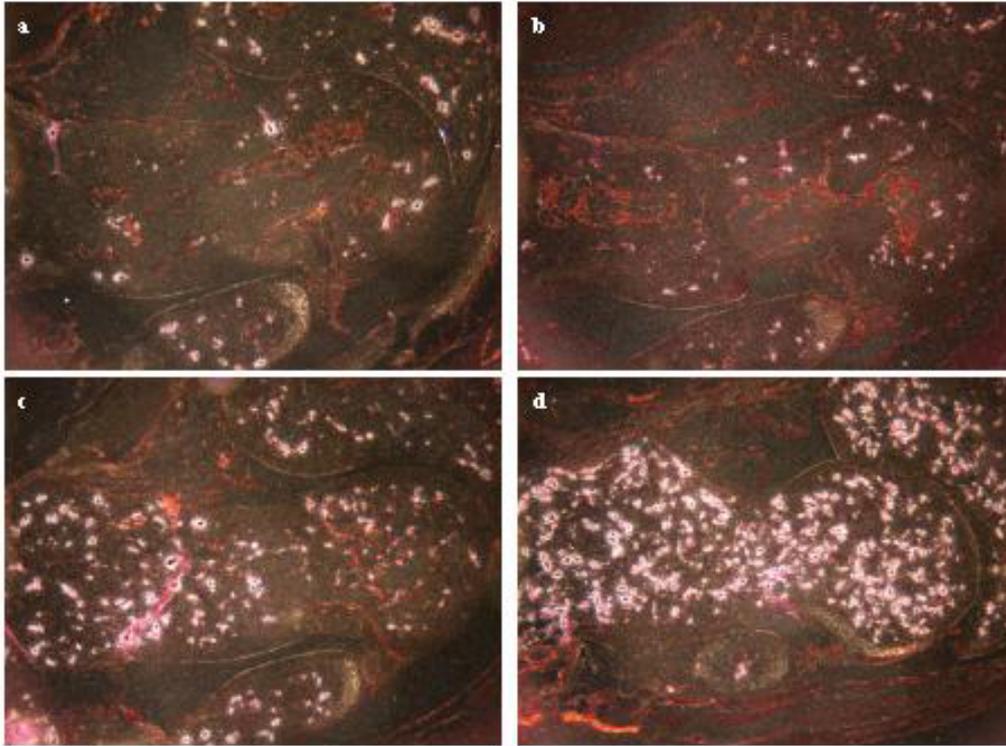


Abb. 5.18 In situ-Hybridisierung mit ^{35}S -markierter TRAP-cRNA des Talus vier Wochen alter Mäuse. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen in Dunkelfeldmikroskopie in 5 facher Vergrößerung. Schnitte des Wildtyps (CL2-/-) (**a**), der Kollagen I-Mutation (CL2-rr) (**b**), der transgenen Maus (CL2+/-) (**c**) und der Experimentmaus (CL2+rr) (**d**).

Zur Vervollständigung und Kontrolle dieser Ergebnisse wurden bei ausgewählten Tieren zusätzlich TRAP-Färbungen durchgeführt. Bei dieser enzymatischen Reaktion ließen sich unter dem Lichtmikroskop in den Experimentmäusen (CL2+/rr) erneut sehr viele positive Zellen erkennen, welche der Knochenoberfläche anhafteten. Somit wurden die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierungen auf Proteinebene bestätigt.

Alle hier vorgefundenen Beobachtungen waren in den Experimenten mit zwei und vier Wochen alten Tieren konsistent.

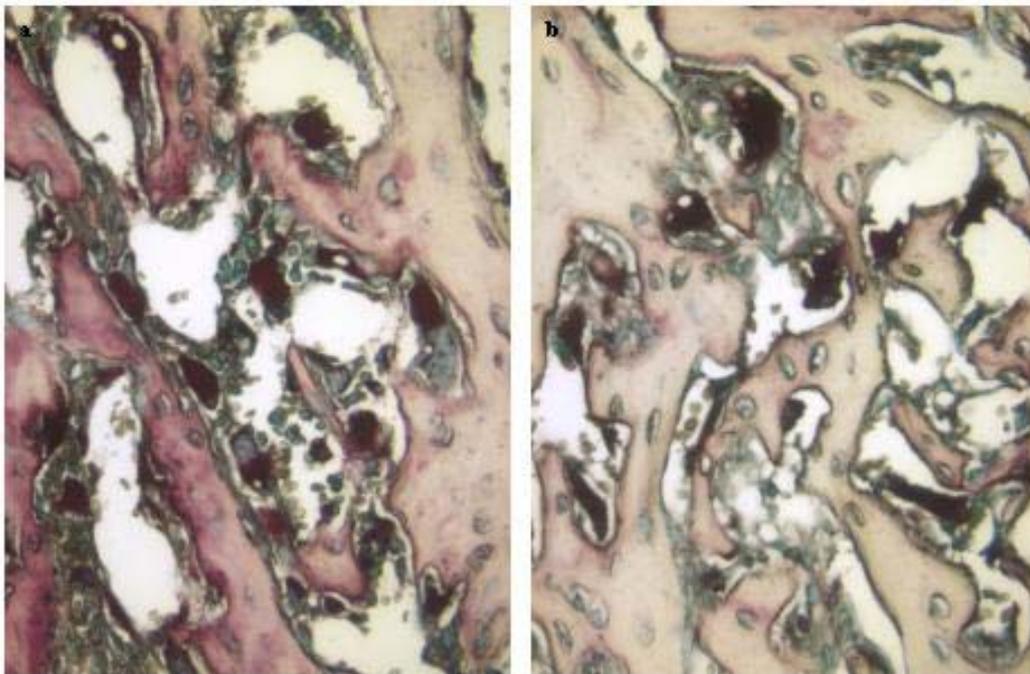


Abb. 5.19 TRAP-Färbung der proximalen Tibia (a) und des Talus (b) einer Experimentmaus (CL2+/rr) im Alter von vier Wochen in 30 facher Vergrößerung.

5.5 Histomorphometrie des Knochens

Die bisher beschriebenen qualitativen Veränderungen der Experimentmäuse wurden durch Messungen im Labor von R. Chiusaroli/ R. Baron, Yale (CT), quantifiziert.

Im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) und zur Kollagen I-Mutation (CL2-/rr) war in den Experimentmäusen (CL2+/rr) ebenso wie in den transgenen Mäusen die Dicke der Kortikalis auf etwa die Hälfte reduziert. Diese Veränderung war hoch signifikant. Die Periostale Mineralisierungsrate (periosteal mineral apposition rate) als Korrelat der Osteoblastenfunktion im kortikalen Knochensegment verhielt sich für die Experimentmäuse (CL2+/rr) erneut ähnlich wie für die transgenen Tiere (CL2+/-): Signifikante Erniedrigung im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) und der Kollagen I-Mutation (CL2-/rr).

Somit bewirkte die Kollagen I-Alteration der transgenen Mäuse im Bereich des Kortikalknochens keine zusätzlichen Veränderungen und konnte nicht einmal in geringem Maße den transgenen Phänotyp (CL2+/-) korrigieren.

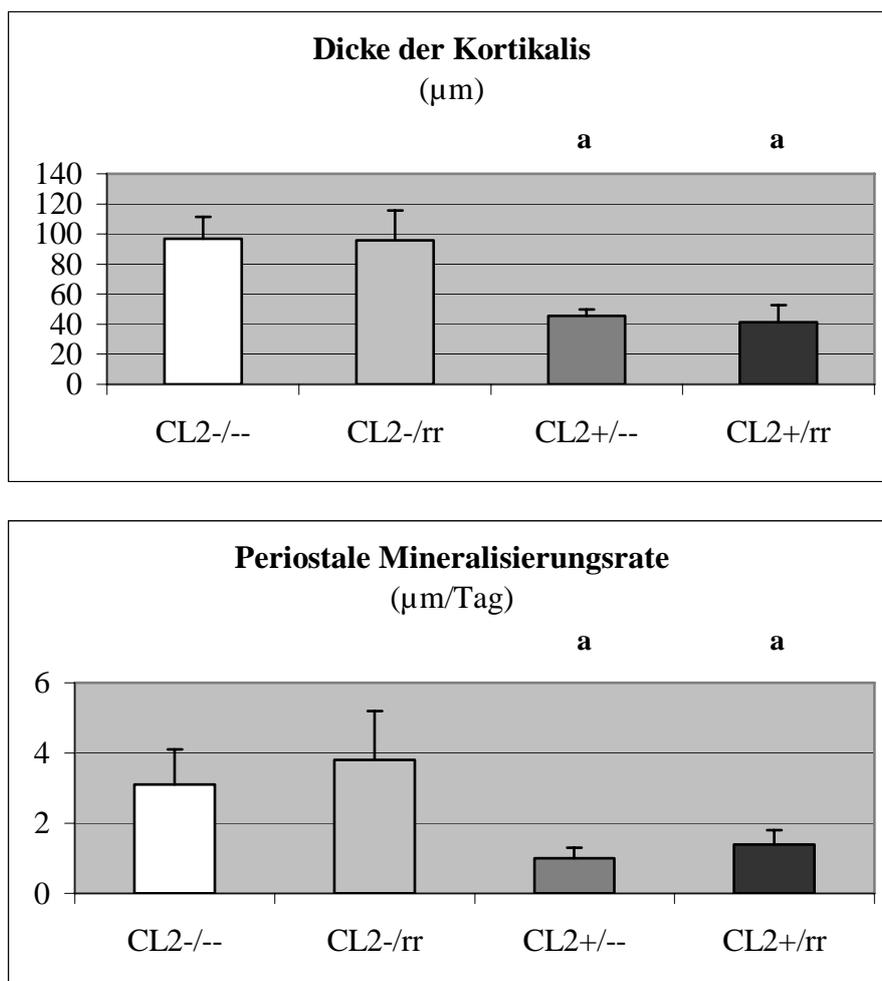


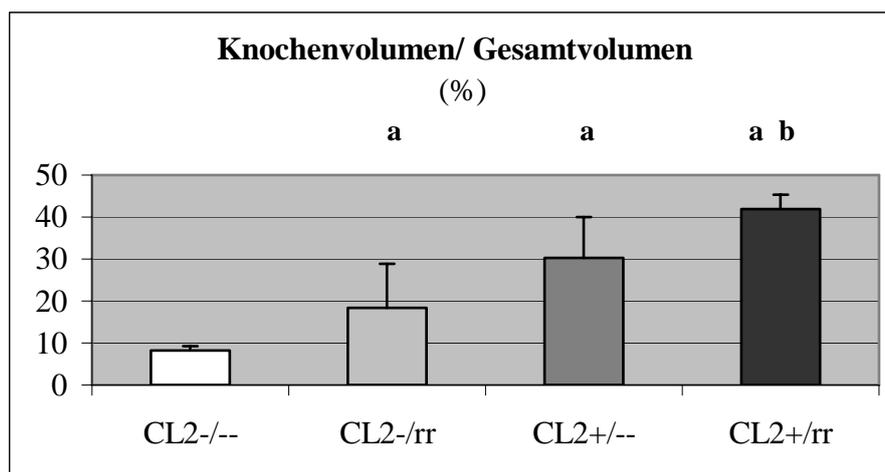
Abb. 5.20 Histomorphometrie der Kortikalis, Tibia. a, $P < 0,05$ gegen Wildtyp (CL2-/-).

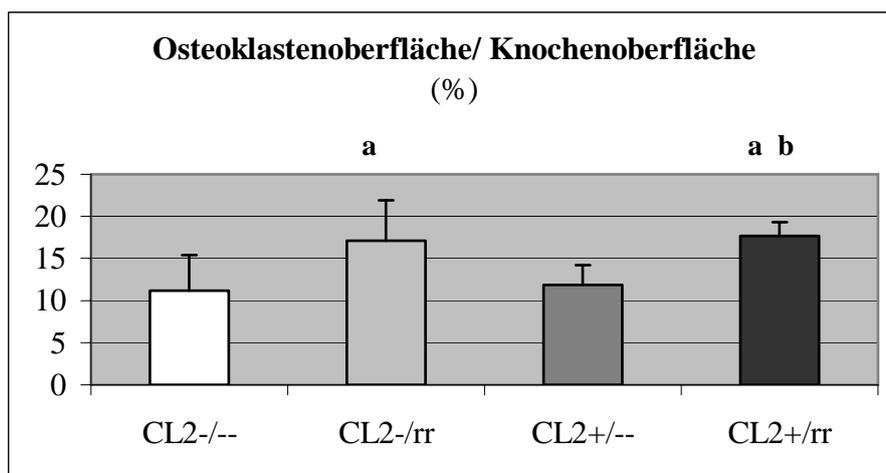
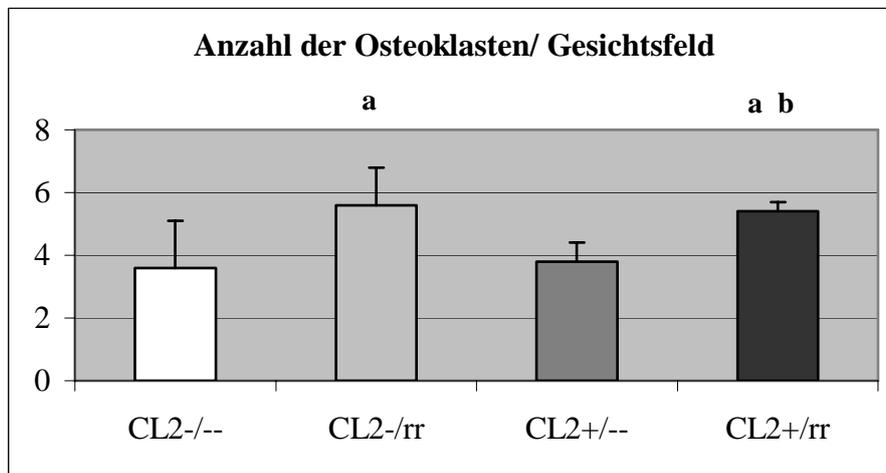
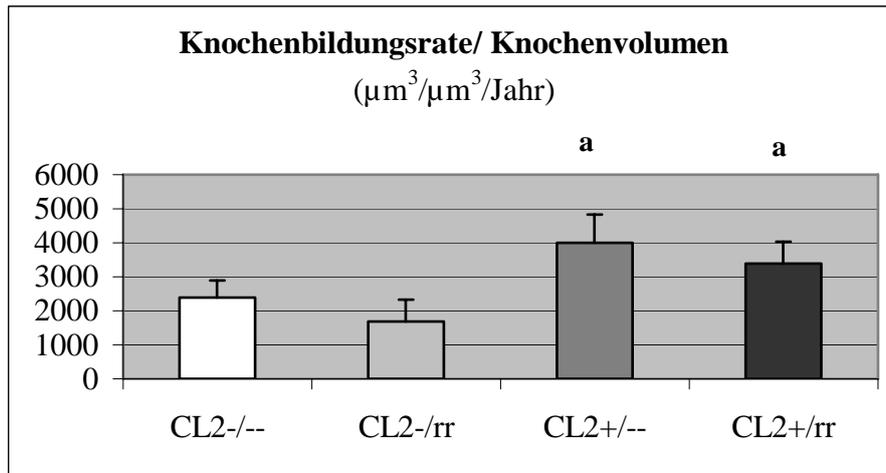
Auch im Bereich des Trabekularknochens konnten statische und dynamische knochenmorphometrische Untersuchungen die bereits qualitativ beschriebenen Ergebnisse bestätigen. Wie es aufgrund der eindrucksvollen Histologie zu erwarten gewesen war, zeichneten sich die Experimenttiere (CL2+/rr) durch eine deutliche Vermehrung des trabekulären Knochen volumens aus.

In der dynamischen Histomorphometrie zeigten vier Wochen alte CL2-/rr-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) eine Abnahme der Knochenbildungsrate und der trabekulären Mineralisierungsrate („mineral apposition rate“), einem Index der Osteoblastenfunktion. Ebenso nahmen diese beiden Parameter in den doppelt mutierten Mäusen (CL2+/rr) im Vergleich zu den rein transgenen Tieren (CL2+/-) ab, waren jedoch immer noch signifikant größer als im Wildtyp (CL2-/-).

Die Anzahl der Osteoklasten im Trabekularsegment war in den Experimentmäusen (CL2+/rr) ebenso wie in der Kollagen I-Mutation im Vergleich zum Wildtyp und zu den transgenen Mäusen (CL2+/-) deutlich erhöht. Gegenläufig dazu verhielt sich die Anzahl der Osteoblasten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibierung der Kollagenase abhängigen Kollagenspaltung die Osteoblastenaktivität im Trabekularknochen abschwächt und die Osteoklastenfunktion teilweise verhindert. Diese beiden Effekte resultieren in einer Zunahme des Trabekularvolumens.





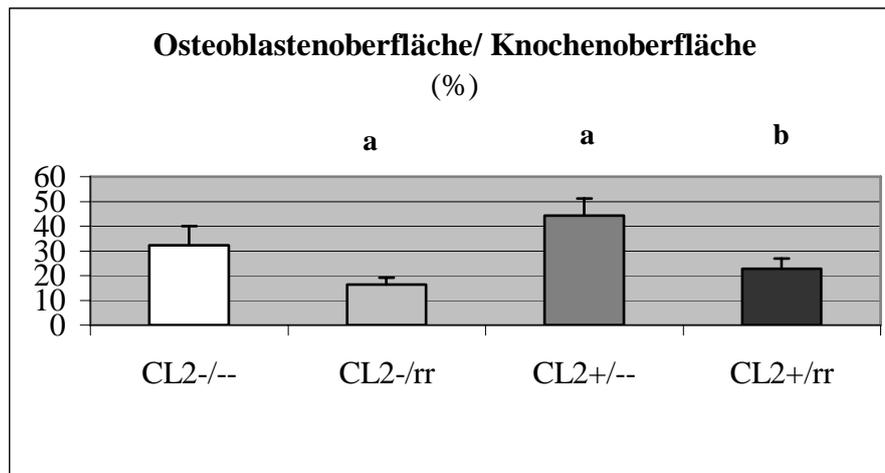
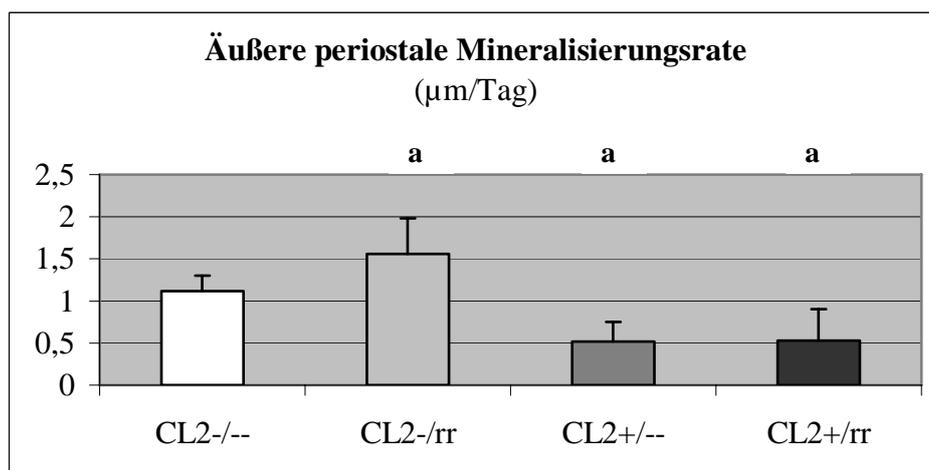


Abb. 5.21 Histomorphometrie des Trabekularknochens, Tibia. a, $P < 0,05$ gegen Wildtyp (CL2-/-). b, $P < 0,05$ gegen transgene Maus (CL2+/-).

Bei den dynamischen Messungen im Bereich der Schädelknochen imponierte in der Experimentmaus (CL2+/rr) eine mit der transgenen Maus vergleichbare reduzierte Mineralisierungsrate im inneren und äußeren periostalen Bereich. Ebenso war die Porosität in diesen beiden Mäusen annähernd gleich hoch und im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht.

Somit konnte wie bereits im Kortikalknochen kein statistisch fassbarer Unterschied zwischen den transgenen Mäusen (CL2+/-) und den doppelt mutierten Tieren (CL2+/rr) gefunden werden.



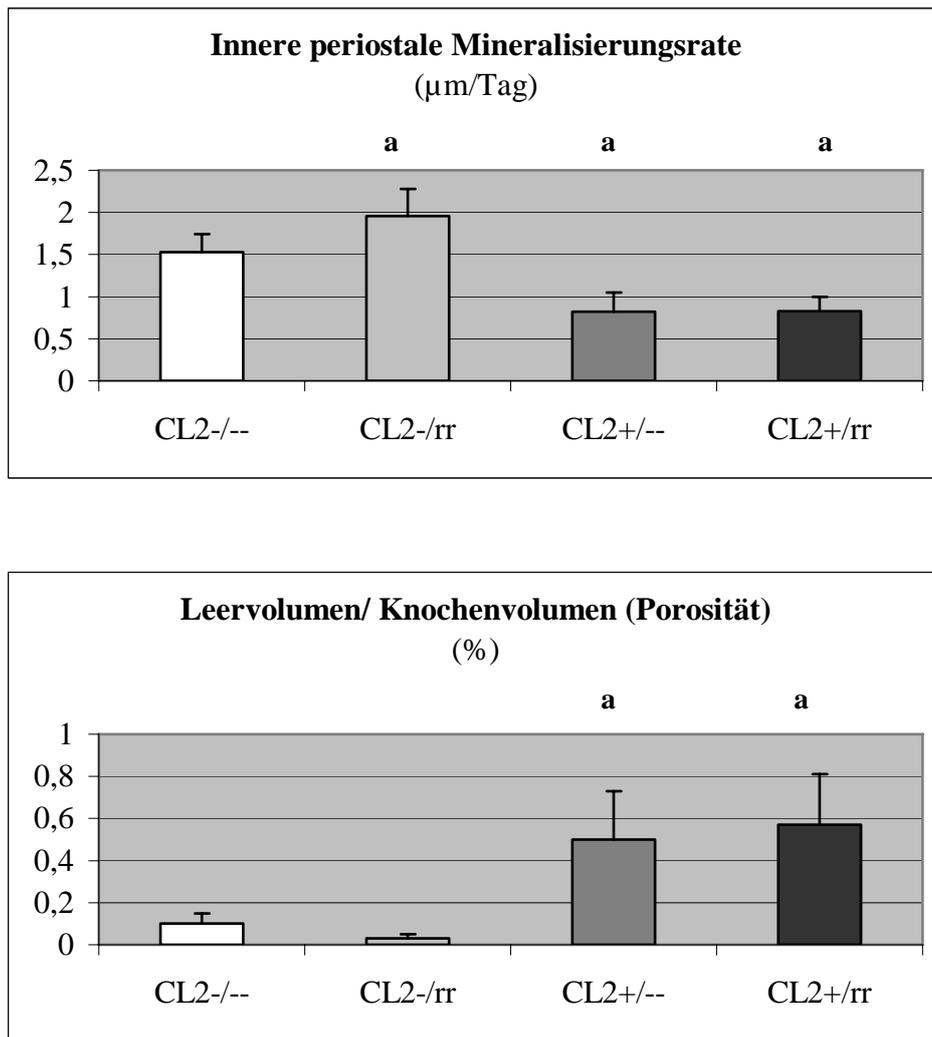


Abb. 5.22 Histomorphometrie der Schädelknochen. a, $P < 0,05$ gegen Wildtyp (CL2-/-). b, $P < 0,05$ gegen transgenen Maus (CL2+/-).

Abb. 5.20-5.22 Die statistische Analyse der histomorphometrischen Messungen wurde mit ANOVA durchgeführt mit $P < 0,05$ als signifikant. a: signifikanter Unterschied zum Wildtyp (CL2-/-). b: signifikanter Unterschied zur transgenen Maus (CL2+/-). Die Messungen und statistischen Berechnungen wurden von R. Chiusaroli, Yale University, New Haven (CT) U.S. durchgeführt; mit freundlicher Genehmigung.

6. Diskussion

Um in vivo die Rolle der Matrixmetalloproteinasen für Parathormon induzierte Knochenumbauvorgänge (über den PTH/PTHrP-Rezeptor abhängigen cAMP-Signalweg) zu untersuchen und die bisherigen Erkenntnisse zu bestätigen, wurden Mäuse erzeugt, welche einerseits aufgrund eines in Osteoblasten exprimierten konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptors (CL2+) in ihrem Knochenaufbau verändert sind (Calvi L.M. et al., 2001) und andererseits eine Mutation im Gen für Kollagen I aufweisen, welche zu einer Resistenz seines Proteins gegenüber Abbau durch Kollagenasen führt (Wu H. et al., 1990; Liu X. et al., 1995).

Das Enzym Kollagenase 3 steht schon seit längerer Zeit im Verdacht, an den durch Parathormon induzierten Knochenumbauvorgängen beteiligt zu sein (Sakamoto S. et al., 1984; Selvamurugan N. et al., 2000). Erst vor kurzem konnte eine kollaborierende Arbeitsgruppe unter Leitung von S. Krane durch die Generierung der Kollagen I mutierten Mäuse (Col1 α 1^{tml Jae}) nachweisen, dass die genetisch veränderten Tiere im Vergleich zum Wildtyp auf Parathormongabe mit deutlich verminderter Knochenresorption reagieren (Zhao W et al., 1999).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Kollagen I- Spaltung durch Metalloproteinasen eine wichtige Rolle in der durch Parathormon eingeleiteten Knochenresorption spielt.

Durch die erstmals durchgeführte Kreuzung der transgenen (CL2+) mit den Col1 α 1^{tml Jae} - Mäusen ergab sich die Möglichkeit, Tiere zu untersuchen, welche auf der einen Seite selektiv in Osteoblasten einen konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor mit folgender Einleitung des cAMP-Signalweges und, je nach Knochenkompartiment, teilweise katabolem, teilweise anabolem Effekt aufweisen, auf der anderen Seite jedoch gegen die Parathormonwirkung auf osteoklastäre Knochenresorption (über die Kollagendegradierung durch Metalloproteinasen) resistent zu sein scheinen.

Eine entscheidende Frage war in diesem Zusammenhang, inwiefern Resorption mit nachfolgendem Knochenaufbau gekoppelt ist, beziehungsweise ob ein eingeschränkter Knochenabbau Veränderungen in der Knochenneuf ormation nach sich ziehen würde.

In der Versuchsanordnung wurden Tiere zweier verschiedener Mäuselinien miteinander gekreuzt. Aufgrund einer solchen Rassenmischung kann es zu Schwankungen in der Ausprägung verschiedener Merkmale kommen. Die signifikanten Unterschiede, die sich bei der

Untersuchung der Mäuse ergaben, waren wohl zu stark, als dass sie sich mit solchen "Vermischungserscheinungen" vereinbaren ließen.

Dennoch wurden zur Sicherheit Versuchstiere über mehrere Generationen hinweg mit einer der beiden Rassen zurückgekreuzt. Dabei konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine auffälligen Veränderungen festgestellt werden, so dass ein "Rassenmischungsartefakt" ausgeschlossen werden kann.

Die Experimentmaus (CL2+/rr) sollte aufgrund der Fragestellung in erster Linie mit der transgenen Maus (CL2+/-) verglichen werden. Zum besseren Verständnis der Vorgänge wurden zusätzlich Vergleiche zum Wildtyp (CL2/-) und zur reinen Kollagen I- Mutation (CL2-/rr) gezogen.

Das Optimalziel war es, die Experimentmaus und die drei verschiedenen Kontrolltiere aus einem Wurf zu isolieren, um sicher zu stellen, dass die Tiere nicht aufgrund der Größe des Wurfes oder anderer äußerer Einflüsse Unterschiede in der Reifung und im Wachstum aufzeigten. Auch geschlechtsspezifische Differenzen in der Knochenbeschaffenheit können sich bei Mäusen ab etwa einem Alter von zwei bis drei Wochen manifestieren. Deshalb sollten die Versuchstiere möglichst gleichgeschlechtlich sein.

Da es äußerst schwierig war, all diesen Forderungen gerecht zu werden (ein Wurf enthält für gewöhnlich zwischen vier und dreizehn verschiedengeschlechtliche Jungtiere), mussten jeweils geeignete Individuen aus verschiedenen Würfen ausgewählt werden. Erst durch die Gesamtauswertung vieler Vergleichspärchen fügte sich das "Ergebnispuzzle" zusammen. Wegweisend zeigten sich dabei auch die Untersuchungen an heterozygoten Mäusen (CL2-/r+), welche die Ergebnisse der eigentlichen Versuchstiere in zu erwartender Weise bestätigen konnten (nicht dargestellt). Insgesamt wurden die Resultate als so eindeutig erachtet, dass bei den weiteren Versuchen aus Zeitgründen auch Tiere verschiedener Würfe miteinander verglichen wurden.

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden die Zeitpunkte zwei und vier Wochen nach Geburt ausgewählt. Zwei Wochen, da von den transgenen Mäusen (CL2+) ein besonders starker Phänotyp in diesem Alter bekannt war, dessen Ausprägung im weiteren Verlauf abnahm, um sich im Alter von drei Monaten erneut zu verstärken.

Es stellte sich heraus, dass sich die Experimenttiere (CL2+/rr) jedoch bereits im Alter von zwei Wochen durch einen stark abweichenden eigenen Phänotyp auszeichneten, welcher über mehrere Wochen hinaus konstant blieb. Demzufolge eigneten sich vier Wochen alte adulte

Mäuse aufgrund der zu diesem Zeitpunkt sehr starken Unterschiede besonders gut für die vergleichenden Untersuchungen.

Da nach neueren Erkenntnissen die Kollagen I-mutierten Mäuse mit zunehmendem Alter Abnormalitäten in verschiedenen Organbereichen aufweisen (Zhao W. et al., 2000) und außerdem für die transgenen Mäuse (CL2+) geringfügige Schwankungen der phänotypischen Merkmalsausprägung bekannt sind, wäre eine weitere Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt eine wünschenswerte Ergänzung der bisher durchgeführten Experimente. Veränderungen beim Knochenumbau könnten auf längere Sicht deutlicher zum Tragen kommen als in der kurzen Zeit von vier Wochen nach Geburt.

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde die bewährte Southern Blot-Methode ausgewählt (Schipani E. et al., 1997). Sie wurde trotz des hohen Zeitaufwands vor allem deshalb einer Genotypisierung mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) vorgezogen, da sie zu sehr zuverlässigen Ergebnissen führt und außerdem mit ihrer Hilfe zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren unterschieden werden kann. Dies war für den Nachweis der Kollagen I-Mutation unerlässlich.

Die Auswahl der Knochen für die Untersuchungen erfolgte aus verschiedenen Gründen.

Stellvertretend für lange Röhrenknochen wurde die Tibia ausgewertet. Ebenso wie die kurzen Fußknochen entsteht sie durch chondrale Ossifikation aus dem Mesoderm.

Dagegen entwickeln sich die Knochen der Schädeldecke direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe, welches die Anlage des Gehirns umgibt, also über desmale Ossifikation.

Bei den platten Schädelknochen kann am ehesten durch histologische Betrachtung die Aktivität der Knochen resorbierenden Zellen eingeschätzt werden. Erhöhte Porosität entspricht hierbei verstärkter Osteoklasten-Aktivität und umgekehrt.

Es wäre für die Bestätigung der Ergebnisse interessant gewesen, alle ausgewählten Knochen im Alter von zwei und vier Wochen zu untersuchen. Leider fehlen bisher histologische Auswertungen der Kalvarien zum Zeitpunkt vier Wochen, da die entsprechenden Köpfe zur histomorphometrischen Auswertung versandt wurden.

Die histologischen Schnitte wurden mit dem Mikrotom 5 µm dick geschnitten. Bei der unteren Extremität konnten im Bereich der Tibia durch "Cross-section-Schnitte" für die vergleichende Analyse sehr gut geeignete Knochenquerschnitte erzielt werden.

Die Fußknochen wurden leider nicht immer im exakt gleichen Winkel getroffen, was jedoch mehr zu ästhetischen denn wissenschaftlich relevanten Unterschieden bei den Bildern führt. Im Gegensatz dazu könnte ein leicht abweichender Schnittwinkel durch die Schädelknochen in Bezug auf die Knochendicke durchaus einen nicht vorhandenen Unterschied zwischen den Tieren vortäuschen, beziehungsweise einen vorhandenen überdecken. Da es praktisch unmöglich ist, gerade bei den Experimenttieren mit ihren sehr kleinen und eventuell auch verformten Köpfen eine konstant gleiche Schnittführung zu gewährleisten, sollten dafür um so mehr Schädelknochen untersucht und miteinander verglichen werden.

Die neu generierte Experimentmaus (CL2+/rr) zeichnete sich im Vergleich zu den verschiedenen Kontrolltieren durch mehrere Besonderheiten aus.

Die vermehrte trabekuläre Knochensubstanz der transgenen Mäuse (CL2+/-) war auf die Fähigkeit des Parathormons zurückgeführt worden, unter bestimmten Bedingungen, einen anabolen Effekt auf den Knochen auszuüben. Die Experimentmaus (CL2+/rr) wies nun im Vergleich dazu eine weitere signifikante Zunahme an Trabekularknochen auf, welche ab einem Alter von etwa vier Wochen einen osteopetrotischen Phänotyp mit vollständiger Obliteration der Knochenmarkshöhle bewirkte.

Für die zusätzliche trabekuläre Knochenzunahme in der Experimentmaus gibt es grundsätzlich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Eine davon ist eine verstärkte Aktivität der Osteoblasten mit Knochenneubildung. Dagegen sprechen bei diesen Versuchen jedoch einerseits die erniedrigte Anzahl an Osteoblasten in der Experimentmaus (CL2+/rr), andererseits die im Vergleich zur transgenen Maus (CL2+/-) verminderte Knochenbildungsrate und Mineralisierungsrate, einem direkten Parameter für die Osteoblastenfunktion.

Weitere mögliche Erklärungen für das vermehrte Knochenvolumen der Experimentmäuse finden sich in einer verminderten Bereitstellung oder Dysfunktion der Osteoklasten.

Verschiedene Autoren haben bereits früher die Hypothese aufgestellt, dass Kollagenase 3 eine wichtige Rolle bei der Osteoklastenrekutierung, beziehungsweise ihrer Aktivierung nach Parathormonstimulation spielt (Scott D.K. et al., 1992; Zhao W. et al., 1999).

In den hier durchgeführten Experimenten konnte mit Hilfe der In situ-Hybridisierung und der TRAP-Färbung eine sehr große Osteoklastenpopulation im Trabekulaknochen dargestellt werden. In gleicher Weise bestätigten auch die histomorphometrischen Messungen, dass es sich um kein Problem der Osteoklastenrekutierung handeln konnte.

Somit bleibt als mögliche Interpretationsmöglichkeit der Ergebnisse, dass zwar Osteoklasten zahlreich vorhanden sind, diese jedoch nicht ihrer Hauptaufgabe, der Knochenresorption,

nachkommen können und deshalb, aufgrund eines „antiresorptiven Effekts“ der Kollagen I-Mutation, das trabekuläre Knochenkompartiment vergrößert ist.

Dies stimmt mit den bisherigen Erkenntnissen zur Aktivität der Kollagenasen überein. Danach kann Knochensubstanz erst dann effektiv von Osteoklasten abgebaut werden, wenn zuvor eine Bearbeitung der Oberfläche durch Kollagenasen stattgefunden hat (Chambers T.J. et al., 1985).

Bezogen auf dieses Tiermodell könnte dies folgendermaßen aussehen:

Auf der einen Seite haben wir es mit einem konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor zu tun, dessen Aktivität nicht nur die beschriebenen Veränderungen der Knochenstruktur hervorruft, sondern auch Osteoblasten zur Sekretion von Kollagenase 3 anregt. Eine sehr hohe Expression von Kollagenase 3 war in den transgenen Tieren (CL2+/-) mittels In situ-Hybridisierungen nachgewiesen worden (Calvi L.M. et al., 2001) und kann in gleicher Weise für die Experimentmaus (CL2+/rr) vorausgesetzt werden, da bei der Einführung der Kollagen I-Mutation nicht das Enzym selbst, sondern das Substrat genetisch verändert worden war. Außerdem war die Kollagenresistenz durch erneuten enzymatischen Verdau mit Kollagenase 3 nachgewiesen worden.

Kollagenase 3 und die weiteren Kollagenasen können jedoch in der Experimentmaus (CL2+/rr) ihre lytische Aktivität nicht entfalten, da die Kollagenmatrix aufgrund der eingeführten Mutation eine Resistenz gegenüber Degradierung durch Metalloproteinasen aufweist. Gemäß der Hypothese können infolgedessen die vorhandenen Osteoklasten keine effektive Knochenresorption durchführen. Die erhöhte Anzahl der Osteoklasten in der Experimentmaus (CL2+/rr) und in der Maus mit der Kollagen I-Mutation (CL2-/rr) könnte in diesem Erklärungsansatz als kompensatorisch betrachtet werden und wird vermutlich über einen negativen Regelmechanismus hervorgerufen.

Das erhöhte Knochenvolumen im Trabekularbereich setzt sich nach dieser Hypothese aus mehreren Komponenten zusammen. Zum einen aus dem beschriebenen anabolen Einfluss des konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor, zum anderen aus der wegen der Kollagen I-Mutation partiell gehemmten osteoklastären Knochenresorption.

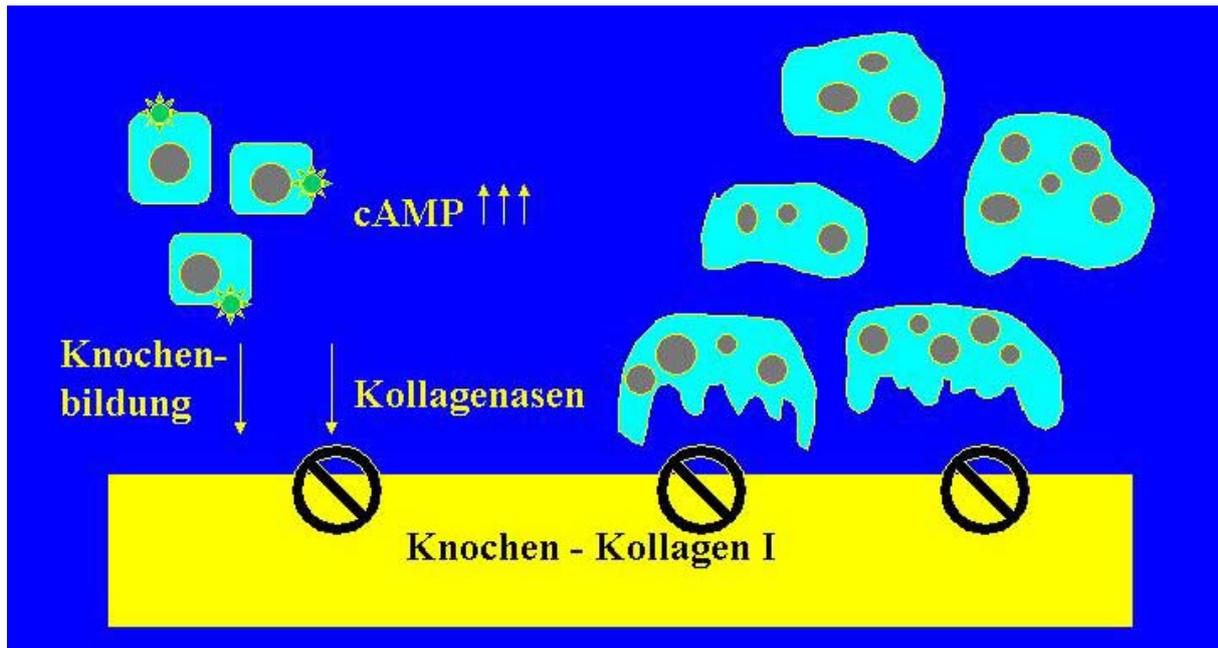


Abb. 6.1 Die Rolle der Kollagenasen in der Parathormon abhängigen Knochenresorption: Osteoblasten exprimieren einen konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor mit anabolem Effekt einerseits und Sekretion von Kollagenasen andererseits. Aufgrund der Mutation ist jedoch Kollagen I resistent gegenüber Abbau durch Kollagenasen, so dass die zahlreich vorhandenen Osteoklasten den Knochen nicht effektiv abbauen können.

Interessanterweise konnte der für die Experimentmaus (CL2+/rr) vermutete Resorptionsdefekt zu keiner signifikanten Veränderung im Bereich der Kortikalis führen. Wie in den transgenen Mäusen (CL2+/-) war auch in den Experimentmäusen (CL2+/rr) eine deutliche Abnahme der periostalen Mineralisierungsrate zu verzeichnen. Die Dicke der Kortikalis war annähernd gleich. Somit überwog im Bereich des Kortikalknochens der katabole Effekt des Parathormons. Offensichtlich hat die fehlende Kollagenspaltung im Bereich des Kortikalknochens keinen Einfluss auf den CL2-Phänotyp. Oder anders beschrieben: Kollagenasen wirken als Downstream-Effektoren des Parathormons im Trabekularknochen, nicht jedoch im Bereich der Kortikalis.

Es muss jedoch die Einschränkung gemacht werden, dass der Untersuchungszeitpunkt von 4 Wochen postnatal relativ früh gewählt war. Es ist eventuell vorstellbar, dass für die Auswirkung der osteoklastären Dysfunktion auf den Kortikalknochen mit einem Alter von vier Wochen noch nicht genügend Zeit vorhanden war, um dort in ähnlicher Weise wie im Trabekularknochen einzuwirken.

Ob sich in einem Alter von mehreren Monaten der antiresorptive Effekt der Kollagen I-Mutation im Bereich der Kortikalis wenigstens durch eine geringfügige Dickenzunahme manifestieren würde?

Als Ergänzung sollen an dieser Stelle die histologischen Befunde der Schädeldeckknochen angeführt werden.

In diesen durch desmale Ossifikation entstandenen Knochen kann besonders gut auf osteoklastäre Aktivität geschlossen werden. Der Porositätsgrad der platten Schädelknochen korreliert mit der Aktivität der Osteoklasten.

Typischerweise war in der Kalvaria der transgenen Tiere (CL2+/-) die Knochenbildungsrate im Endosteum erhöht und im Periosteum erniedrigt. Insgesamt zeichnete sich der kompakte Schädelknochen durch eine erhöhte Porosität aus.

Die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen der Experimentiere (CL2+/rr) konnten die bei den transgenen Mäusen beschriebenen Veränderungen im Bereich der Schädelknochen für die Experimentiere (CL2+/rr) bestätigen. Auch hier ließ sich im Vergleich zum Wildtyp und zur Kollagen I-Mutation eine verminderte innere und äußere periostale Mineralisierungsrate nachweisen.

Zusätzlich wurde in den Experimentmäusen (CL2+/rr) ebenfalls eine signifikant erhöhte Knochenporosität deutlich, die bei einem vermuteten Osteoklastendefekt auf den ersten Blick doch überraschte und erstaunlicherweise im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen bei den Kollagen I-mutierten Mäusen (CL2-/rr) stand (Zhao W. et al., 1999).

Somit zeigte sich, dass in ähnlicher Weise wie im Kortikalknochen die zusätzliche Einführung der Kollagen-Mutation im Bereich der Schädelknochen keine weiteren Auswirkungen auf den CL2-Phänotyp hatte. Zumindest konnte die Resistenz gegen Kollagenabbau in diesem Kompartiment die dramatische Reduktion der Mineralisierungsrate und Kortikalisdicke nicht ausgleichen, welche in den Mäusen beobachtet wird, die den konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor exprimieren.

Man kann es auch von einer anderen Seite betrachten: Die Kollagen I-Mutation weist im Zusammenhang mit dem CL2-Transgen einen gewissen antiresorptiven Effekt auf, beeinflusst jedoch nicht in gleichem Maße dessen anabole Wirkungen. Obwohl die Einführung der Kollagen-Resistenz bei den CL2+-Mäusen die Knochenbildungsrate und Mineralisierungsrate vermindert, ist die Funktion der Osteoblasten im Vergleich zum Wildtyp immer noch deutlich verstärkt.

Der Mechanismus Knochenformation folgt Knochenresorption, beziehungsweise auf verminderte Knochenresorption folgt eingeschränkte Knochenformation scheint in diesem Tiermodell teilweise entkoppelt zu sein (Mundy G.R., 1999).

Hier einige zusätzliche Aspekte, weshalb sich die Mutationen in verschiedenen Knochenkompartimenten unterschiedlich auswirken könnten:

Die ausgewählten Knochen entstehen auf embryologisch unterschiedlichen Wegen. Osteoklasten waren sowohl in den Schädelknochen, als auch im Bereich der kortikalen Tibia offensichtlich in der Lage, trotz partieller Osteoklastendysfunktion und unveränderter Knochenbildungsrate eine Knochenreduktion herbeizuführen. Ist es Zufall, dass gerade der Schaft langer Röhrenknochen durch perichondrale, also eine mit der desmalen Ossifikation verwandten Verknöcherungsart entsteht? Möglicherweise spielt die Wirkung der Kollagenasen im Rahmen der desmalen Ossifikation keine so entscheidende Rolle wie bei der enchondralen, bei welcher eine starke Expression von Kollagenase 3 in der distalen Wachstumszone beobachtet werden kann (Gack S. et al., 1995).

Weiterhin bietet der Trabekularknochen im Rahmen des Remodelings eine viel größere Angriffsfläche für Kollagenasen und eine höhere Knochenumbaurate als die Kortikalis (Rodan G.A., 2001). Demzufolge kann ein Defekt hier schneller deutlich werden.

Einen zusätzlichen Einfluss kann die unterschiedliche Umgebung ausüben, in welcher sich die Knochenzellen befinden. Im trabekulären Bereich befinden sich die Knochenzellen in unmittelbarer Nähe zu Knochenmarkszellen, die mit der Bildung von Zytokinen direkt in die Knochenumbauvorgänge eingreifen können. Dagegen werden die in der Kortikalis lokalisierten Knochenzellen aufgrund ihrer relativen Distanz zum Knochenmark überwiegend durch systemische Hormone kontrolliert (Mundy G.R., 1999).

Auf jeden Fall scheinen sich die beiden Mutationen in verschiedenen Knochen in unterschiedlichem Ausmaß zu überlagern.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die einzelnen Knochenzellen unter anderem durch das RANK/ RANK-Ligand-System in steter Kommunikation zueinander stehen (Suda T. et al., 1999; Liu B.Y. et al., 1998). So können ein Mangel oder Defekt der einen oder anderen Zelllinie über das Kommunikationssystem unmittelbar zur entsprechenden positiven oder negativen Rückkopplung in Bezug auf die Zelldifferenzierung führen.

In diesem Fall könnte damit die erhöhte Anzahl der Osteoklasten erklärt werden. Eine interessante Ergänzung der Experimente wäre die Darstellung der Expression von RANK, beziehungsweise RANK-Ligand in den verschiedenen Knochen mit Hilfe von In situ-Hybridisierungen.

Eine weitere Überlegung besteht darin, dass durch die Wirkung der Kollagenasen verschiedene biologisch aktive Liganden aus der Knochenmatrix freigesetzt werden können, welche in komplexer Weise auf die Rekrutierung und Aktivität verschiedener Knochenzellen Einfluss nehmen. Mangelnde Matrixdegradierung in den mutierten Mäusen würde demzufolge diesen Prozess unterbrechen und zu veränderten Knochenumbauvorgängen führen.

Beispielsweise könnten solche Substanzen als adäquates Signal für die Einleitung der Apoptose bei Osteoklasten wirken. Dies wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die vermehrte Anzahl der Osteoklasten. Mit Hilfe einer TUNEL-Färbung zur Darstellung apoptotischer Zellen könnte dieser Aspekt näher untersucht werden.

Weiterhin können durch Kollagenspaltung Integrinbindungsstellen freigelegt werden. Somit könnte die Abschwächung der Kollagenasen die Osteoklastenaktivität beeinflussen, indem weniger Bindungsstellen entstehen, an welche Osteoklasten mit ihrem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden können.

Die Experimentmäuse unterschieden sich von den anderen Tieren durch ihre geringe Größe. Bereits die transgenen Mäuse (CL2+) wiesen (wie bekannt) deutlich kleinere Extremitäten als der Wildtyp auf, was auf die zusätzliche moderate Expression des konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptors in Chondroblasten zurückgeführt worden war. Dafür war bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine verspätete Chondrozytendifferenzierung mit folgender Extremitätenverkürzung nachgewiesen worden (Schipani E. et al., 1997).

Da jedoch für die Experimentmäuse (CL2+/rr) ein unverändertes Expressionsmuster des Transgenes (CL2) vorausgesetzt werden darf, verwundert es, dass diese Tiere durch einen noch kleineren Phänotyp gekennzeichnet waren.

Die wahrscheinlichste Erklärung dafür liegt nicht in einer veränderten Wachstumsfuge, sondern vielmehr in den in diesem Tiermodell gestörten Knochenumbauvorgängen. Es ist bekannt, dass die Länge der Knochen nicht allein durch die Wachstumsfugen, sondern insbesondere nach dem Abschluss des eigentlichen Körperwachstums durch Remodeling-Vorgänge bestimmt werden. In den Experimentmäusen war der Knochenumbau in komplexer Weise gestört und konnte somit zu dem kleinen Phänotyp führen.

Nach dieser Erklärung wird offenkundig, warum die Größenunterschiede der Vergleichstiere mit zunehmendem Alter immer deutlicher wurden.

Im Übrigen zeichnen sich viele osteopetrotische Mäuse durch einen kleinen Phänotyp mit kurzen Extremitäten aus.

Wenn man von einem partiellen Defekt der Osteoklasten ausgeht, würde man am ehesten einen erniedrigten Kalziumgehalt des Serums bei gleichzeitig kompensatorisch erhöhtem Parathormonspiegel erwarten, wie es bei osteopetrotischen Phänotypen normalerweise der Fall ist. Aus diesem Grund werden derzeit als Ergänzung der Experimente Kalzium- und Parathormonbestimmungen im Blut der verschiedenen Mäuse durchgeführt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten dabei keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Die Werte der transgenen Mäuse (CL2+/-) und der Experimentmäuse (CL2+/rr) befinden sich in einem dem Wildtyp vergleichbaren Bereich, was für eine eher moderate osteoklastäre Dysfunktion spricht.

Im Vergleich zu anderen osteopetrotischen Tiermodellen waren in den Experimentmäusen (CL2+/rr) in allen Fällen die Zähne durchgebrochen.

Da Osteoklasten für den Zahndurchbruch eine wichtige Rolle spielen, wird einmal mehr deutlich, dass deren Funktion nur teilweise gestört sein kann und noch eine Restaktivität vorhanden ist, beziehungsweise die Wirkung in verschiedenen Knochenbereichen völlig verschieden ausfallen kann.

Die weiteren Veränderungen in der Zahnstruktur können mit denjenigen in den transgenen Mäusen (CL2+) verglichen werden (Calvi L.M. et al., 2001), weil Osteoklasten innerhalb der Zähne keine Rolle spielen und deshalb die Kollagen I-Mutation keine unmittelbare Auswirkung auf die Zahnbeschaffenheit haben dürfte.

Selbstverständlich stellt sich wie bei allen Tiermodellen auch hier die Frage, inwieweit die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

Tatsächlich gilt gerade die Maus als sehr gut geeignetes Tiermodell für Untersuchungen am Knochen, da nicht nur die Knochenmorphologie, sondern auch molekularbiologische Faktoren weitgehend mit denen im Menschen übereinstimmen.

Für die Entwicklung der transgenen Mäuse (CL2+) wurde der humane mutierte PTH/PTHrP-Rezeptor der Jansen-Erkrankung verwendet (Schipani E. et al., 1995).

Bei der Generierung der Kollagen I-Mutation-Mäuse wurde ganz bewusst das Substrat und nicht das Enzym verändert, um einer möglichen größeren Vielfalt der murinen Kollagenasen im Vergleich zu den humanen entgegenzuwirken. Trotzdem stellte sich später heraus, dass die Aminosäuren einer bestimmten Kollagenase in Maus und Ratte nur etwa zur Hälfte mit denen der menschlichen identisch sind und das Kollagenmolekül an einer zusätzlichen Stelle schneiden können (Henriet P. et al., 1992; Krane S.M. et al., 1996).

Darin könnte neben anderen Faktoren die Beobachtung begründet sein, dass sich in den Kollagen I-mutierten Mäusen erst im Laufe der Zeit ein ausgeprägter Phänotyp herausbildet. Die zusätzliche Schnittstelle könnte in den ersten Lebenswochen gerade noch ausreichen, trotz der Mutation genügend Kollagen zu degradieren.

Da es sich bei den Experimenten in erster Linie um Grundlagenforschung handelt, spielt dieser kleine Unterschied weniger bei der Übertragung der Versuche auf den Menschen eine Rolle. Wichtiger ist in diesem Zusammenhang, dass durch dieses neue Tiermodell Hinweise für aktuelle klinisch-therapeutische Strategien gewonnen werden können.

Im Rahmen der Osteoporosetherapie wurden zusätzlich zur Kalzium- und Vitamin D-Prophylaxe in den letzten Jahren immer wieder neue therapeutische Konzepte vorgelegt.

Zum einen nützt man sehr gerne die antiresorptiven Effekte der Bisphosphonate aus, um dem eigentlichen Hauptproblem der Osteoporose, dem gesteigerten Knochenabbau, beizukommen (Lieberman U.A. et al., 1995; Black D.M. et al., 1996). Es ist jedoch bis heute nicht geklärt, ob nicht die antiresorptiven Effekte der Bisphosphonate in der Osteoporosetherapie über den bereits erwähnten Kopplungsmechanismus die für den Patienten wichtige Knochenneubildung einschränken können.

Zum anderen stellt die Verabreichung von Parathormon in regelmäßiger Dosierung (tägliche subkutane Injektionen) eine andere therapeutische Möglichkeit dar, von welcher in mehreren Studien bei postmenopausalen Frauen ein deutlicher positiver Effekt in Bezug auf das relative Frakturrisiko und die mittlere Knochendichte nachgewiesen werden konnte. Es führt zu einer Zunahme des Trabekularknochens, verändert jedoch nicht die kortikale Knochenmasse (Neer R.M. et al., 2001). Die offensichtlich ausbleibende anabole Wirkung auf diesen Knochenbereich könnte nach dem hier dargestellten Tiermodell Folge einer Zunahme der Knochenresorption sein, die nicht in adäquater Weise durch Knochenneubildung kompensiert wird.

Für die Therapie der Osteoporose bedeutet dies, dass die additiven Wirkungen von Parathormon und einem Knochenresorptionshemmer (beispielsweise Bisphosphonate) im Rahmen einer Kombinationstherapie optimal ausgenutzt werden könnten. Der Vergleich der Experimentmäuse (CL2+/rr) mit den transgenen Tieren (CL2+/-) und dem Wildtyp (CL2/-) zeigt deutlich, dass trotz Abschwächung der Osteoklastenaktivität die Osteoblastenpopulation noch verstärkt funktionsfähig sein kann.

Demzufolge stellt sich die Kombination aus Parathormon und antiresorptiven Substanzen als äußerst sinnvolle Therapie der postmenopausalen Osteoporose dar.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes sagen:

Die Beeinträchtigung der Kollagenasenaktivität bei transgenen Mäusen, welche in Osteoblasten einen konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor exprimieren, führt zu einer signifikanten Zunahme des Trabekularknochens. Diese ist die Folge einer verminderten Knochenresorption bei zwar zahlenmäßig vielen, doch in ihrer Aktivität eingeschränkten Osteoklasten. Gleichzeitig ist die Osteoblastenaktivität in der doppelt mutierten Maus (CL2+/rr) geringer als in den rein transgenen Mäusen (CL2+/-), jedoch im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) immer noch deutlich erhöht.

Im Bereich des Kortikalknochens bringt die Einführung der Kollagen I-Mutation im Vergleich zur CL2+ transgenen Maus keine zusätzlichen Veränderungen.

Damit konnte in vivo nachgewiesen werden, dass Matrixmetalloproteinasen wichtige Vermittler der parathormonabhängigen Knochenresorption sind und dass das dafür notwendige Signal über den auf Osteoblasten exprimierten PTH/PTHrP-Rezeptor erfolgt.

Die vorgestellten Daten unterstützen die Hypothese, dass Kollagenasen als Downstream-Effektoren des Parathormons im Trabekularknochen, nicht jedoch im Periost wirken.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass eingeschränkter Knochenabbau unter bestimmten Bedingungen durchaus kompatibel mit einer verstärkten Knochenneubildung ist.

Selbstverständlich ist es naturwissenschaftlich äußerst erstrebenswert, die molekularen Wirkungsweisen von Hormonen und Enzymen im Laufe der Zeit immer besser zu erfassen und die Ätiologie bestimmter Krankheiten zu beschreiben.

Darüber hinaus muss jedoch die unmittelbare klinische Relevanz einer derartigen Forschung betont werden.

Experimente an geeigneten Tiermodellen als Ergänzung zu klinischen Studien sind in der heutigen Zeit für ein effizientes Therapiemanagement der meisten Krankheiten unerlässlich.

In diesem Fall konnte es für die Therapie der Osteoporose aufgezeigt werden.

Weiterhin ist dieses Tiermodell ein Beispiel dafür, wie durch die Ausnutzung verschiedener Erkenntnisse und deren Kombination ein größerer Gesamtzusammenhang dargestellt werden kann.

Wenn man zukünftig durch zusätzliche geeignete Modelle nicht nur die Einzelrollen, sondern immer mehr das Zusammenspiel der vielen verschiedenen Faktoren beim Knochenbau aufklären könnte, wäre es durchaus denkbar, weitere Stoffe zu entwickeln, die durch eine selektive Inhibition der Schlüsselfaktoren Volkskrankheiten wie die Osteoporose noch besser als bisher möglich behandeln könnten.

7. Zusammenfassung

Die In vivo Expression des konstitutiv aktiven PTH/PTHrP-Rezeptors in Osteoblasten führt einerseits zu einer starken Volumenzunahme des Trabekularknochens, andererseits zu einer reduzierten Dicke der Kortikalis bei verminderter periostaler Mineralisierungsrate (CL2+-Mäuse). Um die Rolle der Kollagenasen im Rahmen von Parathormon-induzierten Knochenumbauvorgängen näher zu untersuchen, wurden transgene CL2+-Mäuse mit solchen gekreuzt, die aufgrund einer Mutation im Gen für Kollagen I α 1 eine Resistenz gegen Abbau durch Kollagenase 3 und andere Kollagenasen aufweisen (r) und auf Parathormonstimulation mit einer deutlich abgeschwächten Knochenresorption reagieren.

Mithilfe verschiedener histologischer Techniken wurden Tibia, Fußwurzelknochen und die Knochen der Schädeldecke von zwei und vier Wochen alten Tieren untersucht.

Die so generierten Experimentmäuse (CL2+/rr) waren im Alter von zwei bis vier Wochen makroskopisch durchweg kleiner als die Vergleichstiere.

Sie zeichneten sich im Bereich der Tibia und der Fußwurzelknochen durch eine im Vergleich zum Wildtyp (CL2-/-) und zur transgenen Maus (CL2+/-) signifikant erhöhte trabekuläre Knochenmasse aus. Die trabekuläre Knochenbildungsrate der Experimentmäuse (CL2+/rr) war verglichen mit der transgenen Maus (CL2+/-) leicht reduziert, verglichen mit dem Wildtyp (CL2-/-) jedoch signifikant erhöht. Mit Hilfe von In situ-Hybridisierungen und TRAP-Färbungen konnte in den doppelt mutierten Mäusen (CL2+/rr) eine sehr große Osteoklastenpopulation nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen der Kortikalis und der Schädelknochen erbrachten für die Experimentmaus (CL2+/rr) zu diesen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zur transgenen Maus (CL2+/-).

Da zum einen viele Osteoklasten vorhanden waren, zum anderen keine Zunahme der Knochenformation im Kortikalknochen festgestellt werden konnte, kann der beschriebene Phänotyp nur durch eine Dysfunktion der Osteoklasten erklärt werden. Aufgrund der Kollagen I-Mutation und der damit verbundenen verminderten Kollagendegradierung können die zahlreichen Osteoklasten in diesem Knochenkompartiment keine effektive Knochenresorption durchführen.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass Kollagenasen eine entscheidende Rolle bei der Parathormon induzierten Knochenresorption spielen und als Downstream-Effektoren des PTH/PTHrP-Rezeptor im Trabekularknochen, nicht jedoch im Periost agieren.

Schließlich verdeutlichen die Untersuchungen, dass verminderte Osteoklastenaktivität unter bestimmten Bedingungen durchaus mit verstärkter Knochenbildung vereinbar ist.

8. Literatur

Abou-Samra A.B., Jüppner H., Force T., Freeman M.W., Kong X.F., Schipani E., Urena P., Richards J., Bonventre J.V., Potts J.T., Jr. (1992). "Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 2732-6

Aubin J. E., Bonnelye E. (2000). "Osteoprotegerin and its ligand: new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption". *Osteoporos. Int.* **11**: 905-13

Aubin J.E. (1998). „Bone stem cells“. *J. Cell Biochem. Suppl.* **30-31**: 73-82

Baron R. (1999). "Anatomy and ultrastructure of bone". In: Favus M.J. (Hrsg.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4.Aufl., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York; 3f.

Beshyah S.A., Kyd P., Thomas E., Fairney A., Johnston D.B. (1995). "The effects of prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density in hypopituitary adults". *Clin. Endocrinol.* **42**: 249-254

Bi W., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrughe B. (1999). "Sox9 is required for cartilage formation". *Nat. Genet.* **22**: 85-89

Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. (2001). „Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications“. *Stem Cells.* **19**: 180-192

Bikle D.D., Ng D., Tu C.L., Oda Y., Xie Z. (2001). "Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation". *Mol. Cell Endocrinol.* **177**: 161-71

Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A. (1993). "Matrix metalloproteinases: a review". *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 197-250

Black D.M., Cummings S.R., Karpf D.B., Cauley J.A., Thompson D.E., Nevitt M.C., Bauer D.C., Genant H.K., Haskell W.L., Marcus R., Ott S.M., Torner J.C., Quandt S.A., Reiss T.F., Ensrud K.E. (1996). "Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures". *Lancet*. **348**: 1535-41

Blair H.C., Teitelbaum S.L., Grosso L.E., Lacey D.L., Tan H.L., McCourt D.W., Jeffrey J.J., (1993). "Extracellular-matrix degradation at acid pH. Avian osteoclast acid collagenase isolation and characterization". *J. Biol. Chem.* **271**: 28509-28515

Bonewald L.F., Mundy G.R. (1990). "Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling". *Clin. Orthop.* **250**: 261-276

Bossard M.J., Tomaszek T.A., Thompson S.K., Amegadzie B.Y., Hanning C.R., Jones C., Kurdyla J.T., McNulty D.E., Drake F.H., Gowen M., Levy M.A. (1996). "Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation and substrate identification". *J. Biol. Chem.* **271**: 12517-12524

Boyce B.F., Yoneda T., Lowe C., Soriano P., Mundy G.R. (1992). „Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice“. *J. Clin. Invest.* **90**: 1622-7

Brent G.A., LeBoff M.S., Seely E.W., Conlin P.R., Brown E.M. (1988). "Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**: 944-50

Bringhurst F.R., Demay M.B., Kronenberg H.M. (1998). "Hormones and disorders of mineral metabolism". In: Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Larsen P.R., (Hrsg.), *William's textbook of endocrinology*. 9. Aufl., Saunders, 1155ff

Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E., Connolly T.J., Jaiswal N., Zaia J., Barry F.P. (1998). „Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation“. *J. Bone Miner. Res.* **13**: 655-63

Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S. (1998). "Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification". *Genes Dev.* **12**: 1260-8

Burgess T.L., Qian Y., Kaufman S., Ring B.D., Van G., Capparelli C., Kelley M., Hsu H., Boyle W.J., Dunstan C.R., Hu S., Lacey D.L. (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts". *J. Cell Biol.* **145**: 527-38

Burke D., Wilkes D., Blundell T.L., Malcolm S. (1998). "Fibroblast growth factor receptors: Lessons from the genes". *Trends Biochem. Sci.* **23**: 59-62

Burtis W.J., Brady T.G., Orloff J.J., Ersbak J.B., Warrell R.P., Jr., Olson B.R., Wu T.L., Mitnick M.E., Broadus A.E., Stewart A.F. (1990). "Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia in cancer". *N. Engl. J. Med.* **322**: 1106-12

Calvi L.M., Schipani E. (2000). "The PTH/PTHrP receptor in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia". *J. Endocrinol. Invest.* **23**: 545-554

Calvi L.M., Shin H.I., Knight M.C., Saxton J.M., Kronenberg H.M., Schipani E. (2001). "In vivo Expression of a constitutively active PTH/PTHrP-Rezeptor (PPR) in Odontoblasts (OD) alters OD and ameloblast (AB) function and maturation". *ASBMR 23rd Annual Meeting/ JBMR* **16**: suppl.1, S547 (abstract)

Calvi L.M., Sims N.A., Hunzelman J.L., Knight M.C., Giovannetti A., Saxton J.M., Kronenberg H.M., Baron R., Schipani E. (2001). "Activated parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone". *J. Clin. Invest.* **107**: 277-286.

Canalis E. (1994). "Skeletal growth factors and aging". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 1009-1010

Chambers T.J., Athanasou N.A., Fuller K. (1984). "Effect of parathyroid hormone and calcitonin on the cytoplasmic spreading of isolated osteoclasts". *J. Endocrinol.* **102**: 281-6

Chambers T.J., Darby J.A., Fuller K. (1985). "Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption". *Cell Tissue Res.* **241**: 671-675

Charrow J., Poznanski A.K. (1984). "The Jansen's type of metaphyseal chondrodysplasia: confirmation of dominant inheritance and review of radiographic manifestations in the newborn and adult". *Am. J. Med. Genet.* **18**: 321-327

Chung U., Schipani E., McMahon A.P., Kronenberg H.M. (2001). "Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development". *J. Clin. Invest.* **107**: 295-304

De Crombrughe B., Lefebvre V., Nakashima K. (2001). "Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation". *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 721-728

De Haas W.H.D., De Boer W., Griffioen F. (1969). "Metaphysial dysostosis: a late follow-up of the first reported case". *J. Bone Joint Surg. Br.* **51**: 290-299

Deftos J.L., Roos B.A., Oates E.L. (1999). "Calcitonin". In: Favus M.J. (Hrsg.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4.Aufl., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York; 99-104

Dempster D.W., Cosman F., Parisien M., Chen V., Lindsay R. (1993). "Anabolic actions of parathyroid hormone on bone". *Endocr. Rev.* **14**: 690-709 (erratum 1994, **15**: 261)

Dobnig H., Turner R.T. (1997): "The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats". *Endocrinology* **138**: 4607-4612

Dobolyi A., Ueda H., Uchida H., Palkovits M., Usdin T.B. (2002). "Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception". *Proc. Natl., Acad.* **99**: 1651-6

Ducy P., Amling M., Takeda S., Priemel M., Schilling A.F., Beil F.T., Shen J., Vinson C., Rueger J.M., Karsenty G. (2000). "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass". *Cell*. **100**: 197-207

Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G. (1997). "Osf2/ Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation". *Cell*. **89**: 747-54

Dunstan C.R., Capparelli C., Kelley M. et al. (1997). "Osteoprotegerin (OPG), a novel TNF-receptor family member, profoundly inhibits endosteal bone resorption due to growth, humoral hypercalcemia of malignancy, and interleukin 1". *J. Bone Miner. Res.* **12**: 134

Dusso A.S., Finch J., Brown A., Ritter C., Delmez J., Schreiner G., Slatopolsky E. (1991). "Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**: 157-64

Engsig M.T., Chen Q.J., Vu T.H., Pedersen A.C., Therkinsen B., Lund L.R., Henriksen K., Lenhard T., Foged N.T., Werb Z., Delaisse J.M. (2000). "Matrix Metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing bones". *J. Cell Biol.* **151**: 879-889

Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T., Anderson J.J (1993). "Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study". *J. Bone Miner. Res.* **8**: 567-573

Ferrier J., Ward A., Kanehisa J., Heersche J.N. (1986). "Electrophysiological responses of osteoclasts to hormones". *J. Cell Physiol.* **128**: 23-6

Frame B., Poznanski A.K. (1980). "Conditions that may be confused with rickets". *Pediatric Diseases Related to Calcium* 269-289

Franzoso G., Carlson L., Xing L., Poljak L., Shores E.W., Brown K.D., Leonardi A., Tran T., Boyce B.F., Siebenlist U. (1997). „Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development“. *Genes Dev.* **11**: 3482-96

Gack S., Vallon R., Schmidt J., Grigoriadis A., Tuckermann J., Schenkel J., Weiher H., Wagner E.F., Angel P. (1995). "Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes". *Cell Growth Differ.* **6**: 759-767

Gorski J.P. (1998). "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms". *Crit. Rev. Oral Med.* **9**: 201-23

Gowen M., Lazner F., Dodds R., Kapadia R., Feild J., Tavarria M., Bertocello I., Drake F., Zavarselk S., Tellis I., Hertzog P., Debouck C., Kola I. (1999). "Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization". *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1654-63

Gram P.B., Fleming J.L., Frame B., Fine G. (1959). "Metaphyseal chondrodysplasia with long-term followup". *J. Bone Joint Surg. Am.* **41**: 951-959

Grigoriadis A.E., Wang Z.Q., Cecchini M.G., Hofstetter W., Felix R., Fleisch H.A., Wagner E.F. (1994). "c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling". *Science.* **266**: 443-8

Habener J.F., Kronenberg H.M. (1978). "Parathyroid hormone biosynthesis: structure and function of biosynthetic precursors". *Fed. Proc.* **37**: 2561-6

Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N., Wagner E.F. (2000). "Conditional inactivation of VEGF in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state". *Development.* **127**: 1445-1453

Hauge E.M., Qvesel D., Eriksen E.F., Mosekilde L., Melsen F. (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers". *J. Bone Miner. Res.* **16**: 1575-1582

Henriet P., Rousseau G.G., Eeckhout Y. (1992). "Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. Divergence of mouse and rat collagenases from the other mammalian collagenases". *FEBS Lett.* **310**: 175-8

Hoare S.R., Bonner T.I., Usdin T.B. (1999). "Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor". *Endocrinology.* **140**: 4419-25

Hock J.M., 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**: 65-72

Hofbauer L.C., Heufelder A.E. (2001). "Osteoprotegerin-Ligand und Osteoprotegerin". *Dtsch. Med. Wschr.* **126**: 145-150

Hofbauer L.C., Khosla S., Lacey D.L., Dunstan C.R. Boyle W.J., Riggs B.L. (2000). "The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption". *J. Bone Miner. Res.* **15**: 2-12

Holick M.F. (1987). "Photosynthesis of vitamin D in the skin: effect of environmental and life-style variables". *Fed. Proc.* **46**: 1876-82

Holick M.F. (1994). "McCullum Award Lecture, 1994: vitamin D – new horizons for the 21st century". *Am. J. Clin. Nutr.* **60**: 619-30

Holick M.F. (1995). "Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications". *Bone.* **17**: 107S-111S

Holick M.F. (1999). „Vitamin D: Photobiology, Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications“. In: Favus M.J. (Hrsg.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 4.Aufl., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York; 92-98

Holliday L.S., Welgus H.G., Fliszar C.J., Veith G.M., Jeffrey J.J., Glucks S.L. (1997). "Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase". *J. Biol. Chem.* **272**: 22053-22058

Hsu H., Lacey D.L., Dunstan C.R, Solovyev I., Colombero A., Timms E., Tan H., Elliot G., Kelley M.J., Sarosi I., Wang L., Xia X., Elliott R., Chiu L., Black T., Scully S., Capparelli C., Morony S., Shimamoto G., Bass M.B., Boyle W.J. (1999). "Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediated osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 3540-3545

Ikeda K., Weir E.C., Mangin M., Dannies P.S., Kinder B., Deftos L.J., Brown E.M., Broadus A.E. (1988). "Expression of messenger ribonucleic acids encoding a parathyroid hormone-like peptide in normal human and animal tissues with abnormal expression in human parathyroid adenomas". *Mol. Endocrinol.* **2**: 1230-6

Ioffe E., Moon B., Connolly E. Friedman J.M. (1998). "Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 11852-11857

Itoh K., Udagawa N., Matsuzaki K., Takami M., Amano H., Shinki T., Ueno Y., Takahashi N., Suda T. (2000). "Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANK/ ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors". *J. Bone Miner. Res.* **15**: 1766-75

Jakob F. (1999). „1,25(OH)₂-Vitamin D₃ – Das Vitamin D-Hormon“. *Der Internist.* **40**: 414-430

Jansen M. (1934). "Über atypische Chondrodystrophie (Achondroplasie) und über eine noch nicht beschriebene angeborene Wachstumssörung des Knochensystems: Metaphysäre Dysostosis". *Zeitschr. Orthop. Chir.* **61**: 253-286

Joyner C.J., Bennett A., Triffitt J.T. (1997). „Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies“. *Bone.* **21**: 1-6

Jüppner H., Abou-Samra A.B., Freeman M., Kong X.F., Schipani E., Richards J., Kolakowski L.F., Hock J., Potts J.T., Jr., Kronenberg H.M., Segre G.V. (1991). "A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide". *Science*. **254**: 1024-6

Jüppner H., Schipani E. (1997). "The parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related peptide receptor in Jansen's metyphyseal chondrodysplasia". *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* **4**: 433-442

Jüppner H.W., Gardella T.J., Brown E.M., Kronenberg H.M., Potts J.T., Jr. (2000). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development". In: DeGroot L.J., Jameson J.L. (Hrsg.), *Endocrinology*. 4. Aufl., Harcourt, 969ff

Kadler K.E., Holmes D.F., Trotter J.A., Chapman J.A. (1996). "Collagen fibril formation". *Biochem. J.* **316**: 1-11

Kaji K., Katogi R., Azuma Y., Naito A., Inoue J.I., Kudo A. (2001). "Tumor necrosis factor alpha-induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6". *J. Bone Miner. Res.* **16**: 1593-9

Karaplis A.C., Deckelbaum R.A. (1998). "Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development". *Front Biosci.* **3**: d795-803

Karsenty G. (1999). "The genetic transformation of bone biology". *Genes Dev.* **13**: 3037-51

Karsenty G. (2000). "The Central Regulation of Bone Remodeling". *Trends in Endocrinology and Metabolism.* **11**: 437-439

Karsenty G. (2001). "Chondrogenesis just ain't what it used to be ". *J. Clin. Invest.* **107**: 405-7
Kobayashi T., Chung U., Schipani E., Starbuck M., Karsenty G., Katagiri T., Goad D.L., Lanske B., Kronenberg H.M. (2002). "PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps". *Development.* **129**: 2977-2986

Komori T. (2000). „A fundamental transcription factor for bone and cartilage“. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **276**: 813-816

Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato O., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T (1997). "Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of formation owing to maturational arrest of osteoblasts". *Cell* **89**: 755-764

Kong Y.Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H.L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveirados-Santod A.J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C.R., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J., Penninger J.M. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis". *Nature*. **397**: 315-23

Kovacs C.S., Kronenberg H.M. (1997). " Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation". *Endocr. Rev.* **18**: 832-872

Krane S.M., Byrne M.H., Lemaitre V., Henriet P., Jeffrey J.J., Witter J.P., Liu X., Wu H., Jaenisch R., Eeckhout Y. (1996). "Different collagenase gene products have different roles in degradation or type I collagen". *J. Biol. Chem.* **271**: 28509-15

Kruse K., Schütz C. (1993). "Calcium metabolism in the Jansen type of metyphyseal dysplasia". *Eur. J. Pediatr.* **152**: 912-915

Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation". *Cell*. **93**: 165-76

Lau K., Bourdeau J.E. (1995). "Parathyroid hormone action in calcium transport in the distal nephron". *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**: 55-63

Lau L.F., Lam S.C. (1999). "The CNN family of angiogenic regulators: the integrin connection". *Exper. Cell Res.* **248**: 44-57

Lechner A., Schütze N., Siggelkow H., Seufert J., Jakob F. (2000). "The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts". *Bone*. **27**: 53-60

Lian J.B., Stein G.S., Stein J.L., van Wijnen A.J. (1998). "Transcriptional control of osteoblast differentiation". *Biochem. Soc. Trans.* **26**: 14-21

Liberman U.A., Weiss S.R., Bröll J., Minne H.W., Quan H., Bell N.H., Rodriguez-Portales J., Downs R.W., Jr., Dequeker J., Favus M. (1995). "Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis". *N. Engl. J. Med.* **333**: 1437-43

Liu B.Y., Guo J., Lanske B., Divieti P., Kronenberg H.M., Bringhurst F.R. (1998). "Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vivo". *Endocrinology.* **139**: 1952-64

Liu X., Wu H., Byrne M., Jeffrey J., Krane S., Jaenisch R. (1995). "A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling". *J. Cell Biol.* **130**: 227-37

Martin T.J., Findlay D.M., Houssami S., Ikegame M., Rakopoulos M., Moseley J.M., Sexton P.M. (1995). "Heterogeneity of the calcitonin receptor: functional aspects in osteoclasts and other sites". *J. Nutr.* **125**: 2009S-2014S

McHugh K.P., Hodivala-Dilko K., Zhang M.H., Nambo N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F.P., Hynes R.O., Teitelbaum S.L. (2000). „Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts“. *J. Clin. Invest.* **105**: 433-40

Mizuno A., Amizuka N., Irie K., Murakami A., Fujise N., Kanno T., Sato Y., Nakagawa N., Morinaga T., Higashio K., Ozawa H. (1998). "Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 610-5

Mohan S., Farley J.R., Baylink D.J. (1995). "Age-related changes in IGFBP-4 and IGFBP-5 levels in human serum and bone: Implications for bone loss with aging". *Prog. Growth Factor Res.* **6**: 465-473

Mori S., Burr D.B. (1993). "Increased intracortical remodeling following fatigue damage". *Bone* **14**: 103-109

Mosekilde L. (1990). "Consequences of the remodeling process for vertebral trabecular bone structure: A scanning electron microscopy study (uncoupling of unloaded structures)". *Bone Miner.* **10**: 13-35

Mundy G.R. (1999). "Bone remodeling" In: Favus M.J. (Hrsg.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4.Aufl., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York; 30-38

Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., Hodsman A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O., Mitlak B.H. (2001). "Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis". *N. Engl. J. Med.* **344**: 1434-41

Nesbitt S.A., Horton M.A. (1997). „Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts“. *Science.* **276**: 266-9

Olsen B.R., Reginato A.M., Wang W. (2000). "Bone development". *Annu. Rev. Cell Biol.* **16**: 191-220

Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R. Selby P.B., Owen M.J. (1997). "Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development". *Cell* **89**: 765-771

Ozono K., Sone T., Pike J.W. (1991). "The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃". *J. Bone Miner. Res.* **6**: 1021-7

Parfitt A.M. (1994). "Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone". *J. Cell Biochem.* **55**: 273-286

Parfitt A.M., Schipani E., Rao D.S., Kupin W., Han Z.-H., Jüppner H. (1996). "Hypercalcemia due to constitutive activity of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor: Comparison with primary hyperparathyroidism". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 3581-3588

Parisien M., Silverberg S.J., Shane E., de la Cruz L., Lindsay R., Bilezi J.P., Dempster D.W. (1990). "The histomorphometry of bone in primary hyperparathyroidism: preservation of cancellous bone structure". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**: 930-938

Partridge N.C., Walling H.W., Bloch S.R., Omura T.H., Chan P.T., Pearman A.T., Chou W.Y. (1996). "The regulation and regulatory role of collagenase in bone". *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**: 15-27

Petrides P.E. (1998). "Die einzelnen Bestandteile des Bindegewebes, bzw. der extrazellulären Matrix". In: Petrides P.E., Löffler G. (Hrsg.), *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 734ff.

Potts J.T., Jr., Jüppner H. (1997). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors." In: Avioli L.V., Krane S.M. (Hrsg.), *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Academic Press, San Diego, CA; 51-94

Rahn B.A. (1994). "Knochengewebe, Knochenbau". In: Drenckhahn D., Zenker W. (Hrsg.), *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. 15. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore; 145-159

Raisz L.G. (1988). "Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis". *N. Engl. J. Med.* **318**: 818-827

Raisz L.G., Kream B.E., Lorenzo J.A. (1998). "Bone remodeling and its regulation". In: Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Larsen P.R. (Hrsg.), *Endocrinology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PE; 1216-1219

Rao D. S., Frame B., Reynolds W.A., Parfitt A.M. (1979). "Hypercalcemia in metaphyseal chondrodysplasia of Jansen (MCD): an enigma". *Vitamin D: Basic Research and its Clinical application* 1173-1176

Rawlinson S.C., Pitsillides A.A., Lanyon L.E. (1996). "Involvement of different ion channels in osteoblasts' and osteocytes' early responses to mechanical strain". *Bone* **19**: 609-614

Ries C., Petrides P.E. (1995). "Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease". *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. **376**: 345-55

Rodan G.A. (2001). "Bone development and remodeling". In: DeGroot L.J., Jameson J.L. (Hrsg.), *Endocrinology*. 4. Aufl., Harcourt, 1053-1061

Roodman G.D. (1999). "Cell biology of the osteoclast". *Exper. Hemat.* **27**: 1229-1241

Rossert J, Terraz C., Dupont S. (2000). „Regulation of type I collagen genes expression“. *Nephrol. Dial. Transplant.* **6**: 66-8

Rossert 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**: 1421-1432

Rubin D.A., Jüppner H. (1999). "Zebrafish express the common parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide". *J. Biol. Chem.* **274**: 28185-90

Sakamoto S., Sakamoto M., Horton J.E. (1984). "Evidence that collagenase is involved in the mechanisms of bone resorption stimulated with parathyroid hormone: a study in two different bone culture systems". In: Cohn D.V., Fujita T., Potts J.T., Talmage R.V. (Hrsg.), *Endocrine control of bone and calcium metabolism*. Excerpta Medica, Amsterdam; 140-143

Schipani E., Karga H., Karaplis A.C., Potts J.T., Jr., Kronenberg H.M., Segre G.V., Abou-Samra A.B., Jüppner H. (1993). "Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH) / PTH-related peptide receptor". *Endocrinology*. **132**: 2157-65

Schipani E., Kruse K., Jüppner H. (1995). "A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia". *Science* **268**: 98-100

Schipani E., Langman C., Hunzelman J., Le Merrier M., Loke K.Y., Dillon M.J., Silve C., Jüppner H. (1999). "A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 3052-3057

Schipani E., Langman C.B., Parfitt A.M., Jensen G.S., Kikuchi S., Kooh S.W., Cole W.G., Jüppner H. (1996). "Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansens's metaphyseal chondrodysplasia". *N. Engl. J. Med.* **335**: 708-714

Schipani E., Lanske B., Hunzelman J., Luz A., Kovacs C.S., Lee K., Pirro A., Kronenberg H.M., Jüppner H. (1997). "Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 13689-13694

Schmidt C., Pommerenke H., Durr F., Nebe B., Rychly J. (1998). "Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins". *J. Biol. Chem.* **273**: 5081-5085

Schütze N., Lechner A., Groll C., Siggelkow H., Hübner M., Köhre J., Jakob F. (1998). "The human analog of murine cystein rich protein 61 is a $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum". *Endocrinology.* **139**: 1761-70

Scott D.K., Brakenhoff K.D., Clohisy J.C., Quinn C.O., Partridge N.C. (1992). "Parathyroid hormone induces transcription of collagenase in rat osteoblastic cells by a mechanism using cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and requiring protein synthesis". *Mol. Endocrinol.* **6**: 2153-2159

Scott D.K., Brakenhoff K.D., Clohisy J.C., Quinn C.O., Partridge N.C. (1992). "Parathyroid hormone induces transcription of collagenase in rat osteoblastic cells by mechanism using cyclic adenosine 3', 5'-monoposphate and requiring protein synthesis". *Mol. Endocrinol.* **6**: 2153-9

Selvamurugan N., Brown R.J., Partridge N.C. (2000). "Regulation of collagenase-3 gene expression in osteoblastic and non-osteoblastic cell lines". *J. Cell Biochem.* **79**: 182-90

Sexton P.M., Findlay D.M., Martin T.J. (1999). "Calcitonin". *Curr. Med. Chem.* **6**: 1067-93

Silver J., Moallem E., Epstein E., Kilav R., Naveh-Many T. (1994). "New aspects in the control of parathyroid hormone secretion". *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **3**: 379-85

Silverthorn K.G., Houston C.S., Duncan B.P. (1987). "Murk Jansen's metaphyseal chondrodysplasia with long-term followup". *Pediatr. Radiol.* **17**: 119-123

Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Luthy R., Ngyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pat-
tison W., Campbell P., Boyle W.J. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density". *Cell.* **89**: 309-19

St-Jacques B., Hammerschmidt M., McMahon A.P. (1999). "Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation". *Genes Dev.* **13**: 2072-86

Studzinski G.P., McLane J.A., Uskokovic M.R. (1993). "Signaling pathways for vitamin D-induced differentiation: implications for therapy of proliferative and neoplastic diseases". *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **3**: 279-312

Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T., Martin T.J. (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families". *Endocr. Rev.* **20**: 345-57

Suva L.J., Winslow G.A., Wettenhall R.E., Hammonds R.G., Moseley J.M., Diefenbach-Jagger H., Rodda C.P., Kemp B.E., Rodriguez H., Chen E.Y. (1987). "A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression". *Science.* **237**: 893-6

Takeda S., Bonnamy J.P., Owen M.J., Ducy P., Karsenty G. (2001). "Continuous expression of Cbfa1 in non-hypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice". *Genes Dev.* **15**: 467-481

Teitelbaum S.L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts". *Science.* **289**: 1504-8

Teti A., Rizzoli R., Zamboni Z. A. (1991). "Parathyroid hormone binding to cultured avian osteoclasts". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 1217-22

Thiede M.A., Daifotis A.G., Weir E.C., Brines M.L., Burtis W.J., Ikeda K., Dreyer B.E., Garfield R.E., Broadus A. E. (1990). "Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 6969-73

Tondravi M.M., McKecher S.R., Anderson K., Erdmann J.M., Quiroz M., Maki R., Teitelbaum S.L. (1997). "Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1". *Nature.* **386**: 81-4

Ueta C., Iwamoto M., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Enomoto-Iwamoto M., Ohmori T., E. H., Nakata K., Takada K. et al. (2001). "Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes". *J. Cell Biol.* **153**: 87-100

Usdin T.B., Gruber C., Bonner T.I. (1995). "Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor". *J. Biol. Chem.* **270**: 15455-8

Usdin T.B., Wang T., Hoare S.R., 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**: 349-83

Uzawa T., Hori M., Ejiri S., Ozawa H. (1995). "Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone (1-34) on rat bone". *Bone* **16**: 477-484

Vortkamp A., Lee K., Lanske B., Segre G.V., Kronenberg H.M., Tabin C.J. (1996). "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein". *Science*. **273**: 613-22

Vu T.H., Shipley J.M., Bergers G., Berger J., Helms J.A., Hanahan D., Shapiro S.D., Senior R., Werb Z. (1998). "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes". *Cell*. **93**: 411-422

Wagner E.F., Karsenty G. (2001). "Genetic control of skeletal development". *Current Opinion in Genetics and Development*. **11**: 527-532

Wassermann R.H., Fullmer C.S. (1995). "Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses". *J. Nutr.* **125**: 1971S-1979S

Weir E.C., Pilbrick W.M., Amling M., Neff L.A., Baron R., Broadus A.E. (1996). "Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 10240-5

Wong G.L. (1984). "Paracrine interactions in bone-secreted products of osteoblasts permit osteoclasts to respond to parathyroid hormone". *J. Biol. Chem.* **259**: 4019-22

Wu H., Byrne M.H., Stacey A., Goldring M.B., Birkhead J.R., Jaenisch R., Krane S.M. (1990). "Generation of collagenase-resistant collagen by site-directed mutagenesis of murine $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ collagen gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 5888-5892

Yamamoto M., Harm S.C., Grasser W.A., Thiede M.A. (1992). "Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5326-30

Zhao W., Byrne M.H., Boyce B.F., Krane S. (1999). "Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice". *J. Clin. Invest.* **103**: 517-524

Zhao W., Byrne M.H., Wang Y., Krane S.M. (2000). "Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen". *J. Clin. Invest.* **106**: 941-949

Danke

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Franz Jakob für die Überlassung der Arbeit und die Vermittlung und Unterstützung meines Aufenthalts in Boston.

Prof. Jakob betreute mich während der ganzen Zeit auf hervorragende Weise, hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und beeindruckte mich immer wieder aufs neue nicht nur durch seine fachliche, sondern seine herausragende menschliche Kompetenz.

Ich danke den Mitarbeitern von Prof. Jakob am Zentrum für Experimentelle und Klinische Osteologie und dem Labor für Molekulare Experimentelle Orthopädie unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Norbert Schütze für ihre Unterstützung.

Den experimentellen Teil meiner Arbeit erstellte ich während eines sechsmonatigen Aufenthalts im Labor von Henry M. Kronenberg, M.D., in Boston, USA. Ich danke ihm für die Möglichkeit in seiner Abteilung forschen zu dürfen und für seine wissenschaftlichen Anregungen in diversen Veranstaltungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner dortigen Betreuerin Ernestina Schipani, M.D., Ph.D.. Sie hat mich zusammen mit ihrer Arbeitsgruppe bei den zahlreichen Experimenten angeleitet und betreut und mir darüber hinaus in regelmäßigen Treffen auch viele theoretische Grundlagen der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt. Mille grazie, Stina!

Herrn Privatdozent Dr. Eberhard Blind danke ich für die Annahme des Koreferats.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Mann bedanken, bei denen ich für alle meine Vorhaben immer volle Unterstützung gefunden habe.

Ohne die liebevolle Hilfe meiner Eltern wäre weder diese wissenschaftliche Arbeit, noch mein gesamtes Medizinstudium in der erlebten Art und Weise möglich gewesen.

Ein herzliches Vergelt's Gott dafür!

Curriculum vitae

Anja Ernestine Widdermann, geb. Maier

Geburtstag: 20.09.1976

Geburtsort: Ellwangen (Jagst)

Familienstand: verheiratet mit Ulrich Andreas Widdermann

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 –1987 Grundschule „St. Georg“ in Ellwangen-Schrezheim

1987 –1996 Peutinger-Gymnasium in Ellwangen

Studium

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

Famulaturen

Sep. –Okt. 1999 Chirurgische Abteilung des „Municipal Hospital“ in Gifu (Japan)

Aug. 2000 Innere Medizin an der „Virngrund-Klinik Ellwangen“

Aug. –Sept. 2001 Pädiatrie am Diakoniekrankenhaus in Schwäbisch Hall

Febr. –März 2002 Innere Medizin / Allgemeinmedizin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Fladerer in Ellwangen

Praktisches Jahr

Mai –Aug. 2003 Chirurgie im „Hôpital des Cadolles“ in Neuchâtel (Schweiz)

Sept. –Okt. 2003 Innere Medizin (Allgemeinstation) im „Hôpital de la Providence“ in Neuchâtel (Schweiz)

Okt. –Dez. 2003 Innere Medizin (Med. Intensivstation) an der Med. Universitätsklinik in Würzburg

Dez. 03 –März 2004 Neurologie an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg

Forschung/Dissertation

Sept. 2000 –März 2001:

Forschungsaufenthalt in der „Endocrine Unit“ des „Massachusetts General Hospital / Harvard Medical School“ in Boston (USA) bei Ernestina Schipani, M.D., Ph.D. (Laborleiter: Henry M. Kronenberg, M.D.).

In der Folge entstanden zwei Publikationen (Poster beim ASBMR-Kongress 09/2002 in San Antonio/Texas (USA); Veröffentlichung im „Endocrinology“, 09/2003).

Vortrag der Ergebnisse unter anderem beim Würzburger „Promomed-Kongress 11/2002“.

Zusätzliche Praktika/Tätigkeiten

Aug. –Nov.1996	Aufenthalt auf einer Indischen Missionsstation (Andhra Pradesh)
Dez. 96 –Febr.1997	Pflegepraktikum in der „Virngrund-Klinik Ellwangen“
Sept. 1998	Chirurgie-Praktikum in der „Clinique Mozart“ in Nice (Frankreich)
Juli 99 –Nov. 2000	Studentische Mitarbeiterin der „4D-Studie“ (Universität Würzburg)
Sept. 2002	Praktikum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe am „Städtischen Klinikum Lüneburg“

Sonstiges:

Sprachkenntnisse: Latinum
Englisch (fließend in Wort und Schrift)
Französisch (fließend in Wort und Schrift)
Italienisch (Grundkenntnisse)

EDV: Grundkenntnisse in Word, Excel

Freizeitinteressen: Musik in Chor und Orchester

Ellwangen, Oktober 2004

