Universitätsklinikum Ulm Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Zentrum für Muskuloskelettale Forschung Direktorin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Interaktion des Wnt- und des Östrogenrezeptorsignalwegs in der Mechanotransduktion

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> vorgelegt von Claudia Nemitz Geboren in Wolfen

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf BrennerTag der Promotion: 08.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung1
1.1	Knochenfunktion und -aufbau1
1.2	Ossifikation 2
1.3	Mechanotransduktion3
1.4	Osteoporose 15
1.5	Ziel dieser Arbeit 17
2 2 1	Material & Methoden
2.1	Methoden 32
2.2	Frachnisso 54
3.1 Cat Knc	Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β- enin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte ochenformation in Mäusen
3.2 Cat Ant	Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β- enin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte osteogene wort in osteoblastären Zellen
3.3 Sigi mes	Untersuchung des Einflusses der Aktivierung des Wnt/β-Catenin- naltransduktionswegs auf die mechanisch regulierte Differenzierung von senchymalen Stammzellen
4	Diskussion
4.1 tran	Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signal- nsduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation in Mäusen 77
4.2	Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduk-
tion	swegs auf die mechanisch induzierte osteogene Antwort in osteoblastären Zellen88
4.3 Sigi mes	Untersuchung des Einflusses der Aktivierung des Wnt/β-Catenin- naltransduktionswegs auf die mechanisch regulierte Differenzierung von senchymalen Stammzellen
4.4	Schlussfolgerung 111
5 6	Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
Akt	Proteinkinase B
AP-1	activator protein 1
AP2	Adipozytprotein 2
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
BMD	bone mineral density
BMP	bone morphogenetic protein
BMU	basic multicellular unit
bp	Basenpaare
BSP	Bisulfit-Sequenzierung-PCR
CaMKII	Ca ²⁺ - und Calmodulin-abhängige Kinase II
Cbfa1	core-binding factor alpha 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cebpa	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CG-Dinukleotid	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
Chd7	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7
Cox-2	cyclooxygenase-2
CpG-Insel	Cytosin-Phosphat-Guanin-Insel
CREB	cAMP response element-binding protein
Cyr61	cysteine-rich angiogenic inducer 61
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSP	Dithiobis[succinimidyl propionate]
DvI	dishevelled I
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EP2/4	Prostaglandin-E-Rezeptor 2/4
ER	Östrogenrezeptor

ERE	estrogen response element
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FAK	Fokale-Adhäsion-Kinase
FCS	fötales Kälberserum
Fra-1	Fos-related antigen-1
Fzd2	frizzled 2
Gapdh	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter 4
GPER	G protein-coupled estrogen receptor 1
Gsk-3β	Glycogen-Synthase-Kinase 3β
HCI	Salzsäure
HRP	horseradish peroxidase
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IGF-1R	insulin-like growth factor-1 receptor
II-1/6	Interleukin 1/6
Jnk	jun-N-terminal kinase
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
K4Fe(CN) ₆ * 3 H ₂ O	Kaliumhexacyanidoferrat(II)-Trihydrat
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Lef	lymphoid enhancer factor
LPL	Lipoprotein-Lipase
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor-related protein
5/6	
MC3T3-E1	murine präosteoblastäre Zelllinie
MEM	minimal essential medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
зц	microstrain
MSC	mesenchymale Stammzelle
MSP	Methylierungsspezifische PCR
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nfat	nuclear factor of activated T-cells

NIk	nemo-like kinase
NO	Stickstoffmonoxid
Opg	Osteoprotegerin
OPPG	osteoporosis-pseudoglioma syndrome
OSE2	osteoblast specific element 2
OVX	Ovarektomie, ovarektomiert
PBS	Phophat-gepufferte Salzlösung
PCP	planar cell polarity
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
РІЗК	phosphoinositid-3-kinase
РКС	Proteinkinase C
Ppary	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
PTH1R	Parathormon-1-Rezeptor
Ptk7	protein tyr kinase 7
Rankl	receptor activator of NF-κB ligand
RLT-Puffer	Guanidin-Thiocyanat-Puffer
Rock	Rho-Kinase
Ror2	tyrosine-protein kinase transmembrane receptor
RT	reverse Transkriptase
Runx2	runt-related transcription factor 2
SB415286	3-((3-Chloro-4-Hydroxyphenyl)Amino)-4-(2-Nitro-
	phenyl)-1H-Pyrrol-2,5-Dione
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-
	Polyacrylamidgelelektrophorese
Setdb1	SET domain bifurcated 1
Siah2	seven in absentia homolog 2
Shc	Src homology 2 domain containing
Smad1	Mothers against decapentaplegic homolog 1

Sfrp	secreted frizzled-related protein
Tab2	Tak1-binding protein 2
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tak1	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBS	tris buffered saline
Tcf	T-cell factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tgf-β	transforming growth factor-β
Tnf-α	tumor necrosis factor-α
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
Wnt	wingless-type MMVT integration site family

Die international gültigen Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (SI) für physikalische Größen sind in diesem Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Knochenfunktion und -aufbau

Knochen ist ein besonders hartes Binde- und Stützgewebe und bildet das für alle höheren Vertebraten charakteristische Skelett. Dieses dient den Muskeln als Ansatzpunkt, bildet die Grundlage der Körperform und schützt die inneren Organe (Rauner 2012e, Bord et al. 2001). Desweiteren ist es Ort der Blutbildung, spielt eine zentrale Rolle im Mineralhaushalt, ist sogar am Energiemetabolismus beteiligt und dient als Speicher für anorganische Ionen und Knochenmatrixproteine. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, unterliegt der Knochen einer starken Dynamik, ist durchblutet und ein metabolisch aktives Gewebe, das einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt.

Hierbei spielen Zellen unterschiedlicher Abstammung eine Rolle (Zaidi 2007). Die knochenabbauenden Osteoklasten sind hämapoetischen Ursprungs. Sie entfernen alten oder beschädigten Knochen und tragen zum Gleichgewicht des Kalziumhaushalts im Körper bei, indem sie Kalzium aus dem Knochen freisetzen. Osteoblasten hingegen sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und bauen Knochenmatrix auf. Die Osteoblasten synthetisieren die organischen Komponenten der extrazellulären Matrix (Osteoid), hauptsächlich Kollagen I, aber auch andere Proteine, wie z.B. Osteocalcin, Osteopontin oder *bone sialoprotein*. Die anorganische Matrix besteht hauptsächlich aus Kalzium und Phosphat, die zusammen Hydroxyapatitkristalle bilden. Diese Kristalle werden in die Kollagenmatrix eingelagert. Die Kollagenmatrix verleiht dem Knochen Seine Elastizität, während die mineralischen Komponenten dem Knochen Festigkeit und Stabilität verleihen.

Es werden grundsätzlich zwei Knochentypen unterschieden: kortikaler und trabekulärer Knochen (Rauner 2012a). Der kortikale Knochen umgibt in den langen Röhrenknochen und Wirbelkörpern die Markhöhle und den trabekulären Knochen. Er besteht aus longitudinal ausgerichteten, sich überlappenden zylindrischen Einheiten, den sogenannten Osteonen. In deren Zentren verlaufen die Blutgefäße und Nervenbahnen. Darum legen sich konzentrische Lamellen bestehend aus dicht gepackten Kollagenfibrillen. Zwischen diesen Lamellen sind die Osteozyten eingebettet. Sie sind vollständig ausdifferenzierte Osteoblasten und durch sogenannte Kanalikuli miteinander und mit den Zellen an der Knochenoberfläche sowie mit Blutgefäßen und Nervenbahnen verbunden, um Nährstoffe und Metabolite auszutauschen und um mechanische und biochemische Reize wahr-

zunehmen und weiterzuleiten. Die Volkmannschen Kanäle verbinden die Blutgefäße der äußeren und inneren Knochenoberfläche mit denen der Osteone. Der kortikale Knochen ist somit ein sehr harter, dicht gepackter, stark mineralisierter Knochen und erlangt dadurch maximale Stärke, um großen Belastungen standzuhalten. Durch seine geringe Oberfläche unterliegt er einer geringen Umbaurate. Durch die Längsausrichtung der Osteone ist er jedoch vor allem an uniaxiale hohe Belastungen angepasst. Der trabekuläre Knochen hingegen ist vor allem in den Enden der langen Röhrenknochen und in den Wirbelkörpern zu finden. Er ist aus einem Netzwerk von Trabekeln aufgebaut, die sich entlang der am stärksten auftretenden Lasten im Knochen orientieren. Somit wird trotz eines minimalen Gewichtes eine maximale Knochenstärke erreicht. Zudem besitzt der trabekuläre Knochen eine sehr große Oberfläche und unterliegt damit einer hohen Umbaurate, sodass er über eine hohe metabolische Aktivität verfügt. Dadurch macht sich jeder Knochenmasseverlust zuerst im trabekulären Knochen und viel später erst im kortikalen Knochen bemerkbar.

1.2 Ossifikation

Die Ossifikation, die Knochenbildung, findet während des Wachstums oder während der Regeneration, wie z.B. bei der Frakturheilung, statt (Rauner 2012b). Hierbei unterscheidet man die desmale und chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entsteht Knochengewebe direkt aus embryonalem Bindegewebe, indem mesenchymale Stammzellen zunächst zu Osteoblasten differenzieren, die dann Osteoid produzieren. Durch sie entstehen die flachen und unregelmäßigen Knochen, wie z.B. die Kalvarien. Bei der chondralen Ossifikation entsteht der Knochen über eine Zwischenstufe aus Knorpel. Dies ist z.B. bei den langen Röhrenknochen oder während der Frakturheilung der Fall. Außerdem unterscheidet man zusätzlich zwischen Knochenumbau (*remodelling*) und Knochenneubildung (*modelling*).

Durch das *remodelling* kann der Knochen je nach Bedarf Kalzium freisetzen oder einlagern. Aber es dient auch der Erhaltung von Struktur und Mikroarchitektur im Lauf eines Lebens, um den physischen Beanspruchungen gewachsen zu sein. Knochenabbau und -aufbau sind beim *remodelling* miteinander verknüpft, indem Osteoklasten, Osteoblasten und Knochenbelegzellen in der sogenannten BMU (*basic multicellular unit*) eng zusammenarbeiten (Martin and Sims 2005, Rauner 2012c). Reguliert werden diese BMUs jedoch durch die Osteozyten, die mechani-

sche Reize wahrnehmen und weiterleiten können. Durch das *remodelling* können Mikrofrakturen repariert und somit die mechanische Belastbarkeit gewährleistet werden. Aber auch der Kalzium- und Phosphathaushalt sowie die Knochenmorphologie werden so reguliert. Ein *remodelling*-Zyklus kann in vier Teilschritte unterteilt werden: Die Aktivierung durch die Detektion bestimmter Signale (z.B. mechanische Reize, Hormone, Wachstumsfaktoren), die Resorption des Knochenminerals durch die Osteoklasten, der Abbau der zurückgebliebenen Kollagenstruktur durch mononukleäre Zellen, vermutlich *osteomacs* (Rauner 2012d), und schließlich die Neusynthese von Knochenmatrix durch die Osteoblasten.

Modelling kann sowohl Knochenaufbau als auch Knochenabbau bedeuten (Clarke 2008). Hierdurch kann der Knochen seine Form an physiologische Einflüsse und mechanische Kräfte anpassen. Osteoblasten bauen Knochen an den Stellen, an denen er benötigt wird, auf und Osteoklasten bauen ihn dort ab, wo er nicht benötigt wird, um maximale Stabilität bei minimalem Materialaufwand zu erreichen. Entscheidend hierfür sind mechanische Einflüsse. So wird zum Beispiel bei mangelnder Belastung (Bettruhe, Raumfahrt) Knochen abgebaut (Arnaud et al. 1992), während zum Beispiel die starke Stimulation des Schlägerarms bei einem Tennisspieler zum Knochenanbau führt (Haapasalo et al. 1998). Auch das *modelling* wird größtenteils durch die Osteozyten reguliert.

1.3 Mechanotransduktion

Der Prozess der Erkennung des mechanischen Reizes, über die Umwandlung dieses Reizes in ein biochemisches Signal, welches schließlich eine zelluläre Antwort induziert, wird als Mechanotransduktion bezeichnet. Hierbei sind inzwischen die Osteozyten in der Literatur als die Hauptmechanosensoren anerkannt (Bonewald 2006). Diese im Knochen am häufigsten vertretene Zellart ist in der Knochenmatrix in das sogenannte lakuno-kanalikuläre System eingebettet, ein weit verzweigtes System aus Zelllakunen, in denen die Osteozyten sitzen, und Kanälen, in denen die Zellfortsätze die Osteozyten miteinander, aber auch die Osteozyten mit den Osteoblasten und Osteoklasten an der Knochenoberfläche, sowie mit den Zellen im Markraum und mit Blutgefäßen verbinden (Abbildung 1.1). Bei mechanischer Belastung des Knochens kommt es in diesem lakuno-kanalikulärem System zur Flüssigkeitsbewegung, dem sogenannten *fluid flow*, welches an den Osteozyten und ihren Zellfortsätzen Scherspannungen erzeugt (Weinbaum, Cowin and Zeng 1994). Dieser mechanische Reiz kann durch Zilien,

Integrine, das Zytoskelett und Ionenkanäle wahrgenommen werden und über *gap junctions* und Hemikanäle kann die Information über diesen mechanischen Reiz an andere Zellen und in die umliegende Matrix in Form von Signalmolekülen wie Adenosintriphosphat (ATP), Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin E2 (PGE₂) weitergegeben werden (Bonewald 2006, Robling, Castillo and Turner 2006). Für PGE₂ ist aber auch eine autokrine Wirkung nachgewiesen. Denn das vom Osteozyten ausgeschüttete PGE₂ kann an den EP2/4-Rezeptor derselben Zelle binden und so intrazellulär die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) aktivieren, welche dann den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs (Sklerostin, Dickkopf) hemmen und die Transkription von Aktivatoren des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs (Snewald and Johnson 2008).



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion im Knochen. Extrazelluläres *fluid flow* (ECF) im lakuno-kanalikulären System öffnet spannungssensitive (V) und mechanosensitive (M) lonenkanäle der Osteozyten (OCY), wodurch Calcium (Ca²⁺)-Influx ermöglicht wird, und induziert ATP (Adenosintriphosphat)- und PGE₂ (Prostaglandin E2)-Freisetzung. PGE₂ bindet an den EP2- oder EP4-Rezeptor auf Osteoblasten (OB) und löst so intrazelluläre Signalkaskaden aus, die letztendlich zur erhöhten Knochenformation führen. Der Parathormon (PTH)- und der Wnt/β-Catenin-Signalweg sind ebenfalls an der Signaltransduktion in Osteoblasten beteiligt. Im Markraum führen hydrostatischer Druck und *fluid flow* unter anderem zur Ausschüttung von NO (Stickstoffmonoxid) durch MSCs (mesenchymale Stammzellen). NO hemmt die Rankl-Expression und fördert die Opg-Expression und hemmt so die Osteoklastogenese. (Robling 2006; republished with permission of Annual Reviews, Inc., from Annual Review of Biomedical Engineering, 8, 2006; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

Die Effektorzellen, vor allem die Osteoblasten, besitzen ebenfalls für die nach einem mechanischen Reiz ausgeschütteten Signalmoleküle eine Vielzahl an Rezeptoren, darunter den Wnt/ β -Catenin-Rezeptorkomplex aus Frizzled und Lrp5/6, den EP2/4- und den PTH1R-Rezeptor, die ihrerseits nach Bindung eines Liganden eine Vielzahl an intrazellulären Signalkaskaden induzieren, wie zum Beispiel den Wnt/ β -Catenin- oder ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)-Signaltransduktionsweg, die letztendlich die Transkription von Genen stimulieren, die für die Osteoblastenproliferation, -vitalität und -aktivität wichtig sind (Price et al. 2011, Robling et al. 2006), (Abbildung 1.2). An vielen dieser Signalkaskaden scheint der Östrogenrezeptor α (ER α) beteiligt zu sein (Price et al. 2011).



Abbildung 1.2: Mechanisch stimulierte Signalwege in Osteoblasten. Mechanische Reize werden durch eine Vielzahl an Rezeptoren erkannt (z.B. Frizzled-Lrp5/6, EP2/4, PTH1R). Diese wiederum lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die schließlich die Transkription pro-osteogener Faktoren (Wnts, PGE₂) fördern, die Transkription anti-osteogener Faktoren (Sklerostin) hemmen und intrazelluläre Mediatoren wie β-Catenin und ERα aktivieren. Diese lokalen Prozesse werden zusätzlich durch systemische Hormone (PTH, E2) beeinflusst. AKT: Proteinkinase B; AP1: *activator protein 1*; AR: Androgenrezeptor; COX-2: Cyclooxygenase-2; Cx43: Connexin 43; CREB: *cAMP response element-binding protein*; ECM: extrazelluläre Matrix; eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; EP2/4: Prostaglandin-E-Rezeptor 2/4; ERα: Östrogenrezeptor α; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; FAK: Fokale-Adhäsion-Kinase; GSK-3: Glykogen-Synthase-Kinase 3; IGF-1R: *insulin-like growth factor-1 receptor*; Lepr: Leptinrezeptor; LRP5/6: *lipoprotein receptor-related protein 5/6*; NFAT: *nuclear factor of activated T cells*; PGE2: Prostaglandin E2; PI3-K: *phosphotidylinositol 3- kinase*; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; PTH1R: Parathormon-1-Rezeptor; Shc: Src homology 2 domain containing; Smad1: *Mothers against decapentaplegic homolog 1*; TCF/LEF: *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*, Wnt: *wingless-type MMVT integration site family*. (modifiziert nach Price 2011; republished with permission of CURRENT SCIENCE INC, from Curr Osteoporos Rep, 9, 2011; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

Durch die Verformung der Knochenmatrix bei mechanischer Belastung sind auch die Osteoblasten und Osteoklasten selbst durch ihre Bindung an die Knochenoberfläche Verformungen, vor allem Dehnung, ausgesetzt (Bergmann et al. 2010). Osteoblasten können diese Verformungen ähnlich wie die Osteozyten wahrnehmen und schütten ebenfalls Signalmoleküle wie PGE₂ und NO aus. Die inhibierende Wirkung mechanischer Reize auf Osteoklasten hingegen scheint eher indirekt durch osteoblastäre Zellen vermittelt zu werden.

Die Proliferation und Differenzierung der Zellen im Markraum werden bei mechanischer Belastung durch hydrostatischen Druck, *fluid flow* und die Viskosität beeinflusst, wobei der hydrostatische Druck der dominierende Faktor zu sein scheint (Gurkan and Akkus 2008). In *in vitro* Studien konnte aber auch ein Einfluss von mechanischer Dehnung auf MSCs gezeigt werden (Sen et al. 2008).

Zusätzlich zur mechanischen Belastung werden die Proliferation, Differenzierung und Aktivität der Knochenzellen aber auch durch lokale Wachstumsfaktoren und systemische Hormone beeinflusst. In diesem Zusammenhang sind der Wnt/β-Catenin- und der Östrogenrezeptor (ER)-Signaltransduktionsweg von großer Bedeutung.

1.3.1 Bedeutung des Wnt-Signalwegs in der Knochenbiologie und Mechanotransduktion

Nach heutigem Kenntnisstand gibt es 19 Wnt-Liganden, über 15 Wnt-Rezeptoren und -Corezeptoren und eine Vielzahl, zum Großteil noch unerforschte, nachgeschaltene Signalwege (Niehrs 2012). Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg, auch als kanonischer Wnt-Signalweg bezeichnet, und die beiden nichtkanonischen Signalwege, der PCP (*planar cell polarity*)- und der Wnt/Ca²⁺-Signalweg, sind bisher am besten erforscht (Abbildung 1.3).

Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle in der Knochenformation und bei der Umsetzung mechanischer Signale in eine zelluläre Antwort. Die Bindung eines Wnt-Liganden an den heterodimeren Rezeptor, bestehend aus *frizzled* (Fzd) und *low-density lipoprotein receptor-related protein* 5 oder 6 (Lrp5/6), aktiviert intrazellulär das Protein *dishevelled I* (DvI) (Abbildung 1.3). Die Aktivierung von DvI inhibiert den Proteinkomplex, bestehend aus der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (Gsk-3 β), Axin und *adenomatous polyposis coli* (APC), der im nicht aktiven Zustand β -Catenin phosphoryliert und es so für den proteosomalen Abbau vorbereitet. Dadurch wird β -Catenin im Zytosol angereichert und kann in

den Zellkern wandern, wo es mit Transkriptionsfaktoren der *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (Tcf/Lef)-Familie interagiert, um die Transkription wichtiger Gene für die Knochenformation zu aktivieren.



Abbildung 1.3: Wnt-Signalwege. a: Bei dem PCP (planar cell polarity)-Signalweg bindet der Wnt-Ligand an den heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den Transmembranproteinen Frizzled (Fzd) und Receptor tyr kinase-like orphan receptor (Ror) bzw. Protein tyr kinase 7 (Ptk7) und aktiviert so intrazellulär das Protein dishevelled I (DvI), welches dann die GTPasen RhoA und Rac1 aktiviert, wodurch diese die Rho-Kinase (Rock) und die Jun-N-terminal kinase (Jnk) aktivieren können, welche dann schließlich die Polymerisation von Actin und die Jun-abhängige Transkription bewirken. b: Bei dem Wnt/β-Catenin-Signalweg bindet ein Wnt-Ligand an den heterodimeren Rezeptor, bestehend aus Fzd und Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 oder 6 (Lrp5/6) und aktiviert so intrazellulär das Protein Dvl. Die Aktivierung von Dvl inhibiert den Proteinkomplex, bestehend aus der Glykogen-Synthase-Kinase 3β (Gsk-3β), Axin und Adenomatous Polyposis coli (APC) und ermöglicht so die Anreicherung von β-Catenin, welches nun in den Zellkern wandern kann, wo es mit Transkriptionsfaktoren der T-cell factor/Lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef)-Familie interagiert, um die Transkription wichtiger Gene für die Knochenformation zu aktivieren. c: Der Wnt/Ca2+-Signalweg wird durch die Bindung eines Wnt-Liganden an den Fzd-Rezeptor aktiviert. Intrazellulär aktiviert dies die Phospholipase C (PLC), wodurch dann die Ca²⁺- und Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), die Proteinkinase C (PKC) und Calcineurin aktiviert werden. Calcineurin aktiviert über den Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T cells (Nfat) die Transkription von Genen, die an der Zellmigration und -Differenzierung beteiligt sind. d: Neben diesen 3 Signalwegen gibt es noch eine Vielzahl anderer Wnt-Signalwege, die aber noch größtenteils unerforscht sind. CKIa: casein kinase Ia; DAAM: dishevelled associated activator of morphogenesis; MUSK: muscle skeletal receptor Tyr kinase; NFAT: nuclear factor of activated T cells; PTK7: protein Tyr kinase 7; RYK: receptor Tyr kinase; Wnt: wingless-type MMVT integration site family (modifiziert nach Niehrs 2012; republished with permission of NATURE PUBLISHING GROUP, from Nat Rev Mol Cell Biol, 13, 2012; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

Ein Schlüsselregulator der Knochenmasse im Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg ist der Rezeptor Lrp5. Funktionsverlustmutationen dieses Rezeptors führen zu einer erniedrigten Knochenmineraldichte, die wiederum zu Frakturen und Skelettverformungen führt, dem osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) (Gong et al. 2001). Funktionsfördernde Mutationen verhindern die Bindung endogener Wnt/β-Catenin-Inhibitoren (Ai et al. 2005, Boyden et al. 2002, Li et al. 2005) und führen so zu einem Knochenphänotyp mit einer unnatürlich hohen Knochenmineraldichte und einer daraus resultierenden sehr hohen Knochenstabilität (Johnson et al. 1997, Little et al. 2002, Van Wesenbeeck et al. 2003). Nach diesen Entdeckungen wurde die Funktion von Lrp5 bei der Regulation der Knochenmasse im Mausmodell näher untersucht. Die Knochen von Mäusen mit einer Funktionsverlustmutation in Lrp5 (Lrp5^{-/-}) hatten eine signifikant erniedrigte Knochenmineraldichte und dadurch eine verminderte Knochenstabilität (Sawakami et al. 2006). Zudem war bei diesen Mäusen die Aktivierung der Osteopontin-Expression, welche Teil der späten, osteogenen Antwort auf die mechanische Belastung ist, nach mechanischer Belastung der Ulna drastisch reduziert. In einer anderen Mausstudie konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Belastung der Tibia Zielgene des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs hochreguliert wurden (Robinson et al. 2006). Hierbei hatten die Überexpression von Lrp5 (Lrp5 G171V) und die Inhibierung der Gsk-3β einen sensibilisierenden Effekt auf die mechanisch induzierte Genexpression.

Außerdem konnten Robling et al. eine starke lokale Herunterregulation von Sklerostin durch mechanische Stimulation der Ulna in Mäusen zeigen (Robling et al. 2008). Sklerostin, ein vom Sost-Gen kodiertes Protein, wird fast ausschließlich in den Osteozyten, den Mechanosensoren des Knochens, exprimiert und hermt den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg durch Bindung an Lrp5/6 (Li et al. 2005, Semenov, Tamai and He 2005, Semenov and He 2006). Somit ist die Regulation der Sklerostin-Expression durch mechanische Belastung ein wichtiger Mechanismus, mit dem die Osteozyten die Regulation der Knochenmasse durch Modulation des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in den Effektorzellen, wie zum Beispiel den Osteoblasten, regulieren können.

Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg begünstigt aber nicht nur die Osteoblastenaktivität, sondern fördert auch die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in die osteogene Richtung. Bennett et al. und Ross et al. zeigten, dass Wnt10b die Adipogenese durch Inhibierung der Gsk-3β und Aktivierung von

β-Catenin hemmt (Bennett et al. 2002, Ross et al. 2000). Kennell et al. fanden heraus, dass die Aktivierung von Fzd1 durch Wnt8 β-Catenin stabilisierte, wodurch die Osteoblastogenese gefördert und die Adipogenese gehemmt wurde (Kennell and MacDougald 2005). Christodoulides et al. deckten auf, dass zu Beginn der Adipogenese der Wnt-Antagonist Dkk1 hochreguliert und die Wnt-Rezeptoren Lrp 5/6 herunter reguliert sind (Christodoulides et al. 2006).

Der nicht-kanonische PCP-Signalweg spielt eine Rolle bei der Zellpolarität und -migration. Die Bindung eines Wnt-Liganden an den heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den Transmembranproteinen Fzd und *receptor tyr kinase-like orphan receptor* (Ror) bzw. *protein tyr kinase 7* (Ptk7), aktiviert intrazellulär das Protein Dvl, welches die GTPasen RhoA und Rac1 aktiviert, wodurch diese die Rho-Kinase (Rock) und die *Jun-N-terminal kinase* (Jnk) aktivieren können, welche dann schließlich die Polymerisation von Actin und die *Jun*-abhängige Transkription bewirken.

Der nicht-kanonische Wnt/Ca²⁺-Signalweg ist bei der Zellmigration beteiligt, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung. Durch die Bindung eines Wnt-Liganden an den Fzd-Rezeptor wird intrazellulär die Phospholipase C (PLC) aktiviert, wodurch dann die Ca²⁺- und Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), die Proteinkinase C (PKC) und Calcineurin aktiviert werden. Calcineurin aktiviert über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (Nfat) die Transkription von Genen, die an der Zellmigration und -differenzierung beteiligt sind.

Der Wnt-Ligand Wnt5a und einer seiner Rezeptoren, Ror2, sind zwei wichtige Vermittler der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege bei der Knochenformation und beim *remodelling*. Funktionsverlustmutationen von Ror2 führen zu schweren Missbildungen des Skeletts, der autosomal rezessiven Form des Robinow-Syndroms (Afzal et al. 2000). Die Deletion von Ror2 in Mäusen führte ebenfalls zu Skelettmissbildungen (DeChiara et al. 2000, Takeuchi et al. 2000). Zudem konnten Oishi et al. im Mausmodell zeigen, dass die Deletion von Wnt5a zu einem der Ror2-Deletion sehr ähnlichen Phänotyp führte und schlossen daraus, dass Wnt5a und Ror2 miteinander interagieren (Oishi et al. 2003). Später zeigten Liu et al. eine fördernde Wirkung von Wnt5a durch die Aktivierung des Rezeptors Ror2 auf die osteogene Differenzierung von humanen osteoblastären Zellen (Liu et al. 2008). Zudem zeigten Takada et al. eine inhibierende Wirkung von Wnt5a über die Aktivierung von CaMKII auf die Pparγ-Aktivität, ein Schlüsselprotein der adipogenen Differenzierung (Takada et al. 2007).

Beim *remodelling* scheinen Wnt5a und Ror2 als *coupling*-Faktoren zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zu agieren. So zeigten Maeda et al., dass von Osteoblasten ausgeschüttetes Wnt5a an den Ror2-Rezeptor auf Osteoklasten bindet und so über den Jnk-Signalweg die Rankl-abhängige Osteoklastendifferenzierung und -aktivität fördert (Maeda et al. 2012).

Sowohl der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege spielen also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochenmasse. Hierbei scheint aber eine komplexe Interaktion der Signalwege stattzufinden.

Boland et al. zeigten, dass während der osteogenen Differenzierung humaner MSCs Faktoren der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege (Wnt11, Fzd6, Ror2) sowie die Wnt-Inhibitoren (Sfrp2, Sfrp3) hochreguliert, aber Faktoren des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs (Wnt9a, Fzd7) herunter reguliert waren (Boland et al. 2004). Wnt3a induzierte die Translokation von β-Catenin in den Zellkern und Tcf/Lef-Transkriptionsaktivität. Dies förderte die Proliferation und hemmte die Apoptose undifferenzierter MSCs. Die osteogene Differenzierung der MSCs wurde hingegen durch Wnt3a gehemmt und durch die Hemmung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs sowie durch Wnt5a gefördert. Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg scheint also wichtig für die Proliferation mesenchymaler Stammzellen zu sein. Für die Differenzierung hingegen scheinen die Inhibierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs und die Aktivierung nichtkanonischer Wnt-Signalwege wichtig zu sein. Ein wichtiger Regulator hierfür ist Wnt5a. Topol et al. zeigten, dass Wnt5a durch Induktion der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Siah2 (seven in absentia homolog 2) und von APC die Degradation von β -Catenin förderte (Topol et al. 2003). Siah2 und APC gehören zum Siah-APC-Ebi-E3-Ubiquitinligasekomplex, der β-Catenin unabhängig von der Gsk-3β abbaut (Liu et al. 2001, Matsuzawa and Reed 2001). Ishitani et al. deckten eine Signalkaskade auf, bei der Wnt5a durch Bindung an Fzd2 das Einströmen von Ca²⁺ in die Zelle induzierte, wodurch der CaMKII/Tak1/Nlk-Signalweg aktiviert wurde und die Serin-Threonin-Protein-Kinase Nlk (nemo-like kinase) die Tcf/Lef-Transkriptionsaktivität durch Phosphorylierung von Tcf inhibierte (Ishitani et al. 2003).

1.3.2 Bedeutung des Östrogenrezeptor-Signaltransduktionswegs in der Knochenbiologie und Mechanotransduktion

Auch der Östrogenrezeptor (ER)-Signaltransduktionsweg ist wichtig für die Knochenhomöostase und Mechanotransduktion. Es sind zwei Rezeptoren, ER α und ER β , im Knochen exprimiert, welche die knochenerhaltende Wirkung von Östrogen vermitteln. Im kortikalen Knochen ist überwiegend ER α exprimiert, während im trabekulären Knochen beide Rezeptoren gleichermaßen vertreten sind (Bord et al. 2001, Centrella and McCarthy 2012). Die Bedeutung der Interaktion der beiden Rezeptoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Mödder et al. zeigten, dass ER β die Signalwirkung von ER α hemmt (Modder et al. 2004). Sims et al. hingegen zeigten, dass ER β die Signalwirkung von ER α auch ersetzen oder erhöhen kann (Sims et al. 2003, Sims et al. 2002).



Abbildung 1.4: Östrogenrezeptor (ER)-Signaltransduktionsweg. 1. Klassischer Signalweg: Der E2 (Östrogen)-ER-Komplex bindet an EREs (*estrogen response elements*) im Promotor. 2. ERE-unabhängiger Signalweg: Der E2-ER-Komplex bindet durch Protein-Protein-Interaktion an andere Transkriptionsfaktoren. 3. Östrogenunabhängiger Signalweg: Wachstumsfaktoren (GF) induzieren Protein-Kinase-Kaskaden, die durch Phosphorylierung ER an ERE aktivieren. 4. Nichtgenomischer Signalweg: Der E2-ER-Komplex bindet an die Membran und löst Protein-Kinase-Kaskaden aus. Dadurch werden zytoplasmatische Proteine oder nukleäre Transkriptionsfaktoren aktiviert. (Björnström 2005; republished with permission of ENDOCRINE SOCIETY, from Mol Endocrinolog, 19, 2005; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

Durch Bindung an den Östrogenrezeptor kann Östrogen den "klassischen" Signalweg aktivieren, bei dem der Östrogenrezeptor direkt an Erkennungssequenzen auf der DNA, den sogenannten *estrogen response elements* (EREs), bindet (Abbildung 1.4). Bei dem "nicht-klassischen" Signalweg hingegen interagiert der Östrogenrezeptor mit anderen Proteinen (Paech et al. 1997, Umayahara et al. 1994) oder wird an der Membran, wie zum Bespiel an den *G protein-coupled estrogen receptor 1* (GPER), gebunden (Chang and Karin 2001, Manavathi and Kumar 2006, Revankar et al. 2005) (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.5: Einfluss von Östrogen auf die Knochenzellen. Östrogen beeinflusst hauptsächlich die Knochenresorption, indem es entweder direkt die Osteoklastenaktivität beeinflusst oder indem es die osteoklastenregulierenden Mechanismen von Osteoblasten, Osteozyten und T-Zellen beeinflusst. Östrogen beeinflusst aber auch die Knochenformation durch seinen Einfluss auf die Osteoblastenbildung und -aktivität. Blaue Pfeile: direkter Einfluss von Östrogen. Rote Pfeile: Aktivierung der Osteoklasten durch Osteozyten, Osteoblasten und T-Zellen, die durch Östrogen inhibiert wird.

Durch Bindung an seine Rezeptoren schützt Östrogen den Knochen vor Abbau (Fitzpatrick 2006). Es verhindert die Apoptose der Osteozyten, welche die *remodelling*-Aktivität regulieren, und hemmt so die Resorptionsaktivität der Osteoklasten (Emerton et al. 2010), (Abbildung 1.5). Die knochenresorbierenden Osteoklasten selbst können sowohl ein direktes als auch indirektes Ziel von Öst-

rogen sein. Östrogen kann direkt die Apoptose von Osteoklasten fördern, indem es in diesen Zellen an ERα bindet und so Fas Ligand induziert (Nakamura et al. 2007). Außerdem kann es die durch Rankl (*receptor activator of NF-κB ligand*) induzierte Osteoklastendifferenzierung hemmen (Shevde et al. 2000, Srivastava et al. 2001). Indirekt kann Östrogen die Bildung von Rankl in Osteoblasten, T- und B-Zellen hemmen und die Bildung von Opg (Osteoprotegerin) in osteoblastären Zellen fördern und so die Osteoklastenaktivität hemmen (Eghbali-Fatourechi et al. 2003, Hofbauer et al. 1999). Außerdem vermindert Östrogen die Bildung der proresorptiv wirkenden Zytokine Interleukin-1 (II-1), II-6 und TNFα (*tumor necrosis factor-α*) in Osteoblasten und mononukleären Zellen im Knochenmark und fördert die Bildung des antiresorptiv wirkenden Zytokins TGF-β (*transforming growth factor-β*) in osteoblastären Zellen (Manolagas and Jilka 1995, Oursler et al. 1991).

Aber Östrogen beeinflusst auch das Überleben und die Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten. So inhibiert es die Apoptose dieser Zellen über die Aktivierung des Src/Shc/ERK-Signalwegs (Kousteni et al. 2001) und durch Hemmung von Jnk (Kousteni et al. 2003) und es fördert die Osteoblastenbildung, indem es oxidativen Stress verhindert (Almeida et al. 2007). Die Osteoblastenaktivität fördert es, indem es die Bildung von NF-κB hemmt, welches den für die Knochenmatrixformation essentiellen Transkriptionsfaktor Fra-1 (*Fos-related antigen-1*) hemmt (Chang et al. 2009).

Der ER-Signaltransduktionsweg ist für die Transduktion mechanischer Signale im Knochen essentiell. In weiblichen Mäusen konnte gezeigt werden, dass ER α an der zellulären Antwort auf mechanische Belastung im kortikalen Knochen beteiligt ist (Lee et al. 2004, Saxon et al. 2012). Er scheint aber nicht die Antwort im trabekulären Knochen zu beeinflussen (Saxon et al. 2012). Die Bedeutung von ER β in der Mechanotransduktion ist noch relativ unerforscht und wird kontrovers diskutiert. Lee et al. zeigten in weiblichen Mäusen einen positiven Effekt von ER β auf die Antwort des kortikalen Knochens auf mechanische Belastung, aber einen inhibierenden Effekt auf die Osteoblastenproliferation *in vitro* (Lee et al. 2004). Saxon et al. hingegen fanden, ebenfalls in weiblichen Mäusen, einen inhibierenden Effekt von ER β auf die Antwort des kortikalen Knochens auf mechanische Selastung und keinen Effekt auf die Antwort im trabekulären Knochen (Saxon et al. 2012). Sowohl ER α als auch ER β sind an der mechanisch induzierten Verminderung der Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten beteiligt, indem sie Caveolin-1 an der Zellmembran binden und so den ERK-Signalweg aktivieren

(Aguirre et al. 2007). An diesem Prozess scheint in osteoblastären Zellen die Phosphorylierung von Serin 122 des ER α beteiligt zu sein (Jessop et al. 2001). Galea et al. entdeckten kürzlich, dass mechanische Belastung und Östrogen die Osteoblastenproliferation über ER α fördern, aber die damit verbundene Herunterregulation der Sost-Expression über ER β reguliert wird (Galea et al. 2013).

1.3.3 Einfluss der Interaktion des Wnt/β-Catenin- und Östrogenrezeptor-Signaltransduktionswegs auf die Mechanotransduktion

In der Literatur gibt es aus in vitro-Experimenten wenige Hinweise darauf, dass der Wnt/β-Catenin- und Östrogenrezeptor (ER)-Signaltransduktionsweg bei der Antwort auf mechanische Belastung miteinander interagieren. Zunächst zeigten Lau et al. anhand einer Genexpressionsanalyse in primären Mausosteoblasten, dass der Wnt/β-Catenin- und der ER-Signaltransduktionsweg neben dem IGF-1und dem BMP-Signaltransduktionsweg nach mechanischer Belastung hochreguliert waren (Lau et al. 2006). Desweiteren konnten Armstrong et al. zeigen, dass zur Stimulierung der Tcf/Lef-Promotoraktivität durch β-Catenin ERα benötigt wird (Armstrong et al. 2007). Die Autoren vermuteten hierbei eine direkte Interaktion von β-Catenin und ERα. In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten Liedert et al. in osteoblastären Zellen einen sensibilisierenden Effekt von Östrogen auf die mechanisch induzierte Expression von Cox-2 (Cyclooxigenase-2), ein mechanosensitives Gen, das in die frühe Antwort auf mechanische Belastung involviert ist, zeigen (Liedert et al. 2010). Bei zusätzlicher Wnt/β-Catenin-Aktivierung zur mechanischen Belastung wurde jedoch sowohl der sensibilisierende Effekt von Östrogen als auch der stimulierende Effekt der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs allein gehemmt. Schließlich deckten Sunters et al. ein ganzes Signalosom auf (Sunters et al. 2010). Sie konnten nachweisen, dass mechanische Belastung die Translokation des ungebundenen ERa an die Zellmembran induzierte, wo er mit dem Rezeptor IGF-1R assoziierte. Dadurch wurde intrazellulär AKT über PI3K aktiviert und somit Gsk-3ß inhibiert. Dies ermöglichte die Translokation von β-Catenin in den Zellkern, wo es die Tcf/Lef-Transkriptionsaktivität erhöhte.

1.4 Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des Skeletts, die sich durch eine geringe Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes auszeichnet, wodurch es zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und Anfälligkeit für Frakturen kommt (ohne Autor (1993)). Sie wird durch ein Ungleichgewicht zwischen der Knochenresorption durch die Osteoklasten und der Knochenformation durch die Osteoblasten erzeugt. Bei der sehr seltenen genetisch bedingten Osteoporose, der postmenopausalen Osteoporose (Typ I) und der altersbedingten Osteoporose (Typ II) spricht man von einer primären Osteoporose. Wird der Knochenmasseverlust hingegen durch Medikamente (z.B. Aromataseinhibitoren, Glucocorticoide, Protonenpumpeninhibitoren) oder durch eine andere Grunderkrankung (z.B. Diabetes mellitus, Hyperparathyreoidismus) ausgelöst, spricht man von einer sekundären Osteoporose.



Abbildung 1.6: Osteoporotische Veränderungen am trabekulären und kortikalem Knochen. Trabekulär: Dargestellt ist die µCT-3D-Rekonstruktion eines lumbalen Wirbelkörpers einer jungen, gesunden und einer Frau mit postmenopausaler Osteoporose. Bei postmenopausaler Osteoporose ist die Trabekelanzahl und -dicke verringert, wobei vor allem die horizontal ausgerichteten Trabekel verloren gehen. Kortikal: Schematische Darstellung des kortikalen Wachstums während der Pubertät und des Verlusts von Knochenmasse während der Menopause. Der Anteil des kortikalen Knochens am Gesamtknochen verändert sich bei der Frau während der Pubertät nicht, aber der Knochen wird größer. Während der Menopause wird endostal sehr viel Knochen abgebaut. Dies wird durch den leichten periostalen Anbau nicht ausgeglichen. (modifiziert nach Riggs 2002; republished with permission of ENDOCRINE SOCIETY, from Endocr Rev, 23, 2002; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.) Die postmenopausale Osteoporose wird durch das Absinken des Östrogenspiegels induziert. Fällt der Östrogenspiegel während der Menopause, kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Knochenresorption, verbunden mit einer moderaten, vorübergehenden Erhöhung der Knochenformation, so dass es zum Knochenmasseverlust kommt (Garnero et al. 1996, Hannon et al. 1998). Im trabekulären Knochen führt zunächst die erhöhte Resorptionstiefe zur Perforation der Trabekel und damit zu einer verminderten Konnektivität (Riggs, Khosla and Melton 2002), (Abbildung 1.6). Später kommt es durch die verminderte Formation zusätzlich zu einer Verdünnung der Trabekel. Die kortikale Dicke nimmt durch die erhöhte endostale Resorption ab (Riggs et al. 2002), (Abbildung 1.6). Dies kann auch durch die moderate Erhöhung des periostalen Zuwachses nicht ausgeglichen werden. Intrakortikal führt die verstärkte BMU-Aktivität zu einer erhöhten Porosität. Im Markraum kommt es mit zunehmendem Alter und bei Osteoporose durch die vermehrte Differenzierung der MSCs in die adipogene statt in die osteogene Richtung zur Anreicherung von Fettgewebe (Duque 2007, Justesen et al. 2001), (Abbildung 1.7).



Abbildung 1.7: Vergleich des Knochenmarks von jungen Ratten mit dem von alten Ratten. 24 Monate alte Ratte hat deutlich mehr Fettgewebe und dünnere Trabekel im Markraum (B) als 4 Monate alte Ratte (A). (Duque 2007; republished with permission of International Bone and Mineral Society, from BoneKEy-Osteovision, 4, 2007; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.)

Diesen strukturellen Veränderungen des Knochens liegt eine Vielzahl an regulatorischen Veränderungen in den Knochenzellen zugrunde. Durch Östrogenmangel wird die Apoptoserate der Osteozyten erhöht, wodurch die Osteoklastenaktivität erhöht (Emerton et al. 2010, Tomkinson et al. 1998, Tomkinson et al. 1997) und die Mechanosensitivität vermindert wird (Bonewald 2011). Wie die Osteoklastenaktivität durch die Osteozytenapoptose erhöht wird ist noch weitgehend unerforscht. Eine diskutierte Möglichkeit ist, dass apoptotische Osteozyten die Osteoklasten durch die Ausschüttung proresorptiver Signalmoleküle aktivieren (Tatsumi et al. 2007, Verborgt et al. 2002). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die sterbenden Osteozyten ihre inhibierende Wirkung auf die Osteoklasten verlieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Apoptose der Osteozyten die Osteoblastenaktivität vermindert und die adipogene Differenzierung von MSCs im Markraum begünstigt wird (Tatsumi et al. 2007).

Unter Östrogenmangel ist die Osteoklastenbildung, -aktivität und -lebensdauer erhöht. Die osteoklastenspezifische Deletion von ERα zeigte, dass Osteoklasten ein direktes Ziel von Östrogen sind. Unter Östrogenmangel ist die Apoptose vermindert (Martin-Millan et al. 2010, Nakamura et al. 2007) und die Rankl-induzierte Differenzierung erhöht (Shevde et al. 2000). Zudem schütten Osteoblasten, T- und B-Zellen unter Östrogenmangel vermehrt Rankl aus und begünstigen so die Osteoklastogenese (Eghbali-Fatourechi et al. 2003).

Die Knochenformation ist bei Östrogenmangel zunächst leicht erhöht. Zur Erhöhung der Knochenformation kommt es durch eine erhöhte Proliferation der mesenchymalen Osteoprogenitoren, die dann zu Osteoblasten differenzieren können (Jilka et al. 1998). Dennoch reicht die mineralisierende Aktivität der Osteoblasten unter Östrogenmangel nicht aus, um die durch die Osteoklasten resorbierte Fläche wieder aufzufüllen. Ein Grund hierfür könnte die erhöhte Apoptoserate der Osteoblasten unter Östrogenmangel sein (Kousteni et al. 2001). Außerdem führt Östrogenmangel zu oxidativem Stress, welcher die Osteoblastogenese hemmt und die Lebensdauer von Osteoblasten verkürzt (Almeida et al. 2007, Manolagas and Almeida 2007). Eine dritte Möglichkeit könnte die unter Östrogenmangel vermehrte Freisetzung von NF-κB und Sklerostin sein, die beide die Knochenformation hemmen (Chang et al. 2009, Modder et al. 2011, Sapir-Koren and Livshits 2013). Schließlich konnte gezeigt werden, dass bei Östrogenmangel im Markraum verstärkt Adipogenese stattfindet und diese invers mit dem abnehmenden trabekulären Volumen korreliert (Duque 2007, Justesen et al. 2001, Martin and Zissimos 1991).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Osteoporose ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei deren Entstehung das Fehlen mechanischer Reize oder Veränderungen im Hormonhaushalt beteiligt sind. Das Fehlen mechanischer Reize, wie zum Beispiel bei Immobilisierung und Schwerelosigkeit, vermindert die Knochenformation und erhöht die Knochenresorption (Takata 2001). Grund hierfür ist eine erhöhte Apoptoserate der Osteozyten (Aguirre 2006), welche die Osteoklastenaktivität erhöht und Osteoblastenaktivität vermindert (Aguirre 2006, Tatsumi 2007). Veränderungen im Hormonhaushalt, wie das Absinken des Östrogen-

spiegels während der Menopause, führen ebenfalls zur Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Knochenformation und -resorption zu Gunsten der Resorption.

Die zellulären Mechanismen, die diesen Veränderungen der Überlebensrate und Aktivität der Knochenzellen zugrundeliegen, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der ER- und der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg an der mechanischen und hormonellen Regulation der Überlebensrate und Aktivität der Knochenzellen beteiligt sind (Fitzpatrick 2006, Galea et al. 2013, Lau et al. 2006, Lee et al. 2004). Die Inhibierung dieser beiden Signaltransduktionswege führt zu einer verminderten Mechanosensitivität und einer verminderten Knochenmasse (Gong et al. 2001, Lee et al. 2004, Sawakami et al. 2006). Ein Mangel an mechanischer Belastung oder Östrogen führt zur Herunterregulation dieser beiden Signaltransduktionswege (Bord et al. 2003, Herrmann et al. 2002, Modder et al. 2011, Robling et al. 2008). Auf der anderen Seite führt die Aktivierung dieser beiden Signaltransduktionswege zu einer erhöhten Mechanosensitivität und einer erhöhten Knochenmasse (Robinson et al. 2006, Windahl et al. 2013). Desweiteren gaben in vitro-Studien und die Mausexperimente von Armstrong et al. erste Hinweise darauf, dass der ER- und der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg interagieren (Armstrong et al. 2007, Liedert et al. 2010, Sunters et al. 2010).

In der vorliegenden Studie sollte erstmals *in vivo* der Einfluss der Aktivierung des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanische Regulation der Knochenmasse untersucht werden. Mögliche zugrundeliegende, zelluläre Mechanismen sollten *in vitro* aufgedeckt werden. Hierfür wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Welchen Einfluss haben Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation durch axiale Belastung der Ulna im Mausmodell?
- 2. Wie wird die mechanisch induzierte, osteogene Antwort in osteoblastären Zellen durch Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs beeinflusst?
- 3. Welchen Einfluss hat die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch regulierte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen?

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

Für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurden weibliche CD1 Mäuse von The Jackson Laboratories (Maine, USA) käuflich erworben. Das mittlere Körpergewicht betrug 26,8 g ± 2,9 g. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 4 Tieren pro Käfig bei einem 14 h Licht/ 10 h Dunkelheit Zyklus gehalten und erhielten bis zum Alter von 10 Wochen eine Standard-Nager-Diät. Danach wurde die Diät auf ein phytoöstrogenarmes Futter (R/M-H phytoöstrogenarm, V1554, ssniff) umgestellt. Alle Tierversuche wurden gemäß der nationalen und internationalen Bestimmungen zum Umgang mit Labortieren durchgeführt und wurden vom Regierungspräsidium Tübingen (Reg. Nr. 1019) genehmigt.

2.1.2 Zellen

2.1.2.1 MC3T3-E1 Zellen

Zellen der Linie MC3T3-E1 wurden ursprünglich aus den Kalvarien neugeborener Mäuse isoliert (Kodama 1981). Hierbei handelt es sich um eine osteogene Zelllinie, die *in vitro* zu Osteoblasten differenzieren kann, die zur Mineralisierung fähig sind.

2.1.2.2 C3H10T1/2 Zellen

Diese Zelllinie wurde aus 14 bis 17 Tage alten C3H-Mausembryonen generiert (Reznikoff, Brankow and Heidelberger 1973). Sie weisen eine fibroblastäre Morphologie auf und sind mesenchymalen Stammzellen funktional ähnlich. Diese Zellen werden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) kommerziell vertrieben.

2.1.2.3 Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm Top10 One Shot Chemical Competent *E.coli* von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie

α-MEM F0995
α-MEM 41061, phenolrotfrei
β-Glycerophosphat (Dinatriumsalz)
2-Mercaptoethanol
17-β-Estradiol

17-β-Estradiol Pellet, 60-Day Release,0,18 mg17-β-Estradiol Placebo Pellet

Agarose Albumin Fraction V (BSA) Aluminiumoxid 60 Ammoniumpersulfat (APS) Ampicillin Ascorbat-2-Phosphat (Sesquimagnesium Salz) Basenpaarleiter (100 bp) BenchMark prestained Protein Ladder Benzoylperoxid Bromphenolblau CL-XPosure Film Clindamycin-Injektionslösung

Dimethyl-p-Toluidin DMSO DSP DTT EDTA Essigsäure 100% (v/v) Ethanol absolut Ethanol vergällt

Hersteller

Biochrom, Berlin, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Fluka, Buchs, Schweiz Calbiochem, Darmstadt, Deutschland Innovative Research of America, Sarasota, USA Innovative Research of America. Sarasota, USA Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Serva, Heidelberg, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Thermo Scientific, Rockford, USA Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland

Serva, Heidelberg, Deutschland Thermo Scientific, Rockford, USA Roth, Karlsruhe, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Ethidiumbromid FCS A15-101

FCS A15-119 (aktivkohlebehandelt) Forene 100% (v/v), Wirkstoff: Isofluoran (1-Chloro-2,2,2-Trifluoroethyldifluoromethylether) FREKA Derm

4% Formalin, phosphatgepuffert Glycerin Glycin

100x Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail HyperLadder I (1.000 bp) Immunocal Isopropanol Isotone NaCI-Lösung 0,9%

Kollagen, Typ I, aus Rattenschwanz L-Glutamin Ladepuffer (6 x) Luria Broth Base Methanol Methylmethacrylat Natriumchlorid (NaCl) Natriumphosphat Nonylphenyl-Polyethylenglycol-Acetat Octenisept

Ölrot-O Ovalbumin Serva, Heidelberg, Deutschland PAA Laboratories, Pasching, Österreich PAA Laboratories, Pasching, Österreich Abbott, Baar, Schweiz

Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland Thermo Scientific, Rockford, USA

Bioline, Luckenwalde, Deutschland Decal Chemical Corp., NY, USA Merck, Darmstadt, Deutschland B. Braun Melsung AG, Melsung, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Biochrom, Berlin, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Thermo Scientific, Rockford, USA

Material & Methoden Paraformaldehyd, 16% w/v aq. soln., Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland methanol free PBS PAA Laboratories, Pasching, Österreich Penecillin/Streptomycin (P/S) Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland Protein-A-Sepharose Sigma, Deisenhofen, Deutschland Protran Nitrocellulose Transfer Membran Whatman, Dassel, Deutschland **RIPA-Puffer** Thermo Scientific, Rockford, USA RNasin Ribunuclease Inhibitor Promega, Mannheim, Deutschland **RLT-Puffer** Qiagen, Hilden, Deutschland Röntgen-Entwickler-Konzentrat Adefo, Dietzenbach, Deutschland Röntgen-Fixier-Konzentrat Adefo, Dietzenbach, Deutschland Rotiphorese Gel 30 Roth, Karlsruhe, Deutschland SB415286 Tocris Bioscience, Bristol, England SDS Fluka, Buchs, Schweiz Select Agar Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland TEMED Upstate, Karlsruhe, Deutschland Tramal Grünenthal GmbH, Aachen Tris Merck, Darmstadt, Deutschland Tris/HCI Roth, Karlsruhe, Deutschland Trypanblau-Lösung (0,4%) Sigma, Deisenhofen, Deutschland Trypsin/EDTA (10x) Biochrom, Berlin, Deutschland 0,05%/0,02% (w/v) Tween 20 Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland Wnt3a, recombinant mouse R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/Lösung

APS-Lösung

Anodenpuffer

Reagenzien 10% (w/v) in A. dest.

25 mM Tris 192 mM Glycin, pH 8,3 20% Methanol (v/v)

	Material & Methoden
Antikörperverdünnungspuffer	8 ml 10x TBS-Puffer
	1% BSA (w/v)
	0,1% Tween-20 (v/v)
	72 ml A. dest.
Crosslinker-Lösung	250 mM DSP in trockenem DMSO
Kathodenpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin, pH 8,3
	0,1% SDS (w/v)
Lysepuffer (Coimmunpräzipitation)	20 mM Tris/HCI pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 μl/ml 100x Halt Protease & Phos-
	phatase Single-Use Inhibitor Cocktail
Lysepuffer (mRNA-Extraktion)	RLT-Puffer
	1% 2-Mercaptoethanol (v/v)
Nachsättigungslösung	15 ml 10x TBS-Puffer
	3% BSA (w/v)
	0,1% Tween-20 (v/v)
	135 ml A. dest.
Ölrot-O-Färbelösung	0,25 g Ölrot-O
	50 ml Isopropanol
	33 ml A. dest.
PTO-Puffer	20 mM Natriumphosphat pH 7,2
	0,5% Tween 20
	0,1% Ovalbumin
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCI, pH 6,8

SDS-Lösung	20% SDS (w/v) in A. dest.
1x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8 8.5% Glycerin
	1% SDS
6x SDS-Probenpuffer mit/ohne DTT	187 mM Tris/HCl, pH 6,8 30% Glycerin
	6% SDS
	(150 mM DTT)
6x SDS/DTT-Probenpuffer	187 mM Tris/HCl, pH 6,8 30% (v/v) Glycerin
	6% SDS (w/v)
	10 mM DTT
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	62 ml A. dest.
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
10x TBS-Puffer	200 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1,5 M NaCl
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Waschpuffer	50 ml 10x TBS-Puffer
	0,5 ml Tween-20
	450 ml A. dest.

2.1.5 Kits

Kit

Allprep DNA/RNA/Protein Mini Kit BCA Protein Assay Kit

Dual Luciferase Reporter Assay System Estradiol ELISA Fugene HD Transfection Reagent Imprint DNA Modification Kit HotStarTaq Mastermix Kit **NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents** NucleoBond Mini Kit Omniscript RT Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG RNase Free DNase Set RNeasy Mini Kit mit QiaShredder SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat System **TOPO TA Cloning Kit**

Hersteller

Qiagen, Hilden, Deutschland Perbio Science, Pierce, Bonn, Deutschland Promega, Mannheim, Deutschland Calbiotech, Spring Valley, USA Promega, Mannheim, Deutschland Sigma, Deisenhofen, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Thermo Scientific, Rockford, USA

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Qiagen, Hilden, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Perbio Science, Pierce, Bonn, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Primer

2.1.6.1 Primer für die cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Random-Hexamer-Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) Oligo-dT-Primer (Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.6.2 Primer für die Real-Time PCR

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm, Deutschland) oder der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

 Tabelle 2.1.1: Für die Real-Time PCR verwendete Primer

Zielgen	Primersequenz
Cebpα	F 5' - CGT CTG CCT CCC AGA GGA CCA ATT A - 3' R 5' - CAC CCT TGG ACA ACT AGG GGA GAG G - 3'
c-Fos	F 5' - CCA GTC AAG AGC ATC AGC AA - 3' R 5' - ATG ATG CCG GAA ACA AGA AG - 3'
Cox-2	F 5' - AGG GGT GTC CCT TCA CTT CT - 3' R 5' - CAT TGA TGG TGG CTG TTT TG - 3'
Cyr61	F 5' - TCC TCT GTG TCC CCA AGA AC - 3' R 5' - CAA ACC CAC TCT TCA CAG CA - 3'
Gapdh	F 5' - ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG - 3' R 5' - GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT - 3'
Fzd2	F 5' - CCG TCT CTG GAT CCT CAC AT - 3' R 5' - TAG CAG CCG GAC AGA AAG AT - 3'
Pparγ	F 5' - CGT GAA GCC CAT CGA GGA CAT CC - 3' R 5' - GGG TGG TTC AGC TTG AGC TGC AG - 3'
Ror2	F 5' - GCC ACT TCG TCT TCC CTC TG - 3' R 5' - AGC ACC TCA CAT TCA TCC CG - 3'
Runx2	F 5' - CCA CCA CTC ACT ACC ACA CG - 3' R 5' - CAC TCT GGC TTT GGG AAG AG - 3'
Setdb1	F 5' - CAG GCA CTA GGG TCG GTA GA - 3' R 5' - AGG ACC CAG GCT GAT GCT A - 3'
Wnt5a	F 5' - ACA ATA CTT CTG TCT TTG GCA GG - 3' R 5' - GGC GTT CAC CAC CCC AG - 3'
Wnt10b	F 5' - CCA GCC GCC TCT TGG ATG GC - 3' R 5' - CGT CTG CCG GAG CAC GTT GT - 3'

2.1.6.3 Primer für MSP und BSP

Mit der MSP und BSP sollte die DNA-Methylierung im Pparγ-Promotor untersucht werden. Hierfür wurde die NCBI-Referenzsequenz NT_039353.8 verwendet und daraus im speziellen die CpG-Insel in dem Bereich 84.557.287 - 84.559.390. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Zielsequenz	Primername	Primersequenz
84.558.351-	MF	F 5' - AGA AGA GAT TTG GGG CGT TGC - 3'
84.558.428	MR	R 5' - GAT CAC CTT ATC GTC ACA CTC GAT C - 3'
84.558.350-	UF	F 5' - AAG AAG AGA TTT GGG GTG TTG TGT T - 3'
84.558.431	UR	R 5' - CCC AAT CAC CTT ATC ATC ACA CTC A - 3'
84.557.968- 84.558.656	BSP F BSP R	F 5' - TTA TGA TAG ATA TGG ATA TGG ATA T - 3' R 5' - CTA TCA AAA TAT AAC TTC TCA TCC C - 3'

Tabelle 2.1.2: Für die MSP und BSP verwendete Primer

2.1.7 Antikörper

I abelle Z.I.J. Fillinalantikulper	Tabelle	2.1.3:	Primärantikörper
---	---------	--------	------------------

Antikörper	Hersteller	Wirt	Protein- größe	Verdün- nungsfaktor
anti-aktiv-β-Catenin	Millipore	Kaninchen	92 kDa	1:1000
anti- β-Catenin	Millipore	Kaninchen	92 kDa	1:1000
anti-Cebpα	Cell Signaling	Kaninchen	28/42 kDa	1:1500
anti-Cox-2	Diagnostic Bio- systems	Kaninchen	70 kDa	1:1000
anti-Cyr61	R&D Systems	Schaf	42 kDa	1:2000
anti-Gapdh	Cell Signaling	Kaninchen	37 kDa	1:1000
anti-ERα	Abcam	Schaf	66 kDa	1:500
anti-phospho-Gsk-3β	Cell Signaling	Kaninchen	46 kDa	1:1000
anti-Pparγ	Abcam	Kaninchen	58 kDa	1:400
anti-Runx2	Cell Signaling	Kaninchen	55/62 kDa	1:1000

ər

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnungsfaktor
anti-Kaninchen-IgG- HRP	Abcam	Ziege	1:5000
anti-Schaf-IgG-HRP	Cell Signaling	Kaninchen	1:5000

2.1.8 Vektoren

Vektor

pCR4-TOPO pRL-SV40 Topflash

2.1.9 Zellkulturmedien

Expansionsmedium

Hersteller

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Promega, Mannheim, Deutschland Upstate, Hamburg, Deutschland

α-MEM 10% FCS PAA 100 μg/ml P/S 2 mM L-Glutamin

50 µM Indomethacin

Für die Kultivierung der C3H10T1/2-Zellen wurde das FCS 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Osteogenes	α-MEM, phenolrotfrei	
Differenzierungsmedium	10% FCS PAA, aktivkohlebehande	
	100 µg/ml P/S	
	0,2 mM Ascorbat	
	10 mM β-Glycerophosphat	
Adipogenes	α-MEM, phenolrotfrei	
Differenzierungsmedium	10% FCS PAA, hitzeinaktiviert	
	100 µg/ml P/S	
	0,1 µM Dexamethason	
	5 µg/ml Insulin	

2.1.10 Geräte

Neben der Standardausrüstung eines molekularbiologischen und eines Zellkulturlabors sowie eines Tieroperationssaals und eines Histologielabors wurden für die Zell- und Tierexperimente zusätzlich folgende Geräte eingesetzt:

Gerät **Biometra Thermocycler** Centro LB 960 Microplate Luminometer Dehnmessstreifen Geldokumentationsgerät Fusion SL Gelelektrophoresekammer Horizon 11-14 Heizblock Thermomixer 5436 Kühlzentrifuge 5417R Mikro-CT 1172 Mikroskop IX70 Mikroskop Leica DMI6000 B Polarisation Mikrotiterplatten-Reader Infinite 200 PRO mit NanoQuant Platte Real Time PCR-Gerät StepOnePlus SDS-PAGE-Kammer Mini-Protean 3 Cell Transferkammer Semi-Dry Blotting Unit V20-SDB (700-7156) Ulna-Stimulationsgerät Vollautomatisches Rotationsmikrotom

Cut 6062 Wärmeschüttler SM-30

Zellstimulationsgeräte Zentrifuge Labofuge 400R

Hersteller Göttingen, Deutschland Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland HBM, Darmstadt, Deutschland Vilber Lourmat Deutschland GmbH Eberhardzell, Deutschland Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Skyscan, Kontich, Belgien Olympus, Hamburg, Deutschland Leica, Wetzlar, Deutschland Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Bio-Rad, München, Deutschland VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland Eigenbau, Ulm, Deutschland SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland EB Labortechnik, Hechingen, Deutschland Eigenbau, Ulm, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland

Ulna-Stimulationsgerät

Dieses Ulna-Stimulationsgerät (Abbildung 2.1.1) wurde in unserer Arbeitsgruppe in Anlehnung an die Arbeit von Lee, M. et al., 2002 entwickelt, um die lokale mechanische Induktion der Knochenformation in der Maus-Ulna untersuchen zu können (Lee, Maxwell and Lanyon 2002). Hierbei handelt es sich um ein nichtinvasives System, bei dem das gebeugte Carpalgelenk dem gebeugten Ellenbo-
gen gegenüberliegend positioniert und eine definierte axiale Kompression über den Carpus auf die Ulna übertragen wird (Abbildung 2.1.1). Die Belastungsverteilung in der Ulna entspricht annähernd einer bei normaler Bewegung erzeugten Belastungsverteilung.



Abbildung 2.1.1: Ulna-Stimulationsgerät. Links: Schematische Darstellung der nicht invasiven, axialen Belastung der Ulna. Das Handgelenk wird dem Ellenbogengelenk gegenüber positioniert. Der auf das Handgelenk aufgebrachte Druck führt zur Biegung der Ulna aufgrund ihrer natürlichen Krümmung (Sawakami et al. 2006). Rechts: Foto von Herbert Schmitt, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm.

Zellstimulationsgerät

Dieses Gerät wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe entwickelt (Neidlinger-Wilke, Wilke and Claes 1994). Es ermöglicht die zyklische uniaxiale Dehnung von Zellen im zweidimensionalen System mit unterschiedlichen Frequenzen und Dehnungsamplituden (Abbildung 2.1.2). Hierfür wurden Silikonschalen (Abbildung 2.1.3), die mit Kollagen Typ I beschichtet und mit einer Zell-Monolayer besiedelt wurden, in das Gerät eingespannt und entlang ihrer Längsachse gedehnt. Die gewünschte Dehnungsamplitude wird durch den entsprechenden Exzenter erzeugt. Die Dehnungsfrequenz entspricht der Rotationsgeschwindigkeit des Exzenters und wird am Motor eingestellt.



Abbildung 2.1.2: Zellstimulationsgerät zur zyklischen uniaxialen Dehnung von Zellen (Foto von Herbert Schmitt, Zeichnung von Patrizia Horny, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)



Abbildung 2.1.3: Silikonschale für zweidimensionale Monolayerkultur (Foto von Herbert Schmitt, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

2.1.11 Software

Software

CT Analyzer Dataviewer Fusion Software

i-control Microplate Reader Software ImageJ Leica Metamorph Software Magellan Data Analysis Software Mikrowin Software

NRecon StepOne Software

Anbieter

Skyscan, Kontich, Belgien Skyscan, Kontich, Belgien Vilber Lourmat Deutschland GmbH Eberhardzell, Deutschland Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich plattformunabhängig Leica, Wetzlar, Deutschland Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland Skyscan, Kontich, Belgien Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Ex vivo-Kalibrierung des Ulna-Stimulationsgeräts

Das Ulna-Stimulationsgerät wurde mit der jeweils rechten Ulna von vier 16 Wochen alten, weiblichen CD1-Mäusen kalibriert. Der Dehnmessstreifen wurde auf die mediale Seite, in der Mitte der Ulna geklebt. Die Ulna wurde in das Ulna-Stimulationsgerät eingespannt und mit verschiedenen Gewichten belastet. Die durch die Gewichte erzeugten Verformungen (*strain*) in der Ulnamitte wurden detektiert, wobei eine Kompression negative und eine Dehnung positive Werte in µstrain ergab. Anhand der Daten wurde eine Kalibriergerade generiert (Abbildung 2.2.1). Diese ergab, dass eine Belastung mit 250 g (2,5 N) Kompressionen von -2.000 bis -3.000 µm/m erzeugte. Dies entsprach Kompressionen, die durch physiologische Belastungen erzeugt werden (Rubin and Lanyon 1985).



Abbildung 2.2.1: Kalibrierungsgerade zur Ermittlung der Verformung der Ulna in µstrain bei Belastung mit einem definierten Gewicht in g.

2.2.2 Bilaterale Ovarektomie und Bestimmung des Östrogenspiegels im Blut mittels ELISA

Durch die Entfernung beider Ovarien (OVX) im Alter von 12 Wochen wurde ein Östrogenmangel in den Mäusen erzeugt. Eine Versuchstiergruppe mit scheinovarektomierten Mäusen (*Sham*) wurde mitgeführt. Es wurde eine Inhalationsnarkose mit 2% Forene (Isofluoran) verwendet. Während der gesamten Narkose wurden die Mäuse durch eine Wärmeplatte vor Unterkühlung geschützt. Die Operation wurde unter sterilen Operationsbedingungen durchgeführt. Es wurde der dorsale Zugang für die Ovarektomie mit bilateraler Verlagerung des Hautschnitts gewählt. Die Analgesie erfolgte mit 25 mg/l Tramal über das Trinkwasser. Als Antibiotikum wurden 45 µg/g KG Clindamycin subkutan appliziert. Außerdem erhielt jede Maus vor der Operation zur Flüssigkeitssubstitution 500 µl 0,9% NaCl-Lösung und die Augen wurden durch Aufbringen einer Augensalbe vor Austrocknung geschützt.

Das Absinken des Östrogenspiegels wurde mit einem kompetitiven Estradiol-ELISA nachgewiesen. Hierfür wurde den Mäusen Blut über die Schwanzvene entnommen. Aus diesem Blut wurde das Serum gewonnen, indem die Proben nach einstündiger Gerinnung bei Raumtemperatur für 10 min bei 2.800 upm zentrifugiert wurden. Bis zur Messung wurden die Serumproben bei -20°C gelagert. Der Estradiol-ELISA basierte auf dem Prinzip eines kompetitiven ELISAs, bei dem das Estradiol in der Probe mit einer definierten Menge an HRP-gekoppeltem Estradiol um die Bindung an den oberflächengebundenen Estradiol-Antikörper konkurriert. Mit steigender Estradiolkonzentration in der Probe nimmt die Bindung des HRPgekoppelten Estradiols an den Antikörper ab. Es folgte die Zugabe der TMB (Tetramethylbenzidin)-Lösung, die der HRP das Substrat für die Farbreaktion lieferte. Nach dem Abbruch der Farbreaktion mit einer Stopplösung wurde die Absorption im Tecan Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm gemessen und mit der Magellan-Software ausgewertet. Die Quantifizierung der Estradiolkonzentration in der Probe erfolgte mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe (0, 10, 30, 100, 300, 1000 pg/ml).

2.2.3 Mechanische Stimulation der Ulna

Mit Hilfe des Ulna-Stimulationsgerätes wurde die Knochenformation in der rechten Ulna der Maus mechanisch stimuliert. Die linke Ulna diente als kontralaterale Kontrolle. Hierbei handelte es sich um ein nicht-invasives Belastungsmodell, bei dem eine definierte Last über das dem Ellenbogen gegenüber positionierte Karpalgelenk appliziert wurde. Dadurch wurde eine Biegung der Ulna entlang ihrer natürlichen Krümmung induziert. Die mechanische Stimulation erfolgte unter Inhalationsnarkose mit circa 2% Forene. Eine Analgesie war nicht nötig, da die Belastung im physiologischen Bereich lag. Die rechte Ulna wurde über einen Zeitraum von 2

33

Wochen an jeweils 5 aufeinanderfolgenden Tagen, mit einer Kraft von 2,5 N und einer Frequenz von 2 Hz für 1 min täglich belastet, wobei mit der Belastung 4 Wochen nach der Ovarektomie begonnen wurde (Abbildung 2.2.2). Mit einer Kraft von 2,5 N wurde die mediale Seite der Ulnamitte um -2.000 µstrain bis -3.000 µstrain komprimiert. Die Mäuse wurden 24 h nach der letzten Stimulation getötet.



Abbildung 2.2.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. OVX: Ovarektomie, E2: 17β-Estradiol-Pellet, i.p.: intraperitonal, s.c.: subkutan

2.2.4 Chemische Behandlung der Mäuse

Neben der mechanischen Induktion der Knochenformation wurden zusätzlich der Wnt/ β -Catenin- und der ER-Signaltransduktionsweg aktiviert (Abbildung 2.2.2). Zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs wurde den Mäusen während des gesamten Versuchszeitraumes der mechanischen Stimulation täglich 1 µg/g KG SB415286 subkutan injiziert (Robinson et al. 2006, Thotala, Hallahan and Yazlovitskaya 2008, Whittle et al. 2006). Zur Aktivierung des ER-Signaltransduktionswegs wurde den Mäusen 2 Tage vor der ersten mechanischen Belastung ein 17- β -Estradiol Pellet (0,18 mg 17- β -Estradiol, 60-tägige Freiset-zung) in die Nackenregion implantiert (Beil 2010). Es wurden entsprechende Versuchstiergruppen mitgeführt, in denen die Vehikellösung injiziert bzw. ein Placebo Pellet implantiert wurden.

2.2.5 Histomorphometrie

Anhand der Einlagerung von 2 Fluoreszenzfarbstoffen in die Knochenmatrix während der Mineralisation in einem definierten zeitlichen Intervall kann der Knochenzuwachs quantifiziert werden. Hierfür wurde jeder Maus an Tag 3 während des Zeitraums der mechanischen Stimulation 0,03 mg/g KG Calceingrün und an Tag 11 0,05 mg/g KG Alizarinrot intraperitoneal injiziert (Abbildung 2.2.2). Das Weichgewebe der rechten und linken Ulna (15 mm \pm 0,0 mm mittlere Knochenlänge) jeder Maus wurde entfernt. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind lichtlabil. Deshalb wurden

alle folgenden Inkubationsschritte und die Lagerung der Knochen im Dunkeln durchgeführt. Die Ulnae wurden in 4% Paraformaldehyd 24 h, bei 4°C fixiert, in Ethanol dehydriert und in Methylmethacrylat infiltriert (100 ml mit Aluminiumoxid entstabilisiertes Methylmethacrylat + 0,33 g Benzoylperoxid + 10 ml Nonylphenyl-Polyethylenglycol-Acetat) und eingebettet (100 ml mit Aluminiumoxid entstabilisiertes Methylmethacrylat + 0,66 g Benzoylperoxid + 10 ml Nonylphenyl-Polyethylenglycol-Acetat + 0,5 ml Dimethyl-p-Toluidin). Es wurden 10 µm dicke Querschnitte der unentkalkten Ulnae senkrecht zur Längsachse und 2 mm distal von der Knochenmitte (Abbildung 2.2.3), der Region des größten Knochenzuwachses, geschnitten. Die angefertigten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Leica DMI6000 B Polarisation angeschaut und fotografiert. Hierfür wurde ein Doppelfilter für Grün/Rot-Fluoreszenz und die Leica-Metamorph-Software verwendet. Diese Software wurde ebenfalls für die histomorphometrische Analyse verwendet. Die Knochenoberfläche (BS), die Einzel- (sLS/BS) und Doppel- (dLS/BS) Fluoreszenzbanden und der Fluoreszenzbandenabstand zwischen den Mittelpunkten zweier zusammengehörender Fluoreszenzbanden (Ir.L.Th) wurden gemessen. Zur Messung der Doppel-Fluoreszenzbande wurde nur die Länge der Alizarinrotbande berücksichtigt. Der Zeitraum zwischen der Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe (Ir.L.t) betrug 8 Tage. Aus diesen Parametern konnte die mineralisierte Oberfläche (MS = dLS/BS + ¹/₂ sLS/BS), die Mineralisierungsrate (MAR = Ir.L.Th/Ir.L.t) und schließlich die endostale (ec) und periostale (ps) Knochenformationsrate (BFR = MAR x MS/BS) berechnet werden. Alle gemessenen und berechneten Parameter wurden gemäß der Standardnomenklatur nach Parfitt bezeichnet (Parfitt et al. 1987).

2.2.6 Knochenanalyse im Mikro-CT

Zur Untersuchung der Knochenstruktur wurden im Skyscan 1172-Mikro-CT 3D-Knochenrekonstruktionen erstellt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Knochen zunächst schichtweise mit einer Auflösung von 8 µm eingescannt und anschließend wurden die so erhaltenen 2D-Bilder zu einem 3D-Datensatz mit der Software NRecon rekonstruiert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Ovarektomie auf die trabekuläre Knochenstruktur wurde im Femurkopf in einem zylindrischen ROI (0,5 x 0,5 mm) die Knochenmineraldichte (BMD = *bone mineral density*), das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV), die Trabekeldicke (Tb.Th), die Trabekelan-

35

zahl (Tb.N) und der Trabekelabstand (Tb.Sp) mit der Software CT Analyzer bestimmt. Der Einfluss der Ovarektomie auf die kortikale Knochenstruktur wurde in der Ulnamitte in einem zylindrischen ROI (1 x 1 mm) anhand von BMD und Ct.Th (kortikale Dicke) untersucht. Zur Untersuchung der Einflüsse von Ovarektomie und Östrogen auf den trabekulären Knochen wurden im trabekulären Bereich des fünften lumbalen Wirbelkörpers (L5) der Knochenvolumenanteil am Gesamtvolumen (BV/TV), die trabekuläre Dicke (Tb.Th), die Trabekelanzahl (Tb.N) und der Abstand zwischen den Trabekeln (Tb.Sp) bestimmt. Zur Differenzierung des mineralisierten Knochens vom restlichen Gewebe wurde der Grenzwert nach Otzu bestimmt (Otsu 1979).

Zur Untersuchung des Einflusses von Ovarektomie, Östrogen, Wnt/β-Catenin-Aktivierung und mechanischer Belastung auf die Struktur des kortikalen Knochens in der Ulna wurden in der Region 2 mm distal von der Knochenmitte, die 160 µm (20 Querschnitte) umfasste, die Markraumfläche (Ma.Ar) und kortikale Dicke (Ct.Th) mit der Software CT Analyzer bestimmt (Abbildung 2.2.3). Diese Region 2 mm distal von der Knochenmitte wurde für die Auswertung ausgewählt, weil hier der größte mechanisch induzierte Knochenzuwachs beobachtet wurde. Alle gemessenen und berechneten Parameter wurden gemäß der Standardnomenklatur nach Parfitt bezeichnet (Parfitt et al. 1987).



Abbildung 2.2.3: 3D-Rekonstruktion einer rechten Ulna. Die Ulnae waren 15 mm \pm 0,0 mm lang. Zur histomorphometrischen und Mikro-CT-Auswertung wurde der Bereich 2 mm distal von der Knochenmitte (ROI = *region of interest*) gewählt.

2.2.7 Zellkultur

Die in Kapitel 2.1.2 aufgeführten Zellen wurden in Expansionsmedium bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde zweimal wöchentlich durchgeführt. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet.

2.2.8 Zellquantifizierung in einer Zellsuspension

Vor jeder Aussaat muss die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Durch Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension können lebende von toten Zellen unterschieden werden, weil der Farbstoff nur durch die defekte Membran von toten Zellen eindringen kann und diese so blau anfärbt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit der Trypanblau-Lösung verdünnt und die nicht blauen Zellen anschließend sofort in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop IX70 ausgezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen in der Zellsuspension wurde mit folgender Formel berechnet:

Anzahl gezählter Zellen / 4 (Anzahl der ausgezählten Quadrate) x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 (Kammerfaktor) x Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml x ml⁻¹.

2.2.9 Aussaat der Zellen in Silikonschalen

Vor der Aussaat wurden die Silikonschalen zunächst mit 5 µg/cm² Kollagen Typ I beschichtet und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte sofort die Zellaussaat. Hierfür wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA aus der Zellkulturflasche gelöst, bei 1.200 upm für 6 min zentrifugiert, in 5 ml Expansionsmedium resuspendiert und bei einer 1:2 Verdünnung in Trypanblau-Lösung gezählt. Pro beschichtete Silikonschale wurden 200.000 Zellen ausgesät.

2.2.10 Zelldifferenzierung

2.2.10.1 Osteogene Differenzierung

Die MC3T3-E1-Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

2.2.10.2 Adipogene Differenzierung

Die C3H10T1/2-Zellen wurden nach einer zweitägigen Vorkultur in Expansionsmedium über einen Zeitraum von 5 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und 5 direkt vor der mechanischen Stimulation.

2.2.11 Chemische Stimulation der Zellen

2.2.11.1 Chemische Stimulation der MC3T3-E1-Zellen

Für die Coimmunpräzipitation und die Transfektionsexperimente wurden die Zellen 5 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. An Tag 5 wurden die Zellen vor der mechanischen Stimulation 3 h mit 10 nM 17- β -Estradiol, 3 nM Wnt3a bzw. 20 μ M SB415286 vorinkubiert (Coghlan et al. 2000, Liedert et al. 2010). Die Substanzen wurden direkt in das osteogene Differenzierungsmedium pipettiert. Es wurden Kontrollansätze mit den entsprechenden Vehikellösungen mitgeführt.

Für die Untersuchung der Expression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene wurden dem Medium während der 21-tägigen osteogenen Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen 10 nM 17- β -Estradiol bei jedem Mediumwechsel zugesetzt. Hierfür wurde für jede Behandlungsgruppe ein Mastermix aus osteogenem Differenzierungsmedium und 10 nM 17- β -Estradiol bzw. der entsprechenden Vehikellösung hergestellt. Zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs wurden die Zellen an Tag 21 der osteogenen Differenzierung mit dem Agonisten SB415286 (20 μ M) 3h vor der mechanischen Stimulation vorinkubiert. Der SB415286 wurde direkt in das osteogene Differenzierungsmedium pipettiert. Es wurden Kontrollansätze mit den entsprechenden Vehikellösungen mitgeführt.

2.2.11.2 Chemische Stimulation der C3H10T1/2-Zellen

Während der adipogenen Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen wurden dem Medium 20 µM SB415286 bei jedem Mediumwechsel zugesetzt. Hierfür wurde für jede Behandlungsgruppe ein Mastermix aus adipogenem Differenzierungsmedium und 20 µM SB415286 bzw. der entsprechenden Vehikellösung hergestellt.

2.2.12 Mechanische Stimulation der Zellen

2.2.12.1 Mechanische Stimulation der MC3T3-E1-Zellen

Die mechanische Stimulation der MC3T3-E1-Zellen erfolgte in dem in Kapitel 2.1.10 beschriebenen Zellstimulationsgerät an Tag 5 bzw. Tag 21 der osteogenen Differenzierung. 24 h vor der mechanischen Stimulation wurde das FCS entfernt und durch 0,25% (w/v) BSA ersetzt. Die zyklische uniaxiale Dehnung betrug 2% und wurde bei einer Frequenz von 1 Hz für 30 min für die Genexpressionsanalyse bzw. für 90 min für die Proteinexpressionsanalyse durchgeführt. Als Kontrolle dienten ungedehnte, in den Silikonschalen kultivierte Zellen. Der Versuchsabbruch erfolgte sofort nach der mechanischen Stimulation.

2.2.12.2 Mechanische Stimulation der C3H10T1/2-Zellen

Die C3H10T1/2-Zellen wurden während der fünftägigen Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium täglich für 30 min, mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dehnungsamplitude von 2% gedehnt. Als Kontrolle dienten ungedehnte, in den Silikonschalen kultivierte Zellen. Der Versuchsabbruch erfolgte sofort nach der letzten mechanischen Stimulation.

2.2.13 Transfektion von MC3T3-E1-Zellen mit dem Reportervektor Topflash

Unter Transfektion versteht man die Einbringung von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle. In der vorliegenden Studie wurde die Lipofektion angewendet, ein chemisches Verfahren, bei dem die in einem Plasmid enthaltende DNA mit Hilfe von Liposomen in die Zelle eingebracht wird. Ziel war es, die Aktivität der Wnt/β-Catenin-responsiven Tcf-Promotorbindungsstellen nach mechanischer Stimulation, nach Wnt/β-Catenin-Aktivierung und Behandlung mit Östrogen zu untersuchen. Hierfür wurde der Wnt/β-Catenin-Reporter Topflash, in dem die Tcf-Bindungstellen einem Luciferase-Reportergen vorgeschalten sind, mit Hilfe des Fugene-HD-Reagenzes in MC3T3-E1-Zellen eingebracht. Diese wurden anschließend stimuliert und schließlich wurde die Luciferaseaktivität mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System luminometrisch bestimmt.

2.2.13.1 Transfektion von MC3T3-E1-Zellen

Die Transfektion der MC3T3-E1-Zellen mit dem Fugene-HD-Reagenz erfolgte nach einer dreitägigen Kultur in Expansionsmedium nach Herstellerangaben. Die Transfektion wurde nach dem Schema in Tabelle 2.2.1 pipettiert.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Menge pro Reaktion
serumfreies Medium	100 µl	
Fugene HD Reagenz	7 µl	
Topflashvektor	variabel	1 µg
pRL-SV40-Kontrollvektor	variabel	0,1 µg

Tabelle 2.2.1: Pipettierschema der Transfektion

Die Transfektionsansätze wurden nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion für 3 h mit 3 nM des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators Wnt3a und 10 nM Östrogen behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 400 µl Reporter-Lysepuffer aufgenommen, in einem auf -80°C gekühlten Kühlblock kurz eingefroren und nach dem Auftauen für 2 min, bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Luciferaseaktivität verwendet.

2.2.13.2 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Proben wurden mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System nach Herstellerangaben aufgearbeitet und die Luciferaseaktivität im Centro LB 960 Microplate Luminometer bestimmt. Hierfür wurden 20 µl des Überstandes, der wie in Kapitel 2.2.13.1 beschrieben gewonnen worden war, in ein *Well* einer 96-*Well*-Microplatte pipettiert. Im Luminometer wurden das Dual Luciferase Reporter Assay Reagenz und die Stopplösung automatisch hinzugefügt und die Intensität der Lumineszenz bei der Substratumsetzung durch die Luziferase bestimmt. Die Topflash-Luziferaseaktivität wurde auf die pRL-SV40-Luciferaseaktivität normalisiert.

2.2.14 Genexpressions analyse

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse konnten nach chemischer bzw. mechanischer Stimulation von Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen differentiell exprimierte Gene erfasst werden. Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA mittels RT-PCR zu cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde schließlich in die *Real-Time* PCR eingesetzt, um die Expression von Zielgenen mittels spezifischer Primer und anhand des effizienz-korrigierten, relativen Quantifizierungsmodells (Pfaffl 2001, Ramakers et al. 2003) zu quantifizieren.

2.2.14.1 Gesamt-RNA-Isolation

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Zellen direkt nach dem Versuch einmal mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert. Die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit mit QiaShredder nach Herstellerangabe. Hierfür wurde zunächst das Lysat durch eine QiaShredder Säule homogenisiert. Anschließende Wurde die RNA durch Versetzen der Probe mit 70% EtOH und anschließende Zentrifugation durch die Silica Membran an diese gebunden. Nach mehreren Waschschritten und 15 min Inkubation mit der RNase Free DNase wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Quantität und Qualität der RNA wurde bei 260 nm/280 nm photometrisch am Tecan Mikrotiterplatten-Reader mit der i-control Microplate Reader Software bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.14.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese mit der aufgereinigten RNA als Matrize wurde mit dem Omniscript RT Kit durchgeführt. Hierbei bildete die Omniscript Reverse Transkriptase zunächst zum RNA-Strang den komplementären cDNA-Strang und degradierte anschließend spezifisch den RNA-Strang des RNA:DNA-Hybrids. Als Primer dienten der Random-Hexamer-Primer, der aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden besteht, und der Oligo-dT-Primer, dessen Sequenz komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen RNA ist. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Matrize wurde 1 µg RNA eingesetzt, die vor der cDNA-Synthese zunächst mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht und für 5 min bei 65°C denaturiert wurde. Die Ansätze für die cDNA-Synthese wurden nach dem Schema in Tabelle 2.2.2 pipettiert, sodass man einen Gesamtansatz von 20 µl erhielt. Der RNasin-Ribonuclease-Inhibitor wurde zuvor 1:4 mit 1x Reaktionspuffer von 40 U/µl auf 10 U/µl verdünnt.

Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Gerät Biometra Thermocycler zunächst bei 37°C für 60 min und anschließend bei 42°C für weitere 60 min.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration pro Reaktion
RNA	12 µl	1 µg
Reaktionspuffer	2 µl	10x
dNTP-Mix	2 µl	5 mM pro dNTP
RNasin Ribonuclease Inhibitor	1 µl	10 U/µl
Oligo-dT-Primer	1 µl	0,1 mM
Random-Hexamer-Primer	1 µl	1 mM
Omniscript	1 µl	4 U

Tabelle 2.2.2: Pipettierschema der cDNA-Synthese

2.2.14.3 Real-Time RT-PCR

Die synthetisierte cDNA wurde nun in die *Real-Time* RT-PCR zur quantitativen Bestimmung der Expression der zu untersuchenden Gene eingesetzt. Zur Quantifizierung wurde das in Tabelle 2.2.4 aufgeführte *Real-Time* RT-PCR-Programm verwendet. Hierbei wurde bei der Amplifikation der Matrize mittels spezifischer Primerpaare der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in den neu synthetisierten DNA-Doppelstrang während der Elongation eines jeden PCR-Zyklus eingelagert. Je stärker das Fluoreszenzsignal war desto mehr doppelsträngige DNA war vorhanden. Zur Quantifizierung wurde auf das murine *Housekeeping*-Gen Gapdh normiert. Für die *Real-Time* RT-PCR wurde das Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG Kit nach Herstellerangabe verwendet. Es wurden für jede Probe und die Negativkontrolle jeweils 25 µl Ansätze in Doppelbestimmung nach dem Schema in Tabelle 2.2.3 pipettiert, wobei für jede Reaktion ein Mastermix erstellt wurde.

Für die *Real-Time* RT-PCR wurde das *Real-Time* PCR-Gerät StepOnePlus und das in Tabelle 2.2.4 aufgeführte Programm verwendet. Die mittlere Amplifikationseffizienz wurde nach jedem *Real-Time* RT-PCR-Lauf für jedes eingesetzte Primerpaar mit LinRegPCR berechnet (Ramakers et al. 2003). Die Rohdaten wurden anschließend anhand des effizienzkorrigierten, relativen Quantifizierungsmodells quantifiziert (Pfaffl 2001).

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
steriles Wasser	8,25 µl	
SYBR Green Mastermix	12,5 µl	
Rox	0,25 µl	
Primermix (0,5 µM pro Primer)	2 µl	0,04 µM
cDNA (bis zu 1:10 verdünnt)	2 µl	variabel

Tabelle 2.2.3: Pipettierschema der Real-Time RT-PCR

Tabelle 2.2.4: Real-Time RT-PCR-Programm

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Schritt 1	1	50°C	2 min
	1	95°C	2 min
Schritt 2	40	95°C	15 s
		60°C	1 min
Schmelzkurve	1	95°C	15 s
		60°C	1 min
		+ 0,3°C Schritte bis 95°C	15 s

2.2.15 SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion von Proteinen

Mit Hilfe des Western Blottings konnten Proteine nach chemischer bzw. mechanischer Stimulation der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen semiquantitativ analysiert oder deren Phosphorylierung untersucht werden. Die Zellen wurden hierfür direkt nach Versuchsende lysiert und der Gesamtproteingehalt wurde mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt. Anschließend wurden die Proteine nach ihrer Größe in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und schließlich wurden die Zielproteine mittels spezifischer Antikörper detektiert.

2.2.15.1 Gesamtprotein-Isolation

Unmittelbar nach Versuchsende wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gespült und anschließend mit 300 µl eiskaltem RIPA-Puffer pro Schale, der mit 10 µl/ml 100x Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail versetzt war, 10 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde aus der Schale in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und schließlich 10 min bei 4°C und 2000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand diente der weiteren Analyse. Alle nachfolgenden Aufarbeitungsschritte erfolgten auf Eis.

2.2.15.2 BCA-Proteinbestimmung

Um später von jeder Probe die gleiche Proteinmenge für die SDS-PAGE auftragen und eine semiquantitative Aussage treffen zu können, wurde die Gesamtproteinkonzentration in jeder Probe photometrisch mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits bestimmt. Bei der hier zugrundeliegenden Farbreaktion wird zunächst unter alkalischen Bedingungen Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch die Proteine reduziert (Biuretreaktion). Anschließend reagiert Bicinchoninsäure (BCA) mit dem Cu¹⁺-Kation. Dieser BCA-Cu¹⁺-Komplex ist wasserlöslich und zeigt eine lineare Absorption bei 562 nm mit zunehmender Proteinkonzentration. Dazu wurde zunächst eine Standardverdünnungsreihe (25, 125, 250, 500, 750, 1000 µg/ml) mit einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) und 1:10 verdünntem RIPA-Puffer als Verdünnungslösung erstellt. Die photometrische Messung erfolgte nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C im Tecan Mikrotiterplatten-Reader und wurde mit der dazugehörigen Software Magellan ausgewertet.

2.2.15.3 SDS-PAGE

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden die zu analysierenden Proben zunächst mit 6x SDS-DTT-Probenpuffer versetzt und die Proteine bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden 30 µg Protein bzw. 10 µl BenchMark Prestained Protein Ladder pro Tasche auf das SDS-Gel aufgetragen. Es wurden 5%-ige Sammelgele und 10%- ige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 1,5 h bis 2 h bei Raumtemperatur in Elektrophoresepuffer.

2.2.15.4 Western Blotting

Beim Western Blotting wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst im Wet-Blotting-Verfahren (Towbin, Staehelin and Gordon 1979) bei 80 V für 75 min aus dem SDS-Gel auf eine Protran Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken in Nachsättigungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor der anschließenden Antikörperbindung abzusättigen. Die Primärantikörper wurden mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Die Nitrozellulose-Membran inkubierte in dieser Lösung über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der dem Primärantikörper entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in Antikörperverdünnungslösung verdünnt und die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken darin inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde der Protein-Antikörperkomplex mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System nach Herstellerangabe durch zum einen die Belichtung eines CL-XPosure Films und zum anderen im Geldokumentationsgerät Fusion SL detektiert. Als Housekeeping-Protein diente Gapdh.

2.2.16 Coimmunpräzipitation

Mit Hilfe der Coimmunpräzipitation sollte in dieser Studie der ER α - β -Catenin-Proteinkomplex in MC3T3-E1-Zellen nach mechanischer Stimulation, Wnt/ β -Catenin-Aktivierung und Östrogenbehandlung nachgewiesen werden. Hierfür wurde der ER α - β -Catenin-Proteinkomplex mit Hilfe des an die Protein-A-Sepharose gebundenen ER α -Antikörpers aus dem Gesamtproteingemisch bzw. dem Kernproteingemisch isoliert und anschließend mittels *Western Blotting* mit dem β -Catenin-Antikörper detektiert.

2.2.16.1 Aufbereitung der MC3T3-E1-Zellen und Gesamtproteinextraktion

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen in Expansionsmedium kultiviert. An Tag 4 erfolgte die Serumreduktion auf 0,25% BSA. An Tag 5 wurden die Zellen für 30 min, mit einer Dehnungsamplitude von 2% und einer Frequenz von 1 Hz mechanisch stimuliert. Die Zellen wurden vor der mechanischen Stimulation 3 h mit 20 μ M SB415286 und 10 nM Östrogen inkubiert. Hierfür wurden die Substanzen direkt in die Schalen pipettiert. Sofort nach der mechanischen Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit *Crosslinker*-Lösung (Endkonzentration 1-2 mM in PBS) inkubiert. Hierdurch sollte die Bindung des Proteinkomplexes verstärkt werden. Nach erneutem zweimaligen Waschen in eiskaltem PBS wurde die Vernetzungsreaktion durch Inkubation mit 10-20 mM Tris-Lösung (pH 7,5) für 15 min abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Lysepuffer für 5 min, bei 4°C lysiert und bei 12.000 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

2.2.16.2 Kernproteinextraktion

Das Kernprotein wurde mit dem NE-PER Nuclear & Cyoplasmic Extraction Reagents Kit nach Herstellerangabe isoliert. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.16.1 beschrieben stimuliert. Sofort nach der mechanischen Stimulation wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst und durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min pelletiert. Danach wurden alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden 1-10 x 10⁶ Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 500 x g für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch die Zugabe der Reagenzien CERI und II wurde die Zellmembran zerstört und die Bestandteile des Zytoplasmas freigesetzt. Die noch intakten Zellkerne wurden aus dem Zytoplasmaextrakt mittels Zentrifugation isoliert und in dem NER-Reagenz lysiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

2.2.16.3 Bindung des ERα-Antikörpers an die Protein-A-Sepharose

Der ERα-Antikörper wurde in PTO-Puffer verdünnt und 2 h mit der Protein-A-Sepharose durch End-über-Kopf-Rotation bei 4°C inkubiert. Hierfür wurden zu 0,5 ml PTO-Puffer 3 µl Antikörperlösung und 1,5 mg Protein-A-Sepharose hinzugefügt. Im Kontrollansatz wurden statt der Antikörperlösung 3 µl IgG-Lösung verwendet. Anschließend wurde der Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplex durch Zentrifugation mit 12.000 x g, für 10 min, bei 4°C pelettiert, 2x mit PTO-Puffer gewaschen und zwischen und nach den Waschschritten ebenfalls immer wieder durch Zentrifugation mit 12.000 x g für 10 min bei 4°C pelettiert.

2.2.16.4 Coimmunpräzipitation

Der Überstand aus Kapitel 2.2.16.1 bzw. aus Kapitel 2.2.16.2 wurde auf den ER α -Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplex aus Kapitel 2.2.16.3 pipettiert, das Gemisch homogenisiert und durch End-über-Kopf-Rotation, bei 4°C über Nacht inkubiert, um den ER α - β -Catenin-Proteinkomplex an den ER α -Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplex zu binden. Anschließend wurde der Protein-Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplex durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 min bei 4°C pelettiert und dreimal mit 500 µl Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Lösung des β -Catenins von ER α in 20 µl 6x SDS-Probenpuffer durch Vortexen (Dissoziation). Anschließend wurde ER α von der Protein-A-Sepharose durch Inkubation bei 37°C für 30 min und Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 min gelöst. Der Überstand wurde zur Detektion der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.15.3) und *Western Blotting* (Kapitel 2.2.15.4) eingesetzt.

2.2.17 Untersuchung der DNA-Methylierung

Die Methylierung von Cytosin-Basen der DNA innerhalb von CG(Cytosin-Guanin)-Dinukleotiden ist die wichtigste epigenetische Veränderung (Jeltsch 2002). Die CG-Dinukleotide kommen gehäuft in den genregulierenden Regionen, den Promotoren, als so genannte CpG-Inseln (Cytosin-Phosphat-Guanin-Inseln) vor. An die methylierten CG-Dinukleotide binden Methyl-CG-erkennende Proteine, wodurch sich weitere Proteine anlagern und zur Verdichtung des Nukleosoms führen. Dadurch wird die DNA an solchen methylierten CG-Dinukleotide für die RNA-Polymerase nicht ablesbar und die Transkription des betreffenden Gens inhibiert. Der Methylierungsgrad der CpG-Inseln im Promotor eines Gens ist also ein Maß für die Transkriptionsaktivität. Eine verstärkte Methylierung im Promotor inhibiert somit die Genaktivität (Seisenberger et al. 2013).

Die Bisulfitmodifikation ist der Goldstandard um die DNA-Methylierung zu untersuchen. Hierbei werden nicht methylierte Cytosine durch Desaminierung in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Bei der nachfolgenden PCR wird Uracil in Thymin umgewandelt.

Bei der PCR-Analyse gibt es 2 mögliche Vorgehensweisen (Shiraz 2012):

 Die Methylierungsspezifische PCR (MSP): Hierbei werden zur Amplifikation der bisulfitmodifizierten DNA zwei Primerpaare verwendet, die an dieselbe DNA-Sequenz binden. Das eine Primerpaar ist spezifisch für die methylierte DNA, das andere für die nicht methylierte DNA. Diese Methode ist ein qualitatives Verfahren, mit dem man eine schnelle Aussage darüber treffen kann, ob in einem bestimmten CG-Dinukleotid eine Methylierung stattgefunden hat. Aber bei unvollständiger Bisulfitmodifizierung, falschem Primerdesign oder zu geringer Anzahl der Wiederholungen können falsch positive Ergebnisse generiert werden.

2. Die Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP): Bei dieser Methode wird die bisulfitmodifizierte DNA mit Primern amplifiziert, die außerhalb der zu untersuchenden CpG-Insel binden und somit nicht zwischen methylierter und nicht methylierter DNA unterscheiden. Das Amplifikat wird anschließend sequenziert. Die nicht methylierten Cytosine erscheinen nun auf dem Hauptstrang als Thymin und auf dem Folgestrang als Adenin. Die methylierten Cytosine sind erhalten geblieben. Diese Methode ist sehr aufwendig und kostspielig, aber sie ermöglicht die Untersuchung eines größeren DNA-Fragments und die Quantifizierung der methylierten Cytosine in diesem Fragment.

2.2.17.1 DNA-Isolation

Die Zellen wurden direkt nach dem Versuch einmal mit PBS gewaschen und mit RLT-Puffer + 1% β-Mercaptoethanol lysiert. Die Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte mit dem Allprep DNA/RNA/Protein Mini Kit nach Herstellerangabe. Hierfür wurde zunächst das Lysat durch eine QiaShredder Säule homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation in der Allprep DNA-Zentrifugationssäule gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA in 100 µl EB-Puffer eluiert. Die Quantität und Qualität der DNA wurde bei 260 nm/280 nm photometrisch am Tecan Mikrotiterplatten-Reader mit der i-control Microplate Reader Software bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.17.2 Bisulfitmodifizierung

Die Bisulfitmodifizierung der aufgereinigten, genomischen DNA erfolgte mit dem Imprint DNA Modification Kit nach Herstellerangaben. Die DNA-Denaturierung und die Bisulfitmodifizierung fanden simultan statt. Das Bisulfit band spezifisch an einzelsträngige DNA und desaminierte Cytosin zu Uracil. Anschließend wurde die bisulfitmodifizierte DNA in der Zentrifugationssäule mit Hilfe von Waschpuffern aufgereinigt und schließlich in einer Elutionslösung eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.17.3 Design der MSP- und BSP-Primer

Die Sequenz der zu untersuchenden Promotorregion wurde in NCBI Genome gesucht. Diese Sequenz wurde in das Programm MethPrimer kopiert (Li and Dahiya 2002). Dieses Programm zeigt die bisulfitmodifizierte Sequenz analog zur Originalsequenz an sowie die einzelnen CG-Nukleotide und CpG-Inseln. Für die CpG-Inseln wurden folgende Kriterien gewählt: Inselgröße > 100 bp, CG-Gehalt > 50%, Verhältnis der beobachteten zu den erwarteten CpGs > 0.6. Entsprechend dieser Kriterien wurden MSP- und BSP-Primer vorgeschlagen.

2.2.17.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die aufgereinigte, bisulfitmodifizierte DNA wurde mit dem HotStarTaq Mastermix Kit mit dem in Tabelle 2.2.5 aufgeführten MSP-Programm amplifiziert.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Schritt 1	1	95°C	15 min
Schritt 2	40	95°C	1 min
		60°C	45 s
		72°C	1 min
Schritt 3	1	72°C	20 min

Es wurden für jede Probe und die Negativkontrolle jeweils ein 20 µl Ansatz nach dem Schema in Tabelle 2.2.6 pipettiert, wobei für jede Reaktion ein Mastermix erstellt wurde.

Die qualitative Analyse der MSP-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierfür wurden 10 µl eines jeden MSP-Ansatzes mit 6x Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel, das mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt war, aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 110 V in TAE-Puffer. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Doppelhelix ein und fluoresziert unter UV-Licht. So konnten die aufgetrennten DNA-Banden mit einem Geldokumentationsgerät detektiert werden.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
steriles Wasser	7 μΙ	
2x HotStar Mastermix	10 µl	1x
5 µM Primermix (<i>Forward</i> + <i>Reverse</i>)	2 µl	0,5 µM
DNA	1 µl	variabel

Tabelle 2.2.6: Pipettierschema der MSP und BSP

2.2.17.5 Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP)

Bei der BSP wurde die aufgereinigte, bisulfitmodifizierte DNA mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Reinheit und Größe überprüft. Anschließend wurden die BSP-Amplifikate in einen Vektor kloniert, in Bakterien transformiert und vermehrt, aus diesen wieder isoliert und schließlich durch MWG (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

2.2.17.5.1 PCR und Agarosegelelektrophorese

Die aufgereinigte, bisulfitmodifizierte DNA wurde mit dem HotStarTaq Mastermix Kit und dem in Tabelle 2.2.7 aufgeführten PCR-Programm amplifiziert. Es wurden für jede Probe und die Negativkontrolle jeweils ein 20 µl Ansatz nach dem Schema in Tabelle 2.2.6 pipettiert, wobei für jede Reaktion ein Mastermix erstellt wurde. Die Reinheit und Größe der PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierbei wurde wie in Kapitel 2.2.17.4 beschrieben vorgegangen.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Schritt 1	1	95°C	15 min
Schritt 2	40	95°C	1 min
		53°C	45 s
		72°C	1 min
Schritt 3	1	72°C	20 min

Tabelle 2.2.7: PCR-Programm

2.2.17.5.2 Klonierungsreaktion

Mit dem TOPO TA Cloning Kit wurden die PCR-Amplifikate in den Plasmid-Vektor pCR4-TOPO kloniert. Dieser enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen zur späteren Selektion der Bakterien, die den Plasmid-Vektor aufgenommen hatten. Denn aufgrund dieses Ampicillin-Resistenzgens konnten nur diese Bakterien auf ampicillinhaltigem Nährboden überleben und sich vermehren.

Für jeden Klonierungsansatz wurden 1 µl PCR-Produkt, 1 µl pCR4-TOPO, 1 µl Salzlösung und 2 µl steriles Wasser pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Klonierungsansätze bis zur Transformation in die Bakterien auf Eis gelagert. Die Transformation in die Bakterien rien erfolgte an demselben Tag.

2.2.17.5.3 Herstellung des LB-Mediums und der LB-Agarplatten für die Bakterienkultivierung

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 25 g Luria Broth Base in 1 I destilliertem Wasser (pH 7,0) gelöst und autoklaviert. Dem abgekühlten LB-Medium wurden 50 µg/ml Ampicillin zugegeben. Für die Herstellung der LB-Agarplatten wurden 25 g Luria Broth Base und 15 g Select-Agar mit 1 I destilliertem Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Der handwarme, noch flüssige LB-Agar wurde mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt und in der Sterilbank in sterile Petrischalen gegossen, die bis zur vollständigen Abkühlung und Gelierung des LB-Agars leicht geöffnet in der Sterilbank blieben. Die Lagerung des LB-Mediums und der LB-Agarplatten erfolgte bei 4°C.

2.2.17.5.4 Transformation in Bakterien

Der Plasmid-Vektor wurde nach Herstellerangaben in die Top10 One Shot Chemical Competent *E.coli* transformiert. Hierfür wurde der kompetente *E.coli*-Bakterienstamm langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl Klonierungsansatz zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen erfolgte die Transformation des Plasmid-Vektors in die Bakterien mittels Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Heizblock. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und mit 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 200 upm auf der Schüttelplattform inkubiert. Danach wurden 2 verschiedene Volumina (50 µl und 200 µl) des Transformationsansatzes auf vorgewärmten, ampicillinhaltigen LB-Agarplatten mit einem sterilen Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert.

2.2.17.5.5 Bakterienflüssigkultur

Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden weiter vermehrt, indem pro LB-Agarplatte 5 Kolonien gepickt wurden und in ein 15 ml Falconröhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium überführt wurden. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 250 upm auf der Schüttelplattform inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.17.5.6 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoBond Mini Kit aus den Bakterien nach Herstellerangaben isoliert. Hierfür wurde der Kulturansatz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Zelllyse wurde das Bakterienpellet in einem alkalischen SDS-Puffer, der mit RNase A versetzt war, resuspendiert. Die chromosomale und die Plasmid-DNA wurden unter diesen alkalischen Bedingungen denaturiert. Durch die anschließende Zugabe eines Kaliumacetatpuffers wurden die chromosomale DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert und das Lysat neutralisiert. Durch die Neutralisierung nahm die Plasmid-DNA wieder ihre ursprüngliche *supercoiled*-Struktur an und blieb in der klaren Lösung. Nach der Equilibrierung der Zentrifugationssäule mit einem Equilibrierungspuffer wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation in der Säule gebunden, mit Waschpuffer gewaschen und schließlich eluiert. Die eluierte DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, mit 70% EtOH gespült, bei Raumtemperatur getrocknet, in TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Quantität und Qualität der Plasmid-DNA wurde bei 260 nm/280 nm photometrisch am Tecan Mikrotiterplatten-Reader mit der i-control Microplate Reader Software bestimmt. Zur Überprüfung der Klonierung des PCR-Amplifikats in den Plasmid-Vektor wurde 1µl des Plasmid-DNA-Eluats in die in Kapitel 2.2.17.5.1 beschriebene PCR eingesetzt und das Reaktionsprodukt mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.17.5.7 Sequenzierung

Die Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung mit dem BSP-Primerpaar von der Firma MWG in Ebersberg analysiert.

2.2.18 Ölrot-O-Färbung

Die Ölrot-O-Färbung ist ein histologisches Verfahren zur Untersuchung des Differenzierungszustandes von mesenchymalen Stammzellen. Bei der Ölrot-O- Färbung werden intrazelluläre Lipidvakuolen, ein morphologisches Merkmal der Adipozyten, rot gefärbt. In der vorliegenden Studie sollte die adipogene Differenzierung der mesenchymalen Zelllinie C3H10T1/2 anhand der Lipidvakuolenbildung untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gespült, 10 min in 5 ml 4% phosphatgepufferten Formalin fixiert und anschließend erneut zweimal mit 5 ml PBS gespült. Die Färbung erfolgte in 5 ml Ölrot-O-Färbelösung für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach zweimaligen Spülen mit 5 ml A. dest. wurden die Zellen unter dem Mikroskop IX70 betrachtet und fotografiert.

2.2.19 Statistik

In dem *in vivo* Experiment bestanden die Versuchsgruppen aus 4 bis 6 Mäusen (n = 4-6). Die mechanisch belastete Ulna wurde mit der kontralateralen nicht belasteten Ulna mit dem Wilcoxon-Test, einem nicht-parametrischen Signifikanztest für verbundene Stichproben, verglichen. Der Effekt von Östrogen und Wnt/β-Catenin-Aktivierung wurde mit der Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test, einem nicht-parametrischen Signifikanztest für unverbundene Stichproben, verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei p \leq 0,05 festgelegt und die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die *in vitro* Experimente dieser Studie umfassten 2 bis 4 Wiederholungen in Doppelbestimmung (n = 4-8). Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test für ungepaarte Stichproben auf Signifikanz ($p \le 0,05$) getestet und wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation in Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation *in vivo* wurde die rechte Ulna weiblicher, 16 Wochen alter Mäuse axial belastet. Zur Untersuchung des Einflusses des Östrogenhaushalts wurden die Mäuse zunächst im Alter von 12 Wochen ovarektomiert, um die Mechanotransduktion bei reduziertem Östrogenspiegel untersuchen zu können. Der Zeitraum von 4 Wochen zwischen Ovarektomie und mechanischer Belastung wurde in einem Vorversuch festgelegt, bei dem die Veränderung des Östrogengehalts im Serum nach Ovarektomie und deren Einfluss auf die Knochenstruktur untersucht wurden. Zur Untersuchung der Mechanotransduktion bei einer definierten Östrogenkonzentration wurde den Mäusen 2 Tage vor Beginn der mechanischen Belastung ein Östrogenpellet subkutan in die Nackenregion implantiert. Der Einfluss der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Mechanotransduktion wurde durch tägliche Injektion des Gsk-3 β -Inhibitors SB415286 während der mechanischen Belastung untersucht.

3.1.1 Veränderung der Östrogenkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf von 4 Wochen nach Ovarektomie und deren Einfluss auf die Knochenstruktur

Für die spätere mechanische Belastung sollte der Östrogenspiegel im Serum signifikant vermindert, die Knochenstruktur jedoch unverändert sein, um das Verhalten des Knochens bei der mechanischen Belastung nicht durch die Ovarektomie zu beeinflussen. Der Uterus der OVX-Mäuse war 4 Wochen nach der Ovarektomie atrophiert (Abbildung 3.1, oben links). Die Uterusatrophie ist ein Indikator für Östrogenmangel. Die Östrogenkonzentration im Serum war ab Tag 14 nach der Ovarektomie signifikant vermindert (Abbildung 3.1, oben rechts). Die Östrogenkonzentration im Serum der OVX-Mäuse war aufgrund der hohen Standardabweichung innerhalb der Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant geringer als die im Serum der *Sham*-Mäuse. Der erzeugte Östrogenmangel hatte 14 und 28 Tage nach der Ovarektomie keine signifikante Auswirkung auf die Struktur des trabekulären und des kortikalen Knochens (Abbildung 3.1, Mitte und unten). Sowohl die Knochenmineraldichte (BMD = *bone mineral density*) als auch das Knochenvolumen im trabekulären Knochen (Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, BV/TV) sowie die kortikale Dicke (Ct.Th) blieben unverändert.



Abbildung 3.1: Auswirkung der Ovarektomie auf den Uterus, die Östrogenkonzentration (Östrogen-ELISA) und den trabekulären und kortikalen Knochen (μ CT). Oben links: Der Uterus war 28 Tage nach Ovarektomie atrophiert. Oben rechts: Die Östrogenkonzentration wurde im Serum von scheinovarektomierten (*Sham*) und ovarektomierten (OVX) Mäusen mittels Östrogen-ELISA im Verlauf von 28 Tagen nach Ovarektomie bestimmt. Mitte: Veränderungen im trabekulären Knochen des Femurkopfes 28 Tage nach Ovarektomie wurden anhand der Trabekeldicke (Tb.Th), der Trabekelanzahl (Tb.N), des Trabekelabstandes (Tb.Sp), der Knochenmineraldichte (BMD) und anhand des auf das Gesamtvolumen bezogenen Knochenvolumens (BV/TV) im μ CT untersucht. Unten: Veränderungen im kortikalen Knochen der Ulnamitte 28 Tage nach Ovarektomie wurden anhand der Stade (Ct.Th) im μ CT bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. n = 6, * p ≤ 0,05 im Vergleich zu Tag 0 (Mann-Whitney-U-Test).

3.1.2 Auswirkungen der reduzierten Östrogenkonzentration im Serum auf die Knochenstruktur 6 Wochen nach Ovarektomie

Der Östrogenspiegel im Blutserum scheinovarektomierter Mäuse (*Sham*) betrug bei der Tötung 13,7 ± 4,1 pg/ml und wurde durch Ovarektomie (OVX) innerhalb von 6 Wochen um 28% reduziert (Abbildung 3.2). Die subkutane Implantation eines Östrogenpellets (E2; 3 μ g/Tag) in den Nacken der ovarektomierten Mäuse 2 Wochen vor der Tötung erhöhte den Östrogenspiegel auf das Sechsfache der im Serum der *Sham*-Mäuse gemessenen Östrogenkonzentration. Östrogenmangel führte zur Uterusatrophie. Das Uterusgewicht reduzierte sich durch Ovarektomie um 70% im Vergleich zu den *Sham*-Mäusen. Durch die Implantation des Östrogenpellets erhöhte sich das Uterusgewicht der OVX-Mäuse wieder um das Vierfache.

Im trabekulären Knochen induzierte der Östrogenmangel eine Verminderung der relativen Knochenmasse (BV/TV) um 17% im Vergleich zu den *Sham*-Mäusen. Dies war auf eine Verminderung der Trabekelanzahl (Tb.N) um 17% und der damit einhergehenden Erhöhung des Trabekelabstandes (Tb.Sp) um 15% zurückzuführen. Die Trabekeldicke (Tb.Th) war nach Ovarektomie im Vergleich zu den *Sham*-Mäusen nicht signifikant vermindert, wurde aber durch die Gabe von Östrogen in den OVX-Mäusen um 7% erhöht. BV/TV und Tb.N wurden durch die Gabe von Östrogen in den OVX-Mäusen um 45% und 35% erhöht und Tb.Sp wurde um 17% vermindert.

Die kortikale Dicke (Ct.Th) war durch die Ovarektomie nach 6 Wochen im Vergleich zu den *Sham*-Mäusen um 7% reduziert und wurde durch Östrogenapplikation nach Ovarektomie wieder leicht, aber nicht signifikant, erhöht. Die Kortexverdünnung nach Ovarektomie war auf endostale Resorption zurückzuführen. Dies konnte durch die Vergrößerung der Markraumfläche (Ma.Ar) um 32% im Vergleich zu den *Sham*-Mäusen gezeigt werden. Die Östrogenapplikation führte zu einem endostalen Wiederanbau von Knochen, wodurch sich der Markraum der OVX-Mäuse um 14% verkleinerte.

Ergebnisse



Abbildung 3.2: Östrogenkonzentration (Östrogen-ELISA) und ihre Auswirkung auf das Uterusgewicht, die kortikale und die trabekuläre Knochenstruktur (μ CT). Oben links: Die Östrogenkonzentration wurde im Serum von scheinovarektomierten (*Sham*), ovarektomierten (OVX) und ovarektomierten Mäusen, denen ein Östrogenpellet (0,11 mg/kg/Tag) implantiert wurde (OVX + E2), mittels Östrogen-ELISA bestimmt. Oben rechts: Das Uterusgewicht wurde in den entsprechenden Gruppen bestimmt. Mitte: Veränderungen im trabekulären Knochen des 5. Lendenwirbelkörpers (WK L5) wurden anhand des auf das Gesamtvolumen bezogenen Knochenvolumens (BV/TV), der trabekulären Dicke (Tb.Th), der trabekulären Anzahl (Tb.N) und des trabekulären Abstands (Tb.Sp) im μ CT bestimmt. Unten: Veränderungen am kortikalen Knochen der Ulna wurden anhand der Markraumfläche (Ma.Ar) und der kortikalen Dicke (Ct.Th) 2 mm distal von der Knochenmitte im μ CT detektiert. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 6, * p ≤ 0,05 (Mann-Whitney-U-Test).

3.1.3 Auswirkungen von mechanischer Belastung, Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf den Knochenzuwachs

Die mechanische Stimulation (+S) der Ulna induzierte an der endostalen und periostalen Knochenoberfläche lamellaren Knochenzuwachs (Abbildung 3.3, Abbildung 3.4). Ohne mechanische Belastung (-S) wurde in den *Sham*-Mäusen kein Knochenzuwachs detektiert. In den OVX-Mäusen wurde periostal auch ohne mechanische Stimulation ein geringer Knochenzuwachs detektiert.

Endostal führte Östrogen (E2) in *Sham*- und OVX-Mäusen zu lamellarem Knochenzuwachs und wirkte additiv zur mechanischen Belastung. Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) induzierte endostal keinen Knochenzuwachs und beeinflusste den endostalen, mechanisch induzierten Zuwachs nicht signifikant. Der SB415286 beeinflusste den endostalen, durch Östrogen induzierten Zuwachs ebenfalls nicht.

Periostal führten Ovarektomie, Östrogen und SB415286 zu einem leichten, aber signifikanten, lamellaren Knochenzuwachs. SB415286 und mechanische Belastung wirkten synergistisch auf den periostalen Knochenzuwachs. Es wurde Geflechtknochen gebildet. Nur in den OVX-Mäusen wirkten auch Östrogen und mechanische Belastung synergistisch auf den periostalen Knochenzuwachs. Auch hier kam es zur Bildung von Geflechtknochen. Überraschenderweise hatten Östrogen und SB415286 bei gleichzeitiger Anwendung in ovarektomierten Mäusen keine stimulierende Wirkung mehr auf den periostalen, mechanisch induzierten Knochenzuwachs.



Abbildung 3.3: Endostaler und periostaler Knochenzuwachs der mechanisch belasteten Ulna von Sham- und OVX-Mäusen. Dargestellt ist der Knochenzuwachs mittels der Calceingrün- und Alizarinrotbande 2 mm distal von der Ulnamitte nach mechanischer Belastung (Kontrolle) und zusätzlicher Behandlung mit Östrogen (E2) und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB).



Abbildung 3.4: Endostale und periostale Knochenformationsrate (ecBFR/BS und psBFR/BS). Oben links: Die endostale Knochenformationsrate (ecBFR/BS) in *Sham*-Mäusen nach mechanischer Belastung (S), Behandlung mit Östrogen (E2) und Behandlung mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB). Oben rechts: Die ecBFR/BS in OVX-Mäusen. Unten links: Die periostale Knochenformationsrate (psBFR/BS) in *Sham*-Mäusen. Unten rechts: Die psBFR/BS in OVX-Mäusen. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 4-6, [#] p < 0,05: +S vs. -S (Wilcoxon-Test), * p < 0,05: Behandlungsgruppe vs. entsprechender Kontrollgruppe (-S, +S; Mann-Whitney-U-Test).

3.1.4 Auswirkungen des durch mechanische Belastung, Östrogen und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs induzierten Knochenzuwachses auf die Knochenstruktur

Die Veränderung der Größe der Markraumfläche (Ma.Ar) ist ein guter Parameter für Veränderungen des Knochenwachstums an der endostalen Knochenoberfläche. So konnte der mechanisch induzierte (+S), endostale Knochenzuwachs (Abbildung 3.4, ecBFR/BS) durch die Verkleinerung der Markraumfläche belegt werden (Abbildung 3.5). Durch mechanische Belastung wurde die Markraumfläche der rechten Ulna in den *Sham*-Mäuse um 18% und in den OVX-Mäuse um 14% verkleinert im Vergleich zur unbelasteten linken Ulna. Auch der durch Östrogen (E2) induzierte endostale Anbau spiegelte sich in der Verkleinerung der Markraumfläche wieder (im Vergleich zur Placebogruppe 21% verkleinert in *Sham*-Mäusen und 14% verkleinert in OVX-Mäusen). Im Vergleich zur Placebogruppe war die Ma.Ar in *Sham*-Mäusen nach mechanischer Belastung und E2-Behandlung um 43% und in OVX-Mäusen um 24% verringert.

Die Veränderung der kortikale Dicke (Ct.Th) ist ein Parameter für den endostalen und den periostalen Zuwachs. In dieser Studie war der endostale Zuwachs jedoch zu gering um ihn anhand der Bestimmung der kortikalen Dicke mittels µCT detektieren zu können (Tabelle 3.4, Abbildung 3.5). Aber die gemessene kortikale Dicke spiegelte den mechanisch induzierten, periostalen Knochenzuwachs wieder. Sie nahm in *Sham*-Mäusen durch mechanische Belastung um 13% und in OVX-Mäusen um 14% zu. In *Sham*-Mäusen wurde die mechanisch induzierte Zunahme der kortikalen Dicke weder durch Östrogen noch durch SB415286 noch durch deren gleichzeitige Anwendung signifikant erhöht. Aber in OVX-Mäusen erhöhten sowohl Östrogen als auch SB415286 die mechanisch induzierte Zunahme der kortikalen Dicke um jeweils 16%. Diese fördernde Wirkung war bei gleichzeitiger Anwendung der beiden Substanzen nicht zu beobachten. Der anhand der psBFR/BS detektierte, minimale periostale Zuwachs in der nicht belasteten Ulna (-S) durch Östrogen und SB415286 führte nicht zu messbaren Veränderungen der kortikalen Dicke.

Die kortikale Fläche (Ct.Ar) ist neben der kortikalen Dicke ein weiterer Messparameter zur Detektion des endostalen und periostalen Zuwachses. Die kortikale Fläche vergrößerte sich in der rechten Ulna im Vergleich zur unbelasteten linken Ulna durch mechanische Belastung in *Sham*-Mäusen um 17% und in OVX-Mäusen um 15%. SB415286 erhöhte die mechanisch induzierte Vergrößerung in *Sham*-Mäusen um 11% und in OVX-Mäusen um 20%. Östrogen verstärkte diese hingegen nur in OVX-Mäusen signifikant um 18%. Bei gleichzeitiger Anwendung von Östrogen und SB415286 hatten die beiden Substanzen nur noch eine gering fördernde Wirkung auf die mechanisch induzierte Vergrößerung der kortikalen Fläche in den OVX-Mäusen.



Abbildung 3.5: Einfluss von mechanischer Belastung (S), Östrogen (E2) und dem Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) auf die Markraumfläche (Ma.Ar), kortikale Dicke (Ct.Th) und kortikale Fläche (Ct.Ar). Dargestellt sind von oben nach unten die Markraumfläche (Ma.Ar), die kortikale Dicke (C.Th) und die kortikale Fläche (C.Ar) der Ulna 2 mm distal von der Knochenmitte in *Sham*-Mäusen und ovarektomierten Mäusen (OVX). Die rechte Ulna wurde innerhalb von 2 Wochen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, für 1 min, mit 2,5 N und 2 Hz stimuliert (S). Zusätzlich erhielten die Mäuse Östrogen (E2) und den Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB). Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 4-6, [#] p ≤ 0,05: +S vs. -S (Wilcoxon-Test), * p ≤ 0,05: Behandlungsgruppe vs. entsprechender Kontrollgruppe (-S, +S; Mann-Whitney-U-Test).

3.1.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Östrogen unabhängig vom endogenen Östrogenstatus endostalen Knochenzuwachs induzierte. Dieser Zuwachs war additiv zu dem mechanisch induzierten, endostalen Zuwachs. Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs hatte keinen Einfluss auf den endostalen und einen sehr geringen Einfluss auf den periostalen Zuwachs. Sie erhöhte aber den mechanisch induzierten, periostalen Zuwachs sowohl in *Sham*- als auch OVX-Mäusen. Besonders interessant war der Einfluss der Östrogenapplikation auf den mechanisch induzierten, periostalen Knochenzuwachs. Nur nach Ovarektomie erhöhte das externe Östrogen den mechanisch induzierten, periostalen Zuwachs. Ebenfalls nur nach Ovarektomie hatten Östrogen und der Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs bei gleichzeitiger Anwendung keinen stimulierenden Einfluss mehr auf den mechanisch induzierten periostalen Knochenzuwachs.

3.2 Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte osteogene Antwort in osteoblastären Zellen

Zur in vitro-Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte, osteogene Antwort wurden osteoblastäre MC3T3-E1-Zellen mit Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator Wnt3a bzw. SB415286 inkubiert und mechanisch stimuliert. Der Einfluss von Östrogen, der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs und von mechanischer Stimulation auf die Interaktion von ERα mit β-Catenin wurde mittels Coimmunpräzipitation untersucht. Der Einfluss von Ostrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Aktivität eines Wnt-responsiven Promotorelements wurde anhand der Luziferaseaktivität guantifiziert. Der Einfluss von Östrogen, der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs und mechanischer Stimulation auf die Expression von Genen, die mit der Osteogenese assoziiert sind, wurde mittels Real-Time RT-PCR und Western Blotting untersucht.

3.2.1 Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Proteine ERα und β-Catenin nach Inkubation mit Östrogen, der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs und mechanischer Stimulation interagieren.

Hierfür wurde der ERα-β-Catenin-Proteinkomplex mittels Coimmunpräzipitation zunächst im Gesamtzellextrakt detektiert (Abbildung 3.6). Mechanische Stimulation (S) führte nach Vorinkubation mit Östrogen (E2) zur Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes. Ohne Vorinkubation mit E2 konnte der Proteinkomplex nach mechanischer Belastung nicht nachgewiesen werden. Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator Wnt3a induzierte ebenfalls die Bildung des Proteinkomplexes. Hierauf hatte die zusätzliche, mechanische Stimulation keinen Einfluss. Die Wnt3a-induzierte Bildung wurde jedoch durch Zugabe von Östrogen reduziert.







Abbildung3.7: Einfluss von mechanischer Belastung (S), Östrogen (E2) und Wnt3a auf die Proteinkomplexbildung aus ERα und β-Catenin im Zellkern von MC3T3-E1-Zellen (Coimmunpräzipitation). Nach der Kernproteinextraktion wurde der Proteinkomplex mit dem anti-ERα-Antikörper aus dem Extrakt isoliert und anschließend mit dem anti-β-Catenin-Antikörper detektiert. Zuvor wurden die Zellen mit 3 nM Wnt3a und 10 nM Östrogen 3 h vorinkubiert und anschließend mechanisch stimuliert (S; 30 min, 1 Hz, 2%). Als Input wurde das Gesamtprotein vor der Präzipitation mit dem Antikörper verwendet. Bei der IgG-Kontrolle wurde statt des anti-ERα-Antikörpers das entsprechende IgG verwendet.

Im Zellkern führte mechanische Stimulation (S) auch ohne Vorinkubation mit E2 zur Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes (Abbildung 3.7). Die mechanisch induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes wurde durch Vorinkubation mit E2 und Wnt3a deutlich reduziert.

3.2.2 Untersuchung des Einflusses der Interaktion von Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator auf die Wnt/β-Catenin-Reporteraktivität

Die Veränderung der Aktivität eines Wnt-responsiven Promotorelements nach Inkubation mit Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 wurde mit Hilfe des Reporterplasmids Topflash detektiert. Die Topflash-Aktivität wurde durch Östrogen (E2) 2,1-fach und durch den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) 1,8-fach erhöht (Abbildung 3.8, A). Die gleichzeitige Inkubation mit SB415286 verminderte die aktivierende Wirkung von Östrogen tendenziell (1,7-fach vs. 2,1-fach). Die Aktivitätserhöhung des Wnt/β-Catenin-Reporters durch Östrogen war zunächst unerwartet. Aber mittels *Western Blotting* konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit Östrogen Gsk-3β durch Phosphorylierung an Serin 9 inhibiert wurde (Abbildung 3.8, B). Durch die Inhibierung von Gsk-3β kann sich β-Catenin im Zytosol anreichern und das Wnt-responsive Promotorelement aktivieren.



Abbildung 3.8: Einfluss von Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 auf die Topflash-Aktivität von transfizierten MC3T3-E1-Zellen. A: Dargestellt ist die zur unbehandelten Kontrolle (schwarzer Kontrollbalken = 1) relative Aktivität des Wnt-Reporters Topflash nach Behandlung mit 20 µM des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators SB415286 (SB) und 10 nM Östrogen (E2) (Luziferase-Test). Die Normalisierung erfolgte durch den Bezug auf die Aktivität des Kontrollvektors pRL-SV40. B: Dargestellt ist die Proteinexpression der an Serin 9 phosphorylierten Gsk-3β (46 kDa) mittels *Western Blotting.* Gapdh (37 kDa) diente als *Housekeeping*-Protein. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 4, [#] p ≤ 0,05 (ungepaarter Student's *t*-Test).
3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Expression mechanoresponsiver, mit der Osteogenese assoziierter Marker

Es wurde der Einfluss von Östrogen und des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators SB415286 auf die mechanisch induzierte Expression der mechanoresponsiven, mit der Osteogenese assoziierten Marker c-Fos, Cox-2 und Cyr61 untersucht. Die Genexpression von c-Fos wurde durch mechanische Belastung (S) 5-fach hochreguliert (Abbildung 3.9). Östrogen (E2) alleine hatte auf diese Hochregulation keinen Einfluss. SB415286 (SB) hingegen verminderte die mechanisch induzierte Genexpression um 54%. Dieser vermindernde Effekt von SB415286 auf die mechanisch induzierte Genexpression war bei zusätzlicher Östrogenapplikation nicht mehr zu beobachten. Die Genexpression von Cox-2 und Cyr61 wurde durch mechanische Belastung leicht erhöht (1,6-fach und 1,5-fach). Östrogen und SB415286 hatten hierauf keinen signifikanten Einfluss. Aber die gleichzeitige Anwendung der beiden Substanzen erhöhte die mechanisch induzierte Genexpression von Cox-2 4,2-fach und von Cyr61 4,1-fach. Zudem induzierte SB415286 auch ohne mechanischen Reiz die Genexpression von Cox-2 1,7-fach und von Cyr61 1,6-fach. Ostrogen induzierte auch ohne mechanischen Reiz die Expression von Cyr61 1,2-fach.



Abbildung 3.9: Einfluss von Östrogen, Wnt/β-Catenin-Aktivierung und mechanischer Belastung auf die Genexpression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Markergene in MC3T3-E1-Zellen (*Real-Time* RT-PCR). Dargestellt ist die zur unbehandelten Kontrolle (schwarzer Kontrollbalken = 1) relative Genexpression von c-Fos, Cox-2 und Cyr61 nach mechanischer Stimulation (S) sowie nach Behandlung mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) und mit Östrogen (E2). Die Zellen wurden über 21 Tage unter Östrogenmangel oder in Anwesenheit von 10 nM Östrogen osteogen differenziert und an Tag 21 mit 20 µM SB415286 3 h vorinkubiert und anschließend mechanisch stimuliert (30 min, 1 Hz, 2%). Die Normalisierung erfolgte durch den Bezug auf die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 6-8, [#] p ≤ 0,05: +S vs. -S (ungepaarter Student's *t*-Test), * p ≤ 0,05: Behandlungsgruppe vs. entsprechender Kontrollgruppe (-S, +S; Student's *t*-Test).

Die Proteinexpression von Cox-2 wurde wie die Genexpression durch mechanische Belastung (S) leicht erhöht (Abbildung 3.10). Anders als auf Genexpressionsebene wurde die Proteinexpression von Cox-2 durch Östrogen (E2) deutlich hochreguliert. Diese Hochregulation wurde durch mechanische Belastung vermindert. Auch der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) wirkte leicht fördernd auf die Expression von Cox-2 und auch hierauf wirkte mechanische Belastung hemmend. Bei gleichzeitiger Anwendung von Östrogen und SB415286 wurde der fördernde Effekt von Östrogen alleine aufgehoben. Durch zusätzliche mechanische Belastung wurde dieser hemmende Effekt noch verstärkt.



Abbildung 3.10: Einfluss von Östrogen (E2), SB415286 (SB) und mechanischer Belastung (S) auf die Proteinexpression des mechanosensitiven, mit der Osteogenese assoziierten Gens Cox-2 in MC3T3-E1-Zellen (*Western Blotting*). Dargestellt ist die Proteinexpression von Cox-2 (70 kDa). Die Zellen wurden über 21 Tage unter Östrogenmangel oder in Anwesenheit von 10 nM Östrogen osteogen differenziert und an Tag 21 mit 20 µM SB415286 3 h vorinkubiert und anschließend mechanisch stimuliert (1,5 h, 1 Hz, 2%). Gapdh (37 kDa) diente als *Housekeeping*-Protein.

3.2.4 Zusammenfassung

Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs förderten die in der vorliegenden Studie untersuchten, mechanisch induzierten Prozesse, die an der osteogenen Antwort beteiligt sind. Dieser fördernde Effekt wurde bei gleichzeitiger Applikation der Substanzen gehemmt.

Mechanische Stimulation, Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs förderten die Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes. Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs hatte hierbei den stärksten Einfluss. Dieser starke Einfluss wurde durch die zusätzliche Applikation von Östrogen vermindert.

Die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Reporterplasmids Topflash wurde durch Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs erhöht. Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs verminderte tendenziell die durch Östrogen induzierte Aktivität.

Bei gleichzeitiger Applikation von Östrogen und des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators, wurde die mechanisch induzierte Genexpression der mechanosensitiven, mit der Osteogenese assoziierten Marker Cox-2 und Cyr61 zwar erhöht. Die Proteinexpression von Cox-2 wurde jedoch durch die gleichzeitige Applikation von Östrogen und SB415286 deutlich inhibiert.

3.3 Untersuchung des Einflusses der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch regulierte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von mechanischer Stimulation und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Adipogenese und Osteoblastogenese von mesenchymalen Stammzellen wurde die pluripotente, mesenchymale Zelllinie C3H10T1/2 während der Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium täglich mechanisch stimuliert und der Wnt/B-Catenin-Signaltransduktionsweg durch SB415286-Applikation aktiviert. Der Einfluss von mechanischer Stimulation und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Lipidvakuolenbildung wurde mittels Ölrot-O-Färbung detektiert. Der Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression von adipogenen und mit der Osteogenese assoziierten Markergenen wurde mittels Real-Time RT-PCR und Western Blotting untersucht. Die epigenetische Regulation des adipogenen Markergens Ppary durch DNA-Methylierung wurde mittels Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP) und methylierungsspezifische PCR (MSP) untersucht.

3.3.1 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Lipidvakuolenbildung unter adipogenen Bedingungen

Nach fünftägiger Kultur der C3H10T1/2-Zellen in adipogenem Differenzierungsmedium hatten die meisten Zellen Lipidvakuolen ausgebildet, die sich mittels Ölrot-O-Färbung nachweisen ließen (Abbildung 3.11.A). Die Lipidvakuolenbildung war durch die Zugabe der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivatoren LiCl oder SB415286 in das Differenzierungsmedium sowie durch tägliche, mechanische Stimulation deutlich reduziert (Abbildung 3.11.B-D). Die Zugabe des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators SB415286 bei gleichzeitiger, täglicher, mechanischer Stimulation unterdrückte die Lipidvakuolenbildung komplett (Abbildung 3.11.E).



Abbildung 3.11: Einfluss von Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivatoren und mechanischer Stimulation auf die Lipidvakuolenbildung in C3H10T1/2-Zellen unter adipogenen Bedingungen (Ölrot-O-Färbung). Nach fünftägiger Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium hatten sich zytoplasmatische Lipidvakuolen gebildet (A). 10 mM LiCl (B), 20 μM SB415286 (C) und mechanische Stimulation (D, an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, 30 min, 1 Hz, 2%) reduzierten die Anzahl der Lipidvakuolen. Mechanische Stimulation und gleichzeitige Behandlung mit SB415286 (E) unterdrückten die Lipidvakuolenbildung komplett. (200x Vergrößerung)

3.3.2 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression adipogener und mit der Osteogenese assozierter Marker unter adipogenen Bedingungen

Die mechanische Stimulation (S) von C3H10T1/2-Zellen und die Behandlung mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB) verminderte die relative Genexpression der adipogenen Marker Pparγ und Cebpα (Abbildung 3.12). Die SB415286-Behandlung wirkte sensibilisierend auf die mechanisch reduzierte Genexpression von Pparγ und Cebpα.

Die relative Genexpression des osteogenen Markers Runx2 sowie der mit der Osteogenese assoziierten Marker Cox-2 und Cyr61 wurde hingegen durch mechanische Stimulation und den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 erhöht (Abbildung 3.12). Die Behandlung mit SB415286 bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation führte zur Erhöhung der mechanisch induzierten Genexpression. Die relative Genexpression des kanonischen Wnt-Liganden Wnt10b wurde durch mechanische Stimulation nicht signifikant erhöht, jedoch durch die Behandlung mit SB415286 (Abbildung 3.13). Die mechanische Stimulation wirkte sensibilisierend auf die durch SB415286-Behandlung induzierte Genexpression.

Wnt5a ist ein Ligand des nicht-kanonischen Signaltransduktionswegs. Mechanische Stimulation und die Behandlung mit SB415286 regulierte die relative Expression dieses Gens hoch. Die Behandlung mit SB415286 erhöhte die mechanisch induzierte Genexpression.

Der Rezeptor Fzd2 ist sowohl am kanonischen als auch am nicht-kanonischen Signaltransduktionsweg beteiligt. Die relative Expression dieses Gens wurde durch mechanische Stimulation und Behandlung mit SB415286 hochreguliert (Abbildung

3.13). Es konnte jedoch kein sensibilisierender Effekt der SB415286-Behandlung auf die mechanisch induzierte Genexpression nachgewiesen werden.

Die relative Genexpression von Ror2, ein Rezeptor des nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs, wurde durch mechanische Stimulation und SB415286-Behandlung hochreguliert. Die SB415286-Behandlung erhöhte die mechanisch induzierte Genexpression.

Schließlich wurde die Genexpression der Histon-Methyltransferase Setdb1 untersucht (Abbildung 3.13). Die relative Expression dieses Gens wurde durch mechanische Stimulation und SB415286-Behandlung hochreguliert. Die mechanische Stimulation hemmte die durch SB415286-Behandlung induzierte Genexpression leicht.

Die Proteinexpression von Cebpα und Pparγ wurde durch Behandlung mit dem SB415286 (SB) zu dem untersuchten Zeitpunkt herunter reguliert, jedoch nicht durch mechanische Stimulation (S) (Abbildung 3.14). Die zusätzliche mechanische Stimulation hatte keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt der SB415286-Behandlung.

Die Proteinexpression von Runx2 und Cyr61 wurde durch mechanische Stimulation (S) und Behandlung mit dem SB415286 (SB) hochreguliert (Abbildung 3.14). Für die Proteinexpression von Cox-2 konnte dies zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Aber diese wurde durch mechanische Stimulation und gleichzeitige SB415286-Behandlung deutlich erhöht. Auch die mechanisch induzierte Proteinexpression von Cyr61 wurde durch Behandlung mit SB415286 erhöht. Auf die durch SB415286-Behandlung stark erhöhte Proteinexpression von Runx2 hatte zusätzliche mechanische Stimulation keinen Einfluss.

Die Proteinexpression des aktiven β-Catenins wurde durch mechanische Stimulation und Behandlung mit SB415286 erhöht, während die Proteinexpression des Gesamt-β-Catenins unverändert geblieben zu sein schien (Abbildung 3.15). Die Behandlung mit SB415286 hatte zu diesem Zeitpunkt jedoch keinen sensibilisierenden Einfluss auf die mechanisch induzierte Proteinexpression.



Abbildung 3.12: Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression von adipogenen und mit der Osteogenese assoziierten Markergenen in C3H10T1/2-Zellen (*Real-Time* RT-PCR). Dargestellt ist die zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolllinie = 1) relative Genexpression des osteogenen Markers Runx2 sowie der mit der Osteogenese assoziierten Marker Cox-2 und Cyr61 sowie der adipogenen Marker Cebp α und Ppar γ nach mechanischer Stimulation (S) und Behandlung mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB). Die Zellen wurden 5 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Währenddessen wurden die Zellen täglich mechanisch stimuliert (30 min, 2%, 1 Hz) und dem Medium 20 µM SB415286 zugesetzt. Die Normalisierung erfolgte durch den Bezug auf die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 6-8, [#] p ≤ 0,05: Behandlung vs. Kontrolle (K = 1; Mann-Whitney-U-Test), * p ≤ 0,05: S bzw. SB vs. S + SB (-S, +S; Mann-Whitney-U-Test).

Ergebnisse



Abbildung 3.13: Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression von Genen, die an Signalwegen beteiligt sind, die die Adipogenese und Osteoblastogenese in C3H10T1/2-Zellen beeinflussen (*Real-Time* RT-PCR). Dargestellt ist die zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolllinie = 1) relative Genexpression der Wnt-Liganden Wnt10b und Wnt5a, der Wnt-Rezeptoren Fzd2 und Ror2 sowie von der Methyltransferase Setdb1 nach mechanischer Stimulation (S) und Behandlung mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 (SB). Die Zellen wurden 5 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Währenddessen wurden die Zellen täglich mechanisch stimuliert (30 min, 2%, 1 Hz) und dem Medium 20 µM SB415286 zugesetzt. Die Normalisierung erfolgte durch den Bezug auf die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. n = 6-8, [#] p ≤ 0,05: Behandlung vs. Kontrolle (K = 1; Mann-Whitney-U-Test), * p ≤ 0,05: S bzw. SB vs. S + SB (-S, +S; Mann-Whitney-U-Test).



Abbildung 3.14: Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Proteinexpression adipogener und mit der Osteogenese assoziierter Marker in C3H10T1/2-Zellen (*Western Blotting*). Dargestellt ist die Proteinexpression der adipogenen Marker Cebpα (28 kDa) und Pparγ (58 kDa) sowie des osteogenen Markers Runx2 (62 kDa) und der mit der Osteogenese assoziierten Marker Cox-2 (70 kDa) und Cyr61 (42 kDa) nach mechanischer Stimulation (S; an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, 30 min, 1 Hz, 2%) und nach Behandlung mit 20 μM SB415286 (SB). Gapdh (37 kDa) diente als *Housekeeping*-Protein.



Abbildung 3.15: Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression von β-Catenin und dessen Phosphorylierungsstatus (*Western Blotting***). Dargestellt ist die Proteinexpression vom aktiven (dephosphoryliert an Serin 37 und Threonin 41) und Gesamt-β-Catenin (92 kDa) nach mechanischer Stimulation (S; an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, 30 min, 1 Hz, 2%) und nach Behandlung mit 20 µM SB415286 (SB). Gapdh (37 kDa) diente als** *Housekeeping***-Protein.**

3.3.3 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf den Methylierungsstatus des Pparγ-Promotors unter adipogenen Bedingungen

Die Hemmung der Transkription von Ppary durch DNA-Methylierung ist ein Mechanismus, durch den die Adipogenese gehemmt wird. Um den Methylierungsstatus des Pparγ-Promotors nach mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs mit SB415286 zu untersuchen, wurde nach der Bisulfitmodifizierung eine methylierungsspezifische PCR (MSP) und eine Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP) durchgeführt.

Mittels MSP, bei der die Primer spezifisch an methylierte CG-Dinukleotide (MF/MR-Primerpaar) bzw. an die entsprechenden nicht-methylierten CG-Dinukleotide (UF/UR-Primerpaar) banden, konnte keine Erhöhung des Methylierungsstatus durch mechanische Belastung (S) und Behandlung mit SB415286 (SB) im Vergleich zur Behandlungskontrolle (K) nachgewiesen werden (Abbildung 3.16).



Abbildung 3.16: Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf den Methylierungsstatus der CG-Dinukleotide in der Erkennungssequenz des MF/MR- bzw. UF/UR-Primerpaars (MSP). Nach mechanischer Stimulation (S; an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, 30 min, 1 Hz, 2%) und nach Behandlung mit 20 μM SB415286 (SB) wurde die genomische DNA bisulfitmodifiziert und mit dem methylierungsspezifischen Primerpaar MF/MR bzw. dem entsprechenden Primerpaar UF/UR für die nicht methylierte Sequenz amplifiziert. Dargestellt ist die Agarosegelelektrophorese mit 10 μl Aliquots der MSP-Reaktionen von den Kontrollansätzen (K), den mechanisch stimulierten (S) und mit SB415286 behandelten (SB) Ansätzen sowie von der Negativkontrolle der MSP (N). Gapdh diente als *Housekeeping*-Gen.

Um den Methylierungsstatus einer größeren Anzahl an CG-Dinukleotiden untersuchen zu können, wurde die BSP durchgeführt, bei der die Primererkennungssequenzen außerhalb einer CpG-Insel liegen und somit die gesamte CpG-Insel untersucht werden kann. Die Amplifikate wurden anschließend kloniert und sequenziert. Die Sequenzen aus der Sequenzierung wurden mit der entsprechenden Sequenz aus der NCBI Genome Datenbank, bei der mittels MethPrimer die Bisulfitmodifikation der vollständig methylierten DNA simuliert wurde, verglichen (Abbildung 3.17). Auch mittels BSP konnte keine Erhöhung des Methylierungsstatus durch die Behandlung mit SB415286 (SB) im Vergleich zur Behandlungskontrolle (K) nachgewiesen werden.

A: Sequenz aus NCBI Genome Datenbank (NT_039353.8), simulierte Bisulfitmodifikation der vollständig methylierten DNA mit MethPrimer

84.558.007	CGGGATTTTT	TTGGGT <mark>CG</mark> TT	TTTTAG <mark>CG</mark> GT	TGTGAGGAGT	AAGG <mark>CG</mark> GTTA
84.558.057	GGTAATTAG <mark>C</mark>	GTA <mark>CG</mark> GCGTC	GGGCGCGGGA	GGGTTA <mark>CGCG</mark>	GGTTT <mark>CG</mark> TGG
84.558.107	G <mark>CG</mark> T <mark>CG</mark> GTTT	T <mark>CG</mark> GGTG <mark>CG</mark> G	G <mark>CGCG</mark> GGGTT	TT <mark>CG</mark> GTTTTA	TTTTGGGTAT
84.558.157	CGTTTTTCCG	T <mark>CG</mark> GT <mark>CG</mark> GGT	GGTT <mark>CG</mark> GTT <mark>C</mark>	GTTTTTTT <mark>CG</mark>	GTT <mark>CGCG</mark> GT <mark>C</mark>
84.558.207	<mark>G</mark> GTTAGG <mark>CG</mark> G	GGTT <mark>CG</mark> T <mark>CG</mark> T	ATTTAGAG <mark>CG</mark>	GTAGT <mark>CG</mark> TTT	GGGG <mark>CG</mark> TT <mark>CG</mark>
84.558.257	GGT <mark>CG</mark> GGT <mark>CG</mark>	GTTTTAT <mark>CG</mark> A	<mark>CG</mark> TATAGTAT	T <mark>CG</mark> TTAAGT <mark>C</mark>	GTCGTTTTAG
84.558.307	GTTAGAGT <mark>CG</mark>	TTT <mark>CG</mark> GGTTA	CGCG <mark>GTT</mark> CGT	CGGAGGGACG	<mark>CG</mark> GAAGAAGA
84.558.357	<u>GA</u> TTTGGG <mark>C</mark>	GTTGCCTTGG	GGTATTGGGT	CGCGCG TAGT	TTGAGGGGAT
84.558.407	<mark>CG</mark> AGTGTGA <mark>C</mark>	<mark>G</mark> ATAAGGTGA	T <mark>CG</mark> GGTTGAG	GGGA <mark>CG</mark> GGT	

56 methylierbare CG-Dinukleotide

B: Kontrolle, Ansatz 1

84.558.007	CGGGATTTTT	TTGGGT <mark>TG</mark> TT	TTTTAG <mark>TG</mark> GT	TGTGAGGAGT	GAGG <mark>TG</mark> GTTA
84.558.057	GGTAATTAG <mark>T</mark>	GTA <mark>TG</mark> G <mark>TG</mark> TT	GGGTGTGGGA	GGGTTA <mark>TGTG</mark>	GGTTT <mark>TG</mark> TGG
84.558.107	G <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> GTTT	T <mark>TG</mark> GGTG <mark>TG</mark> G	G <mark>TGTG</mark> GGGTT	TT <mark>TG</mark> GTTTTA	TTTTGGGTAT
84.558.157	TGTTTT <mark>TG</mark> GT	T <mark>TG</mark> GT <mark>TG</mark> GGT	GGTT <mark>TG</mark> GTT <mark>T</mark>	G GTTTTTTT TG	GTT <mark>TGTG</mark> GT <mark>G</mark>
84.558.207	<mark>G</mark> GTTAGG <mark>TG</mark> G	GGCT <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> T	ATTTAGAG <mark>TG</mark>	GTAGT <mark>TG</mark> TTT	GGG <mark>TG</mark> TT <mark>CG</mark>
84.558.257	GGT <mark>TG</mark> GGT <mark>TG</mark>	GTCTTAT <mark>TG</mark> A	TGTATAGTAT	T <mark>TG</mark> TTAAGT <mark>T</mark>	G TTGTTTAG
84.558.307	GTTAGAGT <mark>TG</mark>	TTT <mark>TG</mark> GGTTA	TGTGGTTTGT	TGGAGGGA <mark>TG</mark>	TGGAAGAAGA
84.558.357	GATTTGGG <mark>T</mark>	GTTGTGTGTTGG	GGTATTGGGT	TGTGTG TAGT	TTGAGGGGAT
84.558.407	<mark>TG</mark> AGTGTGA <mark>T</mark>	<mark>G</mark> ATAAGGTGA	T <mark>TG</mark> GGTTGAG	GGGA <mark>TG</mark> GGT	

3 methylierte von 56 methylierbaren CG-Dinukleotiden

C: Kontrolle, Ansatz 2

84.558.007	TGGGATTTTT	T GGGT <mark>TG</mark> TT	TTTTAG <mark>TG</mark> GT	TGTGAGGAGC	AAGG <mark>TG</mark> GTTA
84.558.057	G <u>GTAAT</u> TAG <mark>T</mark>	GTA <mark>TG</mark> G <mark>TG</mark> TT	GGGTGTGGGA	GG <u>GT</u> CA <mark>CG</mark> TG	GGTTT <mark>TG</mark> TGG
84.558.107	G <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> GTTT	T <mark>TG</mark> GGTG <mark>TG</mark> G	G <mark>TGTG</mark> GGGTT	TT <mark>TG</mark> GTTT <u>TA</u>	TTT <u>TGGG</u> TAT
84.558.157	TGTTTT <mark>TG</mark> GT	T <mark>TG</mark> GT <mark>TG</mark> GGT	GGTT <mark>TG</mark> GTT <mark>T</mark>	GGTTTTTTT <mark>TG</mark>	GTT <mark>TGTG</mark> GT <mark>G</mark>
84.558.207	GTTAGGTGG	GGTT <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> T	<u>AT</u> TTAGAG <mark>TG</mark>	GTAGT <mark>TG</mark> CTT	<u>GGGG<mark>TG</mark>TT<mark>TG</mark></u>
84.558.257	GGT <mark>TG</mark> GGT <mark>TG</mark>	GTC <u>TT</u> AT <mark>TG</mark> A	TGTATAGTAT	T <mark>TG</mark> TTAAGT <mark>T</mark>	GTTGTTTTAG
84.558.307	GTTAGAGT <mark>TG</mark>	TTT <mark>TG</mark> GGTTA	TGTGGTT <mark>TG</mark> T	TGGAGGGA <mark>TG</mark>	<mark>TG</mark> GAAGAAGA
84.558.357	<u>GA</u> TTTGGGG	GTTG <mark>TG</mark> TTGG	$G\underline{GT}ATTGGGT$	TGTGTGTGTAGC	TTGAGGGGAT
84.558.407	<mark>TG</mark> AGTGTGA <mark>T</mark>	<mark>G</mark> ATAAGGTGA	T <mark>TG</mark> GGTTGAG	GGGA <mark>TG</mark> GGT	

2 methylierte von 56 methylierbaren CG-Dinukleotiden

D: SB415286, Ansatz 1

84.558.007	TGGGATTTTT	TTGGGT <mark>TG</mark> TT	TTTTAG <mark>TG</mark> GT	TGTGAGGAGT	AAGG <mark>CG</mark> GTTA
84.558.057	GGTAATTAG <mark>T</mark>	GTA <mark>TG</mark> G <mark>TG</mark> CT	GGG <mark>TGTG</mark> GGA	GGGTTA <mark>TGTG</mark>	GGTTT <mark>TG</mark> TGG
84.558.107	G <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> GTTT	C <mark>CG</mark> GGTG <mark>TG</mark> G	G <mark>TGTG</mark> GGGTT	TT <mark>TG</mark> GTTTCA	TTTTGGGTAT
84.558.157	TGTTTT <mark>TG</mark> GT	T <mark>TG</mark> GT <mark>TG</mark> GGT	GGCT <mark>CG</mark> GTT <mark>T</mark>	GGTTTTTTT <mark>TG</mark>	GTT <mark>TGTG</mark> GT <mark>G</mark>
84.558.207	<mark>G</mark> GTTAGG <mark>TG</mark> G	GGCT <mark>TG</mark> C <mark>TG</mark> T	ATTTAGAG <mark>TG</mark>	GTAGT <mark>TG</mark> TTT	GGGG <mark>TG</mark> TT <mark>TG</mark>
84.558.257	GGT <mark>TG</mark> GGT <mark>TG</mark>	GTTTTAT <mark>TG</mark> A	TGTATAGTAT	T <mark>TG</mark> TTAAGT <mark>T</mark>	GTTGTTTTAG
84.558.307	GTTAGAGT <mark>TG</mark>	TTT <mark>TG</mark> GGTTA	TGTGGTT <mark>TG</mark> T	TG <mark>GAGGGA</mark> TG	TG <mark>GAAGAAGA</mark>
84.558.357	GATTTGGGG	GTTG <mark>TG</mark> TTGG	GGTATTGGGT	TGTGTG TAGT	TTGAGGGGAC
84.558.407	<mark>TG</mark> AGTGTGA <mark>C</mark>	<mark>G</mark> ATAAGGTGA	T <mark>TG</mark> GGTTGAG	GGGA <mark>CG</mark> GGT	

6 methylierte von 56 methylierbaren CG-Dinukleotiden

E: SB415286, Ansatz 2

84.558.007	<mark>a</mark> gga tttt	TTGGGT <mark>CG</mark> TT	TTTTAG <mark>TG</mark> GT	TGTGAGGAGT	AAGG <mark>TG</mark> GTTA
84.558.057	GGTAATTAG <mark>T</mark>	GTA <mark>TG</mark> G <mark>TG</mark> TT	GGG <mark>TGTG</mark> GGA	GGGTTA <mark>TGTG</mark>	GGTTT <mark>TG</mark> TGG
84.558.107	G <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> GCTT	C <mark>TG</mark> GGTG <mark>TG</mark> G	G <mark>TG</mark> CGGGGTT	TT <mark>TG</mark> GTTTTA	TTTTGGGTAT
84.558.157	TGTTTT <mark>TG</mark> GT	T <mark>TG</mark> GT <mark>TG</mark> GGT	GG <mark>T</mark> T <mark>TG</mark> GTT <mark>T</mark>	GTTTTTTT <mark>TG</mark>	GTT <mark>TGTG</mark> GT <mark>G</mark>
84.558.207	GTTAGG <mark>TG</mark> G	GG <mark>T</mark> T <mark>TG</mark> T <mark>TG</mark> T	ATTTAGAG <mark>TG</mark>	GTAGT <mark>TG</mark> TTT	GGGG <mark>TG</mark> TT <mark>TG</mark>
84.558.257	GGT <mark>TG</mark> GGT <mark>TG</mark>	GT <mark>T</mark> TTAT <mark>TG</mark> A	TGTATAGTAT	T <mark>TG</mark> TTAAGT <mark>T</mark>	GTTGTTTAG
84.558.307	GTTAGAGT <mark>TG</mark>	TTT <mark>TG</mark> GGTTA	TGTGGTT <mark>TG</mark> T	TG <mark>GAGGGA</mark> TG	<mark>TG</mark> GAAGAAGA
84.558.357	GATTTGGGG	GTTG <mark>TG</mark> TTGG	GGTATTGGGT	TGTGTG TAGT	TTGAGGGGAT
84.558.407	TG <mark>AGTGTGA</mark> T	GATAAGGTGA	T <mark>TG</mark> GGTTGAG	GGGA <mark>TG</mark> GGT	

3 methylierte von 56 methylierbaren CG-Dinukleotiden

: methyliert / ____: nicht methyliert

Abbildung 3.17: Einfluss der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf den Methylierungsstatus der CG-Dinukleotide in den Amplifikaten der BSP. Nach Behandlung mit 20 µM SB415286 (SB) wurde die genomische DNA bisulfitmodifiziert und mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden anschließend kloniert und sequenziert. Dargestellt ist die Sequenz aus der NCBI Genome Datenbank, bei der mittels MethPrimer die Bisulfitmodifikation der vollständig methylierten DNA simuliert wurde (A), die Sequenzen der bisulfitmodifizierten DNA aus den Kontrollansätzen 1 und 2 (B, C) und die Sequenzen der bisulfitmodifizierten DNA aus den mit SB415286 behandelten Ansätzen 1 und 2 (D, E). Die methylierten CG-Dinukleotide sind grün dargestellt, die nicht-methylierten rot.

3.3.4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass mechanische Stimulation und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSCs) beeinflussen und dabei interagieren. Sowohl die Wnt/β-Catenin-Aktivierung als auch die mechanische Stimulation hemmten die Adipogenese und förderten gleichzeitig Prozesse, die an der Osteoblastogenese beteiligt sind. Die Behandlung mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 wirkte hierbei sensibilisierend auf die mechanisch verminderte Expression adipogener Marker und auf die mechanisch induzierte Expression von mit der Osteogenese assoziierten Markern.

Es wurde vermutet, dass ein Mechanismus der Adipogenesehemmung die Inhibierung der Pparγ-Aktivität durch DNA-Methylierung sei. Dieser Mechanismus konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation in Mäusen

In dieser Studie wurde zum ersten Mal *in vivo* der Einfluss der Aktivierung des Östrogenrezeptor (ER)-Signaltransduktionswegs und der gleichzeitigen Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation untersucht. Die rechte Ulna von 16 Wochen alten, weiblichen CD1-Mäusen wurde axial belastet. Hierfür wurde das nicht invasive Belastungsmodell von Lee et al. verwendet (Lee et al. 2002). Zur Untersuchung der Mechanotransduktion unter Östrogenmangel wurden die Mäuse im Alter von 12 Wochen ovarektomiert. Die ovarektomierte Maus ist ein anerkanntes Tiermodell zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose (Turner 1999). Denn die Ovarektomie führt bei Mäusen zum Absinken des Östrogenspiegels im Körper wie es auch während der Menopause beim Menschen, wenn die Ovarien ihre Funktion einstellen, der Fall ist.

Der ER- und der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg sind beide an der mechanisch induzierten Knochenformation beteiligt (Lee et al. 2004, Sawakami et al. 2006). In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Östrogen und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zu einer erhöhten Mechanosensitivität des Knochens führen können, während Östrogenmangel und die Inhibierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zu Osteoporose führen können (Frost 1987, Gong et al. 2001, Robinson et al. 2006). Studie In der vorliegenden wurden jedoch erstmals beide Signaltransduktionswege gleichzeitig aktiviert und deren gemeinsamer Einfluss auf die mechanisch induzierte Knochenformation untersucht. Hierfür wurde ein Östrogenpellet implantiert und ein Gsk-3^β-Inhibitor injiziert.

4.1.1 Einfluss von mechanischer Belastung auf die Knochenformation

Das in dieser Studie verwendete, nicht invasive Belastungsmodell, bei dem die Ulna der Maus dynamisch, axial belastet wurde, wurde von Lee et al. (Lee et al. 2002) etabliert und in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe bereits angewendet (Liedert et al. 2011). Die Vorteile nicht invasiver gegenüber invasiven Belastungsmodellen (Chambers et al. 1993, Lanyon and Rubin 1984) sind die einfa-

chere Durchführbarkeit und die Vermeidung einer Weichgewebsverletzung sowie der Induktion einer inflammatorischen Antwort (McBride and Silva 2012). Die axiale Belastung gilt als "Goldener Standard" zur Untersuchung der mechanisch induzierten, kortikalen Knochenformation in Mäusen und Ratten. Sie ahmt physiologische Belastungen nach, indem die Ulna entlang ihrer natürlichen Krümmung gebogen wird (Lee et al. 2002, Torrance et al. 1994). Dabei kommt es medial zur Kompression und lateral zur Dehnung, wodurch medial und lateral eine periostale Knochenformation induziert wird. Bei starker mechanischer Belastung (3000 $\mu\epsilon$) beobachteten Lee et al. zusätzlich eine endostale Knochenformation (Lee et al. 2002).

Die erzeugte periostale Knochenformation war in der vorliegenden Studie 2 mm distal von der Knochenmitte am stärksten. Die Stärke der mechanisch induzierten Knochenformation wird neben der Anatomie der Ulna (Lu et al. 2012) durch 3 unabhängige Parameter bestimmt: die aufgebrachte Kraft, die verwendete Frequenz und die Anzahl der Belastungszyklen (McBride and Silva 2012).

Die Kompression und die Dehnung, die unter dem Oberbegriff "strain" zusammengefasst werden können, nehmen linear mit zunehmender aufgebrachter Kraft zu. Sowohl für die Kompression als auch für die Dehnung gibt es einen unteren Grenzwert, unter dem keine Knochenformation induziert wird (Rubin and Lanyon 1985). Dieser Grenzwert wird durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Spezies, Alter oder Geschlecht beeinflusst. Im Bereich zwischen 1.200 und 2.000 microstrain (µɛ) wurde lamellarer Knochenzuwachs beobachtet (Hsieh et al. 2001, Saxon and Lanyon 2008). Für die Kompression und Dehnung gibt es aber auch einen oberen Grenzwert, der wie der untere Grenzwert durch mehrere Faktoren beeinflusst wird und über dem Geflechtknochen gebildet wird. Geflechtknochen kann schneller als Lamellenknochen gebildet werden, allerdings auf Kosten der Knochenqualität. Denn in der Knochenmatrix des Geflechtknochens sind die Kollagenfasern nicht parallel ausgerichtet, wodurch er weniger belastungsfähig ist. In dieser Studie wurde eine Kalibrierung durchgeführt, bei der mit Hilfe von Dehnmessstreifen ermittelt wurde, dass die axiale Belastung mit einer Kraft von 2,5 N an der medialen Seite der Ulnamitte eine Kompression von -2.000 bis -3.000 µɛ ergab. In der Literatur ist für dieses Belastungsmodell der Mausulna ein beobachteter, mechanisch induzierter Knochenzuwachs von 3 mm proximal von der Knochenmitte bis 4 mm distal von der Knochenmitte beschrieben (Lee et al. 2002). In der vorliegenden Studie wurde anhand der µCT-Aufnahmen der Bereich 2 mm distal von der Ulnamitte als der Bereich mit dem größten mechanisch induzierten Knochenzuwachs detektiert. Die mechanische Belastung induzierte medial und lateral einen lamellaren Knochenzuwachs (Abbildung 3.3). Dies stimmte mit den Beobachtungen von Lee et al. überein (Lee et al. 2002). Der gleichzeitig induzierte, endostale Zuwachs deutete jedoch darauf hin, dass die mechanische Belastung Kompressionen und Dehnungen nahe dem oberen Grenzwert erzeugte.

Neben dem Einfluss der aufgebrachten Last steigt die Antwort des Knochens auf dynamische Belastung ebenso mit zunehmender Frequenz (McBride and Silva 2012). Unter 1 Hz ist die Antwort auf mechanische Belastung sehr gering. Darüber steigt sie bis zu einem Grenzwert von 10-20 Hz an. Die in der vorliegenden Studie verwendete Frequenz von 2 Hz liegt in dem in der Literatur vorwiegend genutzten Bereich zwischen 2 und 4 Hz, für den gezeigt wurde, dass er der in Ratten gemessenen Schrittfrequenz entspricht (Mosley et al. 1997).

Der letzte Parameter, der die mechanisch induzierte Knochenformation beeinflusst, ist die Anzahl der Belastungszyklen (McBride and Silva 2012). Rubin et al. zeigten, dass bereits 36 Belastungszyklen ausreichten, um eine Knochenformation zu induzieren und die Erhöhung der Zyklusanzahl die Knochenformation nicht weiter erhöhte (Rubin and Lanyon 1985). Dies deutet darauf hin, dass die Knochenzellen recht schnell für mechanische Reize desensibilisiert werden. Deshalb und wegen der bereits erfolgreichen Anwendung von 120 Belastungszyklen pro Tag in einer anderen Studie aus unserer Arbeitsgruppe (Liedert et al. 2011) wurde in dieser Studie ebenfalls diese relativ geringe Anzahl an Belastungszyklen als ausreichend erachtet.

4.1.2 Einfluss von Östrogen auf die mechanisch induzierte Knochenformation

Der ER-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion. Die Rolle von Östrogen hierbei ist jedoch bis heute nicht vollständig verstanden. Zur Untersuchung des Einflusses des ER-Signaltransduktionswegs auf die Mechanotransduktion unter Östrogenmangel wurden die Mäuse 4 Wochen vor der mechanischen Stimulation und 6 Wochen vor der Tötung ovarektomiert. Durch die Ovarektomie (OVX) sollte der Östrogenspiegel im Blut weitestgehend verringert werden. Hierbei sollte der so erzeugte Östrogenmangel jedoch nicht zu einer messbaren Verringerung der Knochenmasse und Verschlechterung der Knochenstruktur führen, weil eine Veränderung dieser beiden Parameter durch die Ovarektomie den mechanisch induzierten Knochenzuwachs maßgeblich beeinflussen würde und somit ein Vergleich der Ergebnisse aus der OVX-Gruppe mit denen aus der Sham-Gruppe nicht mehr möglich gewesen wäre.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass 4 Wochen nach OVX der Östrogenspiegel im Blut deutlich reduziert und der Uterus atrophiert war, dieser reduzierte Östrogenspiegel aber noch keinen signifikanten Einfluss auf die Knochenmasse und -struktur hatte (Abbildung 3.1). Nach der zweiwöchigen mechanischen Stimulation und damit 6 Wochen nach der Ovarektomie, war der Östrogenspiegel, wie bereits nach 4 Wochen, reduziert und der Uterus atrophiert (Abbildung 3.2). Der Östrogenmangel hatte nach 6 Wochen nun aber auch signifikante Auswirkungen auf den Knochen. Die kortikale Dicke der nicht mechanisch belasteten Ulna wurde durch endostale Resorption signifikant vermindert. Außerdem waren weniger Trabekel im fünften Lendenwirbelkörper vorhanden. Die Trabekeldicke war jedoch 6 Wochen nach Ovarektomie noch nicht signifikant reduziert. Riggs et al. beschrieben in ihrem 2002 veröffentlichen Review zwei Phasen des durch Östrogenmangel induzierten Knochenabbaus (Riggs et al. 2002): In der ersten schnellen Phase zeigen sich vor allem die Auswirkungen der erhöhten Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Am kortikalen Knochen wird endostal verstärkt Knochen abgebaut. Trabekulär führt die erhöhte Resorptionstiefe zur Perforation der Trabekel und somit zu einer verminderten Konnektivität. In der späteren langsamen Phase hingegen zeigen sich dann die Auswirkungen der gestörten Osteoblastenaktivität und der damit einhergehenden verminderten Formation durch eine Verminderung der Trabekeldicke. Da die Trabekeldicke in der vorliegenden Studie 6 Wochen nach Ovarektomie im fünften Lendenwirbelkörper noch nicht vermindert war, überwog vermutlich zu diesem Zeitpunkt noch die durch die erhöhte Resorptionsaktivität der Osteoklasten verursachte Perforation der Trabekel. Ohne mechanische Belastung wurde die Knochenmasse also innerhalb von 6 Wochen leicht vermindert, vermutlich vor allem durch eine erhöhte Knochenresorptionsaktivität der Osteoklasten. Für die erhöhte Osteoklastenbildung und -aktivität bei Östrogenmangel gibt es zahlreiche Belege in der Literatur (Eghbali-Fatourechi et al. 2003, Emerton et al. 2010, Martin-Millan et al. 2010, Nakamura et al. 2007, Shevde et al. 2000).

In der mechanisch belasteten Ulna hingegen wurde keine Verminderung der Knochenmasse beobachtet, sondern hier kam es, genauso wie bei den *Sham*-Mäusen, zu einem mechanisch induzierten Knochenzuwachs in der Ulna (Tabelle 3.3 und 3.4, Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). Der durch die Ovarektomie induzierte Östrogenman-

gel hatte also keinen Einfluss auf den mechanisch induzierten, kortikalen Knochenzuwachs in der Ulna 2mm distal von der Knochenmitte. Dies war neben der oben beschriebenen unveränderten Trabekeldicke ein weiteres Indiz dafür, dass der Östrogenmangel die Knochenformationsaktivität der Osteoblasten zu diesem Zeitpunkt nach der Ovarektomie nicht negativ beeinflusst hatte. Im Gegenteil, die Ergebnisse zur Bestimmung der Knochenformationsrate zeigten einen minimalen, aber signifikanten Anstieg der periostalen Knochenformationsrate durch die Ovarektomie in der nicht mechanisch belasteten Ulna (Abbildung 3.4). Garnero et al. zeigten, dass bei Frauen in der Menopause der Östrogenmangel nicht nur Knochenresorptionsmarker, sondern auch Knochenformationsmarker erhöhte (Garnero et al. 1996). Aber die Erhöhung der Knochenformationsmarker war deutlich geringer. Deshalb kommt es unter Östrogenmangel zu einem Netto-Knochenabbau. Auch bei ovarektomierten Ratten wurde gezeigt, dass der so induzierte Östrogenmangel wie während der Menopause der Frau zu einer leicht erhöhten Knochenformation führte (Miller et al. 1991, Turner, Vandersteenhoven and Bell 1987, Wronski et al. 1989).

Durch die Implantation eines Östrogenpellets 4 Wochen nach der Ovarektomie und damit 2 Wochen vor Versuchsende wurde den Mäusen eine Östrogenmenge verabreicht, die, wie die Bestimmung der Östrogenkonzentration im Serum zeigte, die endogen zirkulierende Menge an Östrogen in den Sham-Mäusen deutlich überschritt (Abbildung 3.2). Das exogene Östrogen induzierte in den Sham- und OVX-Mäusen eine endostale Knochenformation (Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). Außerdem erhöhte das exogene Östrogen die endostale Knochenformation zusätzlich zu der mechanisch induzierten in den Sham- und OVX-Mäusen. In der Literatur wurde schon mehrfach beschrieben, dass eine Behandlung mit Östrogen additiv und unabhängig zu mechanischer Belastung auf die Knochenmasse wirkte (Li et al. 2003, Pajamäki et al. 2008, Yeh, Aloia and Barilla 1994, Yeh, Liu and Aloia 1993). Li et al. zeigten in 6 Monate alten, ovarektomierten Ratten, dass Östrogen und mechanische Belastung einen additiven Effekt bei der Verminderung des Knochen-remodellings im lumbalen Wirbelkörper und im Femurhals hatten (Li et al. 2003). Zusätzlich konnten die Autoren aber auch einen additiven und unabhängigen Effekt der beiden Behandlungen auf die kortikale Fläche im Femurhals nachweisen. Denn während Östrogen die endostale Resorption hemmte, förderte mechanische Belastung die periostale Formation. Ihre Wirkung war also räumlich spezifisch. Pajamäki et al. zeigten in 11 Wochen alten, weiblichen Ratten, dass die

Wirkung des körpereigenen Östrogens und der mechanischen Belastung durch körperliche Bewegung im trabekulären Knochen strukturell unterschiedlich und somit bei gleichzeitiger Anwendung additiv war (Pajamäki et al. 2008). Anders als in der vorliegenden Studie, beschrieb jedoch keiner der Autoren eine Induktion der endostalen Knochenformation durch Östrogen oder durch mechanische Belastung. Diese Reaktion des Knochens wurde in anderen Studien als ein Zeichen für eine Überstimulation mit einer unphysiologisch hohen Menge an Östrogen oder mit einer an Überlastung grenzenden mechanischen Belastung beschrieben (Lee et al. 2002, Turner 1999).

Die periostale, mechanisch induzierte Knochenformation wurde durch die Implantation des Östrogenpellets in Sham- und OVX-Mäusen unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). Nur in den OVX-Mäusen erhöhte das exogene Östrogen die periostale, mechanisch induzierte Knochenformation. Der durch die Ovarektomie induzierte Östrogenmangel schien also die knochenbildenden Zellen für eine Behandlung mit Östrogen sensibilisiert zu haben. Die Rolle von Östrogen sowie des Östrogenrezeptors (ER) bei der Mechanotransduktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei der mechanisch induzierten, periostalen Knochenformation wurde für Östrogen ein aktivierender, inhibierender oder gar kein Einfluss beschrieben. Cheng et al. zeigten anhand eines Organkultursystems der Ulna von 5 Wochen alten Ratten, dass sowohl mechanische Belastung als auch Östrogen die Proliferation und Aktivität periostaler Osteoblasten stimulierten und das Östrogen den mechanischen Effekt erhöhte (Cheng et al. 1996). Windahl et al. hingegen zeigten, dass in 17 Wochen alten Mäusen ERa bei der Mechanotransduktion unabhängig von Östrogen agierte (Windahl et al. 2013). Die periostale Knochenformationsrate in der Tibia war in Sham- und OVX-Mäusen nach mechanischer Belastung ähnlich erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten Sample et al. durch axiale Belastung der Ulna von ovarektomierten, 17 Wochen alten Ratten, dass physiologische Mengen an Östrogen die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation hemmten (Sample et al. 2012). Für diese kontroversen Ergebnisse gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Es hat zum Beispiel einen Einfluss, ob ein Experiment in vitro oder in vivo durchgeführt wurde. Genauso haben aber auch das Tiermodell, der Genotyp, der Knochentyp, das Belastungsmodell, die Applikationsart und Dosierung des Östrogens sowie das Alter der Tiere einen Einfluss. Aber der Hauptgrund für diese kontroversen Ergebnisse ist vermutlich der Zeitpunkt der Östrogenapplikation nach der Ovarektomie. In der vorliegenden Studie wurde das Östrogenpellet 4 Wochen nach der Ovarektomie implantiert. In den Studien, in denen Östrogen inhibierend auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation wirkte, wurde es direkt nach der Ovarektomie appliziert (Jagger, Chow and Chambers 1996, Sample et al. 2012). In der vorliegenden Studie war also vermutlich ein vorausgehender Östrogenmangel für den fördernden Effekt des exogenen Östrogens auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation nötig. Es ist bekannt, dass Östrogen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten hemmt und damit die Osteoblastenanzahl verringert (Jagger et al. 1996, Jilka et al. 1998, Yokose et al. 1996, Yu et al. 2012). Die mechanisch induzierte Aktivität reifer Osteoblasten hingegen wird durch Östrogenapplikation erhöht (Jagger et al. 1996). So könnte in der vorliegenden Studie zunächst der durch die Ovarektomie erzeugte Östrogenmangel die Anzahl reifer Osteoblasten durch vermehrte Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen erhöht haben. Anschließend könnte dann die spätere Östrogenapplikation die mechanisch induzierte Aktivität der nun in höherer Anzahl vorhandenen reifen Osteoblasten erhöht haben.

Die Wirkung von Östrogen wird durch die beiden Östrogenrezeptorisoformen ERa und ERß vermittelt (Brzozowski et al. 1997, Walter et al. 1985). In den Osteoblasten und Osteozyten an der periostalen Knochenoberfläche wird vor allem ERα exprimiert (Bord et al. 2001). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von Östrogen auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation vermutlich auch vor allem durch ERa vermittelt. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkungsweise von Östrogen in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Osteoblasten lieferten Bodine et al. (Bodine et al. 1998). Sie zeigten, dass ERα in reifen Osteoblasten am stärksten exprimiert war. Außerdem zeigten sie, dass Östrogen in der frühen Phase der Osteoblastenreifung die Expression von Alkalischer Phosphatase, Osteocalcin, Osteonectin und ERα-mRNA hemmte, aber diese im späten Mineralisierungsstadium der Osteoblasten, zu dem Zeitpunkt, an dem ERa am stärksten exprimiert war, förderte. So scheint also ERa bei der Mechanotransduktion zwar unabhängig von Östrogen agieren zu können (Windahl et al. 2013), aber Östrogen scheint reife, mineralisierende Osteoblasten und Osteozyten für mechanische Reize zu sensibilisieren, indem es die Expression von ERα erhöht (Bodine et al. 1998, Zaman et al. 2006).

In der vorliegenden Studie wurde in OVX-Mäusen bei zusätzlicher Östrogenapplikation zur mechanischen Belastung an der periostalen Knochenoberfläche

Geflechtknochen statt lamellarem Knochen gebildet (Abbildung 3.3). Bei Geflechtknochenbildung nach mechanischer Belastung wird in der Literatur allgemein von einer destruktiven Überbelastung des Knochens ausgegangen, bei der es durch die mechanische Belastung zu Mikrofrakturen kommt (McBride and Silva 2012). Der Geflechtknochen ist hierbei mit einem Frakturkallus vergleichbar. Aber in der vorliegenden Studie wurde weder bei den Sham- noch bei den OVX-Mäusen durch die mechanische Belastung alleine die Geflechtknochenbildung als Zeichen einer destruktiven Belastung beobachtet. Allerdings deuteten sowohl die mechanisch induzierte endostale Knochenformation als auch die hohe periostale Knochenformationsrate darauf hin, dass die in dieser Studie aufgebrachte Last recht hoch war (Lee et al. 2002). Östrogen scheint in den OVX-Mäusen die ohnehin schon mechanisch stark induzierten knochenbildenden Zellen zusätzlich für mechanischen Reiz sensibilisiert zu haben. sodass den es zur Geflechtknochenbildung kam. Die Bildung von Geflechtknochen ermöglicht dem Knochen eine viel schnellere Reaktion auf plötzlich auftretende, starke mechanische Belastungen als die Bildung von lamellarem Knochen. Diese stark sensibilisierende Wirkung von Östrogen auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation wurde so in der Literatur noch nicht beschrieben.

4.1.3 Einfluss der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB415286 hatte einen sehr geringen Einfluss auf die Knochenformation, indem keine endostale und eine kaum messbare, aber zumindest in den *Sham*-Mäusen signifikante, periostale Knochenformation induziert wurde (Abbildung 3.4). Dieser geringe Effekt war zunächst überraschend, da der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg wichtig für die Knochenhomöostase ist. Er ist an der Re-krutierung, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beteiligt (Baron and Rawadi 2007, Yavropoulou and Yovos 2007) und kontrolliert indirekt die Differenzierung der Osteoklasten, indem er die Osteoblasten und Osteozyten beeinflusst (Baron and Rawadi 2007, Kramer et al. 2010). Der Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator SB415286 inhibiert die GSK-3 β sehr spezifisch durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle (Coghlan et al. 2000). Robinson et al. zeigten in den Kalvarien von Mäusen, dass dieser Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator bei lokaler Applikation die Expression von β -Catenin signifikant erhöhte (Robinson et al. 2006). Dadurch

nahmen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die MAR (mineral apposition rate) und die Dicke der Kalvarien zu. Die Autoren schlossen daraus, dass die Osteoblastenaktivität und somit die Knochenformation erhöht worden war. In einem weiteren Versuch applizierten sie den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator systemisch, um seinen Einfluss auf die mechanisch induzierte Genexpression von Wnt/β-Catenin-Zielgenen in der Tibia zu untersuchen. Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator erhöhte die mechanisch induzierte Genexpression, alleine hatte er jedoch keinen Einfluss auf die Genexpression. Die Autoren vermuteten, dass die Dosis zu gering war, um eine Genantwort zu induzieren. In der vorliegenden Studie hingegen induzierte der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator bei systemischer Applikation eine gerade noch anhand der Knochenformationsrate bestimmbare periostale Knochenformation. Warum konnten Robinson et al. dann keine Genantwort auf die systemische Applikation des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator detektieren, die doch der Knochenformation vorausgeht? Die Diskrepanz zwischen den beiden Studien lässt sich vermutlich durch die unterschiedlichen Versuchsabläufe erklären. Robinson et al. belasteten die Tibia einmalig durch 4-Punkt-Biegung, nachdem sie den Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivator 14 Tage lang, zweimal täglich injiziert hatten. In der vorliegenden Studie wurde der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator täglich direkt vor der mechanischen Belastung injiziert. Außerdem wurde in der vorliegenden Studie eine andere Konzentration verwendet. Da uns die in der Publikation von Robinson et al. angegebene Konzentration von 50 mg/kg/BID sehr hoch erschien, kontaktierten wir die Autoren. Sie gaben an, nicht 50 mg/kg/BID sondern 50 µg/kg/BID verwendet zu haben. Da uns diese Konzentration wiederum sehr gering erschien, entschieden wir uns für die mehrfach in der Literatur verwendete Konzentration von 1 mg/kg (Robinson et al. 2006, Thotala et al. 2008, Whittle et al. 2006), die in der vorliegenden Studie subkutan appliziert wurde.

Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator hatte keinen Effekt auf die mechanisch induzierte, endostale Knochenformation (Abbildung 3.4). Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg an der endostalen Knochenformation beteiligt ist (Sawakami et al. 2006). Denn Sawakami et al. zeigten, dass die mechanisch induzierte, endostale Knochenformation in Lrp5^{-/-}-Mäusen gehemmt war. Der Lrp-Rezeptor liegt *upstream* der Gsk-3β und durch Bindung eines Wnt-Liganden an Lrp5 und seinen Corezeptor Frizzled wird der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg aktiviert. Dadurch wird unter anderem die Gsk-3β

gehemmt, was in der vorliegenden Studie durch den Gsk-3β-Inhibitor bewirkt wurde. Da also die mechanisch induzierte, endostale Knochenformation in Lrp5^{-/-}-Mäusen gehemmt worden zu sein schien, wurde im Umkehrschluss in der vorliegenden Studie erwartet, dass die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs mit dem Gsk-3β-Inhibitor zu einer Sensibilisierung der knochenbildenden Zellen an der endostalen Oberfläche für mechanische Reize führen würde und so die mechanisch induzierte, endostale Knochenformation erhöhen würde. Dass dies nicht der Fall war, könnte eventuell an einer zu geringen Konzentration des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators gelegen haben.

Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator erhöhte jedoch, wie erwartet, in der vorliegenden Studie die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation (Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). Auch für die periostale, mechanisch induzierte Knochenformation zeigten bereits Sawakami et al. in ihrem Lrp5^{-/-}-Mausmodell die maßgebliche Beteiligung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs (Sawakami et al. 2006). Zudem zeigten Robinson et al., dass die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs die mechanisch induzierte Genantwort in der Tibia von Mäusen erhöhte (Robinson et al. 2006). In der vorliegenden Studie führte die Sensibilisierung der knochenbildenden Zellen für mechanische Reize an der periosta-Knochenoberfläche den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator len durch zur Geflechtknochenbildung, während die mechanische Belastung alleine zu einer periostalen Knochenzubildung in lamellarer Form führte (Abbildung 3.3). Wie schon bei der durch die zusätzliche, sensibilisierende Wirkung des exogenen Östrogens beobachtete Geflechtknochenbildung in den OVX-Mäusen, scheint auch der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator die ohnehin schon mechanisch stark induzierten knochenbildenden Zellen zusätzlich sensibilisiert zu haben. Auch diese stark sensibilisierende Wirkung des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation wurde wie die in Kapitel 4.1.2 beschriebene, sensibilisierende Wirkung von Östrogen so in der Literatur noch nicht gezeigt.

4.1.4 Einfluss von Östrogen und gleichzeitiger Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Knochenformation

Eine Interaktion des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs bei der Beeinflussung der mechanisch induzierten Knochenformation wurde in der vorlie-

genden Studie ausschließlich an der periostalen Knochenoberfläche beobachtet (Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). Endostal hatte der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator keinen Einfluss auf die Wirkung des Östrogens. Aufgrund der weiter oben bereits erwähnten Beteiligung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs an der endostalen Knochenformation (Sawakami et al. 2006) und aufgrund der bekannten Interaktion zwischen dem Wnt/β-Catenin- und ER-Signaltransduktionsweg (Armstrong et al. 2007, Lau et al. 2006, Liedert et al. 2010, Sunters et al. 2010) vorliegenden Studie ein Einfluss wurde in der des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators auf die Wirkung des exogenen Östrogens an der endostalen Knochenoberfläche erwartet. Auch hier könnte wie schon bei der von dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator unbeeinflussten, mechanisch induzierten, endostalen Knochenformation die Konzentration des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators zu gering gewesen sein, um Einfluss auf die endostale Knochenformation zu nehmen. An der periostalen Oberfläche wurde eine Interaktion des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs bei der Beeinflussung der mechanisch induzierten Knochenformation nur in den OVX-Mäusen beobachtet (Abbildung 3.3, 3.4, 3.5). In diesen Mäusen hatten Östrogen und der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator alleine eine fördernde Wirkung auf die mechanisch induzierte Knochenformation, bei gleichzeitiger Applikation hingegen nicht. Dass dieser Effekt in den Sham-Mäusen nicht zu beobachten war, lag vermutlich daran, dass das applizierte Östrogen alleine schon keinen Einfluss auf die mechanisch induzierte, periostale Knochenformation in den Sham-Mäusen hatte. Stattdessen schien wiederum die Wirkung des erst 4 Wochen nach der Ovarektomie applizierten Östrogens für die beobachtete Interaktion zwischen dem Wnt/β-Catenin- und ER-Signaltransduktionsweg in den OVX-Mäusen entscheidend gewesen zu sein. Für die Interaktion dieser beiden Signaltransduktionswege gibt es in der Literatur bereits einige Belege (Armstrong et al. 2007, Lau et al. 2006, Liedert et al. 2010, Sunters et al. 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden in vivo-Studie konnten die in vitro-Ergebnisse von Liedert et al. untermauern. Liedert et al. zeigten einen sensibilisierenden Effekt von Östrogen auf die mechanisch induzierte Expression des mechanosensitiven Gens Cox-2 in osteoblastären Zellen, welcher durch die zusätzliche Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs aufgehoben wurde (Liedert et al. 2010). Das von Sunters et al. beschriebene mechanisch induzierte Signalosom, bei dem der östrogenungebundene ERa an die Zellmembran translozierte und so eine
ß-Cateninaktivierende Signalkaskade induzierte, wurde durch die Zugabe von Östrogen inhi-

biert (Sunters et al. 2010). Ein Schritt dieser Signalkaskade war die Bindung von ERα an IGF-IR an der Zellmembran. Die Autoren vermuteten, dass Östrogen durch Bindung an ERa die Bindung von ERa an IGF-IR hemmte und somit die nachfolgende, β-Catenin-aktivierende Signalkaskade. Des weiteren zeigten Almeida et al., dass ERa durch Förderung der Wnt/Tcf-vermittelten Transkription die Proliferation von Osteoblastenvorläuferzellen, die Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu reifen, mineralisierenden Osteoblasten und somit die periostale Knochenformation erhöhte (Almeida et al. 2013). Dieser stimulierende Effekt auf die Differenzierung wurde durch Östrogen gehemmt. Zudem wird, wie weiter oben bereits erwähnt, die Expression von ER α durch die Östrogenkonzentration gesteuert (Bodine et al. 1998, Zaman et al. 2006), so dass in der vorliegende Studie der Östrogenmangel einen Mangel an ERa induziert haben könnte. So war 4 Wochen nach der Ovarektomie vermutlich eine geringere ERa-Konzentration in den Knochenzellen der OVX-Mäuse, während durch die spätere Östrogenapplikation eine erhöhte Östrogenkonzentration bestand. Bei diesem ERα/Östrogen-Ungleichgewicht war vermutlich ERα sehr stark, wenn nicht sogar komplett östrogengebunden, so dass Östrogen über einen Mechanismus, wie von Sunters et al. und Almeida et al. beschrieben (Almeida et al. 2013, Sunters et al. 2010), die sonst β-Catenin-aktivierende Wirkung des östrogenungebundenen ERα hemmte.

4.2 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte osteogene Antwort in osteoblastären Zellen

In den in diesem Kapitel diskutierten *in vitro*-Experimenten mit der murinen, präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 wurden folgende intrazelluläre, molekularbiologische Prozesse untersucht, die an der osteogenen Antwort beteiligt sind und die durch Östrogen, die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs sowie mechanische Belastung beeinflusst werden:

- die Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes und dessen Translokalisation in den Zellkern,
- 2. die Aktivität Wnt/β-Catenin-responsiver Promotorelemente und
- 3. die Expression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene.

Zur Untersuchung der Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes und dessen Translokalisation in den Zellkern sowie der Aktivität Wnt/β-Catenin-responsiver Promotorelemente wurden die MC3T3-E1-Zellen 5 Tage in Kollagen I- beschichteten Silikonschalen osteogen differenziert. An Tag 5 erfolgte die mechanische Stimulation nach einer Vorinkubation von 3 h mit Östrogen und dem Wnt-Signalwegaktivator Wnt3a bzw. SB415286. Für die Untersuchung der Expression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene wurden die MC3T3-E1-Zellen 21 Tage in Kollagen I-beschichteten Silikonschalen osteogen differenziert. Die Östrogenzugabe erfolgte während der gesamten Kultivierung bei jedem Mediumwechsel. Die mechanische Stimulation erfolgte an Tag 21 nach einer Vorinkubation von 3 h mit dem Wnt-Signalwegaktivator SB415286.

Das in dieser Studie verwendete Modell der zyklischen, uniaxialen Dehnung von Zellen im zweidimensionalen System wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Neidlinger-Wilke et al. 1994) und seitdem in zahlreichen Studien unserer Arbeitsgruppe angewendet (Kaspar et al. 2002, Liedert et al. 2010, Neidlinger-Wilke et al. 2001). Die Östrogenkonzentrationen von 10 nM und die Wnt3a-Konzentration von 3 nM wurden schon in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe in Stimulationsexperimenten mit MC3T3-E1-Zellen verwendet (Liedert et al. 2010) und deshalb für diese Studie übernommen. Für den GSK-3 β -Inhibitor SB415286 zeigten Coghlan et al. in humanen Leberzellen, dass die Aktivität der GSK-3 β ab einer Konzentration von 10 μ M SB415286 fast vollständig inhibiert wurde (Coghlan et al. 2000). Die Luziferaseaktivität eines β -Catenin-LEF/TCF-Reporters wurde mit 20 μ M SB415286 signifikant erhöht. Deshalb wurde die Konzentration von 20 μ M in der vorliegenden Studie verwendet.

Der ERα-β-Catenin-Proteinkomplex wurde mittels Coimmunpräzipitation nachgewiesen, bei der dieser Komplex mit einem anti-ERα-Antikörper präzipitiert und anschließend mit einem anti-β-Catenin-Antikörper mittels *Western Blotting* detektiert wurde. Die Aktivität Wnt/β-Catenin-responsiver Promotorelemente wurde in Transfektionsexperimenten mit dem Tcf-Reporterplasmid Topflash untersucht. Die Topflash-Aktivität wurde mittels Luziferase-Assay bestimmt. Die Expression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene wurde auf Genexpressionsebene mittels *Real Time* RT-PCR und auf Proteinexpressionsebene mittels *Western Blotting* bestimmt.

4.2.1 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes

Der Einfluss von mechanischer Stimulation, Östrogen und des Wnt/ β -Catenin-Signalwegaktivators Wnt3a auf die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes in MC3T3-E1-Zellen wurde mittels Coimmunpräzipitation untersucht. In einem ersten Versuch wurde hierfür der Gesamtzellextrakt, der das Gesamtprotein aus Zytosol und Zellkern enthielt, verwendet. In dem darauffolgenden Versuch wurde nur der Kernextrakt untersucht, um die spezifische Lokalisation des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes im Zellkern nachzuweisen.

In unbehandelten MC3T3-E1-Zellen konnte der ERα-β-Catenin-Proteinkomplex mittels Coimmunpräzipitation weder im Gesamtzellextrakt noch im Kernextrakt nachgewiesen werden (Abbildung 3.6 und 3.7). Auch nach mechanischer Stimulation konnte der ERa-β-Catenin-Proteinkomplex im Gesamtzellextrakt nicht nachgewiesen werden. Doch im Kernextrakt war der ER α - β -Catenin-Proteinkomplex nach mechanischer Stimulation nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der ERα-β-Catenin-Proteinkomplex nach mechanischer Stimulation vor allem im Zellkern lokalisiert war. Auch Norvell et al. zeigten, dass Flüssigkeitsströme, die an der Zelloberfläche Scherkräfte auslösen, in MC3T3-E1-Zellen zur Translokalisation von β-Catenin in den Zellkern führten (Norvell et al. 2004). Armstrong et al. zeigten durch 4-Punkt-Biegung von ROS 17/2.8-Zellen die gleichzeitige Translokalisation von β-Catenin und ERα in den Zellkern (Armstrong et al. 2007). Sie fanden außerdem heraus, dass ERα die mechanisch induzierte Translokalisation von β-Catenin in den Zellkern unterstützt. In der vorliegenden Studie wurde jedoch erstmals bewiesen, dass β-Catenin und ERα nach mechanischer Stimulation von MC3T3-E1-Zellen nicht nur gleichzeitig in den Zellkern translozieren und sich dabei gegenseitig beeinflussen, sondern dass sie in einem Proteinkomplex direkt miteinander interagieren.

Wurden die MC3T3-E1-Zellen mit Östrogen für 3 h vorinkubiert und dann mechanisch stimuliert, war der ER α - β -Catenin-Proteinkomplex auch im Gesamtzellextrakt mittels Coimmunpräzipitation nachweisbar (Abbildung 3.6). Dies deutet auf einen sensibilisierenden Effekt von Östrogen auf die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes hin. Schon Kouzmenko et al. zeigten, dass Östrogen die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes in humanen Darmkrebszellen förderte (Kouzmenko et al. 2004). Einen möglichen, zugrundeliegenden Mechanismus

hierfür fanden Cardona-Gomez et al. (Cardona-Gomez et al. 2004). Sie zeigten, dass ER α mit der Gsk-3 und β -Catenin im Hippocampus von ovarektomierten Ratten einen Proteinkomplex bildete. Die Bindung des β -Catenins an die Gsk-3 führte höchstwahrscheinlich zu dessen Degradation. Östrogen inhibierte die Gsk-3 und löste β -Catenin so aus diesem Komplex. Dem beobachteten, sensibilisierenden Effekt von Östrogen auf die mechanisch induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes in den in der vorliegenden Studie verwendeten murinen, präosteoblastären MC3T3-E1-Zellen könnte ebenfalls dieser Mechanismus zugrunde liegen.

Der Reiz durch Östrogen alleine hat in der vorliegenden Studie hingegen, anders als in der Studie von Kouzmenko et al. (Kouzmenko et al. 2004), nicht ausgereicht, um den ERα-β-Catenin-Proteinkomplex mittels Coimmunpräzipitation nachweisen zu können (Abbildung 3.6). Eine mögliche Erklärung wäre, dass in der Studie von Kouzmenko et al. humane Darmkrebszellen statt muriner, präosteoblastärer Zellen verwendet wurden. Eine zweite mögliche Erklärung könnte sein, dass in der Studie von die von Kouzmenko et al. ERα überexprimiert war, während in der vorliegenden Studie ausschließlich der Einfluss des zelleigenen ERα untersucht wurde.

Ob Östrogen auch die Translokalisation des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes in den Zellkern beeinflusst, konnte in der vorliegenden Studie nicht geklärt werden, da der Einfluss von Östrogen alleine und auf die mechanisch induzierte Komplexbildung nur im Gesamtzellextrakt untersucht wurde. Andere Studien deuten aber darauf hin, dass Östrogen auch die Translokalisation von β-Catenin und damit höchstwahrscheinlich die Translokalisation des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes in den Zellkern beeinflusst (Chandar et al. 2005, Varea et al. 2009). Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-*β*-Catenin-Antikörper in der osteoblastären Zelllinie ROS-PG13 zeigten Chandar et al., dass nach 48 h Inkubation mit Östrogen eine Translokalisation von β-Catenin in den Zellkern stattgefunden hatte (Chandar et al. 2005). In der Studie von Varea et al. wurde in neuronalen Zellen durch Östrogen zeit- und konzentrationsabhängig β-Catenin stabilisiert die β-Catenin-induzierte, Tcf-vermittelte Transkription induziert. Die und Induzierung dieser Transkription wurde durch ERα vermittelt (Varea et al. 2009). Der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator Wnt3a induzierte die Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes (Abbildung 3.6). Es ist bekannt, dass Wnt3a durch Bindung an den Transmembranrezeptor Frizzled und seinen Corezeptor Lrp5 bzw.6

91

eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zur Inhibierung der Gsk-3β und da-

mit zur Stabilisierung von β-Catenin und dessen Translokalisation in den Zellkern führt (Case et al. 2008, He et al. 2004, Spencer et al. 2006). In der vorliegenden Studie wurde nun erstmals gezeigt, dass Wnt3a nicht nur die Stabilisierung von β-Catenin induziert, sondern auch dessen Bindung an ERα. Ob der gebildete ERαβ-Catenin-Proteinkomplex anschließend in den Zellkern translozierte, konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, da der Einfluss von Wnt3a nur im Gesamtzellextrakt untersucht wurde. Die Studie von Spencer et al., in der Wnt3a die Translokalisation von β-Catenin in den Zellkern induzierte (Spencer et al. 2006), und die Studie von Armstrong et al., in der die Translokalisation von β-Catenin in den Zellkern von ERα unterstützt wurde (Armstrong et al. 2007), deuten jedoch stark darauf hin, dass Wnt3a nicht nur die Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes induzierte, sondern auch dessen Translokalisation in den Zellkern.

Die zusätzliche, mechanische Stimulation hatte keinen in der Coimmunpräzipitation nachweisbaren Einfluss auf die Wnt3a-induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes (Abbildung 3.6). Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass ein mechanischer Reiz in Knochenzellen ebenfalls zur Stabilisierung von β -Catenin führt (Bonewald 2011, Sen et al. 2008). Da in der vorliegenden Studie mechanische Stimulation alleine jedoch nicht zu einer mittels Coimmunpräzipitation detektierbaren Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes führte, scheint die Wnt3a-induzierte Stabilisierung von β -Catenin und anschließende Komplexbildung mit ER α in dem in der vorliegenden Studie verwendeten Versuchsdesign weitaus effizienter als die mechanisch induzierte gewesen zu sein.

Während Wnt3a und Östrogen alleine einen positiven Effekt auf die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes hatten, wurde die Wnt3a-induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes durch die zusätzliche Applikation von Östrogen reduziert (Abbildung 3.6). Auch die im Zellkern beobachtete mechanisch induzierte Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit Östrogen und Wnt3a reduziert (Abbildung 3.7). Da schon Wnt3a alleine die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes induzierte und Östrogen alleine eine fördernde Wirkung auf die mechanisch induzierte Komplexbildung hatte, könnte die Wirkung der gleichzeitigen Behandlung mit Wnt3a und Östrogen so groß gewesen sein, dass sie eine *negative feedback*-Regulation induzierte. Wie weiter oben bereits diskutiert können sowohl Wnt3a als auch Östrogen die Kom-

plexbildung unter anderem durch die Stabilisierung von β-Catenin beeinflussen. Deshalb wäre ein naheliegender, möglicher Mechanismus für eine negative feedback-Regulation die Destabilisierung von β-Catenin. So zeigten Leung et al. in RK3-Zellen aus Ratten eine erhöhte Tcf-vermittelte Transkription von Axin2, wenn sie ein in diese Zellen transformiertes Fusionsprotein aus β -Catenin und ER α mit Tamoxifen aktivierten (Leung et al. 2002). Tamoxifen ist ein selektiver ER-Modulator, der wie Östrogen den ER aktiviert. Axin2 gehört zu dem Multiproteinkomplex, der β-Catenin durch Phosphorylierung für den proteosomalen Abbau im Zytoplasma vorbereitet (Polakis 2001, Yamamoto et al. 1998). Eine Induzierung des transformierten ERa-β-Catenin-Proteinkomplexes führte also zu einer erhöhten Axin2-Expression. Eine erhöhte Axin2-Expression könnte somit auch in der vorliegenden Studie zur Destabilisierung von
ß-Catenin und damit auch zur verminderten Bildung des ERα-β-Catenin-Proteinkomplexes geführt haben. De Groot et al. entdeckten erst kürzlich in den embryonalen Nierenzellen 293T Huwe1 als einen evolutionär konservierten Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs (de Groot et al. 2014). Sie zeigten, dass Huwe1 die DvI-Aktivität und somit die Wnt3a-induzierte Aktivität des Wnt/β-Catenin-Reporterplasmids Topflash hemmte. DvI hemmte den β-Catenin-phosphorylierenden Multiproteinkomplex durch Bindung an Axin (He et al. 2004). Die Autoren untersuchten leider nicht den Einfluss von Wnt3a auf die Expression von Huwe1. Auch die Expression und der Einfluss von Huwe1 in Knochenzellen sind noch unbekannt. Doch wenn dieser Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auch in Knochenzellen exprimiert wäre, könnte die Wnt3a-induzierte Expression von Huwe1 eine weitere *negative feedback*-Regulation durch die Destabilisierung von β-Catenin sein.

4.2.2 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Wnt/β-Catenin-Reporteraktivität

Zur Untersuchung des Einflusses von Östrogen und des Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivators SB415286 auf die Transkriptionsaktivität Wnt-responsiver Promotorelemente wurden MC3T3-E1-Zellen mit dem Tcf-Reporterplasmid Topflash transfiziert und anschließend mit Östrogen und SB415286 behandelt. Sowohl die Behandlung der Topflash-transfizierten Zellen mit Östrogen als auch

die mit SB415286 erhöhte die Aktivität der Tcf-vermittelten Transkription des Luziferasegens (Abbildung 3.8, A). Diese Aktivitätserhöhung zeigte, dass der

Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg durch Östrogen und SB415286 induziert wurde.

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Erhöhung der Topflash-Aktivität durch Behandlung von Topflash-transfizierten MC3T3-E1-Zellen mit dem Wnt-Liganden Wnt3a gezeigt (Liedert et al. 2010). Case et al. konnten auch in Topflash-transfizierten, aus Mauskalvarien isolierten CIMC-4-Zellen nach Behandlung mit LiCl, welches wie SB415286 ein Gsk-3β-Inhibitor ist, eine erhöhte Topflash-Aktivität feststellen (Case et al. 2008).

Die Erhöhung der Topflash-Aktivität durch Östrogen zeigte, dass Östrogen nicht nur die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes förderte, sondern auch die Transkriptionsaktivität Wnt-responsiver Promotorelemente. Wie bereits weiter oben diskutiert könnte ein möglicher Mechanismus die Inhibierung der Gsk-3 β durch Östrogen sein (Cardona-Gomez et al. 2004). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich zum Einfluss von Östrogen auf die Topflash-Aktivität auch dessen Einfluss auf die Gsk-3 β -Phosphorylierung an Serin 9 untersucht (Abbildung 3.8, B), die zur Inhibierung der Gsk-3 β führt (Wu and Pan 2010). Hierbei konnte gezeigt werden, dass in der präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 Östrogen zur Gsk-3 β -Phosphorylierung an Serin 9 führte, diese so inhibierte und damit die Akkumulation von β -Catenin und die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes ermöglicht worden sein könnte.

Östrogen alleine schien in der vorliegenden Studie die Topflash-Aktivität stärker zu erhöhen als mit SB415286 zusammen. Dieser hemmende Effekt von SB415286 auf die Östrogen-induzierte Topflash-Aktivität war jedoch nicht signifikant und damit nicht eindeutig nachweisbar.

4.2.3 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Genexpression mechanoresponsiver, mit der Osteogenese assoziierter Marker

Zur Untersuchung des Einflusses des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Expression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene wurden murine, präosteoblastäre MC3T3-E1-Zellen mit Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 inkubiert und anschließend mechanisch stimuliert. Vor der Stimulation wurden die Zellen über 21 Tage osteogen differenziert, da in der Literatur beschrieben ist, dass reifere Osteoblasten sensitiver auf mechanische Stimulation reagieren als

jüngere (Mikuni-Takagaki et al. 1996, Wagner 2011). Nach der Stimulation wurde die Genexpression von c-Fos, Cox-2 und Cyr61 mittels *Real Time* RT-PCR untersucht.

Den Genen c-Fos, Cox-2 und Cyr61 ist gemeinsam, dass sie an der frühen Antwort auf mechanische Belastung beteiligt sind (Kawata and Mikuni-Takagaki 1998, Lean et al. 1996, Tamura et al. 2001). Außerdem werden sie sowohl durch den ER- als auch durch den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg reguliert (Wagner 2011).

Das Protoonkogen c-Fos, ist als Hauptbestandteil des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 ein Schlüsselfaktor der Proliferation und Differenzierung sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten (Grigoriadis, Wang and Wagner 1995). So wird die Osteoblastendifferenzierung durch c-Fos-Defizienz vermindert, während eine c-Fos-Überexpression zur Osteosarkombildung führt (Demiralp et al. 2002, Wagner 2002). Auch die Osteoklastendifferenzierung wird durch c-Fos-Defizienz gehemmt, wodurch c-Fos-defiziente Mäuse eine Osteopetrose ausbildeten (Grigoriadis et al. 1994).

Das Enzym Cox-2 katalysiert zwei essentielle Schritte bei der Prostaglandinsynthese (Simmons, Botting and Hla 2004). Zum einen wandelt es Arachidonsäure in PGG₂ um und zum anderen wandelt es PGG₂ in PGH₂ um, welches als Substrat für verschiedene bioaktive Prostaglandinisomere dient. Unter diesen ist Prostaglandin E2 (PGE₂) das Prostaglandindisomer, welches eine wichtige Rolle im Knochen spielt, weil es unter anderem die Knochenformation fördert (Chyun and Raisz 1984), indem es die Osteoblastenproliferation und -Differenzierung stimuliert (Hikiji et al. 2008).

Cyr61 ist eigentlich als angiogener Faktor bekannt (Babic et al. 1998), ist ein sezerniertes Signalprotein der extrazellulären Matrix, gehört zur CCN-Familie und wird aber auch von Osteoblasten exprimiert (Parisi et al. 2006). Außerdem ist es durch Wnt3a induzierbar (Si et al. 2006) und erhöht die Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Zellen, indem es BMP-2 hochreguliert und den ERK-Signalweg aktiviert (Su et al. 2010).

Wie bereits in anderen Studien gezeigt worden war (Kawata and Mikuni-Takagaki 1998, Lean et al. 1996, Tamura et al. 2001, Wagner 2011), wurde auch in der vorliegenden Studie die Genexpression von c-Fos, Cox-2 und Cyr61 durch mechanische Stimulation erhöht (Abbildung 3.9).

In der vorliegenden Studie hatte Östrogen keinen sensibilisierenden Effekt auf die mechanisch induzierte Genexpression dieser drei Gene und erhöhte auch alleine die Genexpression von c-Fos und Cox-2 nicht bzw. von Cyr61 nur leicht (Abbildung 3.9). Diese Ergebnisse waren unerwartet, da sowohl die Bildung des ER α - β -Catenin-Proteinkomplexes als auch die Topflash-Aktivität durch Östrogen stimuliert wurden und in der Literatur bereits ein stimulierender Effekt von Östrogen auf die Expression dieser drei Gene beschrieben wurde. So wird die Genexpression von c-Fos sowohl über den klassischen als auch über den nicht-klassischen ER-Signaltransduktionsweg reguliert (Bjornstrom and Sjoberg 2005) und Östrogen aktivierte den c-Fos-Promotor in humanen osteoblastären Zellen (Harris 1992). Des Weiteren zeigten Yeh et al., dass Östrogen die Genexpression von c-Fos und Cox-2 in humanen, osteoblastären MG63-Zellen induzierte und die Vorbehandlung mit Östrogen auch die mechanisch induzierte c-Fos- und Cox-2-Expression erhöhte (Yeh et al. 2010). Auch die Genexpression von Cyr61 wird im Uterus und in Brustkrebszellen durch Östrogen reguliert (Rivera-Gonzalez et al. 1998, Sampath, Winneker and Zhang 2001). Außerdem wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe, die der vorliegenden Studie vorausgegangen ist, für c-Fos und Cox-2 ein sensibilisierender Effekt von Östrogen auch auf die mechanisch induzierte Genexpression in MC3T3-E1-Zellen gezeigt (Wagner 2011). In der vorliegenden Studie und in der von Wagner wurden dieselbe Östrogenkonzentration und dasselbe Protokoll für die mechanische Stimulation verwendet. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie die MC3T3-E1-Zellen vor der mechanischen Stimulation 21 Tage osteogen differenziert, während sie von Wagner lediglich 5 Tage in Kulturmedium expandiert wurden. Der Differenzierungszustand der Zellen war in den beiden Studien also unterschiedlich. Auch für die Coimmunpräzipitation und die Transfektionsexperimente der vorliegenden Studie wurden die Zellen nur 5 Tage osteogen differenziert und befanden sich damit ebenfalls in einem früheren Differenzierungsstadium als die Zellen für die Untersuchungen der Genexpression. Außerdem wurde in der vorliegenden Studie über den gesamten Differenzierungszeitraum bei jedem Mediumwechsel das Östrogen dem Medium hinzugefügt. Sobei Wagner als auch für die Coimmunpräzipitation wohl und die Transfektionsexperimente der vorliegenden Studie wurde das Östrogen einmalig 3 h vor der mechanischen Stimulation appliziert. Schließlich wurde in der vorliegenden Studie während des gesamten Differenzierungszeitraums ein aktivkohlebehandeltes FCS verwendet. Wagner hingegen stellte die Kultur erst 48 h vor der mechanischen Stimulation auf das aktivkohlebehandelte FCS um. Durch diese Aktivkohlebehandlung wird das natürlich vorkommende Östrogen aus dem FCS nahezu vollständig isoliert, aber es werden auch andere Faktoren wie andere Hormone, Vitamine, Elektrolyte, Enzyme und Metabolite beeinflusst (Cao et al. 2009). Diese veränderte Zusammensetzung des FCS über den langen Zeitraum von 21 Tagen könnte die Zellaktivität unabhängig vom Östrogengehalt beeinflusst haben.

Die Genexpression von Cox-2 und Cyr61 wurde durch den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 nur leicht, aber signifikant erhöht. Die mechanisch induzierte Expression dieser beiden Gene wurde hingegen durch SB415286 nicht beeinflusst. Die erhöhte Genexpression von Cox-2 und Cyr61 durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs wurde in der Literatur bereits gezeigt (Robinson et al. 2006, Si et al. 2006, Wagner 2011). In der Studie von Robinson et al. wurde die Genexpression von Cox-2 durch mechanische Stimulation nur leicht erhöht (Robinson et al. 2006). Auf diese leichte mechanische Erhöhung der Cox-2-Expression hatte SB415286 einen stark sensibilisierenden Effekt. In der Studie von Wagner hingegen wurde die Cox-2-Expression durch den Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator LiCl alleine stark erhöht (Wagner 2011). Zusätzliche mechanische Stimulation inhibierte diesen Effekt von LiCl, sodass es bei Wagner vermutlich zu einer negative feedback-Regulation kam. Diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Studie und denen von Robinson et al. und Wagner könnten auf die verschiedensten Ursachen zurückzuführen sein. Robinson et al. benutzten eine andere Belastungsdauer (5 h) und -stärke (3400 με), eine andere SB415286-Konzentration (5 µM) und ein anderes Zellstimulationssystem (FX-3000 Flexercell). Die bereits weiter oben diskutierten Unterschiede der vorliegenden Studie zu der von Wagner, wie der Differenzierungszustand der Zellen und die Zusammensetzung des FCS, könnten ebenfalls die unterschiedliche Reaktion der Zellen auf die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs erklären.

Der Einfluss von SB415286 auf die Genexpression von c-Fos war unerwartet. Er hatte alleine keinen Einfluss auf die c-Fos-Expression und er verminderte die mechanisch induzierte c-Fos-Expression signifikant. Auch Robinson et al. konnten nur eine leichte Erhöhung der Genexpression von c-Fos durch SB415286 alleine zeigen, aber sie zeigten eine signifikante Erhöhung der mechanisch induzierten c-Fos-Expression durch SB415286 (Robinson et al. 2006). Auch für diese unter-

schiedlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen verwendeten Stimulationsprotokolle, der Differenzierungszustand der Zellen und die FCS-Zusammensetzung eine Erklärung sein.

Während Östrogen und SB415286 alleine auf die mechanisch induzierte Genexpression von c-Fos, Cox-2 und Cyr61 keinen Einfluss hatten bzw. SB415286 die mechanisch induzierte Genexpression von c-Fos sogar hemmte, führte die gleichzeitige Anwendung der beiden Substanzen zu einer signifikanten Erhöhung der mechanisch induzierten Genexpression von Cox-2 und Cyr61. Der hemmende Effekt des SB415286 auf die mechanisch induzierte c-Fos-Expression wurde durch Östrogen aufgehoben. In der Studie von Wagner hingegen hemmte der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator LiCl den sensibilisierenden Effekt von Östrogen auf die mechanisch induzierte Cox-2-Expression (Wagner 2011). Die Ergebnisse der Studie von Wagner werden durch die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation aus der vorliegenden Studie unterstützt. Denn die Coimmunpräzipitation zeigte eine hemmende Wirkung von Östrogen auf die durch Wnt3a erhöhte mechanisch induzierte Proteinkomplexbildung aus ERα und β-Catenin. Für die Coimmunpräzipitation befanden sich die Zellen in demselben Differenzierungszustand wie bei der Untersuchung der Genexpression in der Studie von Wagner. Somit könnten die Unterschiede zwischen den Genexpressionsergebnissen der vorliegenden Studie und der von Wagner auch durch den Differenzierungszustand der Zellen oder die FCS-Zusammensetzung zu erklären sein.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der Genexpression von c-Fos, Cox-2 und Cyr61 nach mechanischer Stimulation und Behandlung mit Östrogen und SB415286, dass die mechanisch induzierte Genexpression dieser mit der Osteogenese assoziierten, mechanosensitiven Gene in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen durch Östrogen oder SB415286 alleine nur sehr schwach oder gar nicht beeinflusst wurde. Die mechanisch induzierte c-Fos-Expression wurde durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs sogar gehemmt. Die gleichzeitige Aktivierung des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs erhöhte jedoch signifikant die mechanisch induzierte Cox-2- und Cyr61-Expression. Damit wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die Interaktion des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs die mechanisch induzierte Genexpression mechanosensitiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene in osteoblastären Zellen beeinflussen.

4.2.4 Einfluss von Östrogen und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Proteinexpression mechanoresponsiver, mit der Osteogenese assoziierter Marker

Zur Untersuchung des Einflusses des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Proteinexpression des mit der Osteogenese assoziierten Markers Cox-2 wurden murine, präosteoblastäre MC3T3-E1-Zellen mit Östrogen und dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 inkubiert und anschließend mechanisch stimuliert. Vor der Stimulation wurden die Zellen über 21 Tage osteogen differenziert. Nach der Stimulation wurde die Proteinexpression von Cox-2 mittels *Western Blotting* untersucht.

Die Proteinexpression von Cox-2 wurde durch mechanische Belastung erhöht (Abbildung 3.10). Die mechanisch induzierte Erhöhung der Proteinexpression von Cox-2 konnte schon in mehreren Studien in den unterschiedlichsten Zellarten gezeigt werden (Lau et al. 2006, Ogasawara et al. 2001, Sen et al. 2009, Wagner 2011). Lau et al. beobachteten eine erhöhte Proteinexpression von Cox-2 in C57BL/6J-Osteoblasten, Sen et al. in MSC und Wagner in MC3T3-E1-Zellen. Ogasawara zeigte zusätzlich, dass die mechanische Erhöhung der Proteinexpression von Cox-2 zeitabhängig ist. Die Proteinexpression war nach 6-stündiger mechanischer Stimulation am höchsten.

Die Proteinexpression von Cox-2 wurde durch Östrogen erhöht. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche mechanische Stimulation vermindert. Lu et al. zeigten in der humanen monozytären Tumorzelllinie U937 eine konzentrationsabhängige Hochregulation von Cox-2 durch Östrogen (Lu, Jiang and Choy 2004). In der vorliegenden Studie vorangegangenen Arbeit von Wagner hatte Östrogen hingegen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Cox-2, erhöhte aber die mechanisch induzierte Cox-2-Proteinexpression (Wagner 2011). Da in der vorliegenden Studie und in der von Wagner dieselben Zellen und dasselbe mechanische Stimulationsprotokoll verwendet wurde, könnte dieser Unterschied durch Faktoren wie die Östrogenapplikation, den Differenzierungszustand der Zellen und die FCS-Zusammensetzung zustande gekommen sein.

Auch der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 wirkte fördernd auf die Expression von Cox-2 und auch hier wirkte mechanische Belastung hemmend auf diesen Effekt. Dieses Ergebnis korreliert mit dem aus der Studie von Wagner (Wagner 2011). Der Einfluss der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Proteinexpression von Cox-2 scheint also unab-

hängig vom Differenzierungszustand der Zellen und der Zusammensetzung des FCS zu sein.

Während auf Genexpressionsebene die Interaktion von Östrogen und SB415286 die mechanisch induzierte Expression von Cox-2 förderte, wurde die Proteinexpression durch die Interaktion von Östrogen und SB415286 bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation gehemmt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit denen aus der Coimmunpräzipitation (Abbildung 3.7), bei der die mechanisch induzierte Bildung des ERα-β-Catenin-Komplexes durch die Interaktion von Östrogen und Wnt3a gehemmt wurde. Zur Aufklärung der Ursachen für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Genexpressions- und der Proteinexpressionsanalyse sind noch weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Zeitversuche nötig. Der Einfluss der Interaktion des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die induzierte Proteinexpression mechanosensitiver, mechanisch mit der Osteogenese assoziierter Gene wurde in der vorliegenden Studie erstmals untersucht.

4.3 Untersuchung des Einflusses der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch regulierte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) beeinflussen mit ihrer Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung die Osteoblastenanzahl und tragen damit maßgeblich zur Knochenformation bei (Dang et al. 2002, Okazaki et al. 2002). Sie können aber auch zu Adipozyten differenzieren (Lecka-Czernik, Rosen and Kawai 2010, Nuttall et al. 1998). Diese im Knochen eher unerwünschte, adipogene Differenzierung tritt vermehrt mit zunehmendem Alter und bei Osteoporose auf und führt zur Verfettung des Markraums (Justesen et al. 2001). Die Richtung, in die die MSCs differenzieren, wird sowohl biomechanisch als auch biochemisch, wie zum Beispiel durch den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg, beeinflusst (David et al. 2007, Kennell and MacDougald 2005).

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, wie mechanische Stimulation und die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs die Differenzierung muriner, mesenchymaler Stammzellen, die unter adipogenen Bedingungen kultiviert wurden, beeinflussen und ob sie miteinander interagieren.

Hierfür wurden C3H10T1/2-Zellen zunächst in Kollagen I-beschichteten Silikonschalen für 2 Tage in Kulturmedium expandiert. Anschließend wurden sie über einen Zeitraum von 5 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium weiter kultiviert und während dieses Zeitraums täglich mechanisch stimuliert. Zusätzlich wurde das adipogene Differenzierungsmedium mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 versetzt. Nach Versuchsabbruch wurde der Einfluss von mechanischer Stimulation und Wnt/β-Catenin-Aktivierung auf die Lipidvakuolenbildung mittels Ölrot-O-Färbung, auf die Genexpression mittels *Real-Time* RT-PCR und auf die Proteinexpression mittels *Western Blotting* untersucht. Zusätzlich wurde der Methylierungsstatus des Pparγ-Promotors mittels MSP und BSP bestimmt.

4.3.1 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Lipidvakuolenbildung unter adipogenen Bedingungen

Wie bereits von Sen et al. beschrieben (Sen et al. 2008), bildeten die C3H10T1/2-Zellen in dem adipogenen Differenzierungsmedium Lipidvakuolen, ein morphologisches Erkennungsmerkmal von Fettzellen, aus (Abbildung 3.11). Die Bildung der Lipidvakuolen wurde sowohl durch mechanische Stimulation als auch durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs mit LiCl oder SB415286, vermindert. LiCl und SB415286 sind beide Gsk-3 β -Inhibitoren. LiCl inhibiert die Gsk-3 β durch nicht ATP-kompetitive, N-terminale Phosphorylierung (Zhang et al. 2003). SB415286 wirkt hingegen ATP-kompetitiv (Coghlan et al. 2000). Die hemmende Wirkung von mechanischer Stimulation und Wnt/ β -Catenin-Aktivierung auf die Adipogenese konnten auch Sen et al. zeigen (Sen et al. 2008). Sie untersuchten jedoch nicht den möglichen Einfluss einer Interaktion von mechanischer Stimulation und Wnt/ β -Catenin-Aktivierung, wodurch in der vorliegenden Studie die Lipidvakuolenbildung komplett unterdrückt wurde.

4.3.2 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Expression adipogener und mit der Osteogenese assoziierter Marker unter adipogenen Bedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses von mechanischer Stimulation und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Gen- und Proteinexpression von adipogenen und mit der Osteogenese assoziierten Markergenen
wurden C3H10T1/2-Zellen während der 5-tägigen Kultur in adipogenen Differenzierungsmedium täglich mechanisch stimuliert und das Medium mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator SB415286 versetzt. Nach der letzten mechanischen Stimulation wurde die Genexpression mittels *Real-Time* RT-PCR und die Proteinexpression mittels *Western Blotting* untersucht.

Als adipogene Marker dienten Cebpa (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) und Ppary (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). Der Transkriptionsfaktor Ppary gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren und ist für die Adipogenese, aber auch für die Aktivität und Vitalität reifer Adipozyten essentiell (Rosen and MacDougald 2006). Eine Vielzahl an adipogenen Genen wird durch unter anderen Adipsin, Lipoprotein-Lipase Pparv reguliert. (LPL), AP2 (Adipozytprotein 2) und PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) (Hu et al. 1996, Tontonoz, Hu and Spiegelman 1995b). AP2, Adipsin und LPL sind wichtig für die adipogene Differenzierung (Hu et al. 1996). PEPCK hingegen ist essentiell für die adipogene Glyceroneogenese (Tontonoz et al. 1995a). Der Transkriptionsfaktor Cebpa gehört zu der CCAAT/enhancer-binding protein alpha-Familie und ist wichtig bei der adipogenen Differenzierung und der Lipidakkumulation (Flodby et al. 1996, Lin and Lane 1992, Lin and Lane 1994). Cebpa reguliert ebenfalls die Expression von AP2, aber auch die Expression von Genen wie GLUT4 (Glukosetransporter 4) und SCD1 (Stearoyl-CoA-Desaturase 1), die am Zellmetabolismus von Adipozyten beteiligt sind (Cheneval et al. 1991, Kaestner, Christy and Lane 1990). Sowohl Ppary als auch Cebpa nehmen also eine Schlüsselrolle bei der Adipogenese ein. Außerdem wird Ppary sowohl durch mechanische Belastung als auch durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs inhibiert und somit auch die Adipogenese gehemmt (Ross et al. 2000, Sen et al. 2008). Für Cebpa wurde bisher nur die Inhibierung durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs gezeigt (Bennett et al. 2002). Aber da Sen et al. zeigen konnten, dass die auf die Adipogenese inhibierende Wirkung der Stimulation durch die Aktivierung des mechanischen Wnt/B-Catenin-Signaltransduktionswegs vermittelt wird (Sen et al. 2008), lag die Vermutung nahe, dass auch Cebpa durch mechanische Stimulation inhibiert wird.

Als mit der Osteogenese assoziierte Marker wurden in der vorliegenden Studie Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*), Cox-2 (Cyclooxygenase-2) und Cyr61 (*cystein-rich angiogenic inducer 61*) verwendet. Diese drei Faktoren sind an der Antwort auf mechanische Stimulation beteiligt (Bakker, Klein-Nulend and Burger

2003, Chagour and Goppelt-Struebe 2006, Franceschi and Xiao 2003, Kanno et al. 2005), sensitiv für Wnt/ β -Catenin-Aktivierung (Araki et al. 2003, Gaur et al. 2005, Si et al. 2006) und sind an Signalwegen, die die Osteoblastogenese beeinflussen, beteiligt. Der Transkriptionsfaktor Runx2 wird während der frühen Phase der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen exprimiert und ist essentiell für die Knochenformation (Ducy et al. 1997, Marie 2008, Otto et al. 1997). Runx2 beeinflusst die Knochenformation durch Bindung an seine Erkennungssequenz OSE2, die in der Promotorregion aller wichtigen osteogenen Marker wie zum Beispiel Osteocalcin, α1-Kette von Kollagen I, BSP und Osteopontin, zu finden ist (Ducy et al. 1997, Marie 2008). Wie schon in Kapitel 4.2.3 erläutert, katalysiert Cox-2 zwei essentielle Schritte bei der Prostaglandinsynthese (Simmons et al. 2004). In mesenchymalen Stammzellen zeigten Zhang et al., dass PGE₂ die osteogene Differenzierung stimuliert, indem es Cbfa1 (Runx-2) und Osterix induziert (Zhang et al. 2002). Cyr61, das sezernierte Signalprotein der extrazellulären Matrix, ist an der Proliferation, Migration und Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten beteiligt (Schutze et al. 2005, Schutze et al. 2007).

Darüber hinaus wurde für Liganden und Rezeptoren sowohl des nichtkanonischen als auch des kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs gezeigt, dass sie die Differenzierung von MSCs beeinflussen. Wnt10b, ein Ligand des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs, fördert die Osteoblastogenese, indem es die osteogenen Transkriptionsfaktoren Runx2, Dlx5 und Osterix induziert und die adipogenen Transkriptionsfaktoren Cebpa und Ppary hemmt (Bennett et al. 2002). Wnt5a hingegen gilt als Ligand des nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs und induziert durch die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/Ca²⁺-Signalwegs die Hemmung der Transkription von Ppary (Takada et al. 2007). Außerdem zeigten Boland et al., dass Wnt5a die Osteoblastogenese fördert (Boland et al. 2004). Fzd2 ist ein Rezeptor, der sowohl am nicht-kanonischen als auch am kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg beteiligt ist (Sato et al. 2010), und ist an der Inhibierung der Adipogenese über nicht-kanonische Mechanismen beteiligt (Kennell and MacDougald 2005). Ror2 gilt als klassischer Rezeptor des nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs, wird durch Wnt5a aktiviert (Liu et al. 2008) und scheint an der Regulierung der osteogenen Differenzierung beteiligt zu sein (Arnsdorf, Tummala and Jacobs 2009a).

Die Histon3-Lysin9-Methyltransferase Setdb1 vermittelt die Wirkung des nichtkanonischen Wnt/Ca²⁺-Signalwegs auf die Differenzierung von MSCs, indem sie

die Transkription von Ppary durch Methylierung hemmt (Takada et al. 2007). Takada et al. zeigten, dass Wnt5a die CaMKII (Ca²⁺- und Calmodulin-abhängige Kinase II) aktiviert, die dann den Komplex aus Tak1 (*transforming growth factor beta-activated kinase 1*) und Tab2 (*Tak1-binding protein 2*) aktiviert. Dieser Komplex aktiviert die Nlk (*nemo-like kinase*), welche dann Setdb1 phosphoryliert (Takada et al. 2007). Dadurch bildet Setdb1 mit Chd7 (*chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7*) einen Komplex, der die Ppary-Transkription hemmt.

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Phosphorylierungsstatus von β -Catenin nach mechanischer Stimulation und SB415286-Behandlung untersucht. β -Catenin spielt eine Schlüsselrolle im Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg: Durch Dephosphorylierung an Serin 37 und Threonin 41 wird β -Catenin vor dem proteosomalen Abbau geschützt und kann sich somit anreichern und in den Zellkern translozieren, wo es zusammen mit Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren die Transkription Wnt/ β -Catenin-responsiver Gene reguliert (Niehrs 2012).

Durch mechanische Stimulation wurde die Genexpression der adipogenen Marker Cebpa und Ppary herunter reguliert und die der mit der Osteogenese assoziierten Marker Runx2, Cox-2 und Cyr61 hochreguliert (Abbildung 3.12). David et al. zeigten *in vivo*, dass vermehrte Bewegung den Fettanteil im Knochenmark von Ratten reduzierte (David et al. 2007). In den anschließenden *in vitro* Experimenten fanden sie heraus, dass zyklische Dehnung die Proteinexpression von Runx2 erhöhte und von Ppary verminderte.

In der vorliegenden Studie war die Proteinexpression von Runx2 und Cyr61 nach mechanischer Stimulation erhöht. Die von Pparγ und Cebpα war zudem untersuchten Zeitpunkt unverändert (Abbildung 3.14). Sen et al. zeigten, dass die Regulation der Proteinexpression von Pparγ durch mechanische Stimulation durch die Dauer und die Art der Stimulation beeinflusst wird und ob die mechanische Stimulation durch Pausen unterbrochen wird oder nicht (Sen et al. 2011). Sie fanden nach 20 min täglicher mechanischer Stimulation über 7 Tage keine Verringerung der Pparγ-Proteinexpression in C3H10T1/2-Zellen und nach 40 min eine schwache Herunterregulation, jedoch nach zweimal 20 min mechanischer Stimulation mit 6-stündiger Pause dazwischen eine deutliche Herunterregulation. Für Cox-2 konnte keine Erhöhung der Proteinexpression nach mechanischer Stimulation detektiert werden. In der Literatur wurde die Erhöhung der Cox-2-Expression durch mechanische Stimulation jedoch schon mehrfach gezeigt (Kawata and Mikuni-Takagaki 1998, Ogasawara et al. 2001, Wagner 2011). Allerdings zeigten

Ogasawara et al., dass diese mechanisch induzierte Cox-2-Expression zeitabhängig ist (Ogasawara et al. 2001). Sie fanden erst 6 h nach mechanischer Stimulation in MC3T3-E1-Zellen eine Erhöhung der Proteinexpression von Cox-2 durch mechanische Stimulation. In der vorliegenden Studie wurde die Proteinexpression jedoch bereits nach 30 min mechanischer Stimulation untersucht.

Zudem scheint bei der Transformation des mechanischen Stimulus in ein biochemisches, intrazelluläres Signal, welches dann die Genexpression der beteiligten Zielgene induziert, der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle zu spielen. Case et al. und Sen et al. zeigten, dass in vitro bei mechanischer Stimulation durch die Aktivierung von Akt die Gsk-3ß inhibiert und dadurch ß-Catenin aktiviert wird (Case et al. 2011, Sen et al. 2008). In der Studie von Sen et al. wurde in diesem Zusammenhang eine verminderte Lipidvakuolenbildung und eine Herunterregulation der Genexpression von adipogenen Markern wie Ppary nach mechanischer Stimulation gezeigt. Die Genexpression des osteogenen Markers Runx2 wurde durch mechanische Stimulation jedoch nicht wie in der vorliegenden Studie erhöht. Dieser Unterschied könnte durch die verschiedenen Belastungsprotokolle zustande gekommen sein. Sen et al. stimulierten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Dehnungsamplitude von 2% und einer Frequenz von 10 Zyklen pro Minute (0,17 Hz) für insgesamt 3600 Zyklen (6 h). In der vorliegenden Studie wurde mit derselben Dehnungsamplitude stimuliert, aber bei einer Frequenz von 1 Hz für 30 min. Für alle drei Einstellungsparameter gibt es ein Optimum bei dem man eine maximale osteogene Antwort erzielt. Bride und Silva fassten aus einer Vielzahl von in vivo-Studien zur mechanischen Stimulation der Knochenformation zusammen, dass sehr geringe Frequenzen unter 1 Hz nur eine sehr geringe osteogene Antwort auslösen und es schon nach wenigen Zyklen zu einer Desensibilisierung gegenüber dem mechanischen Stimulus kommt (McBride and Silva 2012), sodass die Frequenz in der Studie von Sen et al. möglicherweise zu niedrig gewählt war und die Zyklenanzahl zu hoch.

Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs mit SB415286 wirkte inhibierend auf die Genexpression der adipogenen Marker Pparγ und Cebpα und stimulierend auf die der mit der Osteogenese assoziierten Marker Runx2, Cox-2 und Cyr61. Auch Ross et al. zeigten, dass durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs die adipogene Differenzierung von Präadipozyten durch Inhibierung von Cebpα und Pparγ gehemmt wurde (Ross et al. 2000). Sie schlossen daraus, dass die Zellen durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-

Signaltransduktionswegs in einem undifferenzierten Stadium gehalten wurden. Sie untersuchten aber nicht den Einfluss der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf osteogene oder mit der Osteogenese assoziierte Markergene. Gaur et al. hingegen untersuchte den Einfluss der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die osteogene Differenzierung *in vivo* und in den präosteoblastären MC3T3-E1-Zellen (Gaur et al. 2005). Sie konnten zeigen, dass Runx2 durch den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg direkt reguliert wird und ein Ziel von β-Catenin und Tcf1 ist, über das die Knochenformation stimuliert wird. Auch für die mit der Osteogenese assoziierten Marker Cox-2 und Cyr61 konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs induzierbar sind. Araki et al. zeigten in Krebszellen, dass die Expression von Cox-2 durch β-Catenin induziert wurde und fanden eine Tcf4-Bindungsstelle im Promotor von Cox-2 (Araki et al. 2003). Des Weiteren konnten Yun et al. eine synergistische Hochregulation der Cox-2-Expression durch Lef1 und β-Catenin zeigen (Yun and Im 2007). Auch Cyr61 ist ein direktes Ziel des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs und spielt eine wichtige Rolle bei der durch Wnt3a induzierten osteogenen Differenzierung von MSCs (Si et al. 2006). Die Autoren zeigten, dass Wnt3a die Alkalische Phosphatase aktivierte und dabei auch die Expression von Cyr61 erhöht wurde. Die Inhibierung der Cyr61-Expression hingegen hemmte die Wnt3a-induzierte osteogene Differenzierung. Auch für Cyr61 wurde nachgewiesen, dass nach Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs β -Catenin an den Promotor von Cyr61 bindet und so vermutlich die Expression von Cyr61 induziert.

Die in der vorliegenden Studie gezeigten Genexpressionsergebnisse für die Regulation adipogener und mit der Osteogenese assoziierter Marker durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs ließen sich auf Proteinexpressionsebene größtenteils bestätigen. Die Proteinexpression von Cox-2 wurde jedoch durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zu dem in der vorliegenden Studie untersuchten Zeitpunkt nicht hochreguliert. Vermutlich ist die Regulation der Proteinexpression von Cox-2 durch SB415286 wie die durch mechanische Belastung zeitabhängig (Ogasawara et al. 2001).

Jedoch nur Robinson et al. untersuchten bisher den Einfluss der Interaktion von mechanischer Stimulation und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die Genexpression mechanosensitiver und Wnt-responsiver Gene (Robinson et al. 2006). Sie zeigten unter anderem einen sensibilisierenden Effekt

durch Gsk-3β-Inhibierung auf die mechanische Aktivierung von Cox-2, Wnt10b und Fzd2. In der vorliegenden Studie konnte ein sensibilisierender Effekt der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte Expression der mit der Osteogenese assoziierten Marker Runx2, Cox-2 und Cyr61 gezeigt werden.

Die Herunterregulation der Proteinexpression der adipogenen Marker Cebpα und Pparγ durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs wurde durch zusätzliche mechanische Stimulation zu dem untersuchten Zeitpunkt und mit dem verwendeten Stimulationsprotokoll jedoch nicht beeinflusst. Eine Anpassung des mechanischen Stimulationsprotokolls könnte jedoch möglicherweise die Untersuchung des Einflusses von mechanischer Stimulation auf die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs ermöglichen (Sen et al. 2011).

Der beobachtete sensibilisierende Effekt auf die mit der Osteogenese assoziierten Marker legt nahe, dass neben dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg noch andere Signalwege, wie zum Beispiel der durch Wnt5a induzierte nichtkanonische Wnt-Signaltransduktionsweg, an der Übertragung eines mechanischen Reizes beteiligt sein könnten.

Wnt10b, ein spezifischer Wnt-Ligand des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs, hemmt die Adipogenese und fördert die Osteogenese. Ross et al. zeigten, dass Wnt10b während der adipogenen Differenzierung von Präadipozyten herunterreguliert wurde und, wenn ektopisch exprimiert, es durch Stabilisierung von freiem, zytosolischem β-Catenin die Adipogenese hemmte (Ross et al. 2000). Bennett et al. zeigten im transgenen Mausmodell, dass die Überexpression von Wnt10b im Knochenmark die Knochenmasse erhöhte (Bennett et al. 2002). In vitro zeigten sie, dass Wnt10b die osteogene Differenzierung der stromalen Zelllinie ST2 förderte, indem es Runx2 induzierte und Cebpa und Ppary hemmte. Aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf die Adipogenese und seiner fördernden Wirkung auf die Osteoblastogenese wurde in der vorliegenden Studie die Regulation der Genexpression von Wnt10b durch mechanische Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs untersucht (Abbildung 3.13). Die Genexpression Wnt10b Aktivierung von wurde durch die des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs signifikant erhöht, durch mechanische Stimulation hingegen nur tendenziell. Die durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs induzierte Genexpression wurde tendenziell durch mechanische Stimulation erhöht. Die Genexpression von Wnt10b wird also durch die

Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs induziert. Mechanische Stimulation aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg leicht, aber in einem viel geringeren Ausmaß als die spezifische Inhibierung der Gsk-3β mit SB415286. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und die der oben zitierten Arbeiten von Ross et al. und Bennett et al. lassen also vermuten (Bennett et al. 2002, Ross et al. 2000), dass Wnt10b nach Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs transkripiert wird und das Protein dann durch Bindung an Wnt-Rezeptoren wie Fzd2 und Lrp5/6 das Ausgangssignal wie zum Beispiel einen mechanischen Stimulus potenziert.

Diese Vermutung wird durch die in der vorliegenden Studie beobachtete Erhöhung der Genexpression von Fzd2 durch mechanische Stimulation und Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs unterstützt (Abbildung 3.13). Außerdem zeigten Bennett et al., dass Fzd2 in Präadipozyten stark exprimiert ist und dessen Geneexpression während der adipogenen Differenzierung gehemmt wird (Bennett et al. 2002). Daraus schlossen sie, dass der Rezeptor Fzd2 an der Inhibierung der Adipogenese von MSCs durch Wnt10b beteiligt ist. Später fanden Kennell et al. heraus, dass Fzd2 die Adipogenese über einen β -Catenin-unabhängigen Signalweg hemmt, vermutlich unter Beteiligung von Calcineurin (Kennell and MacDougald 2005). Calcineurin wiederum ist an dem nicht-kanonischen Wnt/Ca²⁺-Signaltransduktionsweg beteiligt, der durch Wnt5a aktiviert wird (Niehrs 2012).

Die Genexpressionen des dem nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg zugeordneten Liganden Wnt5a und seines Rezeptors Ror2 wurden sowohl durch mechanische Belastung als auch durch SB415286 erhöht (Abbildung 3.13). Bereits Arnsdorf et al. postulierten die Beteiligung von Wnt5a und Ror2 an der mechanisch induzierten osteogenen Differenzierung (Arnsdorf et al. 2009a). Sie zeigten, dass in C3H10T1/2-Zellen die Genexpression beider Gene durch fluid flow erhöht wird. Wnt5a und Ror2 wiederum können den RhoA-Signalweg aktivieren, der eine wichtige Rolle bei der mechanischen Induzierung der osteogenen Differenzierung spielt (Arnsdorf et al. 2009b, Shi et al. 2012). Die erhöhte Genexpres-Wnt5a Ror2 durch Aktivierung Wnt/β-Cateninsion von und des Signaltransduktionswegs mit dem Gsk-3β-Inhibitor SB415286 in der vorliegenden Studie zeigt, dass es eine Interaktion zwischen dem Wnt/ß-Catenin- und dem nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg geben muss. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Boland et al. sehr interessant (Boland et al. 2004). Sie zeigten, dass Wnt3a über den β-Catenin-Tcf-Signalweg die Proliferati-

on von MSCs förderte und deren osteogene Differenzierung reversibel hemmte. Wnt5a hingegen hatte kaum Einfluss auf die Proliferation, förderte aber die osteogene Differenzierung. Darüber hinaus wurde die Ror2-Expression während der osteogenen Differenzierung signifikant erhöht. Es scheint also einen "Schalter" vom Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg zum nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg zu geben, der den Übergang der MSCs vom Proliferationsstadium in die osteogene Differenzierung kontrolliert. Für diesen Übergang könnte die in der vorliegenden Studie beobachtete erhöhte Genexpression von Wnt5a und Ror2 durch die Aktivierung von β -Catenin der erste Schritt sein.

Die Histon3-Lysin9-Methyltransferase Setdb1 führt als *downstream-target* von Wnt5a die Inhibierung der Transkription von Pparγ durch Histon-Methylierung aus und ist somit unmittelbar an der Inhibierung der Adipogenese beteiligt (Takada et al. 2007). In der vorliegenden Studie wurde die Genexpression von Setdb1 sowohl durch mechanische Stimulation als auch durch Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs erhöht. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass der nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg sowohl durch mechanische Stimulation als auch durch durch mechanische Stimulation wird und damit an der Regulation der Differenzierung von MSCs beteiligt ist.

β-Catenin, das Schlüsselprotein des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs, wurde wie erwartet durch mechanische Stimulation und Behandlung mit SB415286 vermehrt durch Dephosphorylierung aktiviert, während die Proteinexpression des allgemeinen β-Catenins unverändert blieb (Abbildung 3.15). Auch Armstrong et al. zeigten, dass mechanische Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zur Dephosphorylierung von β-Catenin in osteoblastären Zellen führten (Armstrong et al. 2007). Die Aktivierung durch mechanische Stimulation war zwischen 1 h und 3 h am stärksten. Während dieser Zeitspanne konnten die Autoren auch eine Translokation von β-Catenin in den Zellkern beobachten. Die Tcf/Lef-Reporteraktivität wurde ebenfalls durch mechanische Stimulation erhöht.

4.3.3 Einfluss von mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf den Methylierungsstatus des Pparγ-Promotors unter adipogenen Bedingungen

Um den Methylierungsstatus des Pparγ-Promotors (Zhu et al. 1995) nach mechanischer Stimulation und Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs

mit SB415286 zu untersuchen, wurde nach der Bisulfitmodifizierung eine methylierungsspezifische PCR (MSP) und eine Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP) durchgeführt.

Die Methylierung des Ppary-Promotors ist ein Mechanismus, durch den die Transkription von Ppary gehemmt wird (Takada et al. 2007). Doch in der vorliegenden Studie konnte mittels MSP, bei der die Primer spezifisch an methylierte CG-Dinukleotide (MF/MR-Primerpaar) bzw. an die entsprechenden nicht-methylierten CG-Dinukleotide (UF/UR-Primerpaar) binden (Shiraz 2012), keine Erhöhung des Methylierungsstatus durch mechanische Belastung und Behandlung mit SB415286 im Vergleich zur Behandlungskontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 3.16). Auch mittels BSP, bei der eine ganze CpG-Insel untersucht wurde (Shiraz 2012), konnte keine Erhöhung des Methylierungsstatus durch die Behandlung mit SB415286 im Vergleich zur Behandlungskontrolle nachgewiesen werden.

Für die Unterschiede zwischen der Literatur (Fujiki et al. 2009) und der vorliegenden Studie könnte es verschiedene Ursachen geben. Die einfachste Erklärung wäre, dass die in der vorliegenden Studie untersuchte CpG-Insel nicht an der Regulierung der Pparγ-Transkription durch Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs beteiligt war. Denn Fujiki et al. zeigten in der präadipozytären Zelllinie 3T3-L1, dass die Methylierung des Pparγ-Promotors während der adipogenen Differenzierung abnahm (Fujiki et al. 2009). Leider war in der Studie nicht, wie zum Beispiel durch die Angabe einer NCBI-Referenzsequenz, eindeutig beschrieben, welche Promotorregionen genau untersucht wurden. Damit war ein direkter Vergleich mit der vorliegenden Studie nicht möglich.

Darüber hinaus sind die MSP und BSP sehr sensible aber auch sehr fehleranfällige Methoden. So könnte eine nicht vollständige Bisulfitmodifizierung zu einem falschen Ergebnis geführt haben (Patterson et al. 2011). Außerdem ist die bisulfitmodifizierte DNA durch den hohen A/T-Anteil sehr schwer zu sequenzieren (Li and Dahiya 2002). Eine weitere Fehlerquelle ist die Stichprobenanzahl. Umso höher die Anzahl der Wiederholungen pro Primerpaar gewählt wurde, desto zuverlässiger ist das Endergebnis: So wurden in der vorliegenden Studie lediglich 2 Klonierungsansätze verwendet, während zum Beispiel Fujiki et al. 8 Klonierungsansätze verwendete (Fujiki et al. 2009).

Es wäre also durchaus interessant weitere CpG-Inseln zu untersuchen und dann die Anzahl der Klonierungsansätze zu erhöhen. Außerdem sollten Kontrollen, um eine erfolgreiche Bisulfitmodifizierung zu belegen, verwendet werden.

4.4 Schlussfolgerung

Sowohl die Aktivierung des Wnt/β-Catenin- als auch die des ER-Signaltransduktionsweg erhöhten die mechanisch induzierte, kortikale Knochenformation und stimulierten zelluläre Prozesse, die an der mechanisch induzierten Osteogenese beteiligt sind. Bei gleichzeitiger Aktivierung dieser beiden Signaltransduktionswege wurde dieser fördernde Effekt aufgehoben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion dieser beiden Signaltransduktionswege ein Mechanismus ist, durch den der gesunde Knochen sehr fein abgestimmt auf wechselnde mechanische Ansprüche reagieren kann.

Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die Mechanismen dieser Interaktion besser zu verstehen. So könnte zum Bespiel die immunhistochemische Untersuchung der Verteilung und Konzentration von ERa und ERß in den Osteoblasten und Osteozyten in den in der vorliegenden Studie untersuchten Behandlungsgruppen weiteren Aufschluss über den hier beobachteten Effekt der Östrogen-Applikation 4 Wochen nach Ovarektomie geben. Des weiteren könnte die Isolation von mRNA aus Osteoblasten und Osteozyten aus dem Bereich der Ulna, in dem die Knochenformation beobachtet wurde, und deren Untersuchung auf differenziell exprimierte, an der mechanisch induzierten Osteogenese beteiligte Gene die Regulation dieser Gene in den verschiedenen Behandlungsgruppen aufdecken.

Erste Hinweise auf die zugrundeliegenden zellulären Prozesse lieferten die *in vitro*-Experimente in der präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1. Doch auch hier sind weiterführende Experimente nötig. Ein wichtiger Ansatz ist zum Beispiel der Nachweis der in der vorliegenden Arbeit vermuteten Zeitabhängigkeit bei dem Einfluss der Interaktion von mechanischer Stimulation, Wnt/β-Catenin- und ER-Signaltransduktionsweg auf die Expression der hier untersuchten Gene mit Hilfe von Zeitversuchen.

Die Untersuchungen der Expression von Genen des kanonischen und des nichtkanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg lassen eine komplexe Interaktion dieser Signalwege bei der Regulation der Differenzierung von MSCs vermuten. Hierbei könnte der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg die osteogene Differenzierung einleiten und der durch Wnt5a aktivierte nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg für die spätere osteogene Differenzierung essenziell sein. Zur näheren Beleuchtung dieser Interaktion wären fortführende Experimente, wie zum Beispiel die Untersuchung der Gene Wnt5a und Ror2 auf Tcf-Bindungsstellen, interessant.

Auch weiterführende Experimente mit spezifischen Aktivatoren des nichtkanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs könnten zur näheren Beleuchtung dieser Interaktion beitragen. Des Weiteren wäre es interessant die ersten Untersuchungen zur DNA-Methylierung des adipogenen Markers Pparγ durch die Untersuchung weiterer CpG-Inseln im Pparγ-Promotor zu ergänzen.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die *in vivo*-Untersuchung des Einflusses der Interaktion des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs auf die mechanische Regulation der Knochenmasse und die Aufdeckung möglicher zugrundeliegender, zellulärer Mechanismen *in vitro*.

Hierfür wurde in vivo zur mechanischen Stimulation das nicht invasive Ulna-Belastungsmodell in der ovarektomierten Maus verwendet und die Signaltransduktionswege wurden mit einem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator bzw. mit Östrogen aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung des Wnt/β-Catenin- als auch die des ER-Signaltransduktionswegs einen sensibilisierenden Effekt auf die mechanisch induzierte, kortikale Knochenformation hatte. Die Komplexität der Interaktion zwischen mechanischer Stimulation, dem Wnt/
B-Catenin- und dem ER-Signaltransduktionsweg konnte vor allem an der periostalen Knochenoberfläche gezeigt werden. Denn eine bedeutende und zuvor in der Literatur noch nicht beschriebene Beobachtung war, das Östrogen 4 Wochen nach Ovarektomie die mechanisch induzierte Knochenformation förderte. Der durch die Ovarektomie induzierte Ostrogenmangel schien die knochenbildenden Zellen für die Östrogenbehandlung sensibilisiert zu haben. Bei gleichzeitiger Applikation hatten Östrogen und der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator in den ovarektomierten Mäusen keinen sensibilisierenden Effekt mehr auf die periostale, mechanisch induzierte Knochenformation. Die Interaktion des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs hatte also vermutlich zu einem negative feedback geführt.

Zur Aufdeckung möglicher zellulärer Mechanismen, die diesem *negative feedback* zugrunde gelegen haben könnten, wurde der Einfluss der Interaktion des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs auf die mechanisch induzierte osteogene Antwort von osteoblastären Zellen *in vitro* näher beleuchtet. Untersucht wurden die Proteinkomplexbildung aus ERα und β-Catenin, die Reporteraktivität des Wnt-responsiven Topflash-Plasmids sowie der Transkription früh-responsiver, mit der Osteogenese assoziierter Gene in der präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1. Es konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Stimulation sowie die Aktivierung des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs eine komplexe Interaktion zur Feinregulation der zellulären, an der Mechanotransduktion beteiligten Prozesse stattfindet. Auch hier schien die Aktivierung des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs jeweils zu einer Sensibilisierung der untersuchten zellulären Prozesse zu führen, während deren gleichzeitige Akti-

vierung zu einem *negative feedback* geführt zu haben schien. Dieses *negative feedback* war jedoch nicht auf Genexpressionsebene zu beobachten. Es wäre interessant dieses Ergebnis in weiterführenden Versuchen näher zu beleuchten.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Interaktion zwischen mechanischer Stimulation und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen untersucht. Mittels der Versuche in den mesenchymalen Stammzellen C3H10T1/2 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs eine sensibilisierende Wirkung auf die Inhibierung der Adipogenese und auf die Aktivierung der Expression von mit der Osteogenese assoziierten Genen hatte. Außerdem lassen die Untersuchungen der Expression von Genen des kanonischen und des nichtkanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs eine komplexe Interaktion dieser Signalwege bei der Regulation der Differenzierung von MSCs vermuten. Hierbei scheint der nicht-kanonische Wnt-Ligand Wnt5a eine Rolle zu spielen.

Abschließend lieferten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit neue Belege dafür, dass die Interaktion des Wnt/β-Catenin- und des ER-Signaltransduktionswegs ein wichtiger Mechanismus in der komplexen und fein abgestimmten Antwort des Knochens auf wechselnde mechanische Beanspruchungen ist.

6 Literaturverzeichnis

- (1993) Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94, 646-50.
- Afzal, A. R., A. Rajab, C. D. Fenske, M. Oldridge, N. Elanko, E. Ternes-Pereira, B. Tuysuz, V. A. Murday, M. A. Patton, A. O. Wilkie & S. Jeffery (2000) Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet*, 25, 419-22.
- Aguirre, J. I., L. I. Plotkin, A. R. Gortazar, M. M. Millan, C. A. O'Brien, S. C. Manolagas & T. Bellido (2007) A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem*, 282, 25501-8.
- Ai, M., S. L. Holmen, W. Van Hul, B. O. Williams & M. L. Warman (2005) Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, 25, 4946-55.
- Almeida, M., L. Han, M. Martin-Millan, L. I. Plotkin, S. A. Stewart, P. K. Roberson, S. Kousteni, C. A. O'Brien, T. Bellido, A. M. Parfitt, R. S. Weinstein, R. L. Jilka & S. C. Manolagas (2007) Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*, 282, 27285-97.
- Almeida, M., S. Iyer, M. Martin-Millan, S. M. Bartell, L. Han, E. Ambrogini, M. Onal, J. Xiong, R. S. Weinstein, R. L. Jilka, C. A. O'Brien & S. C. Manolagas (2013) Estrogen receptor-alpha signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest*, 123, 394-404.
- Araki, Y., S. Okamura, S. P. Hussain, M. Nagashima, P. He, M. Shiseki, K. Miura & C. C. Harris (2003) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res*, 63, 728-34.
- Armstrong, V. J., M. Muzylak, A. Sunters, G. Zaman, L. K. Saxon, J. S. Price & L. E. Lanyon (2007) Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, 282, 20715-27.
- Arnaud, S. B., D. J. Sherrard, N. Maloney, R. T. Whalen & P. Fung (1992) Effects of 1-week head-down tilt bed rest on bone formation and the calcium endocrine system. *Aviat Space Environ Med*, 63, 14-20.
- Arnsdorf, E. J., P. Tummala & C. R. Jacobs (2009a) Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One*, 4, e5388.
- Arnsdorf, E. J., P. Tummala, R. Y. Kwon & C. R. Jacobs (2009b) Mechanically induced osteogenic differentiation--the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics. *J Cell Sci*, 122, 546-53.
- Babic, A. M., M. L. Kireeva, T. V. Kolesnikova & L. F. Lau (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6355-60.
- Bakker, A. D., J. Klein-Nulend & E. H. Burger (2003) Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 677-83.
- Baron, R. & G. Rawadi (2007) Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology*, 148, 2635-43.
- Beil, F. T., Barvencik, F., Gebauer, M., Seitz, S., Rueger, J.M., Ignatius, A., Pogoda, P., Schinke, T., Amling, M. (2010) Effects of estrogen on fracture healing in mice. *J. of Trauma*.

- Bennett, C. N., S. E. Ross, K. A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K. W. Johnson, S. D. Harrison & O. A. MacDougald (2002) Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*, 277, 30998-1004.
- Bergmann, P., J. J. Body, S. Boonen, Y. Boutsen, J. P. Devogelaer, S. Goemaere, J. Kaufman, J. Y. Reginster & S. Rozenberg (2010) Loading and skeletal development and maintenance. *J Osteoporos*, 2011, 786752.
- Bjornstrom, L. & M. Sjoberg (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol,* 19, 833-42.
- Bodine, P. V., R. A. Henderson, J. Green, M. Aronow, T. Owen, G. S. Stein, J. B. Lian & B. S. Komm (1998) Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. *Endocrinology*, 139, 2048-57.
- Boland, G. M., G. Perkins, D. J. Hall & R. S. Tuan (2004) Wht 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 93, 1210-30.
- Bonewald, L. F. (2006) Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision,* 3, 7-15.
- --- (2011) The amazing osteocyte. J Bone Miner Res, 26, 229-38.
- Bonewald, L. F. & M. L. Johnson (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 42, 606-15.
- Bord, S., A. Horner, S. Beavan & J. Compston (2001) Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2309-14.
- Bord, S., D. C. Ireland, S. R. Beavan & J. E. Compston (2003) The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 32, 136-41.
- Boyden, L. M., J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M. A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna & R. P. Lifton (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, 346, 1513-21.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson & M. Carlquist (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-8.
- Cao, Z., C. West, C. S. Norton-Wenzel, R. Rej, F. B. Davis, P. J. Davis & R. Rej (2009) Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res*, 34, 101-8.
- Cardona-Gomez, P., M. Perez, J. Avila, L. M. Garcia-Segura & F. Wandosell (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci*, 25, 363-73.
- Case, N., M. Ma, B. Sen, Z. Xie, T. S. Gross & J. Rubin (2008) Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem*, 283, 29196-205.
- Case, N., J. Thomas, B. Sen, M. Styner, Z. Xie, K. Galior & J. Rubin (2011) Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *J Biol Chem*, 286, 39450-6.
- Centrella, M. & T. L. McCarthy (2012) Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts direct, indirect, circumspect, and speculative effects. *Steroids*, 77, 174-84.

- Chambers, T. J., M. Evans, T. N. Gardner, A. Turner-Smith & J. W. Chow (1993) Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone Miner*, 20, 167-78.
- Chandar, N., R. Saluja, P. C. Lamar, K. Kolman & W. C. Prozialeck (2005) P53 and beta-catenin activity during estrogen treatment of osteoblasts. *Cancer Cell Int*, 5, 24.
- Chang, J., Z. Wang, E. Tang, Z. Fan, L. McCauley, R. Franceschi, K. Guan, P. H. Krebsbach & C. Y. Wang (2009) Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med*, 15, 682-9.
- Chang, L. & M. Karin (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37-40.
- Chaqour, B. & M. Goppelt-Struebe (2006) Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J*, 273, 3639-49.
- Cheneval, D., R. J. Christy, D. Geiman, P. Cornelius & M. D. Lane (1991) Cell-free transcription directed by the 422 adipose P2 gene promoter: activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 8465-9.
- Cheng, M. Z., G. Zaman, S. C. Rawlinson, R. F. Suswillo & L. E. Lanyon (1996) Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures of rat ulna. *J Bone Miner Res*, 11, 502-11.
- Christodoulides, C., M. Laudes, W. P. Cawthorn, S. Schinner, M. Soos, S. O'Rahilly, J. K. Sethi & A. Vidal-Puig (2006) The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci*, 119, 2613-20.
- Chyun, Y. S. & L. G. Raisz (1984) Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins*, 27, 97-103.
- Clarke, B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol,* 3 Suppl 3, S131-9.
- Coghlan, M. P., A. A. Culbert, D. A. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith & J. C. Holder (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*, *7*, 793-803.
- Dang, Z. C., R. L. van Bezooijen, M. Karperien, S. E. Papapoulos & C. W. Lowik (2002) Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res*, 17, 394-405.
- David, V., A. Martin, M. H. Lafage-Proust, L. Malaval, S. Peyroche, D. B. Jones, L. Vico & A. Guignandon (2007) Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*, 148, 2553-62.
- de Groot, R. E., R. S. Ganji, O. Bernatik, B. Lloyd-Lewis, K. Seipel, K. Sedova, Z. Zdrahal, V. M. Dhople, T. C. Dale, H. C. Korswagen & V. Bryja (2014) Huwe1-mediated ubiquitylation of dishevelled defines a negative feedback loop in the wnt signaling pathway. *Sci Signal*, 7, ra26.
- DeChiara, T. M., R. B. Kimble, W. T. Poueymirou, J. Rojas, P. Masiakowski, D. M. Valenzuela & G. D. Yancopoulos (2000) Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet*, 24, 271-4.
- Demiralp, B., H. L. Chen, A. J. Koh, E. T. Keller & L. K. McCauley (2002) Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos. *Endocrinology*, 143, 4038-47.

- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall & G. Karsenty (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.
- Duque, G. (2007) As a matter of fat: new perspectives on the understanding of age-related bone loss. *BoneKEy-Osteovision*, 4, 129-140.
- Eghbali-Fatourechi, G., S. Khosla, A. Sanyal, W. J. Boyle, D. L. Lacey & B. L. Riggs (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*, 111, 1221-30.
- Emerton, K. B., B. Hu, A. A. Woo, A. Sinofsky, C. Hernandez, R. J. Majeska, K. J. Jepsen & M. B. Schaffler (2010) Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone*, 46, 577-83.
- Fitzpatrick, L. A. (2006) Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol,* 50, 705-19.
- Flodby, P., C. Barlow, H. Kylefjord, L. Ahrlund-Richter & K. G. Xanthopoulos (1996) Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. J Biol Chem, 271, 24753-60.
- Franceschi, R. T. & G. Xiao (2003) Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*, 88, 446-54.
- Frost, H. M. (1987) Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec,* 219, 1-9.
- Fujiki, K., F. Kano, K. Shiota & M. Murata (2009) Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. BMC Biol, 7, 38.
- Galea, G. L., L. B. Meakin, T. Sugiyama, N. Zebda, A. Sunters, H. Taipaleenmaki, G. S. Stein, A. J. van Wijnen, L. E. Lanyon & J. S. Price (2013) Estrogen receptor alpha mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor beta. *J Biol Chem*, 288, 9035-48.
- Garnero, P., E. Sornay-Rendu, M. C. Chapuy & P. D. Delmas (1996) Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 11, 337-49.
- Gaur, T., C. J. Lengner, H. Hovhannisyan, R. A. Bhat, P. V. Bodine, B. S. Komm,
 A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein & J. B. Lian (2005)
 Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating
 Runx2 gene expression. *J Biol Chem*, 280, 33132-40.
- Gong, Y., R. B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A. M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F. H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W. N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J. A. Batch, P. Beighton, G. C. Black, R. G. Boles, L. M. Boon, C. Borrone, H. G. Brunner, G. F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M. L. Halfhide, B. Hall, R. C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Juppner, C. A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T. Letteboer, L. Peltonen, R. S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M. J. van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B. R. Olsen, M. L. Warman & G. Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107, 513-23.

- Grigoriadis, A. E., Z. Q. Wang, M. G. Cecchini, W. Hofstetter, R. Felix, H. A. Fleisch & E. F. Wagner (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclastmacrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266, 443-8.
- Grigoriadis, A. E., Z. Q. Wang & E. F. Wagner (1995) Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet*, 11, 436-41.
- Gurkan, U. A. & O. Akkus (2008) The mechanical environment of bone marrow: a review. Ann Biomed Eng, 36, 1978-91.
- Haapasalo, H., P. Kannus, H. Sievanen, M. Pasanen, K. Uusi-Rasi, A. Heinonen,
 P. Oja & I. Vuori (1998) Effect of long-term unilateral activity on bone mineral density of female junior tennis players. *J Bone Miner Res*, 13, 310-9.
- Hannon, R., A. Blumsohn, K. Naylor & R. Eastell (1998) Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res*, 13, 1124-33.
- Harris, S. A., Subramaniam, M., Riggs, B. L., Spelsberg, T. C. (1992) Estrogen induces c-fos promoter acitivity in normal human osteoblast-like cells. *JBMR*, 7, S94.
- He, X., M. Semenov, K. Tamai & X. Zeng (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131, 1663-77.
- Herrmann, B. L., B. Saller, O. E. Janssen, P. Gocke, A. Bockisch, H. Sperling, K. Mann & M. Broecker (2002) Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. J Clin Endocrinol Metab, 87, 5476-84.
- Hikiji, H., T. Takato, T. Shimizu & S. Ishii (2008) The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res*, 47, 107-26.
- Hofbauer, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. C. Spelsberg & B. L. Riggs (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 140, 4367-70.
- Hsieh, Y. F., A. G. Robling, W. T. Ambrosius, D. B. Burr & C. H. Turner (2001) Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. *J Bone Miner Res*, 16, 2291-7.
- Hu, E., J. B. Kim, P. Sarraf & B. M. Spiegelman (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, 274, 2100-3.
- Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji & K. Matsumoto (2003) The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 131-9.
- Jagger, C. J., J. W. Chow & T. J. Chambers (1996) Estrogen suppresses activation but enhances formation phase of osteogenic response to mechanical stimulation in rat bone. *J Clin Invest*, 98, 2351-7.
- Jeltsch, A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 3, 274-93.
- Jessop, H. L., M. Sjoberg, M. Z. Cheng, G. Zaman, C. P. Wheeler-Jones & L. E. Lanyon (2001) Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res*, 16, 1045-55.
- Jilka, R. L., K. Takahashi, M. Munshi, D. C. Williams, P. K. Roberson & S. C. Manolagas (1998) Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the

murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest*, 101, 1942-50.

- Johnson, M. L., G. Gong, W. Kimberling, S. M. Recker, D. B. Kimmel & R. B. Recker (1997) Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet*, 60, 1326-32.
- Justesen, J., K. Stenderup, E. N. Ebbesen, L. Mosekilde, T. Steiniche & M. Kassem (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*, *2*, 165-71.
- Kaestner, K. H., R. J. Christy & M. D. Lane (1990) Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 251-5.
- Kanno, T., T. Takahashi, W. Ariyoshi, T. Tsujisawa, M. Haga & T. Nishihara (2005) Tensile mechanical strain up-regulates Runx2 and osteogenic factor expression in human periosteal cells: implications for distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg, 63, 499-504.
- Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Beck, L. Claes & A. Ignatius (2002) Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech*, 35, 873-80.
- Kawata, A. & Y. Mikuni-Takagaki (1998) Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 404-8.
- Kennell, J. A. & O. A. MacDougald (2005) Wht signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 280, 24004-10.
- Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S. (1981) Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Japanese journal of oral biology*, 23, 899-901.
- Kousteni, S., T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O'Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, G. B. DiGregorio, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, P. K. Roberson, R. S. Weinstein, R. L. Jilka & S. C. Manolagas (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 719-30.
- Kousteni, S., L. Han, J. R. Chen, M. Almeida, L. I. Plotkin, T. Bellido & S. C. Manolagas (2003) Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest*, 111, 1651-64.
- Kouzmenko, A. P., K. Takeyama, S. Ito, T. Furutani, S. Sawatsubashi, A. Maki, E. Suzuki, Y. Kawasaki, T. Akiyama, T. Tabata & S. Kato (2004) Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem*, 279, 40255-8.
- Kramer, I., C. Halleux, H. Keller, M. Pegurri, J. H. Gooi, P. B. Weber, J. Q. Feng, L.
 F. Bonewald & M. Kneissel (2010) Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol*, 30, 3071-85.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lanyon, L. E. & C. T. Rubin (1984) Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech*, 17, 897-905.
- Lau, K. H., S. Kapur, C. Kesavan & D. J. Baylink (2006) Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. J Biol Chem, 281, 9576-88.

- Lean, J. M., A. G. Mackay, J. W. Chow & T. J. Chambers (1996) Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol*, 270, E937-45.
- Lecka-Czernik, B., C. J. Rosen & M. Kawai (2010) Skeletal aging and the adipocyte program: New insights from an "old" molecule. *Cell Cycle*, 9, 3648-54.
- Lee, K. C., H. Jessop, R. Suswillo, G. Zaman & L. E. Lanyon (2004) The adaptive response of bone to mechanical loading in female transgenic mice is deficient in the absence of oestrogen receptor-alpha and -beta. *J Endocrinol*, 182, 193-201.
- Lee, K. C., A. Maxwell & L. E. Lanyon (2002) Validation of a technique for studying functional adaptation of the mouse ulna in response to mechanical loading. *Bone*, 31, 407-12.
- Leung, J. Y., F. T. Kolligs, R. Wu, Y. Zhai, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho & E. R. Fearon (2002) Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem*, 277, 21657-65.
- Li, C. Y., W. S. Jee, J. L. Chen, A. Mo, R. B. Setterberg, M. Su, X. Y. Tian, Y. F. Ling & W. Yao (2003) Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int*, 72, 42-9.
- Li, L. C. & R. Dahiya (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18, 1427-31.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris & D. Wu (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*, 280, 19883-7.
- Liedert, A., L. Mattausch, V. Rontgen, R. Blakytny, D. Vogele, M. Pahl, R. Bindl, C. Neunaber, T. Schinke, S. Harroch, M. Amling & A. Ignatius (2011) Midkinedeficiency increases the anabolic response of cortical bone to mechanical loading. *Bone*, 48, 945-51.
- Liedert, A., L. Wagner, L. Seefried, R. Ebert, F. Jakob & A. Ignatius (2010) Estrogen receptor and Wnt signaling interact to regulate early gene expression in response to mechanical strain in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 755-9.
- Lin, F. T. & M. D. Lane (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev,* 6, 533-44.
- --- (1994) CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8757-61.
- Little, R. D., J. P. Carulli, R. G. Del Mastro, J. Dupuis, M. Osborne, C. Folz, S. P. Manning, P. M. Swain, S. C. Zhao, B. Eustace, M. M. Lappe, L. Spitzer, S. Zweier, K. Braunschweiger, Y. Benchekroun, X. Hu, R. Adair, L. Chee, M. G. FitzGerald, C. Tulig, A. Caruso, N. Tzellas, A. Bawa, B. Franklin, S. McGuire, X. Nogues, G. Gong, K. M. Allen, A. Anisowicz, A. J. Morales, P. T. Lomedico, S. M. Recker, P. Van Eerdewegh, R. R. Recker & M. L. Johnson (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 70, 11-9.
- Liu, J., J. Stevens, C. A. Rote, H. J. Yost, Y. Hu, K. L. Neufeld, R. L. White & N. Matsunami (2001) Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*, 7, 927-36.

- Liu, Y., B. Rubin, P. V. Bodine & J. Billiard (2008) Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem*, 105, 497-502.
- Lu, B., Y. J. Jiang & P. C. Choy (2004) 17-Beta estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages. *Mol Cell Biochem*, 262, 101-10.
- Lu, Y., G. Thiagarajan, D. P. Nicolella & M. L. Johnson (2012) Load/strain distribution between ulna and radius in the mouse forearm compression loading model. *Med Eng Phys*, 34, 350-6.
- Maeda, K., Y. Kobayashi, N. Udagawa, S. Uehara, A. Ishihara, T. Mizoguchi, Y. Kikuchi, I. Takada, S. Kato, S. Kani, M. Nishita, K. Marumo, T. J. Martin, Y. Minami & N. Takahashi (2012) Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*, 18, 405-12.
- Manavathi, B. & R. Kumar (2006) Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol*, 207, 594-604.
- Manolagas, S. C. & M. Almeida (2007) Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol,* 21, 2605-14.
- Manolagas, S. C. & R. L. Jilka (1995) Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*, 332, 305-11.
- Marie, P. J. (2008) Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys, 473, 98-105.
- Martin-Millan, M., M. Almeida, E. Ambrogini, L. Han, H. Zhao, R. S. Weinstein, R. L. Jilka, C. A. O'Brien & S. C. Manolagas (2010) The estrogen receptoralpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol*, 24, 323-34.
- Martin, R. B. & S. L. Zissimos (1991) Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. *Bone,* 12, 123-31.
- Martin, T. J. & N. A. Sims (2005) Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 11, 76-81.
- Matsuzawa, S. I. & J. C. Reed (2001) Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*, 7, 915-26.
- McBride, S. H. & M. J. Silva (2012) Adaptive and Injury Response of Bone to Mechanical Loading. *Bonekey Osteovision*, 1.
- Mikuni-Takagaki, Y., Y. Suzuki, T. Kawase & S. Saito (1996) Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. *Endocrinology*, 137, 2028-35.
- Miller, S. C., B. M. Bowman, M. A. Miller & C. M. Bagi (1991) Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*, 12, 439-46.
- Modder, U. I., J. A. Clowes, K. Hoey, J. M. Peterson, L. McCready, M. J. Oursler,
 B. L. Riggs & S. Khosla (2011) Regulation of circulating sclerostin levels by sex steroids in women and in men. *J Bone Miner Res*, 26, 27-34.
- Modder, U. I., B. L. Riggs, T. C. Spelsberg, D. G. Fraser, E. J. Atkinson, R. Arnold & S. Khosla (2004) Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur J Endocrinol*, 151, 503-10.
- Mosley, J. R., B. M. March, J. Lynch & L. E. Lanyon (1997) Strain magnitude related changes in whole bone architecture in growing rats. *Bone*, 20, 191-8.

- Nakamura, T., Y. Imai, T. Matsumoto, S. Sato, K. Takeuchi, K. Igarashi, Y. Harada, Y. Azuma, A. Krust, Y. Yamamoto, H. Nishina, S. Takeda, H. Takayanagi, D. Metzger, J. Kanno, K. Takaoka, T. J. Martin, P. Chambon & S. Kato (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130, 811-23.
- Neidlinger-Wilke, C., E. S. Grood, J.-C. Wang, R. A. Brand & L. Claes (2001) Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res*, 19, 286-93.
- Neidlinger-Wilke, C., H. J. Wilke & L. Claes (1994) Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res*, 12, 70-8.
- Niehrs, C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 767-79.
- Norvell, S. M., M. Alvarez, J. P. Bidwell & F. M. Pavalko (2004) Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 75, 396-404.
- Nuttall, M. E., A. J. Patton, D. L. Olivera, D. P. Nadeau & M. Gowen (1998) Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res,* 13, 371-82.
- Ogasawara, A., T. Arakawa, T. Kaneda, T. Takuma, T. Sato, H. Kaneko, M. Kumegawa & Y. Hakeda (2001) Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*, 276, 7048-54.
- Oishi, I., H. Suzuki, N. Onishi, R. Takada, S. Kani, B. Ohkawara, I. Koshida, K. Suzuki, G. Yamada, G. C. Schwabe, S. Mundlos, H. Shibuya, S. Takada & Y. Minami (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells*, 8, 645-54.
- Okazaki, R., D. Inoue, M. Shibata, M. Saika, S. Kido, H. Ooka, H. Tomiyama, Y. Sakamoto & T. Matsumoto (2002) Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*, 143, 2349-56.
- Otsu, N. (1979) A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics,* SMC-9, 62-66.
- Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos, B. R. Olsen, P. B. Selby & M. J. Owen (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89, 765-71.
- Oursler, M. J., C. Cortese, P. Keeting, M. A. Anderson, S. K. Bonde, B. L. Riggs & T. C. Spelsberg (1991) Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology*, 129, 3313-20.
- Paech, K., P. Webb, G. G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P. J. Kushner & T. S. Scanlan (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277, 1508-10.
- Pajamäki, I., H. Sievanen, P. Kannus, J. Jokihaara, T. Vuohelainen & T. L. Jarvinen (2008) Skeletal effects of estrogen and mechanical loading are structurally distinct. *Bone*, 43, 748-57.
- Parfitt, A. M., M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott & R. R. Recker (1987) Bone histomorphometry: standardization of

nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2, 595-610.

- Parisi, M. S., E. Gazzerro, S. Rydziel & E. Canalis (2006) Expression and regulation of CCN genes in murine osteoblasts. *Bone*, 38, 671-7.
- Patterson, K., L. Molloy, W. Qu & S. Clark (2011) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Polakis, P. (2001) More than one way to skin a catenin. *Cell*, 105, 563-6.
- Price, J. S., T. Sugiyama, G. L. Galea, L. B. Meakin, A. Sunters & L. E. Lanyon (2011) Role of endocrine and paracrine factors in the adaptation of bone to mechanical loading. *Curr Osteoporos Rep*, 9, 76-82.
- Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez & A. F. Moorman (2003) Assumptionfree analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339, 62-6.
- Rauner, M., Stein, N., Hofbauer, L.C. 2012a. Basic of bone biology. In *Principles* of osteoimmunology: Molecular mechanisms and clinical applications, ed. P. Pietschmann, 2.
- ---. 2012b. Basic of bone biology. In *Principles of osteoimmunology: Molecular mechanisms and clinical applications,* ed. P. Pietschmann, 3.
- ---. 2012c. Basic of bone biology. In *Principles of osteoimmunology: Molecular mechanisms and clinical applications,* ed. P. Pietschmann, 4.
- ---. 2012d. Basic of bone biology. In *Principles of osteoimmunology: Molecular mechanisms and clinical applications,* ed. P. Pietschmann, 6.
- ---. 2012e. Basic of bone biology. In *Principles of osteoimmunology: Molecular mechanisms and clinical applications,* ed. P. Pietschmann, 1.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn & E. R. Prossnitz (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307, 1625-30.
- Reznikoff, C. A., D. W. Brankow & C. Heidelberger (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*, 33, 3231-8.
- Riggs, B. L., S. Khosla & L. J. Melton, 3rd (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*, 23, 279-302.
- Rivera-Gonzalez, R., D. N. Petersen, G. Tkalcevic, D. D. Thompson & T. A. Brown (1998) Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 64, 13-24.
- Robinson, J. A., M. Chatterjee-Kishore, P. J. Yaworsky, D. M. Cullen, W. Zhao, C. Li, Y. Kharode, L. Sauter, P. Babij, E. L. Brown, A. A. Hill, M. P. Akhter, M. L. Johnson, R. R. Recker, B. S. Komm & F. J. Bex (2006) Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*, 281, 31720-8.
- Robling, A. G., A. B. Castillo & C. H. Turner (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*, 8, 455-98.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldridge, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris & C. H. Turner (2008) Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*, 283, 5866-75.
- Rosen, E. D. & O. A. MacDougald (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 885-96.

- Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson & O. A. MacDougald (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289, 950-3.
- Rubin, C. T. & L. E. Lanyon (1985) Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int*, 37, 411-7.
- Sampath, D., R. C. Winneker & Z. Zhang (2001) Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17betaestradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology*, 142, 2540-8.
- Sample, S. J., M. A. Racette, Z. Hao, C. F. Thomas, M. Behan & P. Muir (2012) Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PLoS One*, 7, e43215.
- Sapir-Koren, R. & G. Livshits (2013) Is interaction between age-dependent decline in mechanical stimulation and osteocyte-estrogen receptor levels the culprit for postmenopausal-impaired bone formation? *Osteoporos Int*, 24, 1771-89.
- Sato, A., H. Yamamoto, H. Sakane, H. Koyama & A. Kikuchi (2010) Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J*, 29, 41-54.
- Sawakami, K., A. G. Robling, M. Ai, N. D. Pitner, D. Liu, S. J. Warden, J. Li, P. Maye, D. W. Rowe, R. L. Duncan, M. L. Warman & C. H. Turner (2006) The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem*, 281, 23698-711.
- Saxon, L. K., G. Galea, L. Meakin, J. Price & L. E. Lanyon (2012) Estrogen receptors alpha and beta have different gender-dependent effects on the adaptive responses to load bearing in cancellous and cortical bone. *Endocrinology*, 153, 2254-66.
- Saxon, L. K. & L. E. Lanyon (2008) Assessment of the in vivo adaptive response to mechanical loading. *Methods Mol Biol*, 455, 307-22.
- Schutze, N., U. Noth, J. Schneidereit, C. Hendrich & F. Jakob (2005) Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal*, 3, 5.
- Schutze, N., R. Schenk, J. Fiedler, T. Mattes, F. Jakob & R. E. Brenner (2007) CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells. *BMC Cell Biol*, 8, 45.
- Seisenberger, S., J. R. Peat, T. A. Hore, F. Santos, W. Dean & W. Reik (2013) Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20110330.
- Semenov, M., K. Tamai & X. He (2005) SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, 280, 26770-5.
- Semenov, M. V. & X. He (2006) LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem*, 281, 38276-84.
- Sen, B., M. Styner, Z. Xie, N. Case, C. T. Rubin & J. Rubin (2009) Mechanical loading regulates NFATc1 and beta-catenin signaling through a GSK3beta control node. *J Biol Chem*, 284, 34607-17.
- Sen, B., Z. Xie, N. Case, M. Ma, C. Rubin & J. Rubin (2008) Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology*, 149, 6065-75.

- Sen, B., Z. Xie, N. Case, M. Styner, C. T. Rubin & J. Rubin (2011) Mechanical signal influence on mesenchymal stem cell fate is enhanced by incorporation of refractory periods into the loading regimen. *J Biomech*, 44, 593-9.
- Shevde, N. K., A. C. Bendixen, K. M. Dienger & J. W. Pike (2000) Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7829-34.
- Shi, Y., Y. Fu, W. Tong, Y. Geng, P. P. Lui, T. Tang, X. Zhang & K. Dai (2012) Uniaxial mechanical tension promoted osteogenic differentiation of rat tendon-derived stem cells (rTDSCs) via the Wnt5a-RhoA pathway. J Cell Biochem, 113, 3133-42.
- Shiraz, O. B., Galehdari, H., Yavarian, M., Geramizadeh, B., Kafilzadeh, F., Janfeshan, S. (2012) Comparative study of direct bisulfite sequencing PCR and methylation specific PCR to detect methylation pattern of DNA. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11, 445-449.
- Si, W., Q. Kang, H. H. Luu, J. K. Park, Q. Luo, W. X. Song, W. Jiang, X. Luo, X. Li, H. Yin, A. G. Montag, R. C. Haydon & T. C. He (2006) CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol*, 26, 2955-64.
- Simmons, D. L., R. M. Botting & T. Hla (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56, 387-437.
- Sims, N. A., P. Clement-Lacroix, D. Minet, C. Fraslon-Vanhulle, M. Gaillard-Kelly, M. Resche-Rigon & R. Baron (2003) A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 111, 1319-27.
- Sims, N. A., S. Dupont, A. Krust, P. Clement-Lacroix, D. Minet, M. Resche-Rigon, M. Gaillard-Kelly & R. Baron (2002) Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*, 30, 18-25.
- Spencer, G. J., J. C. Utting, S. L. Etheridge, T. R. Arnett & P. G. Genever (2006) Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci*, 119, 1283-96.
- Srivastava, S., G. Toraldo, M. N. Weitzmann, S. Cenci, F. P. Ross & R. Pacifici (2001) Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. J Biol Chem, 276, 8836-40.
- Su, J. L., J. Chiou, C. H. Tang, M. Zhao, C. H. Tsai, P. S. Chen, Y. W. Chang, M. H. Chien, C. Y. Peng, M. Hsiao, M. L. Kuo & M. L. Yen (2010) CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the {alpha}v{beta}3 integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *J Biol Chem*, 285, 31325-36.
- Sunters, A., V. J. Armstrong, G. Zaman, R. M. Kypta, Y. Kawano, L. E. Lanyon & J.
 S. Price (2010) Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strainregulated estrogen receptor alpha-mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to Ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptorindependent activation of beta-catenin signaling. J Biol Chem, 285, 8743-58.

- Takada, I., M. Mihara, M. Suzawa, F. Ohtake, S. Kobayashi, M. Igarashi, M. Y. Youn, K. Takeyama, T. Nakamura, Y. Mezaki, S. Takezawa, Y. Yogiashi, H. Kitagawa, G. Yamada, S. Takada, Y. Minami, H. Shibuya, K. Matsumoto & S. Kato (2007) A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol*, 9, 1273-85.
- Takeuchi, S., K. Takeda, I. Oishi, M. Nomi, M. Ikeya, K. Itoh, S. Tamura, T. Ueda,
 T. Hatta, H. Otani, T. Terashima, S. Takada, H. Yamamura, S. Akira & Y.
 Minami (2000) Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells*, 5, 71-8.
- Tamura, I., J. Rosenbloom, E. Macarak & B. Chaqour (2001) Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281, C1524-32.
- Tatsumi, S., K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita & K. Ikeda (2007) Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, **5**, 464-75.
- Thotala, D. K., D. E. Hallahan & E. M. Yazlovitskaya (2008) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta attenuates neurocognitive dysfunction resulting from cranial irradiation. *Cancer Res,* 68, 5859-68.
- Tomkinson, A., E. F. Gevers, J. M. Wit, J. Reeve & B. S. Noble (1998) The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res*, 13, 1243-50.
- Tomkinson, A., J. Reeve, R. W. Shaw & B. S. Noble (1997) The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 3128-35.
- Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale & B. M. Spiegelman (1995a) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*, 15, 351-7.
- Tontonoz, P., E. Hu & B. M. Spiegelman (1995b) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*, 5, 571-6.
- Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan & Y. Yang (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol*, 162, 899-908.
- Torrance, A. G., J. R. Mosley, R. F. Suswillo & L. E. Lanyon (1994) Noninvasive loading of the rat ulna in vivo induces a strain-related modeling response uncomplicated by trauma or periostal pressure. *Calcif Tissue Int*, 54, 241-7.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- Turner, R. T. (1999) Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 14, 187-91.
- Turner, R. T., J. J. Vandersteenhoven & N. H. Bell (1987) The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res*, 2, 115-22.
- Umayahara, Y., R. Kawamori, H. Watada, E. Imano, N. Iwama, T. Morishima, Y. Yamasaki, Y. Kajimoto & T. Kamada (1994) Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. J Biol Chem, 269, 16433-42.
- Van Wesenbeeck, L., E. Cleiren, J. Gram, R. K. Beals, O. Benichou, D. Scopelliti,
 L. Key, T. Renton, C. Bartels, Y. Gong, M. L. Warman, M. C. De Vernejoul,
 J. Bollerslev & W. Van Hul (2003) Six novel missense mutations in the LDL

receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet,* 72, 763-71.

- Varea, O., J. J. Garrido, A. Dopazo, P. Mendez, L. M. Garcia-Segura & F. Wandosell (2009) Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons. *PLoS One*, 4, e5153.
- Verborgt, O., N. A. Tatton, R. J. Majeska & M. B. Schaffler (2002) Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res*, 17, 907-14.
- Wagner, E. F. (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 2, ii40-2.
- Wagner, L. 2011. Interaktion zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg in der Mechanotransduktion. In *Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik.* Deutsche Nationalbibliothek: Universität Ulm.
- Walter, P., S. Green, G. Greene, A. Krust, J. M. Bornert, J. M. Jeltsch, A. Staub, E. Jensen, G. Scrace, M. Waterfield & et al. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7889-93.
- Weinbaum, S., S. C. Cowin & Y. Zeng (1994) A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech*, 27, 339-60.
- Whittle, B. J., C. Varga, A. Posa, A. Molnar, M. Collin & C. Thiemermann (2006) Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol*, 147, 575-82.
- Windahl, S. H., L. Saxon, A. E. Borjesson, M. K. Lagerquist, B. Frenkel, P. Henning, U. H. Lerner, G. L. Galea, L. B. Meakin, C. Engdahl, K. Sjogren, M. C. Antal, A. Krust, P. Chambon, L. E. Lanyon, J. S. Price & C. Ohlsson (2013) Estrogen receptor-alpha is required for the osteogenic response to mechanical loading in a ligand-independent manner involving its activation function 1 but not 2. *J Bone Miner Res*, 28, 291-301.
- Wronski, T. J., L. M. Dann, K. S. Scott & M. Cintron (1989) Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int,* 45, 360-6.
- Wu, D. & W. Pan (2010) GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci*, 35, 161-8.
- Yamamoto, H., S. Kishida, T. Uochi, S. Ikeda, S. Koyama, M. Asashima & A. Kikuchi (1998) Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of Xenopus embryos. *Mol Cell Biol*, 18, 2867-75.
- Yavropoulou, M. P. & J. G. Yovos (2007) The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens),* 6, 279-94.
- Yeh, C. R., J. J. Chiu, C. I. Lee, P. L. Lee, Y. T. Shih, J. S. Sun, S. Chien & C. K. Cheng (2010) Estrogen augments shear stress-induced signaling and gene expression in osteoblast-like cells via estrogen receptor-mediated expression of beta1-integrin. J Bone Miner Res, 25, 627-39.
- Yeh, J. K., J. F. Aloia & M. L. Barilla (1994) Effects of 17 beta-estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. *Bone Miner*, 24, 223-34.
- Yeh, J. K., C. C. Liu & J. F. Aloia (1993) Additive effect of treadmill exercise and 17 beta-estradiol replacement on prevention of tibial bone loss in adult ovariectomized rat. *J Bone Miner Res*, 8, 677-83.
- Yokose, S., T. Ishizuya, T. Ikeda, T. Nakamura, H. Tsurukami, K. Kawasaki, T. Suda, S. Yoshiki & A. Yamaguchi (1996) An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate

proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. *Endocrinology*, 137, 469-78.

- Yu, S. J., H. C. Liu, E. Ling-Ling, D. S. Wang & G. X. Zhu (2012) Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237, 395-406.
- Yun, K. & S. H. Im (2007) Lef1 regulates COX-2 transcription in chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun, 364, 270-5.
- Zaidi, M. (2007) Skeletal remodeling in health and disease. Nat Med, 13, 791-801.
- Zaman, G., H. L. Jessop, M. Muzylak, R. L. De Souza, A. A. Pitsillides, J. S. Price & L. L. Lanyon (2006) Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen. *J Bone Miner Res*, 21, 1297-306.
- Zhang, F., C. J. Phiel, L. Spece, N. Gurvich & P. S. Klein (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*, 278, 33067-77.
- Zhang, X., E. M. Schwarz, D. A. Young, J. E. Puzas, R. N. Rosier & R. J. O'Keefe (2002) Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest*, 109, 1405-15.
- Zhu, Y., C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, M. S. Rao & J. K. Reddy (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7921-5.



LEBENSLAUF

_	_	

Persönliche Daten

Geburtsdatum 24.08.1984

Beruflicher Werdegang

seit 05/2014

Assistentin der Geschäftsführung bei der AMA-SYSTEMS GmbH, Pforzheim Schwerpunkt: Qualitätsmanagement, Kundenbetreuung, Messevorbereitung



02/2010 - 12/2013

Ausbildung

02/2010 - 12/2013	Dissertation am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm, Ulm Schwerpunkt: Untersuchungen zur Mechanotransduktion bei Osteoporose in der Zellkultur und im Mausmodell angestrebter Abschluss: Doktor der Humanbiologie
10/2004 - 01/2010	Agrarbiologie-Studium an der Universität Hohenheim, Stuttgart Schwerpunkte: Molekularbiologie, Biotechnologie Abschluss: Diplom-Agrarbiologin

10/1996 - 06/2004Otto-Hahn-Gymnasium, Ostfildern-Nellingen
Abschluss: Abitur