

**Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 modulieren  
die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen  
im Knochenmark**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Katrin Huck (geb. Rau)

aus Rastatt

Tübingen, 2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

25.07.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	3
1.1 Osteoporose .....	3
1.2 Knochenfunktion und -umbau .....	3
1.3 Zellen des Knochens und Knochenmarks .....	4
1.4 Wichtige Interaktionspartner im Knochenmetabolismus.....	14
1.5 Die RhoGTPasen als Signalvermittler zwischen Osteoblasten und Adipozyten .....	20
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	23
<b>2. Material und Methoden</b> .....	24
2.1 Material .....	24
2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	37
2.3 Zellbiologische Methoden.....	39
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	42
2.5 Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.6 Färbungen und histologische Methoden .....	47
2.7 Statistische Methoden .....	51
<b>3. Ergebnisse</b> .....	52
3.1 Die Rolle der Integrine und der extrazellulären Matrix im Zusammenspiel mit den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten oder Adipozyten .....	52
3.2 Auswirkungen des konditionellen Knockouts mittels des Osterix Promotors auf die Knochen- und Adipozytenentwicklung <i>ex vivo</i> .....	76
3.3 Der Einfluss der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in den MSCs auf die hämatopoetischen Stammzellen .....	93
<b>4. Diskussion</b> .....	105
4.1 Relevanz der Adipogenese im Knochenmark .....	105
4.2 Die Rolle der Osteoblasten bei der Adipogenese.....	106
4.3 Die Rolle der Integrine in der Adipogenese .....	107
4.4 Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 als Vermittler der Differenzierung der MSCs.....	109
4.5 Osterix beeinflusst die MSCs und damit die Knochen- und Adipozytenentwicklung in den konditionellen Knockout-Mäusen.....	112
4.6 Die Cre-Rekombinase beeinflusst die Hämatopoese .....	115
4.7 Der Einfluss von Cdc42 und Rac1 in MSCs auf HSPCs im Knochenmark .....	116
4.8 Schlussfolgerung und Ausblick .....	118
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	120
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	140
<b>7. Tagungsbeiträge aus dieser Arbeit</b> .....	141
<b>8. Lebenslauf</b> .....	142
<b>9. Danksagung</b> .....	145
<b>10. Erklärung</b> .....	146

## Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchloridkalium
Aj.Ar.	<i>engl.: adjusted apposition rate</i>
AK	Antikörper
$\alpha$ MEM	<i>engl.: advanced minimum essential medium</i>
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance</i>
AKT	Proteinkinase B
ALP	Alkalische Phosphatase
BFR	<i>engl.: bone formation rate</i>
BMD	<i>engl.: bone mineral density</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BS	<i>engl.: bone surface</i>
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>engl.: cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	<i>engl.: complementary deoxyribonucleic acid</i>
C/EBP $\beta$	<i>engl.: CCAAT-enhancer-binding protein beta</i>
cKO	konditioneller Knockout
Col I	Kollagen $\alpha$ 1(I)
Cre	<i>engl.: causes recombination</i>
CT	Kontrolle
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
Dexa	Dexamethason
DLK1	<i>engl.: delta like non-canonical notch ligand 1</i>
DMEM	<i>engl.: Dulbecco's modified eagle medium"</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doxy	Doxyzyklin
DPBS	<i>engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
ECL	<i>engl.: enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>engl.: extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>engl.: enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>engl.: extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>engl.: fluorescent activated cell sorting</i>
FAK	<i>engl.: focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>engl.: fetal calf serum</i>
fl	<i>engl.: floxed</i>
FN	Fibronektin
fwd	<i>engl.: forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
het	heterozygot
hom	homozygot
HPRT	Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>engl.: horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>engl.: hematopoetic stem cell</i>
ITG	Integrin

kDa	Kilo Dalton
KEB	Klinische experimenteller Bereich
IBF	Interfakultäre biomedizinische Forschungseinrichtung
JNK	<i>engl.: c-Jun N-terminal kinase</i>
loxP	<i>engl.: locus of crossing over</i>
MAPK	<i>engl.: mitogen activated protein kinase</i>
MLT	<i>engl.: mineralising lag time</i>
mRNA	<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i>
MSC	<i>engl.: mesenchymal stem cell</i>
OB	Osteoblast
Ob.N	<i>engl.: osteoblast number</i>
OC	Osteoklast
Oc.N	<i>engl.: osteoclast number</i>
Osx	Osterix
PBS	<i>engl.: phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>engl.: phosphate buffered saline -Tween</i>
PCR	<i>engl.: polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pFN	Plasmafibronektin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PPAR $\gamma$	<i>engl.: peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
qPCR	<i>engl.: quantitative real time PCR</i>
Rac1	<i>engl.: ras-related C3 botulinum toxin substrat 1</i>
rev	<i>engl.: reverse</i>
Rho	<i>engl.: ras homologue</i>
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Sca-1	<i>engl.: stem cells antigen-1</i>
Scr	<i>engl.: scramble</i>
SDS	<i>engl.: sodium dodecylsulfate</i>
siRNA	<i>engl.: small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
Tris	Tris(hydrxymethyl)aminomethan
VCAM	<i>engl.: vascular cell adhesion molecule 1</i>
Wnt	<i>engl.: wingless-type</i>
WtOB	Wildtyp-Osteoblasten

# 1. Einleitung

## 1.1 Osteoporose

Osteoporose gehört zu den zehn häufigsten Erkrankungen weltweit (WHO). Erstmals wurde die Erkrankung 1885 durch den deutschen Pathologen Gustav Pommer beschrieben (Avioli and Krane, 2013; Bassan et al., 1963). Jede dritte Frau und jeder fünfte Mann über 50 Jahren erleidet einen Knochenbruch durch Osteoporose und die Tendenz bleibt steigend mit zunehmendem Alter, vor allem in entwickelten Ländern (Reginster and Burlet, 2006; Gauthier et al., 2011; Ballane et al., 2017). Besonders betroffen sind Frauen nach der Menopause. Männer trifft es meist erst 10-20 Jahre später. Trotz der enormen Kosten für das Gesundheitswesen - geschätzt liegen diese bei ca. 9 Milliarden Euro pro Jahr in Deutschland - wird diese Erkrankung in vielerlei Hinsicht vernachlässigt (Bleibler et al., 2013; Svedbom et al., 2013).

Osteoporose manifestiert sich nicht nur durch die Verminderung der Knochendichte, sondern auch durch eine Krümmung des Rückens und starke Schmerzen, die durch die Einklemmung der Nerven auf Grund kleiner Wirbelbrüche verursacht werden können und damit die Lebensqualität der Betroffenen stark beeinflussen. Des Weiteren führt die Osteoporose zu einem erhöhten Risiko Frakturen schon bei geringster Belastung zu erleiden. Ein Oberschenkelhalsbruch führt bei ca. 3% der über 50-jährigen Patienten zum Tode (Center et al., 1999; Trombetti et al., 2002; Kanis et al., 2003).

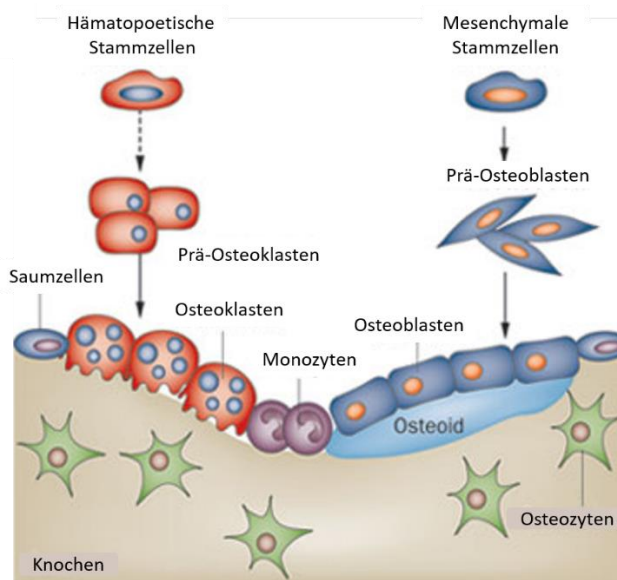
Die Auslöser einer solchen Erkrankung können mehrere Faktoren beinhalten. Primär haben genetische Disposition, die Ernährung, zu wenig Bewegung, sowie Alkohol- und Zigarettenkonsum einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus. Des Weiteren können andere Erkrankungen wie zum Beispiel Leber – und Nierenerkrankungen, Hormon – und Schilddrüsenstörungen, Adipositas, sowie Prostata- und Brustkrebs und die daraus folgenden Medikamenteneinnahmen die Ursache von Osteoporose sein (Rosen and Bouxsein, 2006; Cao, 2011; Pietschmann et al., 2016; Porter and Bhimji, 2017).

## 1.2 Knochenfunktion und -umbau

Der Knochen dient in höheren Vertebraten als Stützskelett und fungiert als Schutz der inneren Organe, sowie als Speicher für Kalzium und Phosphat (Seibel et al., 2006; Chapter 12: A. Boskey). Bei der Knochenbildung (Osteogenese) kommt es zu einem kontrollierten Zusammenspiel von vier verschiedenen Zelltypen: den Osteoblasten, Saumzellen, Osteozyten und den Osteoklasten, die die Funktion und Stabilität eines gesunden Knochens gewährleisten bzw. aufrechterhalten (Florencio-Silva et al., 2015).

Der Knochenumbau findet ein Leben lang statt und regeneriert das Gesamtskelett alle 10 Jahre neu, indem Osteoklasten den Knochen abbauen und Osteoblasten neuen Knochenmasse aufbauen (Abbildung 1, Lian et al., 2012). In diesem Verlauf werden mehrere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mineralien aus der Knochenmatrix resorbiert oder von den dort lokalisierten Zellen sezerniert. Im Detail werden durch die Anregung von sensorischen Osteozyten aufgrund einer mechanischen Belastung des Knochens Transkriptionsfaktoren wie Sklerostin oder RANKL (engl.: receptor activator NF- $\kappa$ B ligand) freigesetzt und aktivieren damit die Rekrutierung von Osteoklasten, welche die Knochenmatrix abbauen. Dabei werden osteogene Faktoren und Wachstumsfaktoren, wie zum

Beispiel TGF- $\beta$  (engl.: transforming growth factor – beta) und IGF-1 (engl.: insulin-like growth factor 1) freigesetzt. Diese rekrutieren mesenchymale Stammzellen (MSC, engl.: mesenchymal stem cell), welche zu Osteoblasten differenzieren können und die Neubildung von Osteoid gewährleisten (Manolagas and Jilka, 1995; Horowitz and Lorenzo, 2004; Rachner et al., 2011; Long, 2012; Crane and Cao, 2014; Pietschmann et al., 2016). Der genauere Differenzierungsprozess der Osteoblasten ist im Abschnitt 1.3.1. beschrieben.



**Abbildung 1: Knochenumbau und Regulationskreislauf der Knochenhomöostase**

Osteoklasten, welche aus den hämatopoetischen Stammzellen differenzieren, resorbieren die Knochenmatrix. Anschließend startet die Knochenneubildung, indem Wachstumsfaktoren aus dem Bereich der resorbierenden Knochenmatrix bzw. den Osteoklasten freigesetzt werden und damit die Osteoblasten aktivieren, welche neues Osteoid bilden und dieses mineralisieren (modifiziert nach Lian et al. 2012).

Wird dieser kontrollierte Umbauprozess gestört, wie zum Beispiel bei hormonellen Veränderungen nach der Menopause bei Frauen, kann dies unter anderem zu einer Verminderung der Knochendichte und damit zu einer Osteoporose führen (Manolagas and Jilka, 1995; Rachner et al., 2011).

## 1.3 Zellen des Knochens und Knochenmarks

### 1.3.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind Matrix-mineralisierende und somit knochenbildende Zellen, die von multipotenten mesenchymalen Stammzellen abstammen, welche außerdem zu Adipozyten, Chondrozyten und Myoblasten differenzieren können (Friedenstein et al., 1976; James, 2013; Rutkovskiy et al., 2016). Im reifen Stadium besitzen Osteoblasten eine Größe von ca. 20 $\mu$ m, haben eine würfelartige Form und sind im Gegensatz zu den Präosteoblasten differenziert und nicht mehr in der Lage zu proliferieren (Florencio-Silva et al., 2015). An der Reifung der Osteoblasten ist unter anderem der Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg mit den nachgeschalteten osteogenen Transkriptionsfaktoren CBFA1/Runx2 (engl.: core-binding factor  $\alpha$ -1/Runt related transcription factor 2) und Osterix beteiligt (Ducy et al., 1997; Malaval et al., 1999; Long, 2012). Bei der Differenzierung liegen die reifen Osteoblasten epithelähnlich nebeneinander aufgereiht auf der Knochenmatrix und produzieren

extrazelluläre Proteine wie Kollagen Typ I, Fibronectin, Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin und Osteonektin. Die hauptsächlich produzierte Kollagen Typ I-Matrix ist das sogenannte unmineralisierte Osteoid. Mittels der alkalischen Phosphatase (ALP) wird anschließend Kalziumphosphat eingelagert und das Osteoid mineralisiert. Des Weiteren besitzen sie Rezeptoren für Hormone, Zytokine und Vitamin D und sind verantwortlich für die Produktion einiger Wachstumsfaktoren, wie BMP (engl.: bone morphogenic proteins), IGF, TGF- $\beta$  und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Anderson, 1989; Blair et al., 2002; Liu et al., 2012b; Long, 2011). Weiter sind Osteoblasten über Zell-Zell-Kanäle, den sogenannten *gap junctions*, mit einander verbunden und können so eine parallel ablaufende Knochenneubildung gewährleisten (Stains and Civitelli, 2005).

Es gibt im Knochen zwei Mechanismen der Ossifikation (Verknöcherung), die desmale (direkte) und chondrale (indirekte) Ossifikation bei der die osteoblastische Differenzierung von Bedeutung ist. Bei der desmalen Ossifikation entstehen platte Knochen wie z.B. die Schädel- und Beckenknochen. Dabei kommt es nach der Runx2-Aktivierung zu einer direkten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten, die sich dann zu reifen Osteoblasten entwickeln. Der restliche Teil des Skeletts, das axiale Knochengerüst und die Extremitäten, entstehen durch die indirekte Ossifikation. D.h. die Präosteoblasten entwickeln sich entweder aus perichondralen Zellen oder Chondroblasten und differenzieren erst dann zu reifen Osteoblasten aus (Rutkovskiy et al., 2016). Die Differenzierung von Präosteoblasten zu reifen würfelförmigen Osteoblasten wird durch unterschiedliche Faktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten reguliert. Zu den Hauptinduktoren gehören die Zytokine BMP 2, 4, 6 und 7, die sowohl die Osteogenese als auch die Adipogenese, die Bildung von Fettzellen im Knochenmark, beeinflussen können (Muruganandan et al., 2009a). Zu den weiteren relevanten frühen Faktoren der Differenzierung gehören Runx2, ALP und Osx (Osterix; SP7). Diese stimulieren weitere Gene wie z.B. Osteokalzin. Dieses Protein fördert die Ablagerung der Mineralien im Osteoid und trägt somit zur Bildung einer neuen Knochenmatrix bei (Rutkovskiy et al., 2016).

Nach dem aktiven Wachstumsprozess der reifen Osteoblasten sterben ca. 50-80% durch Apoptose und der Rest der verbliebenen Osteoblasten bleibt als abgeflachte inaktive Saumzellen (engl.: bone lining cells) auf der neu entstandenen Knochenmatrix und decken diese ab oder werden in den Knochen eingelagert (Jilka et al., 2007; Wein, 2017). Diese Zellen durchlaufen noch eine weitere Entwicklungsphase und werden dann als Osteozyten bezeichnet, welche ca. 90% aller Knochenzellen ausmachen. Sie stehen durch ein stark verzweigtes Netzwerk von zellulären Fortsätzen in ständiger Verbindung sowohl mit anderen Osteozyten, als auch mit Osteoblasten und Osteoklasten und können damit auch mechanosensorische Reize aus der Umgebung weiterleiten (Bonewald, 2007; Long, 2011; Jakob and Felsenberg, 2013).

Die Knochenzellen kommunizieren aber nicht nur untereinander, sondern führen ein reziprokes Verhältnis mit weiteren Zellen im Knochenmark. Dazu gehören z.B. die Adipozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Immunzellen, welche ebenfalls bei Fehlregulationen zu Veränderungen im Knochenmetabolismus führen können. Diese beiden Zelltypen werden in den nächsten beiden Abschnitten eingeführt und beschrieben.



### 1.3.2 Adipozyten

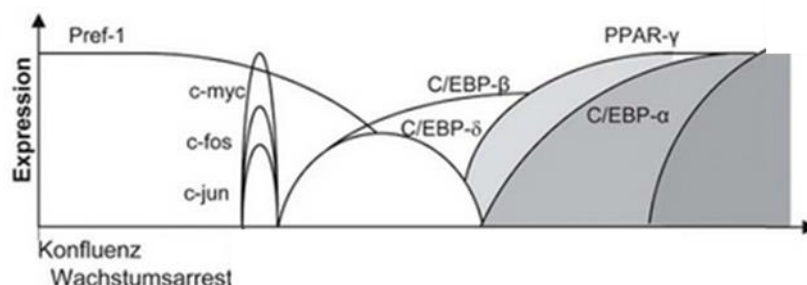
Adipozyten (Fettzellen) sind in der Regulation des Energiestoffwechsels von Bedeutung. Es gibt verschiedene Arten von Adipozyten, die das weiße, das braune und das beige bzw. gelbe Fettgewebe bilden. Bei letzterem ist sich die Wissenschaft noch uneinig, ob die Knochenmarkfettzellen zum beigen oder weißen Fett gehören oder eine ganz eigene Zellart ausmachen, da sie molekulare Eigenschaften sowohl des weißen als auch des beigen Fetts besitzen (Hardouin et al., 2016a; Scheller et al., 2016). Das weiße Fettgewebe besteht aus Zellen mit unilokulären Triglyceridtropfen, es speichert Energie und setzt bei Energieverlust Fettsäuren frei. Dabei sekretieren sie endokrine Zytokine, sogenannte Adipokine, welche den Stoffwechsel und die Bildung von Entzündungsfaktoren im Blut regulieren. Hierbei kann es zu einer Infiltrierung des Fettgewebes durch Immunzellen kommen, welche die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen verstärkt (Fasshauer and Blüher, 2015; White and Tchoukalova, 2014). Das braune Fettgewebe ist für die Umsetzung von Energie in Wärme zuständig, welches durch die Anzahl vieler Mitochondrien in den multilokulären Zellen gewährleistet ist. Das beige Fett beinhaltet unter anderem die Fettzellen im Knochenmark. Sie sind im gesamten Knochengerüst verteilt und können durch die Sekretion von Adipokinen die Knochendichte direkt und indirekt beeinflussen (Gregoire et al., 1998; Hardouin et al., 2014, 2016b).

Neuerdings stieg das Interesse an der Erforschung dieser Fettzellen, da in den unterschiedlichsten Studien ein inverser Zusammenhang zwischen den Knochenmarkadipozyten und der Knochendichte gezeigt werden konnte, welcher mit der Pathophysiologie der Osteoporose übereinstimmte (Scheller and Rosen, 2014; Schwartz, 2015; Ghali et al., 2016; Hardouin et al., 2016b). D.h. es kommt bei der Osteoporose zu einer Verminderung der Osteoblastenzahl und somit zu einer Reduzierung der Knochendichte, wobei die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark ansteigt. Sowohl beim Menschen als auch in zahlreichen Mausmodellen konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden (Fazeli et al., 2013).

Die Evolutionsbiologie zeigt, dass Knochenmarkfett schon bereits vor ca. 400-500 Millionen Jahren in Knochenfischen vorhanden war, jedoch ist bis heute die genaue Funktion dieser Zellen noch ungeklärt (Craft and Scheller, 2017). Die Funktion der Adipozyten scheint von ihrer Lokalisation im Knochenmark abhängig zu sein, wo sie meist von hämatopoetischen und osteogenen Zellen umgeben sind und deren Funktion durch parakrine oder endokrine Sekretion von Adipokinen beeinflussen. Des Weiteren gibt es zwei Arten von Knochenmarkadipozyten, die konstitutiven und regulierenden. In Säugetieren entstehen die konstitutiven Fettzellen kurz nach der Geburt im Bereich der distalen Extremitäten, füllen das Knochenmark zur Stützung auf und lassen das Knochenmark gelb erscheinen. Anschließend erfolgt im Alter, im proximalen Bereich der Extremitäten eine Zunahme der Adipozytenzahl im „roten“ Knochenmark, d.h. umgeben von hämatopoetischen Zellen, und definiert damit die regulierenden Adipozyten, welche den Knochenumbau modulieren (Craft and Scheller, 2017; Scheller et al., 2016).

Die Adipozyten stammen, wie die Osteoblasten, von den mesenchymalen Stammzellen ab. Die siegelring-förmigen Adipozyten besitzen eine mit Triglycerid-gefüllte Vakuole und haben eine Größe von ca. 100µm (Lüllman-Rauch, 2012). Die Differenzierung ist ebenfalls durch eine chronologische Abfolge von zahlreichen Molekülen in der frühen und späten Phase der Adipozytenreifung charakterisiert. Zu Beginn kommt es zu einer Rekrutierung von Vorläuferzellen, welche wie bei der Osteogenese BMP2 und BMP4, sowie den Wnt-Signalweg benötigen, und erst einige Mitosen durchlaufen (Tang and Lane, 2012). Anschließend ist die frühe Differenzierungsphase durch eine

Erhöhung der C/EBP $\beta$  und  $\delta$  (engl.: CCAAT-enhancer-binding protein) Expression gekennzeichnet, welche den Hauptdifferenzierungsmarker PPAR $\gamma$  (engl.: peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) aktivieren. Danach sind PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  dafür verantwortlich, dass die Zellen in die benötigte Arrest-Phase übergehen (Gregoire et al., 1998; Rosen and Spiegelman, 2000; Tang and Lane, 2012). Dabei sind die C/EBP Mitglieder und PPAR $\gamma$  stark voneinander abhängig. C/EBP $\beta$  kann in Abwesenheit von PPAR $\gamma$  keine Expression von C/EBP $\alpha$  induzieren, da PPAR $\gamma$  für die Freisetzung der Histon-Deacetylase-1 (HDAC1) vom C/EBP $\beta$ -Komplex, welche dann C/EBP $\alpha$  bindet, verantwortlich ist (Rosen and MacDougald, 2006; Zuo et al., 2006). Nach der Arrest-Phase kommt es zu einer klonalen Expansion und die Zellen differenzieren durch die Aktivierung weiterer adipozyten-spezifischer Proteine, wie z.B. aP2/FABP4 (engl.: adipocyte fatty acid-binding protein 4), PEPCK (engl.: phosphoenolpyruvat carboxykinase), GLUT4 (engl.: facilitated glucose transporter, member 4) und Leptin zu reifen Adipozyten (Abbildung 2) (Ganten and Ruckpaul, 2006; Gregoire et al., 1998; Tang and Lane, 2012).



**Abbildung 2: Übersicht des Regulationsschemas der Adipozyten Differenzierung**

Die Darstellung zeigt die Expression und Aktivierung der relevanten Gene für die Adipozytendifferenzierung in einer bestimmten Abfolge. Abbildung modifiziert nach Böttner et al. 2006; Ganten und Ruckpaul 2006.

Des Weiteren spielen Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Insulin, IGF-1 und TGF- $\beta$  bei der Induktion bzw. Inhibierung der adipozyten-spezifischen Genexpression und Morphologie der Zellen eine wichtige Rolle. Auch die Kommunikation mit benachbarten Zellen wie Osteoblasten und hämatopoetischen Zellen durch den Zell-Zell-Kontakt und die extrazelluläre Matrix (ECM) sind von Bedeutung, ob die Präadipozyten undifferenziert bleiben oder in den Status der Differenzierung übergehen (Sul et al., 2000). Dabei sind weitere Signalwege, unter anderem der Wnt- und MAPK (engl.: mitogen-activated protein kinase), sowie der DLK1/Pref-1 (engl.: delta like non-canonical notch ligand 1/preadipocyte factor1) Weg involviert (Ahmadian et al., 2013; Gregoire et al., 1998; Rosen and MacDougald, 2006). Somit kann die Differenzierung auch durch das Transmembranprotein DLK1/Pref-1 reguliert werden. Pref-1 ist in Präadipozyten exprimiert, notwendig für die Initiationsphase der Adipozytendifferenzierung und wird während der Differenzierung herunter reguliert. Des Weiteren kann Pref-1 von anderen Zellen als lösliches Molekül freigesetzt werden, welches dann meist einen inhibierenden Effekt auf die Adipozytenentwicklung hat (Rosen and MacDougald, 2006; Sul et al., 2000; Wang et al., 2006b). Der Verlust des Transmembranproteins Pref-1 führt *in vivo* zu Wachstumsverzögerungen, Skelettanomalitäten und einer Zunahme von Fettzellen, wohingegen die Überexpression von löslichem Pref-1 eine Abnahme des subkutanen Fettgewebe verursacht (Lee et al., 2003; Moon et al., 2002; Wang et al., 2006b). Bei der Entscheidung, ob mesenchymale Stammzellen zu Chondrozyten, Osteoblasten oder Adipozyten differenzieren, fördert Pref-1 die chondrogene Induktion, verhindert

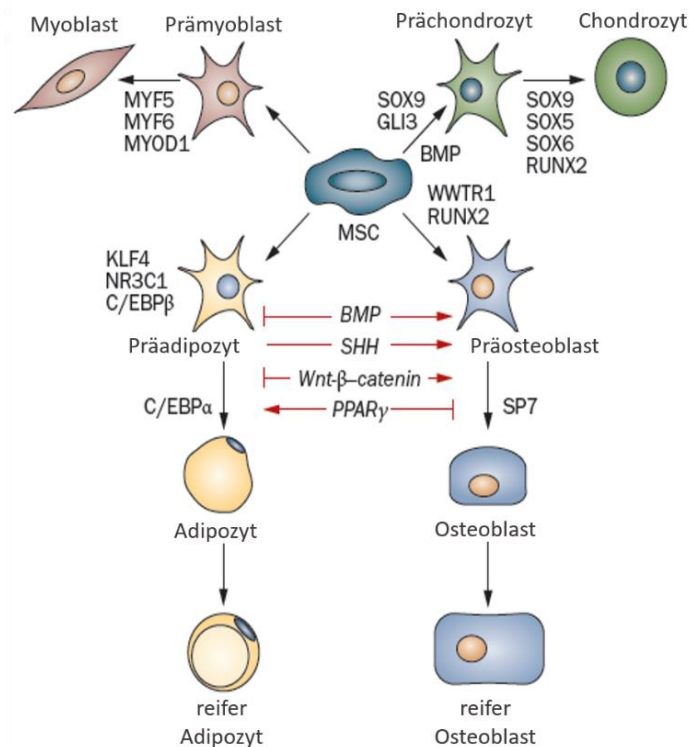
jedoch im gleichen Zug die Differenzierung zu reifen Chondrozyten, so wie auch zu reifen Osteoblasten und Adipozyten (Wang and Sul, 2009). Kim et al. konnten bei einer Signalweguntersuchung von Pref-1 zeigen, dass der MEK/ERK Weg auf eine Zeit- und Konzentrationsabhängige Weise aktiviert wird, wodurch vermutlich die Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  verhindert und die Reifung der Adipozyten unterbunden wird (Gehart et al., 2010; Kim et al., 2007).

### 1.3.3 Hämatopoetische Zellen

Die Hämatopoese (Blutzellbildung) ist ein dynamischer Prozess, an dem ca. 7 Milliarden Zellen pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag gebildet werden. Dies wird durch hämatopoetische Stammzellen (HSC) ermöglicht, die die Fähigkeit besitzen sich selbst zu replizieren (Selbsterneuerung) und durch ihre multipotente Eigenschaft in alle funktionalen Blutzellen differenzieren können (Purton and Scadden, 2008; Seita and Weissman, 2010; Wang and Ema, 2016). Der größte Teil der hämatopoetischen Stammzellen wird im Knochenmark produziert (Calvi and Link, 2014). Dabei sind die HSCs in einer bestimmten Mikroumgebung im Knochenmark lokalisiert, einer sogenannten Nische. Es gibt zwei Arten von Zellen bei der Hämatopoese, die langlebigen Zellen (LT-HSC, engl.: long-term hematopoietic stem cell), welche am Endosteum der Trabekel im Knochen lokalisiert sind und noch die Fähigkeit besitzen sich selbst zu reproduzieren und die kurzlebigen Zellen (ST-HSC, engl.: short-term hematopoietic stem cell), womit die ständige Erneuerung der Zellen im Blut gewährleistet ist (Purton and Scadden, 2008; Seita and Weissman, 2010; Sugimura et al., 2012). Eine komplexe und vielfältige Gruppe von Stromazellen im Knochenmark ist am Fortbestehen der HSCs beteiligt. Dazu gehören, wie bereits erwähnt, die Osteoblasten und Adipozyten, aber auch die Endothelzellen, perivaskuläre Zellen und Neuronen (Anthony and Link, 2014; Birbrair and Frenette, 2016; Wang and Ema, 2016). Des Weiteren können sekretierte Substanzen, wie beispielsweise die Hormone Parathormon (PTH), Östrogen und Katecholamine, sowie Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen (Hoffman and Calvi, 2014).

### 1.3.4 Interaktionen zwischen Osteoblasten, Adipozyten und hämatopoetische Zellen

In den letzten Jahren sind vor allem die Adipozyten im Knochenmark in den Fokus der Forschung gerückt, da die Zellen im Knochenmark miteinander kommunizieren und essentiell für die Reifung und Differenzierung von mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen sind (Bethel et al., 2013; Hardouin et al., 2014). Studien in Mäusen weisen die reziproken Verhältnisse zwischen verminderter Osteoblasten- und erhöhten Adipozytenanzahl auf, sowie die Möglichkeit, dass die Fettzellen die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen zu reifen Adipozyten durch bestimmte Mechanismen selbst fördern (Lecka-Czernik et al., 2002; Rosen et al., 2009). Verschiedene *in vitro* Studien demonstrieren, dass pro-adipogene Faktoren die Osteoblasten inhibieren können (Abbildung 3; Beresford et al., 1992; Muruganandan et al., 2009b; Takada et al., 2007a, 2009a). Der Hauptinitiator der Adipozyten ist, wie bereits in Abschnitt 1.3.2. erwähnt, PPAR $\gamma$ , welcher sowohl in Osteoblasten und Adipozyten, als auch in mesenchymalen Stromazellen exprimiert ist (Zhuang et al., 2016).



### Abbildung 3: Differenzierungsregulatoren der mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stromazellen besitzen durch ihre pluripotente Eigenschaft die Fähigkeit in funktionell unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren. Dabei spielen spezielle Transkriptionsfaktoren eine Rolle, welche die endgültige Entscheidung des Zellschicksals reguliert (modifiziert nach Takada et al. 2009).

PPAR $\gamma$  ist essentiell für die Verschiebung des Schwerpunktes der Differenzierung in Richtung der adipozytären Linie und wirkt damit inhibierend für die osteogene Differenzierung (Rosen et al., 2009). Dazu ist es wichtig zu verstehen, dass PPAR $\gamma$  nicht nur durch die oben genannten Faktoren C/EBP aktiviert werden kann, sondern eine autoregulative Eigenschaft besitzt (Knouff and Auwerx, 2004). Denn ob PPAR $\gamma$  anti-osteoblastisch oder pro-adipozytär wirkt, hängt von den Liganden ab, die die Signalkaskade stimulieren und das Schicksal der jeweiligen Stammzelle bestimmen (Zhuang et al., 2016). Bei Zugabe von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, sogenannten PPAR $\gamma$ -Liganden, wie Thiazolidinedione (TZD) rosiglitzone, GW0072, 15dPGJ (15-Deoxy-delta-prostaglandinJ) oder 9-HODE (9-Hydroxyoctadecadienoic acid) werden unterschiedliche Bereiche der PPAR $\gamma$ -Domänen gebunden und verschiedene Wege reguliert (Lecka-Czernik, 2010). Die Arbeitsgruppe von Lecka-Czernik et al. fand heraus, dass TZD und 15dPGJ sowohl den pro-adipogenen als auch den anti-osteoblastischen Signalweg aktivieren, in dem die CEBP/ $\alpha$  und LPL (Lipoproteinlipase) Synthese aktiviert und die Wnt10b-Expression herunter reguliert wird (Lecka-Czernik et al., 2002). Wnt10b verhindert durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges normalerweise die adipogene Differenzierung (siehe 1.4.1; Ross et al., 2000). GW0072 wiederum inhibiert die Osteoblasten ohne dabei die Adipozytendifferenzierung zu aktivieren und ist ebenfalls auf eine Suppression von Wnt10b zurückzuführen. Des Weiteren stimuliert 9-HODE die Lipidakkumulation, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Osteogenese (Lecka-Czernik et al., 2002). Die unterschiedlichen Wirkungsweisen der Liganden sind damit verbunden, dass eine Ligandenbindung zu einer allosterischen Veränderung der Domänen von PPAR $\gamma$  führt und die Dissoziation von Corepressoren damit einhergeht, dass verschiedene Coaktivatoren eine Vielzahl von Signalwegen wie BMPs, Wnt- $\beta$ -catenin, SHH (engl.: sonic hedgehog) und IGF aktivieren können (Abbildung 3; Nolte et al., 1998).

Defekte im PPAR $\gamma$  Signalweg bzw. eine Insuffizienz dieses Proteins können zu einer Erhöhung der Knochenmasse führen und fördern somit die Osteogenese (Akune et al., 2004; Cao et al., 2015; Takada et al., 2009b). Ein weiterer Interaktionspartner, der an dem molekularen Wechsel beteiligt ist, ist wie bereits erwähnt, die Wnt-Signalkaskade. Die Wnt-Aktivierung ist der Schlüssel-Signalweg für die Knochenhomöostase und Skelettstrukturierung, mehr dazu ist in Abschnitt 1.4.1 beschrieben (Baron and Kneissel, 2013). Takada et al. beschreiben, dass sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Weg bei der Osteogenese und Adipogenese von Bedeutung sind. Beispielsweise kommt es bei Wnt5a-defizienten Mäusen zu einem Verlust der Knochendichte und einer Erhöhung der Adipozyten (Takada et al., 2007b, 2009b). Normalerweise induziert Wnt5a mittels des nicht-kanonischen Weges die Osteogenese, indem Runx2 aktiviert wird und durch die PPAR $\gamma$ -Inhibierung die Adipogenese gehemmt ist (Takada et al., 2007b). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sekretierte Fettsäuren von Adipozyten, in Co-Kultur mit Osteoblasten, einen hemmenden Effekt auf deren Differenzierung haben. Der genaue Mechanismus dieser Sekretion und die verantwortlichen Faktoren sind jedoch noch nicht bekannt (Hardouin et al., 2014).

### 1.3.5 Transdifferenzierung

Eine neuere Sichtweise in der Erforschung des inversen Verhältnisses zwischen Fettzellen und Knochenzellen zeigt sich in der Untersuchung der Transdifferenzierung. D.h. differenzierte Zellen eines bestimmten Gewebes besitzen die Fähigkeit sich zu einer anderen Zelle eines anderen Gewebes umzuwandeln mit all seinen charakteristischen und molekularen Eigenschaften, sozusagen eine Reprogrammierung von bestimmten Zelltypen (Gao et al., 2014). Verschiedene Studien berichten, dass terminal differenzierte Adipozyten nicht die Möglichkeit haben zu proliferieren oder zu dedifferenzieren, während undifferenzierte Präadipozyten noch diese Fähigkeiten besitzen (Gao et al., 2014; MacDougald and Lane, 1995; Wier and Scott, 1986). Diesen Effekt beschreibt eine Studie von Justesen et al., die subkutane Präadipozyten zu knochenbildende Zellen differenzieren konnten (Justesen et al., 2004). Zu den Initiatoren der Transdifferenzierung gehören auch hier der Wnt-Signalweg, Runx2, PPAR $\gamma$  und Oberflächenrezeptoren, die sogenannten Integrine (Schilling et al., 2008). Beispielsweise demonstriert eine weitere Untersuchung, dass die Überexpression von Runx2 die Dedifferenzierung von adipozytären Progenitoren zu Osteoblasten induziert, wobei eine verstärkte Mineralisierung und eine Reduktion der PPAR $\gamma$ -Expression beschrieben wurde (Oki et al., 2008). Eine andere Studie beweist ebenfalls die Wichtigkeit von Runx2, in dem sie mittels 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, Runx2 inhibieren und damit die Transdifferenzierung von Osteoblasten zu Adipozyten induzieren (Kim et al., 2016c). Integrine spielen auch eine Rolle bei der Transdifferenzierung. Sie regulieren die Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsion und unterstützen die Organisation des intrazellulären Aktin-Zytoskeletts bei der Transdifferenzierung, da sich die Zellform hierbei verändert (Gao et al., 2014; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$ 2 die Expression von Runx2, Osx und  $\alpha$ 1(I)-Prokollagen in mesenchymalen Stromazellen vermindert wird und somit das Integrinsignal aufgrund der verminderten Konzentration des extrazellulären Matrixproteins Kollagen I verändert ist und die Adipogenese fördern kann (Lecka-Czernik et al., 2002; mehr dazu ist in Abschnitt 1.4.2 beschrieben).

Bei der Untersuchung der Transdifferenzierung ist in den letzten Jahren eine kontroverse Debatte entstanden, wobei noch nicht klar ist, ob differenzierte Zellen von einer Linie zur anderen, durch die direkte Zell-Zell-Umwandlung oder einem Zwischenschritt, der Dedifferenzierung,

transdifferenzieren können (Ullah et al., 2014). Man geht davon aus, dass vor allem die mesenchymalen Stammzellen und weiterentwickelte Progenitoren mehrere Wege einschlagen können, indem sie differenzieren, dedifferenzieren und transdifferenzieren in Abhängigkeit ihrer Mikroumgebung (Gimble et al., 2006). Dazu gibt es zwei Forschungsbeispiele: Szabo et al. protokollieren eine direkte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Blutzellen (Szabo et al., 2010). Wohingegen Ullah et al. in ihrer Studie nachweisen konnten, dass mesenchymale Stromazellen, die zuerst zu Adipozyten und anschließend zu Osteoblasten differenziert wurden, nicht direkt transdifferenzieren, sondern den Schritt der Dedifferenzierung benötigen, bevor sich die Zelle umwandelt. Dabei gehen die Zellen während der Dedifferenzierung kurzzeitig in den Zellzyklus-Arrest um anschließend die relevanten Gene für die Proliferation und Transdifferenzierung der entsprechenden neuen Zelllinie zu aktivieren (Ullah et al., 2013, 2014). Aufgrund der kontroversen Debatten in diesem Forschungsfeld, gibt es noch einige Unklarheiten die weitere Untersuchungen bedürfen. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet würden eine große Bereicherung in der regenerativen Medizin darstellen.

### 1.3.6 Die Rolle der Hämatopoese im Knochenmark

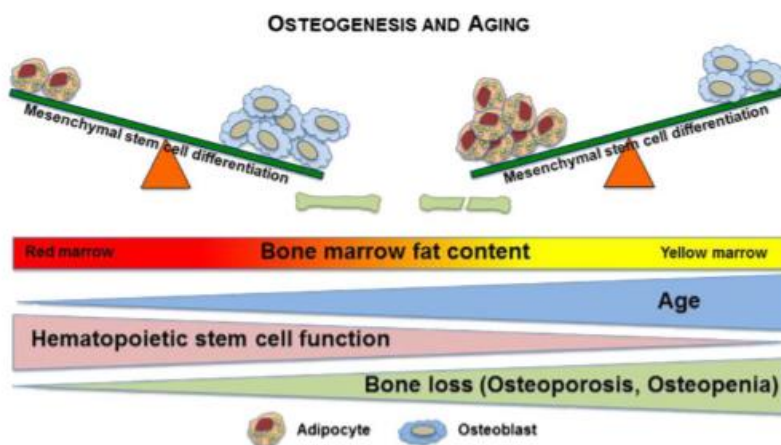
Weitere Interaktionspartner der Knochen- und Fettzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen. Die Rolle der Osteoblasten im Zusammenhang mit der Hämatopoese wurde in den letzten Jahrzehnten ausführlich untersucht. Osteoblasten interagieren mit hämatopoetischen Vorläuferzellen und induzieren damit unter anderem die Differenzierung von Osteoklasten durch den RANK-Liganden (Muruganandan and Sinal, 2014; Taichman and Emerson, 1998a). Des Weiteren tragen Osteoblasten dazu bei, dass die Homöostase der HSCs durch direkten Zell-Zell-Kontakt aufrechterhalten bleibt. Dabei werden mehrere Entwicklungsstadien der Hämatopoese wie z.B. die Granulopoese, Myelopoese und Lymphopoese beeinflusst. In diesem Fall produzieren Osteoblasten Moleküle wie EDA-Fibronektin oder Zytokine wie IL (Interleukin) -1, IL-6, IL-7, sowie GM-CSF (engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und fördern damit die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen (Rosnagl et al., 2016; Taichman and Emerson, 1998b). Die Forschungsgruppe Calvi et al. haben Mäuse generiert, die PPRs (engl.: PTH/PTHrP receptor) überexprimieren, Osteoblasten aktivieren und damit die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen durch die Aktivierung des Notch-Signalweges erhöhen (Calvi et al., 2003a). Andererseits können Osteoblasten mittels TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  Produktion die hämatopoetische Zellproliferation inhibieren und halten somit die Homöostase aufrecht (Naveiras et al., 2009; Taichman and Emerson, 1998a). Im Weiteren zeigte unsere Arbeitsgruppe eindeutig, dass die aus Osteoblasten produzierte Fibronektin-Isoform EDA das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  aktiviert und die Myelopoese *in vitro* und *in vivo* stimuliert. Dies führte zu einer Beeinflussung der Immunantwort, welche zum einen durch ein verstärktes Tumorwachstum und zum anderen durch eine Verbesserung der Leberfibrose nachgewiesen werden konnte (Rosnagl et al., 2016).

Außerdem berichten einige Studien von dem Einfluss der Osteoblasten auf die frühe B-Zellentwicklung (Garrett and Emerson, 2009; Nombela-Arrieta et al., 2011). Zwei Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass bei einer Eliminierung der Osteoblasten und einer damit verbundenen Reduzierung der Wachstumsfaktoren CXCL12 und IL-7 Produktion, die frühe B-Lymphopoese beeinträchtigt wird (Wu et al., 2008; Zhu et al., 2007). Stimuliert man *in vitro* Osteoblasten aus der Calvaria mit PTH, steigt die CXCL12 und IL-7 Konzentration, und die B-Zelldifferenzierung von Progenitor- zu reifen Zellen wird gefördert (Panaroni and Wu, 2013; Zhu et al., 2007). Durch die

Deletion von  $G_s\alpha$ , eine Untereinheit des G-Protein, wird in Mäusen der  $G_s\alpha$ -abhängige Signalweg durch den G-Protein gekoppelten Rezeptor PTH/PTHrP in Osteoblasten gestört und führt zu einer dramatischen Reduzierung der Trabekel im Knochen, sowie zu einem Verlust der B-Vorläuferzellen und der IL-7 Produktion (Wu et al., 2008). Außerdem beschreibt eine weitere Gruppe von Wissenschaftlern einen Zusammenhang zwischen Osteoklasten, Osteoblasten und B-Zellen in alten Mäusen. Hierbei fanden sie heraus, dass B-Zellen sowohl die OPG (engl.: Osteoprotegerin) als auch die RANKL Produktion im Alter erhöhen, was anschließend zu einem OPG/RANKL-Ungleichgewicht führt, die Osteoklastogenese beeinflussen und das Risiko einer Osteoporose erhöhen kann (Li et al., 2014).

Unklar hingegen scheint die Bedeutung der Knochenmarkadipozyten bei der Hämatopoese. Es ist bekannt, dass bei einer Fettzellansammlung im Knochenmark sekretierte Fettsäuren die Knochenremodellierung stören, indem sie die Osteoklastenentwicklung beeinflussen. Dabei reguliert der Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  den Transkriptionsfaktor c-Fos in hämatopoetischen Zellen und aktiviert somit die Osteoklastogenese (Muruganandan and Sinal, 2014; Wan et al., 2007). Des Weiteren gehören Adipozyten im Knochenmark zu den negativen Regulatoren der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Naveiras et al. zeigen in einer Transplantationsstudie, dass die Anwesenheit von Adipozyten die Anzahl von HSCs und die Besiedlung mit kurzlebigen hämatopoetischen Zellen vermindert. Sowohl die Transplantation von Wildtyp HSCs in Adipozyten-defiziente Mäuse als auch die pharmakologische Inhibierung von PPAR $\gamma$  durch BADGE (engl.: bisphenol A diglycidyl ether), führte zu einer verbesserten Regeneration des hämatopoetischen Systems der Empfängermäuse (Bethel et al., 2011a; Naveiras et al., 2009). Eine andere Studie von Ambrosi et al. beschreibt die Beeinträchtigung der Knochenregeneration und Hämatopoese als eine altersabhängige Dysfunktion einer ektopischen Ansammlung von Adipozyten, die aufgrund einer erhöhten Expression von DPP4 (Dipeptidylpeptidase4) an der Fettzelloberfläche, verursacht wird. Mittels Inhibition von DPP4 konnte die Frakturheilung an der Tibia von Mäusen beschleunigt und die Adipozytenanzahl vermindert werden (Ambrosi et al., 2017). Poncin et al. weisen darauf hin, dass nach einer Bestrahlung die erhöhte Runx2-Expression für den Wiederherstellungsprozess der hämatopoetischen Zellen von Bedeutung ist, während PPAR $\gamma$  unterdrückt wird. Demzufolge führt eine Verminderung von Osteoblasten und ein Überschuss an Adipozyten im Alter zu einem Rückgang der Hämatopoese, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt (Bethel et al., 2011a, 2013; Poncin et al., 2012).





**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Balance zwischen Osteoblasten und Adipozyten**

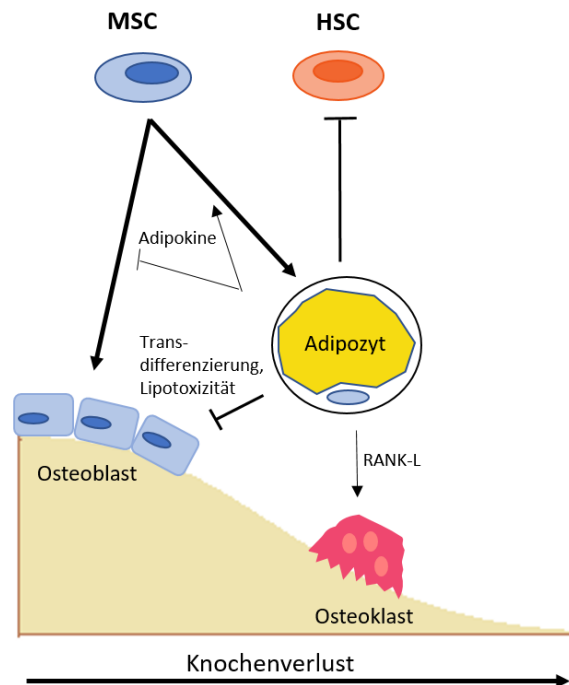
Mit dem Alter verändert sich die Mikroumgebung im Knochenmark und führt dazu, dass die Balance zwischen Osteoblasten und Adipozyten beeinflusst wird und mehr Adipozyten vorhanden sind. Dies führt dann auch zu einer Verminderung der hämatopoetischen Stammzellen. Abbildung übernommen von Bethel et al. 2013.

Mesenchymale Stammzellen können mit Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems interagieren. *In vitro* inhibieren mesenchymale Stromazellen die T-Zellaktivität, die dendritische Zelldifferenzierung, sowie die B-Zellproliferation und beeinträchtigen die Zytolyse der natürlichen Killerzellen (Nombela-Arrieta et al., 2011; Uccelli et al., 2008). RNA-Analysen zeigen, dass einige Gene, die in den knochenmark-spezifischen Präadipozyten angereichert sind, sowohl im braunen als auch im weißen Fettgewebe exprimiert sind. Dazu gehören unter anderem Ebf2 (engl.: early B cell factor; O/E1), Entpd2 (engl.: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2) und Acy3 (engl.: aminoacylase 3) (Ambrosi et al., 2017; Bethel et al., 2011a). Die Ebf-Familie sind Transkriptionsfaktoren, die sowohl von B-Lymphozyten, mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Adipozyten exprimiert werden. Wobei gezeigt werden konnte, dass Ebf1-defiziente Mäuse einen starken Anstieg der Osteoblastenzahl, des Osteoids und der Knochenneubildungsrate aufweisen, aber auch eine dramatische Zunahme von Adipozyten im Knochenmark und in der Leber (Hesslein et al., 2009; Jimenez et al., 2007). Dabei kommt es aber zu einem Verlust des subkutanen Fettgewebes und bestätigt damit, dass die Fettzellen im Knochenmark unabhängig vom weißen und braunen Fettgewebe reguliert werden (Horowitz and Lorenzo, 2007a). Dies zeigt erneut, wie bereits in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, dass es möglich ist, dass mehrere Signalwege gleichzeitig aktiviert bzw. inhibiert werden und somit beide Zelltypen gefördert werden können. Dabei wird Ebf1 von C/EBP $\beta$  und  $\delta$  induziert und aktiviert dann PPAR $\gamma$  und/oder C/EBP $\alpha$ . Des Weiteren ist in den Ebf1-defizienten Mäusen die frühe Proliferation der B-Zellen beeinträchtigt (Åkerblad et al., 2002; Ducy et al., 1997b; Hesslein et al., 2009; Horowitz and Lorenzo, 2007b; Jimenez et al., 2007).

B- und T-Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, die die Knochenresorption und -formation beeinflussen können. Die Immunzellen interagieren direkt mit den MSCs und Osteoblasten mittels Zell-Zellkontakten und setzen dabei meist lösliche Mediatoren frei, die sowohl die Differenzierung der MSCs als auch die B- und T-Zellen beeinflussen (Horowitz and Lorenzo, 2007a; Kovach et al., 2015; Pacifici, 2010). Zwischen den MSCs und den Immunzellen herrscht ein bidirektionales Verhältnis, da sie sich gegenseitig inhibieren und aktivieren (Pacifici, 2010). Eine Studie von Xu et al. demonstriert, dass die trabekuläre Dichte, die Runx2-Expression und die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Bestrahlung von Mäusen vermindert, die PPAR $\gamma$ -Expression und die Anzahl der B- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch erhöht wird (Xu et al., 2017). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass



MSCs durch proinflammatorische T-Zellen, welche IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  produzieren, inhibiert werden, indem die Runx2-Expression vermindert und die Apoptose dieser Zellen erhöht wird. Dieser Zustand kann durch FOXP3+ regulatorische T-Zellen aufgehoben und die Knochenregeneration sowie die Frakturheilung verbessert werden (Liu et al., 2012a).



**Abbildung 5: Zusammenfassung der Effekte von Knochenmarkadipozyten auf benachbarte Zellen**  
Adipozyten besitzen in der Knochenmarknische viele Kommunikationspartner und führen entweder zu einer Aktivierung oder Inhibierung der jeweiligen Zelltypen. MSC: mesenchymale Stammzellen, HSC: hämatopoetische Stammzellen, RANK-L: receptor activator NF- $\kappa$ B ligand. Abbildung modifiziert nach Hardouin et al., 2014.

Zusammengefasst beeinflussen viele komplexe Mechanismen das Verhältnis zwischen Osteoblasten, Adipozyten und hämatopoetischen Zellen. Das Altern verändert in diesem Fall die Prozesse im Knochen am stärksten und wirft noch einige Fragen in diesem Forschungsbereich auf. Zukünftig ist es wichtig zu verstehen, wie die Adipozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und hämatopoetische Zellen miteinander im gesunden Knochen agieren, damit gezielt neue Therapieansätze für bestimmte Erkrankungen wie die Osteoporose entwickelt werden können.

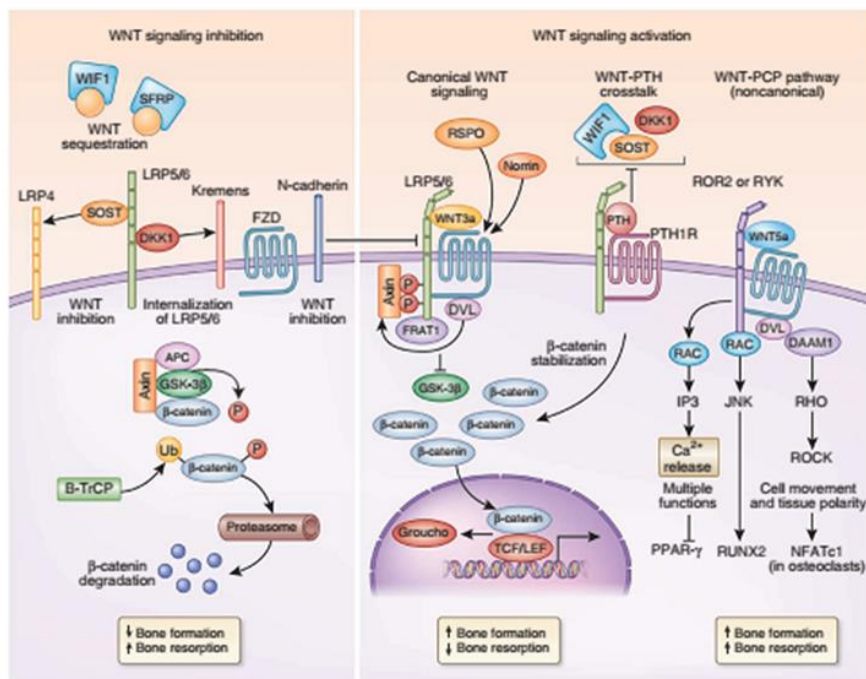
## 1.4 Wichtige Interaktionspartner im Knochenmetabolismus

Die Knochenzellen stehen in ständiger Kommunikation mit den Zellen in ihrer Umgebung und der extrazellulären Matrix. Dazu gehören, wie bereits erwähnt, die Adipozyten und hämatopoetische Progenitorzellen. Damit diese miteinander kommunizieren können und die Remodellierung des Knochens in einem geregelten Prozess abläuft, wird ein komplexes System der unterschiedlichsten Signalwege und Rezeptoren benötigt. Im darauffolgenden Abschnitt werden die wichtigsten für den Knochenmetabolismus relevante Signalwege und Rezeptoren eingeführt.

### 1.4.1 Wnt-Signalweg

Zu den wichtigsten und bekanntesten osteogenen Faktoren der Knochenentstehung gehört der Wnt (engl.: wingless) - Signalweg. Dazu gehören ca. 19 verschiedene extrazelluläre Wnt-Liganden, welche unterschiedliche Zelloberflächenrezeptoren auf zwei Wegen, den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg, aktivieren können (Baron and Kneissel, 2013; Lerner and Ohlsson, 2015; Niehrs, 2012; Witte et al., 2009). Bindet ein Ligand (z.B. Wnt1, Wnt3a, Wnt7b und Wnt10b) an die Transmembranproteine LRP (engl.: lipoprotein receptor-related protein) und FZD (engl.: frizzled) wird der  $\beta$ -catenin abhängige, kanonische Signalweg angeregt. Dabei aktiviert der Rezeptorkomplex LRP5/6 und FZD das Protein DSH (engl.: dishevelled), welcher den Inaktivierungskomplex, bestehend aus den Proteinen GSK-3 $\beta$  (engl.: glycogen synthase 3 beta), Axin und dem Tumorsuppressor APC (engl.: adenomatous-polyposis-coli) inhibiert. Dadurch kann  $\beta$ -catenin im Zytoplasma akkumulieren, und anschließend in den Zellkern translozieren, wo es mit TCF/LEF (engl.: T-cell factor/lymphoid enhancing factor) interagiert und so die Transkription der entsprechenden Zielgene aktiviert (Baron and Kneissel, 2013; Bennett et al., 2005a; Lerner and Ohlsson, 2015). In Abwesenheit eines Wnt-Liganden bleibt der Inaktivierungskomplex aktiv und  $\beta$ -catenin wird im Zytoplasma phosphoryliert und damit gezielt für den Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom gekennzeichnet und degradiert (Baron and Kneissel, 2013). Damit bleiben die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF deaktiviert (Abbildung 5). Nicht nur Wnt-Liganden können die Signalkaskade stimulieren, sondern auch der PTH-Rezeptor 1 kann nach der Bindung mit PTH die Co-Rezeptoren LRP5/6 aktivieren und  $\beta$ -catenin im Cytoplasma stabilisieren (Lerner and Ohlsson, 2015).

Zum nicht-kanonischen,  $\beta$ -catenin unabhängigen Signalweg gehören die Wnt-PCP (engl.: planar-cell polarity) und die Wnt-Kalzium-Kaskade. Durch die Bindung eines Wnt-Liganden (z.B. Wnt4, Wnt5a und Wnt11) an eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase ROR2 (engl.: receptor-tyrosin-kinase-like orphan receptor) bzw. RYK (engl.: receptor-like tyrosine kinase) wird ebenfalls FZD aktiv und interagiert mit DSH, welches einen Komplex mit DAAM 1 (engl.: DSH-associated activator of morphogenesis 1) bildet und dabei entweder mit der RhoGTPase RhoA (engl.: Ras homolog family member) oder Rac1 (engl.: Ras-related C3 Botulinum toxin substrate 1) interagiert und die Aktivierung von ROCK (engl.: RHO-associated kinase) bzw. der Jun-Kinase (JNK) auslöst und die Zellmotilität, -polarität und die Genexpression, welche für die Knochenformation wichtig sind, beeinflusst. Bei der Wnt-Kalzium-Kaskade steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch die Wnt-induzierte G-Protein-gekoppelte ( $G\alpha/G\beta/G\gamma$ ) Aktivierung von PLC (engl.: phospholipase C), DAG (engl.: diacylglycerol) oder IP3 (engl.: inositol 1,4,5-triphosphate, type 3) und somit wird durch die Aktivierung von NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cell) bzw. MAPK die Regulation der Zellmigration und Zelldifferenzierung beeinflusst, wobei der Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  inhibiert wird (Abbildung 6) (Baron and Kneissel, 2013; Bennett et al., 2002; Chang et al., 2007; Lerner and Ohlsson, 2015; Maeda et al., 2012; Niehrs, 2012; Takada et al., 2009c).



**Abbildung 6: Überblick des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs**

In Abwesenheit von Wnt (links) wird  $\beta$ -catenin von dem Inaktivierungskomplex GSK-3 $\beta$ , APC und Axin im Cytoplasma phosphoryliert und anschließend mittels des Proteasoms degradiert. In Anwesenheit von Wnt-Liganden oder PTH (mitte/rechts) wird im kanonischen Signalweg der Inaktivierungskomplex inhibiert,  $\beta$ -catenin gelangt in den Zellkern und interagiert mit TCF/LEF und aktiviert die Transkription von Zielgenen. Der nicht-kanonische Signalweg reguliert die Kalziumkonzentration bzw. aktiviert JNK oder ROCK und beeinflusst somit die Zellmigration, -polarität und -differenzierung. Abbildung übernommen von Baron & Kneissel, 2013.

In klinischen und präklinischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Wnt-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Knochenformation und -dichte übernimmt und mit dem Krankheitsbild der Osteoporose assoziiert ist. Verschiedene Studien demonstrieren, dass Wnt10b durch den kanonischen Weg die Differenzierung von MSC zu Chondrozyten und Adipozyten inhibiert und zu Osteoblasten fördert. Dabei wird auch indirekt die Funktion der Osteoklasten aufgrund der vermehrten Ausschüttung von OPG der Osteoblasten unterdrückt bzw. kontrolliert (Hill et al., 2005; Kennell and MacDougald, 2005; Robinson et al., 2006; Bennett et al., 2007; Takada et al., 2007, 2009). Kommt es zu einer Ausschaltung bestimmter Proteine im Wnt-Signalweg, wie zum Beispiel LRP5 oder Ror2, führt dies zu Veränderungen bei der Knochenbildung. Dies zeigt sich bei der Deletion von LRP5, welche zu einem Verlust der trabekulären und kortikalen Dichte des Knochens beiträgt (Holmen et al., 2004). In Abwesenheit von Wnt5a oder des nicht-kanonischen Rezeptors Ror2 kommt es zu einer Erhöhung der Osteoklastenzahl und einer damit verbundenen Knochenresorption (Maeda et al., 2012; Baron and Kneissel, 2013; Lerner and Ohlsson, 2015). Des Weiteren verhindern Wnt5a und Wnt10b die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten, in dem die Expression von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  unterdrückt wird. Kommt es zu einer Abwesenheit von Wnt5a und Wnt10b steigt die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark an, welches auch ein typisches Merkmal in osteoporotischen Knochen ist. Gegensätzliche Effekte zeigt wiederum Wnt3a, welches kurzzeitig die Leptin-Produktion in den Zellen erhöht und die Reifung der Adipozyten fördert (Bennett et al., 2002, 2005b; Kang et al., 2007; Christodoulides et al., 2009; Takada et al., 2009; D'Alimonte et al., 2013; Chen et al., 2015; Hardouin et al., 2016a).

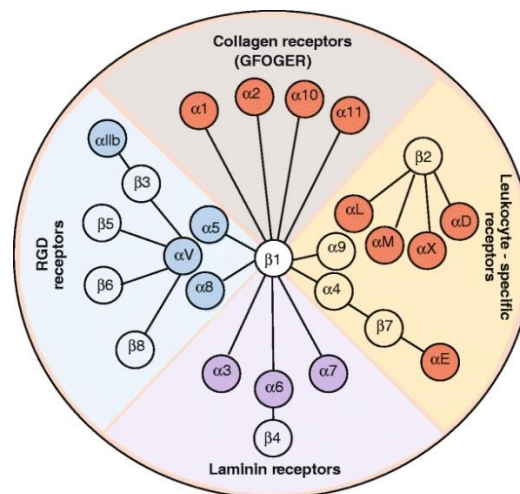
Der Wnt-Signalweg hat nicht nur im Zusammenhang mit den MSCs und den daraus stammenden Osteoblasten eine Bedeutung, sondern beeinflusst auch die HSCs sowie die Lymphopoese, bei der

die Entwicklung von T-Zellen und B-Zellen durch ein Zusammenspiel mit den Knochenzellen mehrfach nachgewiesen wurde (Staal and Clevers, 2005; Lento et al., 2013). Studien zeigen, dass Wnt für die Aufrechterhaltung und Förderung der Selbsterneuerung der HSCs verantwortlich ist und hauptsächlich in der Mikroumgebung um die hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Reya and Clevers, 2005). Zu den drei häufigsten untersuchten Wnt-Liganden im Zusammenhang mit der Hämatopoese gehören Wnt3a, Wnt5a und Wnt10b, welche von myeloiden Zellen, sowie T- und B-Zellen exprimiert werden können (Congdon et al., 2008). Auch hier führen Verluste in bestimmten Bereichen der Wnt-Kaskade zu Veränderungen der Immunzellentwicklung. Dabei zeigen Wnt5a-defiziente Mäuse eine Fehlentwicklung der B-Zellen und der Verlust von LEF-1 führt zu einem Defekt bei der Proliferation von Prä-B-Zellen (Reya et al., 2000; van de Wetering et al., 2002; Liang et al., 2003; Staal and Clevers, 2005; Lento et al., 2013). Im Normalfall unterdrückt der Wnt-Signalweg die Entwicklung von T-Zellen bzw. reduziert die IFN- $\gamma$ -Produktion, welche eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung übernimmt (Sugimura et al., 2012).

### 1.4.2 Integrin-Matrix-Interaktionen im Knochen

Zellinteraktionen mit der extrazellulären Matrix und den benachbarten Zellen sind für die Entwicklung, Organisation und Differenzierung eines Gewebes essentiell und beeinflussen die Genexpression, Zellmotilität und -polarität, Adhäsion, sowie die Zellform, Proliferation und das Überleben der Zelle. Dabei sind die Integrine maßgeblich an dieser Interaktion beteiligt (Damsky, 1999). Integrine gehören zur Familie der Transmembran-Glykoproteine, sogenannte Oberflächenrezeptoren, besitzen eine  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit und bilden damit ein nicht-kovalentes Heterodimer. Die Familie der Integrine besteht aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten, welche sich nach bisheriger Kenntnis zu 24 verschiedenen Kombinationen von Heterodimere zusammen fügen und extrazelluläre Matrixliganden, Oberflächenliganden und lösliche Liganden binden können (Humphries et al., 2006; Takada et al., 2007d).

Trotz ihrer Vielfalt lassen sich Integrine in vier Liganden-spezifische Gruppen einteilen (Abbildung 7). Dazu gehören die RGD-bindenden Integrine ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  und  $\alpha11\beta3$ ), A-Domänen- $\beta1$  bzw. Kollagen/Laminin-bindende Integrine ( $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$  und  $\alpha11\beta1$ ), LDV-bindende Integrine ( $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $\alpha9\beta1$ ,  $\alpha D\beta2$ ,  $\alpha X\beta2$ ,  $\alpha L\beta2$ ,  $\alpha M\beta2$  und  $\alpha E\beta7$ ) und für Laminin hoch selektive Integrine ( $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  und  $\alpha6\beta4$ ) (Barczyk et al., 2010; Humphries et al., 2006; Takada et al., 2007d). Die  $\alpha$ -Untereinheit definiert die Spezifität des Integrins, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheit Signale in die Zelle weiterleitet (Barczyk et al., 2010).



### Abbildung 7: Darstellung der Integrin Familien

In den höheren Vertebraten besteht die Familie aus 24 Dimere aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und sind in vier Liganden-spezifischen Gruppen eingeteilt. Abbildung nach Barczyk et al. 2010.

Integrine sind bidirektionale Rezeptoren, die zum einen Informationen mittels G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die die  $\beta$ -Untereinheit phosphorylieren, aus der Zelle heraus leiten (inside-out signaling) und zum anderen extrazelluläre Signale durch eine Konformationsänderung der Untereinheiten, aufgrund der Ligandenbindung, intrazelluläre Signalmoleküle in der Zelle aktivieren können (outside-in signaling) (Barczyk et al., 2010; Humphries et al., 2006; Legate et al., 2009; Takada et al., 2007d). Durch die „outside-in“ Integrinaktivierung werden weitere Signalkaskaden angeregt und führen zu Veränderungen der Genexpression und/oder des Zytoskeletts der Zelle. Zu den wichtigsten Molekülen der Signalweiterleitung gehören ILK (engl.: integrin-linked kinase) und Src/FAK (engl.: focal adhesion kinase), welche anschließend zahlreiche Signalwege wie PI3K/AKT (engl.: phosphoinositid-3-kinase/proteinkinase B), MAPK, und damit den ERK (engl.: extracellular-signal regulated kinase) und JNK (engl.: c-jun N-terminal kinase) Signalweg aktivieren (Barczyk et al., 2010; Datta et al., 2001; Gahmberg et al., 2009; Legate et al., 2006, 2009; Marie et al., 2014). Des Weiteren werden auch die kleinen RhoGTPasen stimuliert, welche an der Organisation des Zytoskelett und der Zellmorphologie beteiligt sind (Clark et al., 1998; Legate et al., 2009). Unterschiedliche Studien weisen ebenfalls eine Kommunikation zwischen Integrinen und Wachstumsfaktoren nach, d.h. sie interagieren mit verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie PDGF-R (engl.: platelet derived growth factor receptor), EGF-R (engl.: epidermal growth factor receptor), VEGF-R (engl.: vascular endothelial growth factor receptor) und IGF1-R (engl.: insulin-like growth factor receptor) (Borges et al., 2000; Legate et al., 2009; Schneller et al., 1997).

Bei der Osteoblasten- und Adipozytendifferenzierung sind Integrine ebenfalls von großer Bedeutung. Dabei exprimiert jeder Zelltyp eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten und reguliert die Expressionsstärke der Integrine je nach Differenzierungsstatus. Osteoblasten exprimieren die Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha v$  sowie  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 5$  (Clover et al., 1992; Hughes et al., 1993; Hultenby et al., 1993; Moursi et al., 1997; Schneider et al., 2001; Sens et al., 2017a). Dabei sind vor allem in dieser Arbeit die Integrine von Interesse, welche für die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten bzw. Adipozyten im Knochenmark benötigt werden. Dazu gehören die Integrine  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  (Liu et al., 2005; Morandi et al., 2016; Sens et al., 2017b, 2017a; Volloch and Olsen, 2013).

Die Rolle der Integrinaktivierung bei der Osteoblastendifferenzierung wird schon seit Jahrzehnten kontrovers erforscht.  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  gehören zu den Integrinen, welche zur wichtigsten Signalweiterleitung im Knochen, die Mechanotransduktion, sowie auch zu der Bildung von

Connexone, den sogenannten *Gap-Junctions*, beitragen (Marie, 2012). Bei der Mechanotransduktion werden mechanische Reize in chemische Signale umgewandelt, somit kommt es beispielsweise bei einer Skelettentlastung zu einer Verminderung des  $\alpha 5\beta 1$  und auch  $\alpha v\beta 3$  Integrins und führt dadurch zu einer Verminderung der Osteoblastenzahl und damit zur Verminderung der Knochendichte (Bonnet et al., 2012; Watabe et al., 2011; Yavropoulou and Yovos, 2016). Des Weiteren zeigt eine Studie von Batra et al., dass das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  von Osteoblasten mit dem Connexin 43 (CX43, Halbkanal) interagiert, *Gap-junctions* ausgebildet und somit anabolische Stoffe von einer Zelle in die andere transportiert werden können (Batra et al., 2012).

Außerdem ist bekannt, dass die Untereinheiten  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$ , sowie entsprechende extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung von Osteoblasten spielen. Verschiedene Studien demonstrierten, dass die Ausschaltung bzw. Überexpression von  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  oder  $\beta 3$ , sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zu Veränderungen der Genexpression und damit des Signalweges führen und die Differenzierung der Osteoblasten entweder negativ oder positiv beeinflussen (Clover et al., 1992; Gronthos et al., 2001; Martino et al., 2009; Saidak et al., 2015; Yan et al., 2016; Zeng et al., 2015). Zum Beispiel konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die beiden Fibronectin-Isoformen EDA und EDB die Differenzierung und Mineralisierung der Osteoblasten durch die Stimulation der Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\beta 3$  mittels der RGD-Sequenz *in vivo* und *in vitro* fördern (Sens et al., 2017a). Außerdem führt onkofötales Fibronectin, welches bei Patienten mit einer hepatischen Osteodystrophie erhöht ist, zu einer Suppression der Osteoblastendifferenzierung durch die Blockade des Integrin  $\alpha 4\beta 1$  vermittelten Signalweges und vermindert dadurch die Knochenbildung und Knochendichte (Sens et al., 2017b).

Es ist ebenfalls bekannt, dass die extrazelluläre Matrix und die betreffenden Integrine bei der Differenzierung der MSCs in die verschiedenen Zelltypen eine entscheidende Rolle spielen, jedoch im Zusammenhang mit der Bildung von Adipozyten noch nicht ausreichend erforscht sind. Eine Studie von Chen et al. konnte durch ein Osteopontin (OPN)-deletiertes Mausmodell demonstrieren, dass das deletierte Matrixprotein die Differenzierung von MSCs zu Adipozyten fördert und zu Osteoblasten inhibiert. Den gleichen Effekt konnten sie bei einer Blockierung von  $\alpha v\beta 1$  nachweisen, was dafür spricht, dass OPN mit dem Integrin  $\alpha v\beta 1$  interagiert und einen Wechsel der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten voran treibt (Chen et al., 2014b). Zwei weitere Arbeitsgruppen berichten von einem Wechsel der extrazellulären Matrix von Fibronectin-reichem Stroma zu Laminin-reicher Basallamina, sowie eine Verminderung der Integrin-Expression von  $\alpha 5$  zu einer Erhöhung von  $\alpha 6$  während der Adipogenese (Antras et al., 1989; Liu et al., 2005; Nie and Sage, 2009). Der in Abschnitt 1.3.2. bereits erwähnte Adipozyten-Inhibitor Pref-1 kann ohne die Interaktion von Fibronectin mit dem Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , die Adipozytendifferenzierung nicht hemmen (Hudak and Sul, 2013). Dies bestätigt, dass bei einem Knockout von  $\alpha 5\beta 1$  bzw. Pref-1 der inhibitorische Effekt verloren geht, die RhoGTPase Rac1 inaktiviert und die terminale Differenzierung der Fettzellen gefördert werden (Cristancho and Lazar, 2011; Wang et al., 2010). Dieser Vorgang ist jedoch nur in Präadipozyten und nicht in reifen Adipozyten nachweisbar (Cristancho and Lazar, 2011; Liu et al., 2005). Eine weitere Veröffentlichung von Morandi et al. beschreibt in einer Integrinprofil-Analyse von Adipozyten, dass RGD- und LDV-bindende Integrine bei der Adipogenese unterdrückt werden und ausschließlich Laminin- und Kollagen-bindenden Rezeptoren vermehrt in den Adipozyten vorhanden sind. Auch hier spielen die Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  eine bedeutende Rolle, indem sie bei einer Überexpression die Adipogenese beeinträchtigen können (Morandi et al., 2016). Diese Studien verweisen darauf, dass die extrazelluläre Matrix und ihre Rezeptoren die Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp dominieren und Signalkaskaden

aktivieren können, sowie die Bildung von neuer Matrix beeinflussen und damit wichtig für das Zellschicksal der MSCs sind.

## 1.5 Die RhoGTPasen als Signalvermittler zwischen Osteoblasten und Adipozyten

Die Familie der Rho-GTPasen gehört zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen und besteht aus 22 Molekülen: Rho Isoform A, B, C), Rac Isoform 1, 2, 3, Cdc42 (engl.: cell division cycle protein 42), TC10, TCL, Chp und Wrch-1, RhoG, Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoBTB1 und 2, RhoD, Rif, RhoH/TTF und Miro-1 und 2 (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Wennerberg and Der, 2004). Die RhoGTPasen werden durch den GDP/GTP-Zyklus (engl.: Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat) reguliert. Die Aktivierung der Rho-Proteine erfolgt durch einen Wechsel zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Etwa 80 GEFs (engl.: Guanine nucleotide-exchange factors) katalysieren den Nuklotidaustausch GDP zu GTP und aktivieren damit ein entsprechendes Rho-Protein. Und mehr als 70 GAPs (engl.: GTPase-activating proteins) sind wiederum dafür zuständig, dass die GTP-Hydrolyse stimuliert und damit die Funktion inaktiviert wird (Bernards, 2003; Bos et al., 2007; Cherfils and Zeghouf, 2013; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005; Sadok and Marshall, 2014; Sah et al., 2000). Des Weiteren gibt es eine dritte Gruppe dieser regulatorischen Proteine, die GDI (engl.: Guanine nucleotide-dissociation inhibitors), welche die GDP-gebundene Form stabilisieren und diese auch von der Membran loslösen können. Damit ist ein Transport in andere Zellkompartimente gewährleistet, wodurch dort neue Signalkaskaden aktiviert werden können (Cherfils and Zeghouf, 2013; Fukumoto et al., 1990; Ridley, 2001).

RhoGTPasen sind unter anderem Schlüsselmoleküle des nicht-kanonischen und zum Teil auch des kanonischen Wnt-Signalweges und übernehmen deshalb zahlreiche Funktionen, die das morphologische und transkriptionelle Zellverhalten beeinflussen (Schlessinger et al., 2009a). Die größte Rolle spielen dabei die Rho-Proteine RhoA, Cdc42 und Rac1, welche hauptsächlich die Regulation der Aktin-Polymerization an der Zellperipherie steuern und durch die Ausbildung von Lamellipodien bzw. Filopodien für die Zellmigration verantwortlich sein können. Darüber hinaus sind sie an dem Zellzyklus, der Gentranskription, der Zelladhäsion, Phagozytose und Zytokinese, sowie an der zellulären Morphogenese, Polarisation, dem Zellwachstum und -überleben beteiligt (Heasman and Ridley, 2008; Jaffe and Hall, 2005; Nobes and Hall, 1995; Price et al., 1998; Sinha and Yang, 2008). Sie werden über verschiedene Zelloberflächenrezeptoren wie Zytokinrezeptoren, Adhäsionsrezeptoren (Integrine) und den GPCR (engl.: G-protein-coupled receptors), welche ebenfalls mit der extrazellulären Matrix interagieren, aktiviert (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Kjoller and Hall, 1999; Sah et al., 2000). Da, wie bereits erwähnt, die Integrine eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der MSCs spielen, ist es in dieser Arbeit von Bedeutung, welche Auswirkung die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 im Zusammenhang mit der Integrin-Aktivierung bei der Differenzierung von Osteoblasten und Adipozyten im Knochenmark haben.



### 1.5.1 Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 und deren Funktion in Osteoblasten, Adipozyten und hämatopoetischen Zellen

**Cdc42** ist als essentielles Protein für die Aktin-Zytoskelett-Organisation bekannt. Zu der Cdc42 Subfamilie gehören neben Cdc42, auch TC10, TC10L, TCL, Wrch-1, Wrch-2/Chp. All diese Faktoren, außer Wrch-1, binden an WASP (engl.: Wiskott-Aldrich syndrome protein), aktivieren anschließend den Arp2/3 (engl.: actin-related protein2/3) – Komplex und führen damit zur Aktin-Polymerisierung in der Zelle (Aspenström et al., 2004; Jaffe and Hall, 2005; Wennerberg and Der, 2004). Cdc42 ist somit wichtig für die Ausbildung der Filopodien, Zellmigration, Endozytose und dem Vesikeltransport. Die bekanntesten Isoformen von Cdc42 sind Cdc42H, welches ubiquitär exprimiert ist und die Isoform G25K, welche ausschließlich im Gehirn vorkommt (Wennerberg and Der, 2004).

**Rac1** gewährleistet die Bildung von Lamellipodien, welche ebenfalls reich an Aktinfilamenten sind. Hierbei aktiviert Rac1 den WAVE-Komplex, welcher ebenfalls zur WASP-Proteinfamilie gehört und stimuliert auf diesem Wege den Arp2/3-Komplex und reguliert somit die Aktin-Polymerisierung (Heasman and Ridley, 2008; Nobes and Hall, 1995). Die Rac1-Unterfamilie besteht aus Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 und RhoG. Rac1 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen Rac2 in hämatopoetischen Zellen und Rac3 ausschließlich im Gehirn vorkommt (Didsbury et al., 1989; Heasman and Ridley, 2008).

Eine Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 ist embryonal letal (Chen et al., 2000; Sugihara et al., 1998). Des Weiteren führt die Inhibierung der beiden RhoGTPasen zu einer Blockierung der G<sub>1</sub>-Progression im Zellzyklus. Sie beeinflussen im Normalfall die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen während der G<sub>1</sub>-Phase, sowie die Organisation des Mikrotubulin-Aktin-Zytoskeletts während der M-Phase und gewährleisten damit eine korrekte Abfolge der Mitose (Jaffe and Hall, 2005; Olson et al., 1995). In den letzten Jahrzehnten zeigte sich, dass die RhoGTPasen auch an der Entwicklung des Knochens teilnehmen und eine starke Auswirkung auf die Funktion der Zellen im Knochenmark besitzen. Einige Veröffentlichungen bestätigen, dass Cdc42 und Rac1 an der Regulation von Osteoklasten beteiligt sind. Cdc42 loss-of-function in den Osteoklasten führte in der Studie von Ito et al. zu einer Osteopetrose und gain-of-function zu einer Osteoporose in den Mäusen (Ito et al., 2010). Bei einer Deletion von Rac1 kommt es ebenfalls zu einer Osteopetrose, wohingegen Rac1 nur die Funktion der Osteoklasten beeinträchtigt, da die Anzahl der Osteoklasten nicht vermindert ist. Anders ist das bei der Ausschaltung von Cdc42, wodurch die Proliferation und Apoptose von Osteoklasten beeinflusst wird (Croke et al., 2011; Ito et al., 2010; Zhu et al., 2016).

Außerdem berichten Veröffentlichungen von Interaktionen mit den RhoGTPasen zwischen TGF- $\beta$ , Integrinen und dem Wnt-Signalweg, welche die Differenzierung von Osteoblasten beeinflussen können (Wan et al., 2013). Zum Beispiel führt die Deletion von Rac1 in Osteoblasten in einer Studie von Lane et al. zu einer Reduzierung des trabekulären und kortikalen Knochenwachstums *in vivo* und beschreibt *in vitro* fehlerhafte Funktionen der Osteoblasten im Bereich der Adhäsion, Ausbreitung und Proliferation (Lane et al., 2012), sowie die Inhibierung der mesenchymalen Differenzierung zu Chondrozyten (Gao et al., 2010). Eine andere Studie beschreibt, dass Rac1 die TGF- $\beta$ -stimulierende VEGF Synthese einschränkt, in dem Rac1 die p38 MAP-Kinase inhibiert und somit die Osteogenese fördert (Yamamoto et al., 2015).

Die RhoGTPasen für die Regulation der Zellpolarität und die Zellform verantwortlich, welche wichtig für die Entscheidung des Zellschicksals und die Zellteilung sind (Etienne-Manneville, 2004; Etienne-Manneville and Hall, 2002). McBeath et al. zeigten, dass die Differenzierung von humanen MSCs zu entweder Osteoblasten oder Adipozyten mit einer starken morphologischen Veränderung der



Zelle einhergeht und die RhoGTPasen hierbei von Bedeutung sind (McBeath et al., 2004). Im Weiteren stellte die Veröffentlichung von Raffaella Sordella und ihrer Arbeitsgruppe dar, dass die Inhibierung von RhoGTPasen notwendig ist, um die Differenzierung von Adipozyten aus MEF-Zellen (engl.: mouse embryo-derived fibroblast) gewährleisten zu können (Sordella et al., 2003). Es ist bekannt, dass die Fibronectin-Integrin-Bindung den FAK/Src-Komplex, sowie einige Mitglieder der RhoGTPasen aktivieren und anschließend den ERK/MAPK-Signalweg stimulieren. Wie bereits erwähnt fanden mehrere Arbeitsgruppen heraus, dass lösliches Pref-1 Fibronectin bindet und somit das Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , welches vermehrt in Präadipozyten vorkommt, aktiviert. Dabei wird die Rac1-Expression stimuliert, damit bleiben die Präadipozyten in einem undifferenzierten Stadium und inhibieren die Adipogenese (Hudak and Sul, 2013; Liu et al., 2005; Wang et al., 2010).

Die Bedeutung von Cdc42 und Rac1 bei der Hämatopoese wurde über die Jahre in zahlreichen Experimenten nachgewiesen. Den beiden RhoGTPasen wird die Funktion zugeschrieben, die hämatopoetische Zellform, -migration, -adhäsion und -mobilisation zu kontrollieren (Yang et al., 2001). Somit bewirkt zum Beispiel ein konditioneller Knockout von Cdc42 im Knochenmark unterschiedliche Defekte in den hämatopoetischen Zelllinien und führt somit zu einer Suppression der Erythropoese, jedoch auch zu einer Erhöhung der Myelopoese (Heasman and Ridley, 2008; Yang et al., 2007a). Des Weiteren ist Cdc42 an der Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellnische beteiligt, in dem es die Alterung der HSC und Zell-Zell-Interaktionen reguliert (Florian et al., 2012; Geiger et al., 2007). Rac1 wird für die Lokalisation im Knochenmark und Migration der hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen benötigt (Cancelas et al., 2005). Beide RhoGTPasen beeinflussen zusätzlich die Entwicklung und Funktion der B- und T-Lymphozyten (Westerberg et al., 2001). Bei einer Deletion von Cdc42 weisen die Mäuse eine Beeinträchtigung der Proliferation und Aktivität der B-Zellen auf (Guo et al., 2009). Inhibiert man Rac1 führt dies zu einer Erhöhung der T-Zellmigration und -polarisation (Mulloy et al., 2010; del Pozo et al., 1999). Die RhoGTPasen übernehmen in verschiedenen Zelltypen vielfältige Aufgaben und interagieren dort mit zahlreichen Proteinen, wobei sie die unterschiedlichsten Signalwege aktivieren und somit die Entwicklung und Differenzierung erheblich beeinflussen können.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Osteoporose kann im Alter durch eine Fehlregulation im Zusammenspiel von mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten und hämatopoetischen Stammzellen entstehen. Durch die Aktivierung unterschiedlicher Integrine und deren Signalkaskaden kann das Remodeling im Knochen beeinflusst werden. Die Fragestellung dieser Arbeit basiert auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt werden konnte, dass die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, sowohl *in vivo* einen Einfluss auf die Knochendichte als auch *in vitro* auf die Mineralisierung haben. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der Adipozytenanzahl und des Adipozytenmarkers PPAR $\gamma$  in konditionellen Knockout Mäusen bzw. Kulturen von Osteoblasten demonstriert werden.

1. Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle der extrazellulären Matrix und Integrine im Zusammenspiel mit den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten oder Adipozyten zu verstehen.  
Die gewonnenen Ergebnisse sollen Aufschluss über die beteiligten Moleküle geben und eine Möglichkeit zur Manipulation der Knochen- bzw. Fettzellen aufzeigen, um neue Therapieansätze für die Osteoporose entwickeln zu können.
2. Da die Hämatopoese von den Osteoblasten und Adipozyten beeinflusst werden kann, wird abschließend der Einfluss der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in mesenchymalen Stromazellen auf die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Herstellerverzeichnis

<u>Hersteller</u>	<u>Standort</u>
Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Abcam plc	Cambridge, UK
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen
Agfa Healthcare GmbH	Köln
A. Hartenstein GmbH	Würzburg
Alcan Packaging Neenah	Wisconsin, USA
Amersham	Freiburg
AppliChem GmbH	Darmstadt
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Österreich
Axxora Deutschland GmbH	Lörrach
Bachem AG	Bubendorf, Schweiz
Bayer AG	Leverkusen
BD Biosciences	Heidelberg
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BioLegend Europe BV	Uithoorn, Niederlande
Biometra GmbH	Göttingen
Biomers	Ulm
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Bio-Techne (R&D, Tocris)	Wiesbaden-Nordenstadt
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Braun	Tuttlingen
Caliper Life Sciences	Rüsselsheim
Canon Inc.	Tokyo, Japan
Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe
Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Charles River Laboratories	Sulzfeld
CST Cell Signaling	Frankfurt am Main
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dianova GmbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Field Emission Corporation	McMinnville Oregon, USA
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Hiss Diagnostics	Freiburg
Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Johnson & Johnson GmbH	Neuss
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Kinesis GmbH	Langenfeld
Knick GmbH & Co. KG	Berlin
Labinstruments Deutschland GmbH	Crailsheim
Lab & Vet Service GmbH	Wien, Österreich
Leica Microsystems	Wetzlar
LG Electronics	Seoul, Korea
Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach

Merck KGaA	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach
Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
Minerva Biolabs	Berlin
MorphoSys AbD GmbH	Düsseldorf
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main
Nikon GmbH	Düsseldorf
Olympus America Inc.	Center Valley PA, USA
Pall Life Sciences	Dreieich
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
PE Applied Biosystems	Waltham MA, USA
PeptoTech Germany	Hamburg
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Perbio Science	Bonn
Polysciences Europe GmbH	Eppelheim
Progen Biotechnik	Heidelberg
Promega GmbH	Mannheim
Qiagen GmbH	Hilden
Restek GmbH	Bad Homburg
Roche Diagnostics	Mannheim
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	Frankfurt am Main
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg
Sarstedt	Nürnberg
Serva	Heidelberg
Semperit AG	Wien, Österreich
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Stratec Biomedical AG	Birkenfeld
Synchem OHG	Felsberg/Altenburg
System GmbH	Wettenberg
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA
Trevigen Inc.	Gaithersburg, USA
Vitaris AG	Baar
VWR International GmbH	Darmstadt
Whatman International Ltd.	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum	Heidelberg

## 2.1.2 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	Tuttnauer System 5075 EL, System
Binokular	Stemi 200C, Carl Zeiss GmbH
Brutschrank/CO <sub>2</sub> -Inkubator	Innova CO-170, New Brunswick Scientific
Durchflusszytometer	LSRII, Aria III, BD Biosciences
Entwicklungsgerät	Typ CP1000, Agfa
Einfrierbox	#3043317, Nunc, Thermo Fisher Scientific
Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry, Peqlab
ELISA-Messgerät	SLT Spectra, Labinstruments
Gelsystem DNA	DNA Perfect Blue 40-1410, Peqlab
Gelsystem Protein	XCell Sure Lock Mini-Cell EI0002, Invitrogen
	MINI PROTEAN II TM Biorad
Geldokumentation	Gel Doc 1000, BioRad

Heizblock	Thermomixer Compact, Eppendorf
Kamera	EOS 350 Digital (Spiegelreflex)
Laborshake Großschüttler	LABOSHAKE LS500, linear, 230 V, Gerhardt
Light Cycler	Light Cycler 2.0 Instrument, Roche
Magnetrührer	Yellow line MSH basic, Carl Roth
Mikroskope	Mikroskope DM IL, inverses Routinemikroskop, Leica Vanox-S, Olympus, mit Sony Kamera (CCD) Biozero (BZ-8100 ), Keyence ECLIPSE Ti-E, Nikon
Mikrowellengerät	Microwellenherd MK-113, J.S.C.
Mikrotiterplatten Reader	Typ 16039400, Sunrise Basic, Tecan Wallac 1420 VICTOR2™
Mikrotom	Leica RM 2145, Leica
pH-Meter	Typ 761 Calimatic, Knick
Photometer	Pharmacia Ultrospec 2000, GE Healthcare BioPhotometer Plus, Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort classic, IBS Integra Pipetgirl
Plattenwascher (ELISA)	Anthos fluido Typ 24200, ASYS
Scanner	CanoScan LiDE 60, Canon
Sterilbank	Holten LaminAir 1.2, Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank	Chronos Biosafe, Messer
Stromversorger	Standard Power Pack P25, Biometra
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems T Personal Thermocycler, Biometra
Trockenschrank	Sterilisator, Memmert
Ultragefrierschrank	Innova U725, New Brunswick Scientific
Vortex	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern Feinwaage ABJ 120-4M, Kern
Wasserbad	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik
Zellzählapparatur	Typ TT CASY®; Innovatis, Roche
Zentrifugen	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen, Biofuge 15, Heraeus, Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific, Light Cycler 2.0 Sample Carousel (20µl), Roche SORVALL® RC-5B PLUS Superspeed Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Produktnummer, Hersteller</u>
Abdeckfolie	#30001358, Tecan
Aluminiumfolie	#2596.1, Carl Roth
Chamber Slides	#177445, Lab-Tek Chamber Slides, Nunc
Deckgläser 24x60, Ø 10 mm	#0102242, Marienfeld #0111500, Marienfeld
Einmalinjektionskanülen	#304000 Microlance, 30G, BD Biosciences #302200 Microlance, 27G, BD Biosciences
Einmalröhrchen	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt
Frischhaltefolie	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Glaskapillaren qPCR	# 04929292001, Roche

Handschuhe Nitril	#3780872, Sempercare, Semperit AG
Kryoröhrchen	#123263, Greiner Bio-One
Macrosep-Säulen	#MAP100C36, 100 kD, Pall #MAP001C36, 1 kD, Pall
Magnete	Dynal MPC-6, Dynal; Universal Magnet Plate, Iba
Microvette	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt #20,1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt
Nitrozellulose-Membran	#10600016, Amersham Protran, GE Healthcare
Objektträger	#4951PLUS, Thermo Fisher Scientific
Parafilm	#P-996, Alcan Packaging
Pasteurpipetten	#197734230, NeoLab
PCR-Reaktionsgefäße	#7111080, Biozym
Petrischalen	#633171, Greiner Bio-One #664160 Cellstar, Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	#739296, 740290, Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	#72.706 1,5 ml, Sarstedt #72.695 2 ml, Sarstedt
Röntgenfilme (Western-Blot)	#RF12 Fuji Medical Super RX, A. Hartenstein
Serologische Pipette	(2, 5, 10 & 25 ml), Greiner Bio-One
Spritzen	#300013 Plastipak, BD Biosciences
Sterilfilter	#ESF-PV-30-022, KX Syringe Filter PVDF, Kinesis #1564020 Nalgene, Thermo Fisher Scientific
Whatman Papier	#3030917 3MM CHR, Whatman International Ltd.
Zellkulturflaschen	#169900 25 cm <sup>2</sup> , Nunc #156800 75 cm <sup>2</sup> , Nunc #159926 175 cm <sup>2</sup> , Nunc
Zellkulturplatten	#150239 6-Well, Nunc #144530 24-Well, Nunc #150787 48-Well, Nunc #269620 96-Well, Nunc
Zellsiebe	#542040 40 µm, Greiner Bio-One #542070 70 µm, Greiner Bio-One #542000 100 µm, Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen	#188271 15 ml, Greiner Bio-One #227261 50 ml, Greiner Bio-One

#### 2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Medien

<u>Chemikalien, Reagenzien</u>	<u>Produktnummer, Hersteller</u>
Aceton	#40143 Zentrallager Theoretikum
Agarose	#15510-027, Invitrogen
Albumin Fraktion V (BSA)	#8076.2, Carl Roth
Alcian Blue 8GX	#A3157, Sigma-Aldrich
Alizarin Red S	#A5533, Sigma-Aldrich
Aluminiumsulfat	#192430050, Acros Organics
α-MEM	# 22561, Gibco, Invitrogen
Ammoniumchlorid	#32205, Riedel-de Haën, Zentrallager
Aqua pro Injection	#23114.01, Braun
Ascorbinsäure	#3525.1 Carl Roth
β-Glycerophosphat	#G9422 Sigma
Benzoylperoxid	#8.01641 Merck
Borsäure	#A3581 AppliChem
Bromphenolblau	#4F057 Division Chroma

Cell dissociation buffer	#12151-014, Gibco, Invitrogen
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	#20278, Thermo Fisher Scientific
DAPI	#6335.1, Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	#D9779, Sigma-Aldrich
Detektionsreagenz ECL	#32106, ECL Western-Blotting-Substrat, Pierce
Dexamethason	#D1756-100MG, Sigma-Aldrich
4-Dimethylaminobenzaldehyd	#39070, Fluka, Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	#D2650, Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	#A3567, 0500, Applichem
Dispase	#17105-041, Gibco, Invitrogen
DMEM	#41966052, Gibco, Invitrogen
DNA Exitus Plus	#A7089, Applichem
DNA-Marker 100 bp	#T835., Carl Roth
dNTP Mix	#BIO-39044, Bionline
Dodecylsulfat-Na-Salz	#20765.03, Serva
DPBS	#14190, Gibco, Invitrogen
Dynabeads® Schaf anti-Ratte IgG	#110.35, Invitrogen
Dynabeads™ Protein G	#10004D, Invitrogen
EDTA	#E5134, Sigma-Aldrich
Enhancer (PCR)	#01-1030, Peqlab
Essigsäure	#10296, Grüssing
Ethanol	#32205, Riedel-de Haën, Zentrallager
FCS (Fetal Calf Serum)	#P30-3302, Pan Biotech
Formaldehyd	#31245, Riedel-de Haën, Zentrallager
G418 - Disulfat - Lösung, steril	#A6798,0050, Applichem
Gelatine Sepharose 4B	#17-0956-01, GE Healthcare
D-Glucose	#1.08337, Merck
Harnstoff (Urea)	#U5128, Sigma-Aldrich
Hämatoxylin nach Weigert	#HT1079-1SET, Sigma-Aldrich
IBMX	#26445.02, Serva
JNK Inhibitor II	#SP600125, Calbiochem Merck
Kaliumchlorid	#A3582,1000, Applichem
Kaliumhydrogencarbonat	#P748, Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	#1.04873.1000, Merck
Kaliumhydroxid	#Z12038, Zentrallager Theoretikum
Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	#190/12606084, B. Braun
Kollagen	#C777-5mg, Sigma-Aldrich
Kollagenase NB4	#17454, Serva
L-Glutamin	#25030-081, Gibco, Invitrogen
Lichtgrün SF	#L5382, Sigma
Lipofectamin RNAiMax	#P/N100014472, Invitrogen
β-Mercaptoethanol	#444203-250ML, Merck
MATra-si Reagent	#7-2021-020, Iba
Methanol	#32213-2.5L, Sigma-Aldrich
2-Methylbutan	#A1263,1000, Applichem
Magnesiumchlorid	#63072, Fluka
MgCl <sub>2</sub> (PCR)	#01-1030, Peqlab
Micro BCA™ Protein Assay	#23235, Thermo Scientific
Milchpulver	#T145.1, Carl Roth
Molybdätophosphorsäure	#1.00532.0025 Merck
Mowiol 4-88 Reagent	#475904, Calbiochem
Natriumcarbonat	#A4332.1000, Applichem
Natriumchlorid	#64026, Riedel-de Haën, Zentrallager
Natriumcitrat	#S4641, Sigma-Aldrich

Natrium Deoxycholat	#3484.1, Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	#106346, Merck
Natriumfluorid	#S6776, Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	#106323, Merck
Natriumhydroxid	#30620, Sigma-Aldrich
Natriumnitrat	#237213, Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadate	#S6508-50G, Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat	#S7026, Sigma-Aldrich
4-Nitrophenol	#35836 Riedel de Haen
Oil Red O	#O0625, Sigma-Aldrich
Opti-MEM®	#31985-062, Gibco, Invitrogen
Orange G	#0318.2 Carl Roth
Osmium Tetroxid	#0972B-5, Polyscience, Inc.
Osteo-Bed Resin	#17734A Polyscience, Inc.
Paraformaldehyd	#16005 Riedel de Haen
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	#15140-122, Gibco, Invitrogen
PeqGOLD TriFast	#30-2010, Peqlab VWR
PF 573228	#3239, Tocris
Phenolphthalein	#34607, Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	#A0999,0005, AppliChem
pNPP 5mg	#487600, Calbiochem, Merck
Poly-L-Lysin 0,01% Cultrex	#3438-100-01, VWR
Ponceau Xylidine	#P2395 Sigma-Aldrich
2-Propanol	#69595, Riedel-de Haën, Zentrallager
Proteinase K	#3115852001, Roche
Puromycin	#540411, Merck
RedSafe	#21141, Hiss Diagnostics
RevertAid Reverse Transcriptase zusammen mit 5x Reaktionspuffer	#EP0442, Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	#EO0381, Fermentas
RNase A	#EN0531, Fermentas
RNAzol®RT	#R4533, Sigma-Aldrich
Roti®-Histokitt	#6638.1, Carl Roth
Salzsäure	#Z-23-88, Zentrallager Theoretikum
Säurefuchsin	#T128.1, Carl Roth
Schwefelsäure	#13073, Grüssing GmbH
SensiMix™ Capillary Kit	#QT405-01, Bioline
Silbernitrat	#7761-88-8 Grüssing GmbH
Streptavidin - Cy3	#434315, Thermo Fisher Scientific
Taq DNA-Polymerase	#01-1030, Peqlab
Taq DNA-Polymerase	MPI für Biochemie Martinsried
Tetrachlorkohlenstoff	#289116, Sigma-Aldrich
Tissue-Tek	#4583, O.C.T. Compound, Sakura, VWR
TMB	#613544, Merck
Tris	#4855.2, Carl Roth
Tris-HCl	#9090.3, Carl Roth
Triton X-100	#108603, Merck
Trypsin-EDTA	#25300, Gibco, Invitrogen
TurboFect	#R0531, Thermo Fisher Scientific
Tween 20	#9127.1, Carl Roth
U0126 MEK Inhibitor	#V1121, Promega
Xylol	#296325, Sigma-Aldrich
Zinkchlorid	#31650, Sigma-Aldrich



## 2.1.5 Puffer und Lösungen

AcK-Puffer:	4,15 g Ammoniumchlorid 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat 100 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5)
Agarose-Gel:	1,5 % - 3 % Agarose einwiegen mit 1X TAE-Puffer auffüllen in der Mikrowelle unter Kochen lösen und 2 µl Red Safe zugeben und in den Gelschlitten gießen und aushärten lassen
Alzianblau-Lösung:	80 % EtOH 20 % Essigsäure 0,02 % Alzianblau
Alizarinrot-Lösung:	1% KOH 0,01 % Alizarinrot in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> verdünnen
Blank (ALP Assay):	50 µl Substratpuffer 50 µl pNPP Lösung
β-Glycerophosphat-Lösung:	216 mg/ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> einwiegen (1 M) sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20°C lagern, 1:200 einsetzen
Blockierlösung (Western Blot):	5 g Milchpulver in 100 ml PBS-T frisch ansetzen
Dekalzifizierungslösung:	41,4 g EDTA 4,4 g NaOH und auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen, pH 7.0-7.4
Desorptionspuffer:	0,1 M Glycin 0,5 M NaCl in 1X PBS lösen, pH-Wert auf 2,5 einstellen
Dexamethason-Stocklösung:	39,2 mg/100ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> einwiegen (10 mM) mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1:1000 verdünnen (10 µM), sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern, 1:1000 einsetzen
Differenzierungsmedium:	<u>Osteoblastendifferenzierung</u> α-MEM [10 % FCS und 5 % Pen/Strep] Vitamin C (1:1000) Dexamethason (1:1000) β-Glycerophosphat (1:200)
	<u>Adipozytendifferenzierung</u> DMEM IBMX (1:100), in 0,5 N KOH lösen, immer frisch ansetzen Insulin-Stocklösung (1mg/ml) (1:1000) 1mM Dexamethason (1:1000)
DNA-Lysepuffer:	100 mM Tris (pH 8,5) 200 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 % SDS in 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , sterilfiltrieren

EDTA-Lösung 0,5M:	186,1 g EDTA in 700 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> lösen pH-Wert auf 8,0 einstellen und auf 1 L mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen
Einbettmedium (Kunststoff):	3,5 g Benzoylperoxid in 100 ml Osteo-Bed Resin mischen durch invertieren
Elutionspuffer (Sephacose-Säule):	5 M Harnstoff 0,05 M Tris in 1X PBS, pH-Wert auf 7,5 einstellen
Equilibrierungspuffer:	0,01 M Natriumcitrat 0,005 M EDTA in 1X PBS, pH-Wert auf 7,2 einstellen
FACS-Puffer:	2,5% FCS in DPBS
Laufpuffer 10X (Western Blot):	30,25 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen
LB-Medium:	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10g/l NaCl autoklavieren
Lichtgrün-Lösung:	0,4 g Lichtgrün 0,4 ml Essigsäure auf 200 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> auffüllen
Lysepuffer (ALP):	0,1 % Triton X-100 in Substratpuffer
Mowiol (Elvanol):	5 g Mowiol 4-88 Reagent 20 ml 1X PBS (pH 8,0) 10 ml Glycerin, ü.N. bei RT unter Rühren lösen 30min bei 50°C im Wasserbad schütteln 30min bei 5000g zentrifugieren, bei -20° lagern
Na-Thiosulfat-Lösung (von Kossa):	2,5 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> lösen und dunkel lagern
Nitrophenol-Standard (ALP):	1 µl Nitrophenol 999 µl Stopplösung
Oil Red O-Lösung:	Stocklösung: 0,5 g/100ml 2-Propanol 60 ml Stocklösung mit 40 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> mischen und für 1h bei RT inkubieren, anschließend mehrmals durch ein Whatman-Papier (3mm) filtern
Osiumtetroxid-Lösung:	1 Teil 5 % Kaliumdichromat 1 Teil 2 % Osiumtetroxid [Endkonzentration 1 %] für jede Färbung frisch ansetzen
Paraformaldehyd-Lösung 4%:	22,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> 5 µl 10 M NaOH auf 60°C erhitzen 1g Paraformaldehyd 2,5 ml 10X PBS dazu geben und auf Eis abkühlen lassen

pH-Wert auf 7,4 einstellen  
 Aliquots bei 4°C oder länger bei -20°C lagern

Para-Nitrophenylphosphat (pNPP):	pNPP-Tabletten pro Tablette 2,5 ml Substratpuffer
PBS (10X):	400 g NaCl 58 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g KCl auf 5 l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen, pH-Wert auf 7,0 einstellen
PBS-T:	0,05 % Tween-20 in 1X PBS
Phosphormolybdän-Lösung:	8 g Molybdätophosphorsäure 4 g Orange G in 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> lösen
Probenpuffer 4X (DNA):	50 % Glycerin in 4X TBE Spatelspitze Bromphenol hinzugeben
Probenpuffer 4X (Protein):	0,15 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) 1 ml Glycerol 2 ml 10 % SDS 0,1 ml 1% Bromphenolblau 0,5 ml β-Mercaptoethanol (nur bei reduzierenden Bedingungen)
Protein-Lysepuffer:	20 mM Tris-HCL 150 mM NaCl 10 % Glycerin 0,5 % Triton X-100 2 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM PMSF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Proteinase K-Lösung:	20 mg/ml Proteinase K in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> lösen
Säurefuchsin-Lösung:	0,2 g Ponceau Xylidine 0,1 g Säurefuchsin 0,6 ml Essigsäure auf 300ml mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen
Silbernitratlösung (von Kossa):	1,25 g AgNO <sub>3</sub> in 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> lösen und dunkel lagern
siRNA Annealing-Puffer (5X):	50 mM Tris (pH 8,0) 100 mM NaCl
Stopplösung (ALP):	0,5 N KOH in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Stripping-Puffer (Western Blot):	200 mM Glycin in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> pH-Wert auf 2,9 einstellen
Substratpuffer (ALP):	0,1 M Glycin 1 μM MgCl <sub>2</sub>

	1 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> pH-Wert auf 10,4 einstellen
TAE-Puffer (50X):	242 g Tris 57,1 ml reine Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA mit 1 l H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen, pH-Wert auf 8,3 einstellen
TBE-Puffer (10X):	108 g Tris 55,6 g Borsäure 4,65 g EDTA mit 1 l H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen
Transferpuffer 10X (Western Blot):	29,2 g Glycin 58 g Tris 37,6 ml 10 % SDS Lösung auf 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> auffüllen
Verdauungslösung (Osteoblastenisolation):	0,025 g Kollagenase NB4 0,05 g Dispase in 25 ml DMEM
Vitamin-C Stocklösung:	0,28 M Ascorbinsäure in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> lösen, sterilfiltrieren 1:1000 einsetzen

## 2.1.6 Primäre Antikörper

**Tabelle 1:** Auflistung der primären Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Klon	Produktnr./ Hersteller
AKT	Kaninchen	polyklonal	#9272 Cell Signaling
phos-AKT (Ser473)	Kaninchen	polyklonal	#9271 Cell Signaling
Cdc42 (11A11)	Kaninchen	monoklonal	#2466 Cell Signaling
ERK 1/2	Kaninchen	polyklonal	#9102 Cell Signaling
phos-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 185)	Kaninchen	polyklonal	#4376 Cell Signaling
FAK	Kaninchen	polyklonal	#06-543 Millipore
phos-FAK (Y 397)	Kaninchen	monoklonal	#8556 Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	polyklonal	#G9545 Sigma
Histon H3	Kaninchen	polyklonal	#9715S Cell Signaling
Integrin $\alpha$ 4	Ratte	polyklonal	#MAB24501 R&D Systems
Integrin $\beta$ 1	Ratte	polyklonal	#553715 R&D Systems
JNK/ SAPK	Kaninchen	polyklonal	#9252 Cell Signaling
phos-JNK (Thr 183/Tyr 185)	Kaninchen	polyklonal	#9251 Cell Signaling
p38 MAPK	Kaninchen	polyklonal	#9212 Cell Signaling
phos-p38 (Thr 180/ Tyr 182)	Maus	monoklonal	#MABS64 Millipore
PPAR $\gamma$ (C26H12)	Kaninchen	monoklonal	#2435 Cell Signaling

phos-PPAR $\gamma$ Ser112	Kaninchen	polyklonal	#sc-28001-R Santa Cruz
phos-PPAR $\gamma$ Ser 273	Kaninchen	polyklonal	#bs-4888R Bioss (Acris)
Rac 1, 2, 3	Kaninchen	polyklonal	#2465 Cell Signaling
phos-Rac1/Cdc42	Kaninchen	polyklonal	#2461P Cell Signaling

### 2.1.7 Sekundäre Antikörper

**Tabelle 2:** Auflistung der sekundären Antikörper für Western Blot

Antikörper	Konjugat	Produktnummer/ Hersteller
Ziege anti-Kaninchen	HRP	#111-035-045 Dianova
Ziege anti-Ratte	HRP	#112-036-071 Dianova
Ziege anti-Maus	HRP	#170-6515 BioRad

### 2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 3:** Auflistung der primären Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorphor/Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3 $\epsilon$	Alexa 647	145-2C11	1:200	Biolegend
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	1:400	Biolegend
CD5	Biotin	53-7.3	1:200	Biolegend
CD8 $\alpha$	Alexa 700	53-6.7	1:400	Biolegend
CD11b	Biotin FITC	M1/70	1:400 1:1600	Biolegend
CD16/32	PE	93	1:100	Biolegend
CD19	Alexa 700	6D5	1:800	Biolegend
CD29 (Integrin $\beta$ 1)	PE	HMb1-1	1:100	Biolegend
CD49d (Integrin $\alpha$ 4)	PE	9C10	1:100	Biolegend
CD49e (Integrin $\alpha$ 5)	Alexa 647	5H10-27	1:100	Biolegend
CD49f (Integrin $\alpha$ 6)	Alexa 647	GoH3	1:100	Biolegend
CD51 (Integrin $\alpha$ v)	PE	RMV-7	1:100	Biolegend
CD31	PE	MEC13.3	1:100	Biolegend
CD34	Alexa 700	RAM34	1:50	Biolegend
CD44	APC-Cy7	IM7	1:100	Biolegend
CD45	Alexa 700 Pacific Blue	30-F11	1:400 1:400	Biolegend
CD45R (B220)	Biotin FITC	RA3-6B2	1:200 1:200	Biolegend
CD127	APC	A7R34	1:50	Biolegend
CD146	APC	ME-9F1	1:100	Biolegend
cKit (CD117)	APC-Cy7	2B8	1:100	Biolegend

Integrin $\beta$ 3	PE	HM beta3.1	1:100	BioRad
Ly6G (Gr-1)	Biotin	RB6-8C5	1:400	Biolegend
Nkp46	PerCP-Cy5.5	9E2	1:100	Biolegend
Pref-1	APC	1168B	1:50	R&D Systems
Sca-1	PE-Cy7	E13-161.7	1:200	Biolegend
Streptavidin	Pacific Orange	S32365	1:400	Biolegend
TCR- $\beta$	PE	H57-597	1:200	Biolegend
Ter119	Biotin Pacific Blue	Ter119	1:100 1:200	Biolegend

### 2.1.9 siRNA

**Tabelle 4:** Liste der Sequenzen der verwendeten siRNAs

Gen	5' siRNA	3' siRNA	Hersteller
Cdc42	CAAUUUCCCAUCGGAUUAU-dTdT	AUAUUCCGAUGGGAAUUUG-dTdT	Sigma
Integrin $\alpha$ 5	GAGAUGAAGAUCUACCUCA-dTdT	UGAGGUAGAUCUUCAUCUC-dTdT	Sigma
Integrin $\alpha$ 6	CUUAAGCUAGAGUAUAAAU-dTdT	AUUUUAUCUCUAGCUUAAG-dTdT	Sigma
Integrin $\alpha$ v	CUUCUACUGGAUAACUCA-dTdT	UGAGUUUAUCCAGUAGAAG-dTdT	Sigma
Integrin $\beta$ 1	GUGAAGACAUGGACGCUUA-dTdT	UAAGCGUCCAUGUCUUCAC-dTdT	Sigma
Integrin $\beta$ 3	CCUGUAUCGCCGUACAUGU-dTdT	ACAUGUACGGCGAUACAGG-dTdT	Sigma
Rac1	CACCUAAGCACUAAACUCU-dTdT	AGAGUUUAGUGCUUAGGUG-dTdT	Sigma
Negativ Kontrolle	keine Angaben von Seiten der Firma Sigma		#1, Sigma

### 2.1.10 Inhibitoren, Stimulatoren und Beschichtungsreagenzien

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Inhibitoren, Stimulatoren und Reagenzien zur Beschichtung von Kulturplatten für *in vitro* Experimente

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
A66 (PI3K-Inhibitor)	10 $\mu$ M	Tocris
EHT1864 (Rac1-Inhibitor)	5 $\mu$ M	Tocris
Echistatin	0,27 nM	Tocris
Collagen I	10 $\mu$ g/ml	Sigma
Collagen IV	10 $\mu$ g/ml	BD Biosciences
JNK-Inhibitor II	10 $\mu$ M	Calbiochem, Merck
Laminin-411	10 $\mu$ g/ml	Biolamina
ML141 (Cdc42-Inhibitor)	10 nM	Sigma

PF573228 (FAK-Inhibitor)	5 µM	Tocris
pFN	10 µg/ml	selbst aufgereinigt, siehe 2.5.1
Poly-L-Lysin	0,01 %	VWR
SB239063 (p38-Inhibitor)	20 µM	Tocris
Tenascin C	15 µg/ml	Millipore
U0126 (MEK/ERK-Inhibitor)	20 µM	Promega
VCAM	10 µg/ml	Sigma
Vimentin	10 µg/ml	Prospec
Vitronectin	10 µg/ml	Peprotech

### 2.1.11 Oligonukleotide für Genotypisierung

**Tabelle 6:** Auflistung der Primersequenzen für die Genotypisierung

Gen	5'Primer	3'Primer
Cdc42	CATCGGAATATGTACCAACTGT	CCATGACAACCTAAGTTCAACT
eGFP	TCGTGACCACCCTGACCTA	TCGTCCATGCCGAGAGTGAT
Osx Promotor	CTCTTCATGAGGAGGACCCT	GCCAGGCAGGTGCCTGGACAT
Rac1	GTCTTGAGTTACATCTCTGG	CTGACGCCAACAACCTATGC

### 2.1.12 Oligonukleotide und Probes für qPCR

**Tabelle 7:** Liste der Primersequenzen für die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion, alle Primer wurden von der Firma Biomers bezogen

Gen	5' Primer	3' Primer	Probe #
ALP	CGGATCCTGACCAAAAACC	TCATGATGTCCGTGGTCAAT	31
Cdc42	ACAACAAACAAATTCCTCATCG	TTGCCCTGCAGTATCAAAA	22
C/EBPβ	TGATGCAATCCGGATCAA	CACGTGTGTTGCGTCAGTC	102
DLK1 (Pref-1)	GATTCTGCGAGGCTGACAAT	GGTTCCTTGCAGACTCCATT	76
HPRT	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	95
OC	AGACTCCGGCGCTACCTT	CTCGTCACAAGCAGGGTT	32
PPARγ	GAAAGACAACGGACAAATCACC	GGGGGTGATATGTTTGAAGTTG	7
Rac1	AGATGCAGGCCATCAAGTGT	GAGCAGGCAGGTTTTACCAA	77
Runx2	CGTGTCAGCAAAGCTTCTTTT	GGCTCACGTCGCTCATCT	66

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für diese Doktorarbeit wurden Versuchstiere der Gattung *mus musculus*, die sogenannte Hausmaus, verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen und spezifiziert pathogenfrei (SPF) in der Tierhaltung der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) gezüchtet und gehalten. Für die Histomorphometrische Knochenuntersuchungen sind Injektionen von Kalzein erforderlich. Diese werden je nach Alter der Maus entweder vom Tierpfleger direkt in der IBF durchgeführt oder in den Klinisch Experimentellen Bereich (KEB) überführt und dort behandelt. Zusätzlich wurden schwangere Mäuse (RjOrl:SWISS) für die Osteoblastenisolation aus der Calvaria von Neugeborenen direkt von Janvier Labs bezogen.

### 2.2.2 Tierversuchsanträge

**Tabelle 8:** verwendete Tierversuchsanträge im Rahmen dieser Arbeit

Aktenzeichen	Behandlung/Alter der Mäuse	Kurztitel
G-264/12	Kalzein-Injektion/ 1-3 Wochen	Rolle der RhoGTPasen beim Knochenwachstum
G-29/15	Kalzein-Injektion/ 5 u. 24 Wochen; Doxyzyklin-Zugabe im Trinkwasser	Cdc42 und Rac1 im Knochen
G-179/16	Kalzein-Injektion/ 3 Wochen; Doxyzyklin-Zugabe im Trinkwasser	Funktion von Cdc42 und Rac1 im Knochen
G-31/18	Doxyzyklin-Zugabe im Trinkwasser	Der Osterix-Promotor beeinflusst das Knochenwachstum

### 2.2.3 Mausstämme

Der für das Versuchsvorhaben verwendete Mausstamm geht auf den C57BL/6-Stamm von Jackson Laboratory (Bar Harbour, USA) zurück. Diese Mäuse (*B6.Cg-Tg(Sp7-tTA, tetO-EGFP/cre)1Amc/J*) sind hemizygot für das *Osx1-GFP::Cre* Transgen und hilfreich für die Untersuchungen der Knochenentwicklung, die Osteoblasten Differenzierung und des Wnt-Signalweges. Zwei weitere Mausstämme *B6.129sv-Cdc42tm1Ref (cdc42 fl/fl)* und *B6.129sv-Rac1tmRef (rac1 fl/fl)* wurden aus Martinsried (Chrostek et al., 2006; Wu et al., 2006) hinzugezogen und mit den *Osx-GFP::Cre* Mäusen in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) in Heidelberg verpaart.

Außerdem wurde mit einer weiteren Mauslinie (*B6.129S2-Itgb3tm1Hyn/JSemJ*) gearbeitet, bei der das Integrin  $\beta 3$  in allen Zellen ausgeschaltet ist. Homozygot ausgeschaltete Mäuse sind aufgrund eines skelettalen Defekts und durch Blutungen im Uterus bzw. im Gastrointestinaltraktes kaum überlebensfähig (Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000) und wurden deshalb als eine belastende Linie eingestuft. Das Regierungspräsidium Karlsruhe hat die Zucht und Haltung dieser Mauslinie unter dem Aktenzeichen G-303/14 genehmigt.

### 2.2.4 Konditionelle Knockout-Mäuse

Eine Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 ist embryonal letal, deshalb wurden konditionelle Knockout-Mäuse mit Hilfe des Cre/loxP Systems generiert. D.h. das Zielgen (Cdc42 und Rac1) ist von loxP-



Stellen markiert (floxed, fl/fl), welche die Cre-Rekombinase erkennt. Da das Enzym Cre-Rekombinase an die entsprechenden loxP-Stellen bindet, kann der dazwischenliegende DNA-Bereich herausgeschnitten und die DNA-Enden verbunden werden. Durch die Kopplung der Cre-Rekombinase an gewebsspezifische Promotoren ist es möglich, dass die Deletion des Zielgens nur in spezifischem Gewebe erfolgt. Die verwendeten Cdc42 und Rac1 Knockout-Mäuse wurden uns aus der Arbeitsgruppe von Prof. R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Um die entsprechenden Gene auszuschalten, wurden diese Tiere über zwei Generationen mit Tieren, die die Cre-Rekombinase tragen, welche unter der Kontrolle des Osterix (Osx) - Promotors steht, verpaart. Dieser Promotor wird endogen und während der Embryonalentwicklung ab Tag 13,5 spezifisch in Osteoblasten aktiv (Nakashima et al., 2002; Sinha and Zhou, 2013). Es wurden sowohl homozygote Einzel-Knockouts (cdc42 fl/fl rac +/+; cdc42 +/+ rac fl/fl) als auch homozygote bzw. heterozygote Doppel-Knockouts (cdc42 fl/fl rac1 fl/fl; cdc42 fl/+ rac fl/fl; cdc42 fl/fl rac1 fl/+) generiert. Als Kontrolle wurden Mäuse verwendet, welche auf beiden Allelen das gefloxt Cdc42 bzw. Rac1 tragen, aber keinen Osterix Promotor besitzen.

Um zu überprüfen, ob die Effekte der beiden RhoGTPase echt sind oder nur durch die Osx-GFP::Cre Mutation verursacht wurden, wurde den trächtigen Versuchstieren ab dem Embryonalstadium E13.5 und nach Geburt weitere zwei Wochen, 200 µg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser (5% Succroslösung) verabreicht. Doxyzyklin ist ein Antibiotikum und führt zu einer Hemmung der Cre-Rekombinase-Aktivität, dadurch geht die Fähigkeit verloren bestimmte Gene ausschalten zu können.

### 2.2.5 Experimentelle Behandlung der Versuchstiere – Kalzeininjektion

Den Versuchstieren wurde zweimal intraperitoneal Kalzein injiziert. Kalzein ist ein grüner Fluoreszenzmarker, der durch seine Affinität zu Kalzium in der neu mineralisierenden Matrix des Knochens eingebaut wird und Informationen über die noch nicht mineralisierte Matrix zum Zeitpunkt der Injektion gibt und die Berechnung der Mineralisierungsgeschwindigkeit und die Aktivität der Osteoblasten quantifizieren lässt (Dynamische Histomorphometrie). Im Alter von 3 Wochen wurde den Mäusen in einem Abstand von drei Tagen 30 mg/kg Körpergewicht bzw. 7 µl/g Kalzein in der IBF oder KEB verabreicht. Die Injektion von Kalzein wurde vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt und entsprechend des Tierversuchantrages (siehe Tabelle 8) durchgeführt.

Die Mäuse wurden durch die Narkotisierung mit Ketamin/Xylazin, einer finalen Blutentnahme aus dem Herzen und durch die Durchtrennung der Aorta getötet. Die Tötung der Mäuse erfolgte ein bis zwei Tage nach der zweiten Kalzein-Injektion.

### 2.2.6 Probenentnahme nach der Tötung der Versuchstiere

Nach der Euthanasie der Versuchstiere wurde die Maus fixiert und mittels einer 1 ml Spritze wurde Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Das Vollblut wurde entweder zur Gewinnung von Plasma und Serum verwendet und bei -80 °C eingefroren oder ein Blutbild erstellt (siehe 2.2.7). Anschließend wurden die hinteren Extremitäten Tibia und Femur, sowie die Wirbelsäule entnommen und entweder in 70 % Ethanol für die Histomorphometrie oder in 4 % PFA für die Knochendichtemessung und anschließende Osmiumtetroxid Färbung fixiert. Des Weiteren wurde die Schädeldecke der Mäuse für die Alzianblau/Alizarinrot – Färbung frei präpariert und in 96 % Ethanol aufbewahrt. Je nach Fragestellung des jeweiligen Experiments wurde das Knochenmark

aus den hinteren Extremitäten Tibia und Femur mit 1X PBS ausgespült und entweder für die *in vitro* Kultivierung der Zellen weiterverarbeitet, oder für durchflusszytometrische Analysen aufbereitet. Weiterhin wurde die Milz entnommen und diese Zellen ebenfalls für eine durchflusszytometrische Untersuchung gewonnen. Die Niere wurde für eine eventuelle Nachgenotypisierung entnommen und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.2.7 Blutbildbestimmung und Gewinnung von Serum und Plasma**

Zur Blutbilderstellung wurde das aus der Tötung gewonnene Blut mit DPBS + 5 mM EDTA 1:2 verdünnt und anschließend mittels des Hämatologie-Systems CELL-DYN Emerald analysiert. Zur Gewinnung von Serum wurde die Blutprobe in eine Z-Gel Microvette gegeben und für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde mittels einer Microvette mit Tri-Kalium-EDTA gewonnen, welche für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert wurden. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Serum bzw. Plasma bei -80 °C gelagert.

### **2.2.8 Messung der Knochendichte mittels pQCT**

Die Knochendichtemessung wurde mittels der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) *ex vivo* am distalen Femur der Mäuse durchgeführt. Die Computertomographie, welche auf Basis von Röntgenstrahlen die physikalische Dichte als Masse oder Volumen messen kann, ist in der Lage zwischen trabekulären und kortikalen Bereichen des Knochens zu unterscheiden.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Isolation von primären Osteoblasten aus der Calvaria**

Primären Osteoblasten wurden aus der Calvaria von neugeborenen Mäusen (P1-3) gewonnen. Dabei wurden die Neugeborene mittels Dekapitation getötet, die Calvaria entnommen und in einer Petrischale mit 1X PBS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung von Hautresten und Blutgefäßen freipräpariert und gereinigt. Anschließend in eine weitere Petrischale mit Kulturmedium (DMEM-Medium mit 50 IU/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin) auf Eis überführt und gelagert. Dann wurden die gesäuberten Calvaria in eine Verdauungslösung (siehe 2.1.5; 250 µl/Calvaria) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bei 37°C im Thermoschüttler bei 200-300 rpm inkubiert. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt, wobei der Überstand des ersten Verdaus verworfen und der, der drei weiteren Überstände pro Schädel gesammelt wird. Abschließend wurden die verdauten Calvaria mit PBS gewaschen und der Überstand ebenfalls gesammelt. Danach wurden die gesammelten Überstände mit den gewonnenen Osteoblasten für 3-4 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in Kulturmedium ( $\alpha$ -MEM mit 10 % FCS und 50 IU/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin) aufgenommen und die Zellen in einem passenden Kulturgefäß ausgesät.

### **2.3.2 Isolation von murinen Knochenmarkzellen**

Für die murine Knochenmarkzellisolation wurden die hinteren Extremitäten Tibia und Femur nach der Euthanasie der Mäuse entnommen und diese von Haut – und Muskelgewebe frei präpariert. In

einem weiteren Schritt wurden die Enden der Knochen vorsichtig mit einer scharfen Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer mit sterilem 1X DPBS gefüllten Spritze und 25G Kanüle ausgespült und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen auf Eis gesammelt. Anschließend werden die nicht benötigten Erythrozyten im Knochenmark mittels einer ACK-Lyse entfernt. Hierfür wurde das isolierte Knochenmark bei Raumtemperatur (RT) bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert, 1-2 ml ACK-Lysepuffer hinzugegeben, resuspendiert und wieder zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde entweder in 1 ml 1X DPBS oder FACS-Puffer (siehe 2.1.5) resuspendiert und für weitere Experimente, wie die Durchflusszytometrie oder *in vitro* Kultivierung verarbeitet.

### 2.3.3 Isolation von CD45 negativen Zellen aus dem Knochenmark mittels Dynabeads®

Für die Untersuchung mesenchymaler Vorläuferzellen wurden bestimmte Immunzellen im Knochenmark wie CD45- bzw. CD45+ Zellen mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads®) isoliert. Für die Untersuchung von mesenchymalen Stromazellen werden ausschließlich CD45- Zellen benötigt. Hierfür wurden die Protein G-Dynabeads®, welche jede Art von Antikörper an der schweren Kette bindet, verwendet. Zu Beginn wurden die magnetischen Kügelchen mit 1X DPBS gewaschen und anschließend mit dem unkonjugierten CD45 Antikörper für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 50  $\mu$ l Dynabeads und 25  $\mu$ l Antikörper eingesetzt. Danach wurden die magnetischen Kügelchen nochmals mit 1X DPBS gewaschen und mit den Zellen für weitere 30 min bei RT geschüttelt. Mit Hilfe eines Magneten wurden daraufhin die magnetischen Kügelchen mit den gebundenen CD45+ Zellen vom Überstand mit den CD45- Zellen getrennt. Der Überstand wurde hierbei in ein neues Gefäß überführt, mit 1X DPBS gewaschen und die Zellsuspension für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in Kulturmedium ( $\alpha$ -MEM mit 10 % FCS und 50 IU/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin) resuspendiert und für weitere *in vitro* Versuche in einem passenden Kulturgefäß ausgesät. Abschließend wurde die Isolation mittels durchflusszytometrischer Analyse nachgewiesen und bestätigt.

### 2.3.4 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Osteoblasten und MSCs fand unter sterilen Bedingungen statt und erfolgte im entsprechenden Medium in einem Inkubator bei einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Das Medium wurde bei Differenzierungsexperimenten 2-3 mal die Woche gewechselt oder bei einer Konfluenz von 80-90 % in den Zellkulturflaschen gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1X DPBS gewaschen und anschließend wurde eine 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert und für 2-5 min bei 37 °C im Inkubator von der Plastikoberfläche gelöst. Die trypsinisierten Zellen wurden dann in dem entsprechenden Medium aufgenommen, bei 1500 rpm für 3 min abzentrifugiert und das Pellet in einem geeigneten Volumen resuspendiert. Für die weiteren Analysen wurde die Zellzahl mittels des Casy-Zellzählgerätes bestimmt und dementsprechend in einem passenden Kulturgefäß ausgesät. Zur Aufbewahrung einiger Zellen wurden diese keimfrei kryokonserviert und in dem entsprechenden Kulturmedium mit 10 % DMSO in einem Kryoröhrchen für ca. 24 h langsam auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 2.3.5 Differenzierung von primären Osteoblasten und MSCs

Für die Standardkultivierung von Osteoblasten wurde  $\alpha$ -MEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep verwendet. Für Experimente bei dem die primären Präosteoblasten entweder zu Osteoblasten oder zu Adipozyten differenziert wurden, wurde ein spezielles Differenzierungsmedium angesetzt, die Zellen in Kulturplatten ausgesät und für 1-2 Tage normal kultiviert. Das Osteoblasten-Differenzierungsmedium beinhaltet 5 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure und 10 nM Dexamethason und wurde während der Differenzierungsdauer von ca. 12-20 Tagen jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Bei der Differenzierung der primären Osteoblasten zu Adipozyten wurde für Tag 1 und 3  $\alpha$ -MEM Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX; 0,0115 g/ml 0,5 M KOH; 1:100), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 1  $\mu$ M Dexamethason verwendet. An Tag 5 und 7 beinhaltet das Adipozytendifferenzierungsmedium nur noch  $\alpha$ -MEM Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und Insulin. Ab Tag 9 wird das Differenzierungsmedium durch das Standardmedium ausgetauscht und bis zum Ende der Differenzierung alle 2-3 Tage gewechselt. Die mesenchymalen Stromazellen (CD45 - Zellen) wurden ebenfalls in  $\alpha$ -MEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep kultiviert.

### 2.3.6 Stimulation und Inhibition von primären Zellen

Für die Stimulation bzw. Inhibition von Osteoblasten oder MSCs wurden die entsprechenden Zellen entweder in 96- oder 48-Lochplatten ausgesät und für 1-2 Tage normal kultiviert. Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen für 4-6 h mit Medium ohne FCS gehungert, anschließend einmal mit 1X DPBS gewaschen und für 15 min bzw. 2 h mit dem entsprechenden Stimulator bzw. Inhibitor behandelt (siehe 2.1.10). Danach wurden die Zellen in Protein-Lysepuffer (siehe 2.1.5) aufgenommen und entweder direkt für Protein analytische Untersuchungen eingesetzt oder bei -20 °C für kurze und bei -80 °C für längere Zeit gelagert. Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurden die Zellen nach der normalen Kultivierung kurz mit 1X DPBS gewaschen, für 6 h mit den Stimulatoren bzw. Inhibitoren behandelt und anschließend in einem entsprechenden RNAzol Volumen aufgenommen und entweder direkt für die RNA-Isolation weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.3.7 Adhäsionsexperimente

Zur Untersuchung der Integrin-Matrix-Interaktion wurden Adhäsionsexperimente in 96-Lochplatten mit Osteoblasten und MSCs durchgeführt. Hierfür wurden die Kulturplatten mit dem gewünschten Matrixprotein (siehe 2.1.10) beschichtet und bei RT für 1-2 h oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen und die entsprechenden Zellen mit Medium ohne Zusätzen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen in einem entsprechenden RNAzol Volumen aufgenommen und weiter für die RNA-Isolation verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

### 2.3.8 siRNA Transfektion von Osteoblasten und mesenchymalen Stromazellen

Bei der Transfektion mittels Mission®siRNA (Sigma-Aldrich) wurde für die Osteoblasten das TurboFect (Thermo Fischer Scientific) und für die MSCs Lipofectamin®RNAiMAX Transfektionsreagenz verwendet. Hierfür wurden die Osteoblasten zu 80-90 % und die MSCs zu 100 % konfluent ausgesät.

Für die transiente Transfektion mit Turbofect bei den Osteoblasten wurden etwa 16–24 h vor der Transfektion ca. 30.000 – 35.000 Zellen in eine Vertiefung einer 48-Lochplatte bzw. etwa 15.000–20.000 Zellen in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät. Exemplarische wurden für die Transfektion in einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen pro Vertiefung 0,6 µl einer 100 µM siRNA-Lösung (Sigma-Aldrich) mit 25 µl Opti-MEM® (Gibco) gemischt, 0,8 µl Transfektionsreagenz (TurboFect) hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 25 µl pro Vertiefung Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Zellen mit 200 µl α-MEM Medium ohne FCS gegeben und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit dem entsprechenden Medium ohne Reagenzien bedeckt und nach 24 h weiter kultiviert bzw. für weitere Experimente verwendet.

Die mesenchymalen Vorläuferzellen wurden ebenfalls in einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen etwa 16–24 h vor der Transfektion zu 100 % konfluent ausgesät, da über Nacht noch einige Zellen absterben. Exemplarische wurden für die Transfektion in einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen pro Vertiefung eine Lösung A bestehend aus 0,75 µl einer 100 µM siRNA-Lösung (Sigma-Aldrich) mit 30 µl Opti-MEM® (Gibco) und eine Lösung B bestehend aus 2 µl Transfektionsreagenz (Lipofectamin®RNAiMAX) und 30 µl Opti-MEM® hergestellt. Daraufhin wurden die beiden Lösungen A und B gemischt, 5 min bei RT inkubiert und das Transfektionsgemisch tropfenweise 25 µl pro Vertiefung in 200 µl α-MEM Medium mit 5 % FCS hinzugegeben und für 24 h bei 37 °C kultiviert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 DNA-Isolation aus Biopsien und Genotypisierung der konditionellen Knockout-Mäuse

Zu Beginn der Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien wurde den Mäusen ein etwa 1,5 mm großes Stück des Schwanzendes oder eine halbe Niere von den Neugeborenen in einer Verdauungslösung bestehend aus 92 µl DNA-Lysepuffer und 8 µl Proteinase K (20 mg/ml) für mindestens 3 h oder über Nacht bei 56 °C lysiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt und dann für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann jeweils unter gleichen Bedingungen mittels einer „touch down“ Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet und 0,5 µl dieser DNA pro 24,5 µl PCR Ansatz eingesetzt. Für diese Arbeit wurden folgende Primer (Biomers) mit den entsprechenden Sequenzen (siehe 2.1.12) verwendet:

PCR- Ansatz:	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	15,25 µl
	10X Reaktionspuffer	2,50 µl
	Enhancer	2,00 µl
	MgCl <sub>2</sub>	1,50 µl
	dNTPs (25 µM)	1,00 µl
	5'Primer (25 µM)	1,00 µl

3'Primer (25 µM)	1,00 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
DNA-Lysat	0,50 µl

Der entsprechende PCR-Ansatz wurde dann in dem Thermocycler überführt und die Fertigstellung mit dem folgenden PCR-Programm realisiert:

	Zyklus	Temperatur	Zeitdauer
	1.	95 °C	3 min
Touch down:	2.	95 °C	30 sek
	3.	63 °C	30 sek
		(-1 °C/Zyklus)	
	4. Zyklus 2.-4. wird 10x wdh	72 °C	30 sek
Amplifikationsphase:	5.	95 °C	30 sek
	6.	53 °C	30 sek
	7. Zyklus 5.-7. wird 35x wdh	72 °C	30 sek
	8.	72 °C	3 min
	9.	4 °C	∞

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente nach der PCR aufgetrennt. Hierfür wurde ein 2-3 %iges Agarosegel mit 100 ml 1X TAE-Puffer und 2 µl RedSafe hergestellt, die PCR-Proben mit 10 µl 4X-DNA-Probepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einem Gelsystem bei 100-150 Volt in 1X TAE-Puffer und wurde unter UV-Licht dokumentiert.

## 2.4.2 Isolation von RNA

Für die Untersuchung der mRNA-Expression unterschiedlicher Gene wurden Osteoblasten, Knochenmarkzellen oder Gewebe im entsprechendem Volumen RNAzol®RT aufgenommen und bei RT kurz lysiert. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die RNA-Isolation weiterverwendet. Für die RNA-Isolierung aus Osteoblasten bzw. MSCs aus einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen wurden die Zellen meist mit 60 µl RNAzol geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA, Proteine und Polysaccharide zu präzipitieren wurde das entsprechende RNAzol Volumen mit dem 0,4-fachen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> versetzt, für 15 min bei RT inkubiert und bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die RNA durch die Zugabe des 0,4-fachen Volumens 75 %igem Ethanol gefällt und für 8 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 7 min bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nochmals in 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet in 28 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen. Die RNA kann nun weiter für die cDNA-Synthese verwendet werden.

### 2.4.3 cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Damit die RNA mittels einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) untersucht werden kann, wurde diese in komplementär DNA (cDNA) transkribiert. Zu Beginn wurden 10 µl der isolierten RNA mit 1 µl Oligo dT Primer (10mM, Biomers) gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Proben kurzzeitig bei 4 °C gekühlt und mit 9 µl Mastermix mit den folgenden Komponenten versetzt:

5X Reaktionspuffer	4,0 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,0 µl
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,1 µl
Nuklease freies Wasser	2,4 µl

Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 60 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und danach bei -20 °C gelagert oder direkt für die qPCR verwendet.

### 2.4.4 quantitative Echtzeit-PCR (real-time quantitative PCR)

Zur Quantifizierung der cDNA wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Hierfür wurde das qPCR-Kit von Bioline basierend auf dem TaqMan-System verwendet. Die entsprechenden TaqMan-Sonden (Probes) und die verwendeten Primer wurden mittels der *Universal ProbeLibrary Assay Designe* Software von der Firma Roche erstellt und eingesetzt (siehe 2.1.12). Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 15 µl setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

cDNA	3,0 µl
Nuklease freies Wasser	2,4 µl
3'Primer (10 µM)	0,6 µl
5'Primer (10 µM)	0,6 µl
Hydrolyse Probe (TaqMan Sonde)	0,15 µl
SensiFast Enzyme Mix	7,5 µl
20X BSA (1 mg/ml)	0,75 µl

Das qPCR-Programm wurde im Light Cycler II von Roche unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Zyklus	Temperatur	Zeitdauer
1	95 °C	10 min
2 - 49	95 °C	10 sek
	55 °C	30 sek
	72 °C	1 sek
50	40 °C	30 sek

Die Ergebnisse der mRNA-Expression wurden mittels der  $\Delta\Delta C_q$ -Berechnungs-Methode relativ bestimmt und die Expression des Interesses-Gens zu der Expression eines Haushaltsgenes (HPRT) der jeweiligen Probe korrigiert.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Isolation von Fibronectin (pFN) über eine Gelatine-Sepharose Säule

Plasmafibronectin wurde aufgrund seiner hohen Affinität zu Gelatine (denaturiertes Kollagen) aus Gefrierfrischplasma (Blutbank, Universitätsklinikum Heidelberg) mit Hilfe einer Gelatine-Sepharose-Säule aufgereinigt (Engvall and Ruoslahti, 1977). Dazu wurde eine Säule mit 25 ml Gelatine-Sepharose 4B luftblasenfrei gefüllt und mit 100 ml Equilibrierungspuffer gewaschen. Dann wurden 250 ml humanes Blutplasma zur Gewinnung von pFN auf die Säule gegeben und anschließend die Gelatin-Sepharose mit 150 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Dabei wurden jeweils 1 ml Fraktionen aufgefangen und die Proteinkonzentration photometrische bei 280 nm gemessen. Alle Fraktionen deren Proteinkonzentration höher als 0,1 mg/ml wurden gepoolt. Die Gelatin-Sepharose wurde zum Schluss reequilibriert und in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Das gewonnenen Fibronectin wurde dann in 100 kD Macrosep Zentrifugationsröhrchen aufkonzentriert und anschließend gegen PBS, um den Harnstoff aus dem Elutionspuffer zu entfernen, bei 4 °C für 2-3 h dialysiert (Porengröße: 15000 MWCO).

### 2.5.2 Messung der alkalischen Phosphatase Aktivität nach Bessey, Lowry und Brock

Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) Aktivität in den Osteoblasten wurde das Medium von kultivierten bzw. ausdifferenzierten Zellen abgenommen und gesammelt. Die Analyse wurde nach einer abgewandelten Methode nach Bessey, Lowry und Brock (Bessey et al., 1946) durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit 1X DPBS gewaschen und für 30 min bei 37 °C in 100  $\mu$ l Lysepuffer lysiert. Die Zellysate wurden dann mit einer Pipettenspitze abgekratzt, gesammelt und für 90 sek bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 1:10 in Substratpuffer verdünnt und 1:1 mit der p-Nitrophenyl-Phosphatlösung (pNPP) gemischt. Pro Probe wurden 100  $\mu$ l in Duplikaten auf eine 96-Lochplatte aufgetragen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils 50  $\mu$ l Substratpuffer und 50  $\mu$ l pNPP-Lösung eingesetzt. Die Enzymreaktion wurde dann durch die Zugabe von 200  $\mu$ l 0,5 M NaOH pro Vertiefung abgestoppt. Als Standard wurde für die Messung para-Nitrophenol 1:1000 in der 0,5 M NaOH Stopplösung verdünnt und 300  $\mu$ l pro Vertiefung pipettiert. Für die Messung wurde die Absorption des bei der Reaktion entstandene Nitrophenols bei 405 nm am Wallace Victor2 1420 Multi Label Counter quantifiziert. Die Auswertung der Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{(\text{OD-Wert-Blank-Wert}) * 0,05 * 0,3 * \text{Verdünnung}}{\text{OD-Standard} * \text{Inkubationszeit (15min)} * \text{Volumen der Probe}}$$



### 2.5.3 Herstellung von Proteinlysaten zur Analyse mittels Western Blotting

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen wurden Osteoblasten oder MSCs in einer 48-Lochplatte konfluent ausgesät, für 3-4 h gehungert, je nach Experiment stimuliert oder inhibiert und in 50-100 µl Proteinlysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben entweder für 3x 5 Sekunden bei 80 Hz sonifiziert oder für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert und bei -80 °C gelagert bzw. direkt mittels Western-Blot analysiert.

### 2.5.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Quantifizierung eines gewünschten Proteins wurden die Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld mittels einer SDS (Sodiumdodecylsulfate) – Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierfür wurde ein Gel aus zwei Komponenten, das Trenngel und das Sammelgel mit den folgenden Bestandteilen gegossen und auspolymerisiert:

	<b>Trenngel 12,5 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
30 % Acrylamid-Lösung	4,17 ml	0,50 ml
Deionisiertes H <sub>2</sub> O	3,33 ml	1,75 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,50 ml	
1,0 M Tris/HCl pH 6,8		0,75 ml
Temed	6 µl	3 µl
10 % APS	100 µl	30 µl

Danach wurden die Proteinlysate mit 4X SDS-Probenpuffer mit (denaturierend) oder ohne (nativ) β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:4 versetzt, für 3 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese findet zuerst bei 100 V für 15 min und anschließend bei 130 V für 1-2 h statt.

### 2.5.5 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine wurden dann mittels der Semi-Dry-Blotting Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, damit anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern bestimmte Proteine auf der Membran nachgewiesen werden können. Für die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran auf die Anoden-Platte platziert, das Gel, weitere drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere und die Kathoden-Platten (Deckel) daraufgelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt bei 12 V für 45-60 min.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h mit 5 % Milchpulver in PBST bei RT geblockt und anschließend zweimal mit PBST kurz gewaschen. Daraufhin wurde ein primärer Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBST über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und anschließend für 1 h mit einem HRP-gekoppelten Sekundäntikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, schüttelnd bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBST wurde die Membran für die

Detektion der Proteinbanden für 1-3 min in ECL Western-Blotting-Substrat im Verhältnis 1:1 inkubiert und in eine Filmkassette zwischen Klarsichtfolie gelegt. Im Dunkeln wurden dann lichtempfindliche Autoradiographie-Filme durch das entstandene Licht bei der Reaktion von HRP, gebunden am Protein, und dem Substrat ECL, belichtet und in der Entwicklermaschine entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit Image J mittels einer densitometrischen Dichtemessung der Banden und die Ergebnisse der Produktion des Interessens-Proteins wurden zu der Produktion eines Haushaltsproteins (GAPDH) der jeweiligen Probe normalisiert.

### **2.5.6 Durchflusszytometrische Analyse**

Bei der Durchflusszytometrie (engl.: FACS: flow associated cell sorting) können zum einen Größe und Granularität der Zellen gemessen, zum anderen die Expression von Oberflächenmarkern mittels fluoreszenz-markierter monoklonaler Antikörper charakterisiert und detektiert werden. Die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Laser angeregt und deren Emission mit verschiedenen Filtern detektiert und mittels einer speziellen Software (Diva, BD Bioscience) umgewandelt, wobei jede Zelle als einzelner Punkt dargestellt und in einem Dotplot oder Histogramm betrachtet werden kann. Für die Experimente wurden Zellen entweder aus dem Knochenmark oder der Milz isoliert bzw. aus Kulturen verwendet. Pro FACS-Ansatz werden idealerweise  $3 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und mit dem jeweiligen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe 2.1.9) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Nach der Färbung wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und wieder in 100  $\mu$ l FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet. Die Messung erfolgte mit dem LSRII von BD Bioscience und die Auswertung mit der Diva-Software von BD Bioscience. Die Prozentzahl bezieht sich, wenn nicht anders angegeben, auf alle aufgenommenen Ereignisse (Events) nach Doublettenausschluss.

## **2.6 Färbungen und histologische Methoden**

### **2.6.1 Von Kossa Färbung von Osteoblasten**

Bei der Mineralisierung von Osteoblasten bilden sich in der Kultur Kalzium-Phosphat-Präzipitate (Hydroxylapatit-Kristalle, Knoten), welche mittels der Von Kossa Färbung braunschwarz angefärbt werden. Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1X DPBS gewaschen und mit eiskaltem Alkohol (95 % Ethanol und 5 % Isopropanol) für 1 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden den Zellen zweimal mit  $H_2O_d$  gewaschen, 200  $\mu$ l Silbernitratlösung hinzugegeben und für 5-10 min mit UV-Licht bestrahlt. Hierbei werden die Kalziumionen zu Silberionen umgewandelt und zu metallischem Silber reduziert. Durch weiteres Waschen mit  $H_2O_d$  und anschließender Zugabe von 300  $\mu$ l Natriumthiosulfatlösung für 5 min bei RT wurde nicht reduziertes Silber entfernt und die Färbung fixiert. Am Schluss wurde die Lösung wieder abgesaugt, die Zellen mit 100  $\mu$ l  $H_2O_d$  bedeckt und mit Hilfe eines Binokular-Mikroskops zeitnah abfotografiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Image J und einer prozentualen Berechnung der Knotenfläche pro Vertiefung.

### 2.6.2 Oil Red O Färbung

Oil Red O dient zur Anfärbung der Triglyceride in fixierten Zellen. In dieser Arbeit wurden hierbei die Lipidtropfen in den Adipozyten in den Osteoblastenkulturen rötlich angefärbt. Zu Beginn wurde eine Stocklösung bestehend aus 0,5 g Oil Red O Pulver in 100 ml Isopropanol hergestellt, ein gewünschtes Volumen der Stocklösung mit dem 1,5-fachen Volumen von  $H_2O_d$  gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung dreimal durch Whatman-Filterpapier gefiltert, damit ungelöste Reste entfernt werden. Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 30 min mit 4 %igem PFA bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 1 h mit der gefilterten Oil Red O Lösung bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit 1X DPBS gewaschen. Für die Auszählung der Adipozyten wurden die Zellkerne der Osteoblasten mittels DAPI in 1X DPBS über Nacht bei 4 °C angefärbt. Die Zellen wurden dann mit 200  $\mu$ l 1X DPBS pro Vertiefung bedeckt und bis zur Auszählung bei 4 °C gelagert.

### 2.6.3 Osmiumtetroxid Färbung

Für die Quantifizierung der Adipozyten im Knochenmark *ex vivo* wurde eine Osmiumtetroxid-Färbung nach der Methode von Scheller (Scheller et al., 2014) durchgeführt. Osmiumtetroxid bildet durch die Anlagerung und Bindung an ungesättigte Fettsäuren Reaktionsprodukte, welche Lipide schwarz anfärben. Hierfür wurde der Femur entnommen, in 4 % PFA fixiert und zuerst im nicht-dekalzifizierten Zustand die trabekuläre Knochendichte bzw. das Knochenvolumen (siehe 2.2.8) als Referenzwert mit dem PQCT gemessen. Für die Färbung wurden die Knochen für 14 Tage in einer Dekalzifizierungslösung auf einem Schüttler bei RT demineralisiert, wobei die Lösung alle 3-4 Tage gewechselt wurde. Anschließend wurden die Knochen 3 x 10 min mit Leitungswasser gewaschen und die Knochen für 24-48 h in der 1 %igen Osmiumtetroxid-Lösung gefärbt. Nach wiederholtem Waschen mit Leitungswasser (3 x 4-6 h) wurde der gefärbte Femur ein zweites Mal mit dem PQCT gemessen und das Volumen der angefärbten Adipozyten im Verhältnis zum gesamten Knochenvolumen berechnet.

### 2.6.4 Skelettfärbung (Alzianblau – Alizarinrot-Färbung)

Für die Skelettfärbung werden die beiden Farbstoffe Alzianblau (für Knorpel) und Alizarinrot (für mineralisierten Knochen) verwendet und dienen zur Darstellung möglicher Fehlbildungen bei der Skelettentwicklung. Für diese Arbeit wurden 3 Wochen alte Mäuse nach der Euthanasie, dekapitiert und der Schädel von Hautresten, Hirngewebe und Augen befreit und für 2-3 Tage in 95 %igem Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Schädel für 24 h in Azeton überführt und danach für 1-3 Tage (die Färbung von der Schädeldecke benötigt meist 3 Tage) in Alzianblau-Lösung leicht schüttelnd inkubiert. Nach drei Tagen wird die Alzianblau-Lösung zuerst durch 95 % Ethanol für 6 h und dann durch eine 95 % Ethanol/ 2 % KOH -Lösung für 24 h bei RT leicht schüttelnd, ersetzt. Für die Färbung des mineralisierten Knochens wurden die Schädel in die Alizarinrot-Lösung überführt und für 12-24 h bei RT weiterhin leicht schüttelnd inkubiert. Zum Entfärben diente dann eine 1 % KOH/ 20 % Glycerol-Lösung für 24-48 h bei RT. Bei diesem Schritt verlieren die Skelette ihre Stabilität und können auseinanderfallen, daher muss sehr vorsichtig weitergearbeitet werden. Für die Konservierung der Schädel wurde eine aufsteigende Glycerol-Reihe (20 % Glycerol/1 % KOH;

50 % Glycerol/1 % KOH und 80 % Glycerol/ 1 % KOH) hergestellt und die Skelette alle 24 h vorsichtig umgebettet. Abschließend wurden die Schädel mit dem Binokular-Mikroskop abfotografiert. Für eine längere Lagerung werden die Skelette ein letztes Mal in 100 % Glycerol ohne KOH umgebettet.

## **2.6.5 Histomorphometrie des Knochens**

### **2.6.5.1 Anfertigung von Kunststoffschnitten von Knochen**

Für die Histomorphometrische Analyse von nicht-dekalzifizierten Knochen wurden die Proben zunächst in Kunststoff eingebettet. Hierfür wurde die entnommene Tibia in 70 % Ethanol über Nacht fixiert und anschließend in einer stündlich wechselnden Alkoholreihe (80 %, 98 %, 100 %) entwässert. Nach einer weiteren Inkubation in 100 % Ethanol über Nacht wurden die Knochen für jeweils 1 h mit 2 ml Osteo-Bed Resin und 2 ml Einbettlösung bedeckt. Die Tibia wurde dann in Einbettförmchen platziert und mit 9 ml Einbettlösung überschichtet, luftdicht verschlossen und bei 34 °C für 24-48 h im Inkubator ausgehärtet. Die fertigen Kunststoffblöcke wurden dann zurechtgesägt und mit einem Mikrotom 3 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels, getränkt mit 30 % Ethanol, auf Eiweiß-Glycerin-beschichtete Objektträger überführt und auf einer Wärmeplatte getrocknet.

### **2.6.5.2 Masson-Goldner Färbung von Kunststoffschnitten**

Mit Hilfe der Masson-Goldner Färbung wurde die statische Knochen-Histomorphometrie, vor allem die Osteoblasten, Osteoklasten und die abgelagerte Knochenmatrix, untersucht. Mit der Färbung werden folgende Strukturen angefärbt: Zellkerne braunschwarz, Zytoplasma schwach-orange bis ziegelrot, Erythrozyten leuchtend rot, Bindegewebe und Knochen grün und Muskelgewebe schwach-rosa. Frisch angelagerte Knochenmatrix (Osteoid) ist pink bis blass-grün. Dazu wurden die Kunststoffschnitte als erstes dreimal 10 min in Azeton entplastet und in einer absteigenden Alkoholreihe (100-98-80-70 %) entwässert. Anschließend wurden die Schnitte für 2 min in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gewaschen, für 10 min mit Hämatoxylin nach Gill II gefärbt und danach für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dann wurden die Schnitte für 6 min in einer Säurefuchsin-Lösung inkubiert, in H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> und 1 % Essigsäure gewaschen und weiter für 2 min mit Phosphormolybdän-Lösung gefärbt. Nach dreimaligen Waschen mit 1 % Essigsäure erfolgte die Färbung mit Lichtgrün für 5 min. Im Folgenden wurden die Schnitte nochmals in 1 % Essigsäure gewaschen und zuletzt rasch in 100 % Ethanol entwässert und für 2 min mit Xylol bedeckt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt überschichtet und permanent mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die gefärbten Knochenschnitte wurden mit dem Eclips TI Mikroskop in 20-facher Vergrößerung abfotografiert und mittels Image J ausgewertet.

### **2.6.5.3 Histomorphometrische Analyse der Knochenschnitte**

Bei der Histomorphometrische Analyse wird zwischen der dynamischen und statischen Histomorphometrie unterschieden. Für beide Untersuchungen wurden die identischen Knochen-Kunststoffschnitte verwendet. Zuerst wurden Fotos von der Kalzeinfärbung erstellt und dann die

Knochenschnitte mittels Masson-Goldner gefärbt und erneut Fotos mit dem Eclips Ti Mikroskop gemacht. Die dynamische Histomorphometrie dient der Charakterisierung der Knochenneubildung, da sich das Fluorochrom Kalzein in neugebildete Knochenmatrix einlagert (siehe 2.2.5) und die Neubildung mittels eines bekannten Zeitintervalls berechnet werden kann. Die statische Histomorphometrie bezieht sich auf eine Momentaufnahme des Knochens und auf das Ausmessen von Längen und Flächen, sowie auf die Anzahl verschiedener Zelltypen.

Für die Auswertung wurde der Knochen in verschiedene Abschnitte eingeteilt: Der Bereich im gleichbleibende Abstand von 150 µm von der Wachstumsfuge ausgehend, wird als primäre Spongiosa bezeichnet und nicht ausgewertet. Die weiteren 1,5 mm der sekundären Spongiosa wurden analysiert, wobei zwischen einem kortikalen und trabekulären Bereich unterschieden und separat ausgewertet wurde. Die Auswertung mit den folgenden Parametern (Tabelle 9-11) wurde mit Image J durchgeführt und entspricht der international Richtlinie der ASBMR (engl.: American Society for Bone and Mineral Research) (Dempster et al., 2013).

**Tabelle 9:** primäre Parameter der dynamischen Histomorphometrie

Parameter	Beschreibung
sLS, single label surface (mm)	Oberfläche/Länge mit einfachem Kalzeinsignal
dLS, double label surface (mm)	Oberfläche/Länge mit doppeltem Kalzeinsignal
ddLS, distance between double label (µm)	Abstand zwischen dem doppelten Kalzeinsignal

**Tabelle 10:** sekundäre Parameter der dynamischen Histomorphometrie

Parameter	Berechnung & Beschreibung
MS, mineralizing surface (mm)	$0,5 * sLS + dLS$
MAR, mineral apposition rate (µm/day)	$ddLS/4$ , neu mineralisierter Knochen der pro Tag neu angelagert wurde
BFR/BS, bone formation rate/Bone surface (mm <sup>3</sup> /mm/yr)	$MS * MAR$ , Knochenneubildungsrate
Aj.Ar, adjusted apposition rate (µm/day)	$(MS * MAR)/OS$ , Verhältnis zwischen neu und nicht mineralisierter Knochenmatrix
Mlt, mineralising lag time (days)	$(o.Th/(MS*MAR))/OS$ , Zeit, die vergeht bis Osteoid mineralisiert wird

**Tabelle 11:** Parameter der statischen Histomorphometrie

Parameter	Beschreibung
BS, bone surface (mm)	Knochenoberfläche (ohne Osteoblasten)
OS, osteoid surface (mm)	Oberfläche mit neugebildetem Osteoid
o.Th, osteoid thickness (µm)	Dicke des neu gebildeten Osteoids
Ob.N, osteoblast number	Anzahl aktiver Osteoblasten, die Osteoid bilden
Oc.S, osteoclast surface (mm)	Oberfläche mit resorbiertem Knochen
Oc.N, osteoclast number	Anzahl knochenresorbierender Osteoklasten

## 2.7 Statistische Methoden

Für die statistische Analyse der Experimente wurden die Programme GraphPad Prism (V3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und Microsoft Excel 2010 verwendet. Statistische Unterschiede wurden zwischen zwei Gruppen mittels des zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test analysiert und bei mehr als zwei Gruppen mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA; engl.: analysis of variance) evaluiert. Signifikante Veränderungen des p-Wertes werden mit Sternen markiert (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM; engl.: standard error of the mean) gibt die Fehlerrate in den Graphen an.

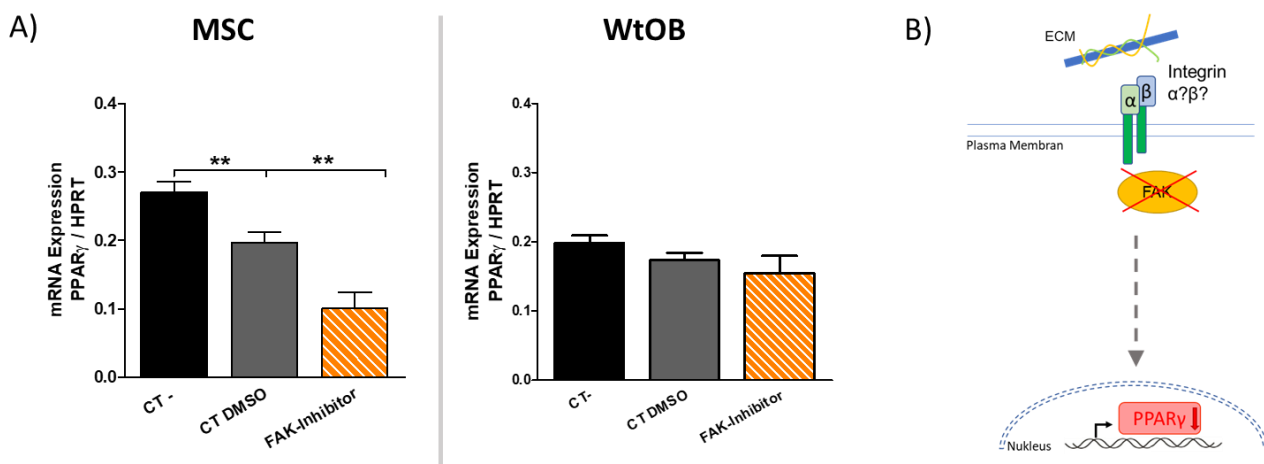
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Rolle der Integrine und der extrazellulären Matrix im Zusammenspiel mit den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten oder Adipozyten

Um die Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) zu Osteoblasten oder Adipozyten und deren Interaktion miteinander untersuchen zu können, ist es wichtig das Zusammenspiel der Integrine mit der extrazellulären Matrix und die daran beteiligten intrazellulären Signalkaskaden zu verstehen. Die folgenden Ergebnisse sollen Aufschluss über die beteiligten Integrine und deren Signalweitergabe in die Zelle geben. Hierfür wurden zum einen Wildtyp-Mäuse für Stimulations- und Inhibitionsversuche verwendet und zum anderen ein Integrin  $\beta 3$  Knockout (KO) Mausmodell zur Untersuchung des Integrin-Signalweges hinzugezogen und analysiert.

##### 3.1.1 Integrin-Signalaktivierung ist beteiligt an der Adipogenese

Zu Beginn wurde analysiert, ob Integrine der MSCs und Wildtyp-Osteoblasten (WtOB) eine Rolle in der Adipogenese spielen. Für diesen Zweck wurde eines der ersten Moleküle des Integrin-Signalweges – FAK (engl.: focal adhesion kinase) - welches spezifisch für die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen aus Integrin-Matrix-Interaktionen verantwortlich ist, inhibiert und die Expression des Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  (engl.: peroxisome proliferator activated receptor gamma) auf mRNA-Ebene untersucht (Abbildung 8A). Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass PPAR $\gamma$  ein Hauptregulator der Adipogenese ist, da durch die Inhibierung dieses Moleküls die Differenzierung der Adipozyten nicht mehr gewährleistet ist (Gregoire et al., 1998; Tang and Lane, 2012). Deshalb wurde in den nachfolgenden Experimenten hauptsächlich die Expression von PPAR $\gamma$  untersucht.



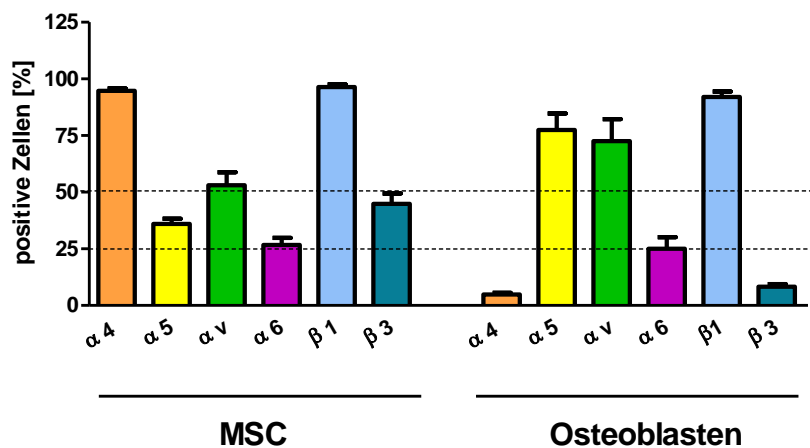
#### Abbildung 8: FAK-Inhibition vermindert PPAR $\gamma$ -Expression

**(A)** Durch die Inhibition von FAK wurde die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  in den MSCs vermindert (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$ ; CT/CT DMSO/FAK-Inhibitor:  $n = 20/19/18$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). In den Osteoblasten (WtOB) war kein signifikanter Unterschied (CT/CT DMSO/FAK-Inhibitor:  $n = 18/18/16$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (SEM, engl.: standard error of mean). **(B)** Die schematische Darstellung der Integrin-Matrix-Interaktion zeigt die Signalweitergabe über das FAK-Molekül, welches dann die PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs beeinflussen kann.

Die Inhibition von FAK und die daraus resultierende Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs lässt vermuten, dass die Integrine bei der adipogenen Differenzierung der MSCs eine Rolle spielen können. Bei den WtOB war der Effekt der FAK-Inhibition nicht signifikant vermindert im Gegensatz zu den MSCs (Abbildung 8A).

### 3.1.2 Die Expression von Integrinen in den MSCs und Osteoblasten

Als nächstes wurde die Expression der für die Osteogenese bzw. Adipogenese relevanten Integrine in den MSCs und den WtOB mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bezogen auf die Literaturangaben sind vor allem die Integrine von Interesse, welche für die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten oder Adipozyten im Knochenmark benötigt werden. Dazu gehören die Integrine  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  (Liu et al., 2005; Morandi et al., 2016; Sens et al., 2017b, 2017a; Volloch and Olsen, 2013). Für die Untersuchung der Integrin-Expression wurden MSCs aus dem Knochenmark oder Osteoblasten aus der Calvaria isoliert, über Nacht kultiviert, anschließend gefärbt und mit dem Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Integrinprofil der MSCs und Osteoblasten**

Das Säulendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen der für die Osteogenese bzw. Adipogenese relevanten Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  in den MSCs und Osteoblasten (MSC: n = 15; Osteoblasten: n = 9).

Dabei stellte sich heraus, dass das Integrinprofil in den MSCs ein anderes ist, als das der Osteoblasten. Besonders auffällig sind die Unterschiede der Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  und  $\beta 3$ . Die Integrine  $\alpha 6$  und  $\beta 1$  sind in den MSCs und Osteoblasten gleich stark auf der Zelloberfläche vorhanden. Deshalb wurde mit den Integrinen  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  und  $\beta 3$  weitergearbeitet.

### 3.1.3 Analyse der Matrix-Integrin-Interaktion

Der nächste Schritt sollte Aufschluss darüber geben, welche Adhäsions- bzw. Matrixproteine die entsprechenden Integrine binden, damit die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert und die Genexpression von PPAR $\gamma$  in den MSCs und Osteoblasten beeinflusst werden kann. Aus diesen Gründen wurden Adhäsions- und Stimulationsexperimente mit den Matrixproteinen Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Tenascin C, VCAM-I (engl.: vascular cell adhesion molecule 1), Vimentin und Vitronectin durchgeführt (verwendete Konzentrationen, siehe Tabelle 5). Dadurch

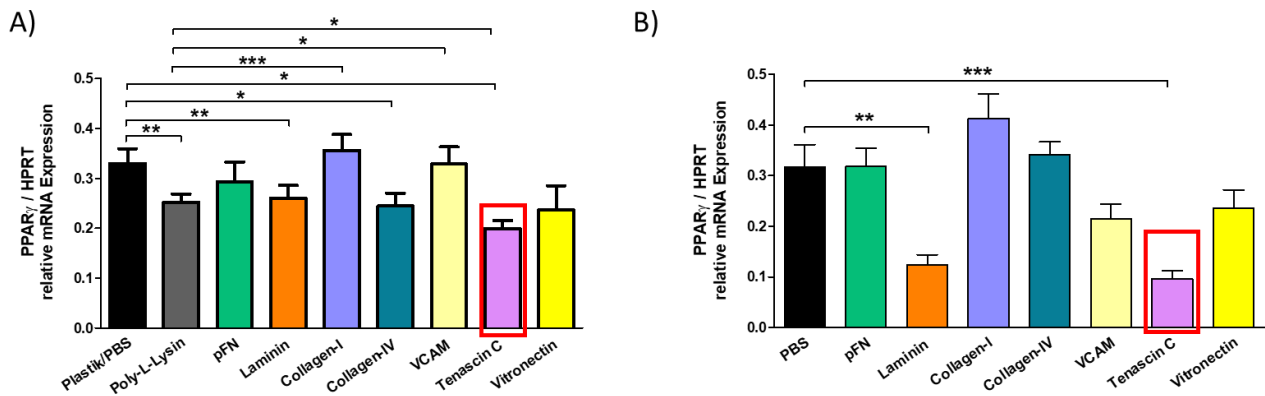


lassen sich Rückschlüsse ziehen, welche Integrine an der Adipogenese beteiligt sein könnten, da jedes extrazelluläre Matrixprotein seine eigenen Liganden besitzt (siehe Tabelle 12). Als Negativkontrolle wurde bei den Beschichtungen 0,01% Poly-L-Lysin verwendet, da es die Adhärenz von Zellen fördert und keine Stimulation durch das Polymer stattfindet.

**Tabelle 12:** Übersichtstabelle für die relevanten Matrix-Integrin-Interaktionen (Harburger and Calderwood, 2009; Horton and Helfrich, 2013)

Matrixproteine	Integrine	Referenzen
Fibronektin	$\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 5\beta 1$ , $\alpha \nu\beta 3$ , $\alpha 9\beta 1$ , $\alpha \nu\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$	(Pankov and Yamada, 2002; Sens et al., 2017a)
Laminin-8 (411)	$\alpha 6\beta 1$ , $\alpha 7\beta 1$	(Nishiuchi et al., 2006; Schéele et al., 2007)
Kollagen I	$\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 11\beta 1$	Jokinen et al., 2004; Tuckwell and Humphries, 1996
Kollagen IV	$\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha \nu\beta 3$	Volloch and Olsen, 2013
Tenascin C	$\alpha \nu\beta 1$ , $\alpha \nu\beta 3$ , $\alpha \nu\beta 6$ , $\alpha 9\beta 1$	Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2015
VCAM-I	$\alpha 4\beta 1$	Humphries et al., 1995; Lobb et al., 1995
Vitronektin	$\alpha \nu\beta 3$ , $\alpha \nu\beta 5$ , $\alpha \nu\beta 1$	Boettiger et al., 2001; Charo et al., 1990
Vimentin (intermediate filament)	$\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$	Kim et al., 2016a, 2016b; Kreis et al., 2005

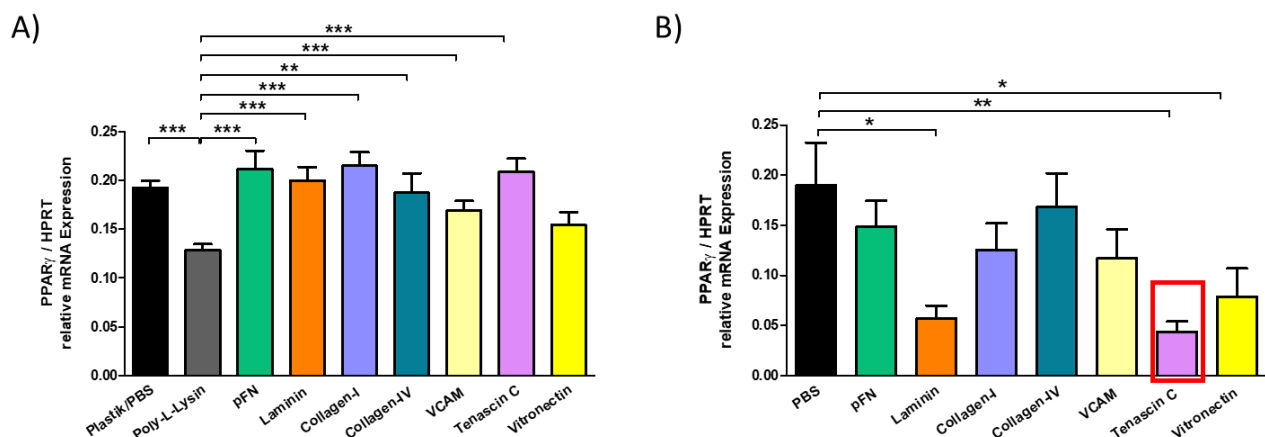
Beschichtet man die Lochplatten mit den entsprechenden Matrixproteinen und inkubiert anschließend frisch isolierte MSCs für 24 h darauf, kam es für die Adhäsionsmoleküle Kollagen I und VCAM-I im Vergleich zu Poly-L-Lysin zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs (Abbildung 10A). Wohingegen die Expression des Adipozytenmarkers bei einer Tenascin C - Beschichtung, sowohl im Vergleich zu Poly-L-Lysin als auch zu Plastik, reduziert wurde (roter Kasten, Abbildung 10A). Der gleiche reduzierende Effekt konnte auch bei einer zehnstündigen Stimulation der MSCs durch die Zugabe von Tenascin C beobachtet werden (roter Kasten, Abbildung 10B). Allerdings können bei der Stimulation die verschiedenen Matrixproteine nur mit PBS verglichen werden, da die Zugabe von Poly-L-Lysin eine schädigende Wirkung auf die MSCs hatte und diese somit kaum bis gar kein PPAR $\gamma$  exprimierten. Die Stimulation mit Laminin führte ebenfalls zu einer Verminderung der mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ .



### Abbildung 10: Matrixproteine beeinflussen die PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs

**(A)** Durch die 24-stündige Kultivierung auf den Matrixproteinen Kollagen I und VCAM-I kam es in den MSCs zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu Poly-L-Lysin und zu einer Verminderung der mRNA-Expression bei einer Tenascin C Beschichtung (One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ ;  $n = 19/19/19/15/15/12/11/12/12/4$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). **(B)** Stimuliert man die MSCs mit den entsprechenden Matrixproteinen für 10 h, wurde die PPAR $\gamma$ -Expression durch Zugabe von Tenascin C reduziert (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 8$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Parallel zu den MSC-Experimenten wurden auch die Osteoblasten für 24 h auf den beschichteten Lochplatten kultiviert und untersucht. Dabei fiel auf, dass im Vergleich zur Negativkontrolle Poly-L-Lysin, die PPAR $\gamma$ -Expression bei einer Beschichtung mit Fibronectin, Laminin, Kollagen I und IV, sowie VCAM und Tenascin C erhöht wurde (Abbildung 11A). Dies bedeutet, dass die Osteoblasten mit ihren Zelloberflächenrezeptoren vermutlich auf alle Matrixproteine reagieren. Im Vergleich zur Kultivierung auf Plastik kam es zu keinen Expressionsunterschieden. Eine Stimulation der Osteoblasten durch die zehnstündige Zugabe von Laminin und Tenascin C führten im Vergleich zu PBS jedoch zu einer Verminderung der relativen mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  (Abbildung 11B). Auch hier war die Zugabe von Poly-L-Lysin nicht möglich, da sich die Zellen ablösten bzw. starben.

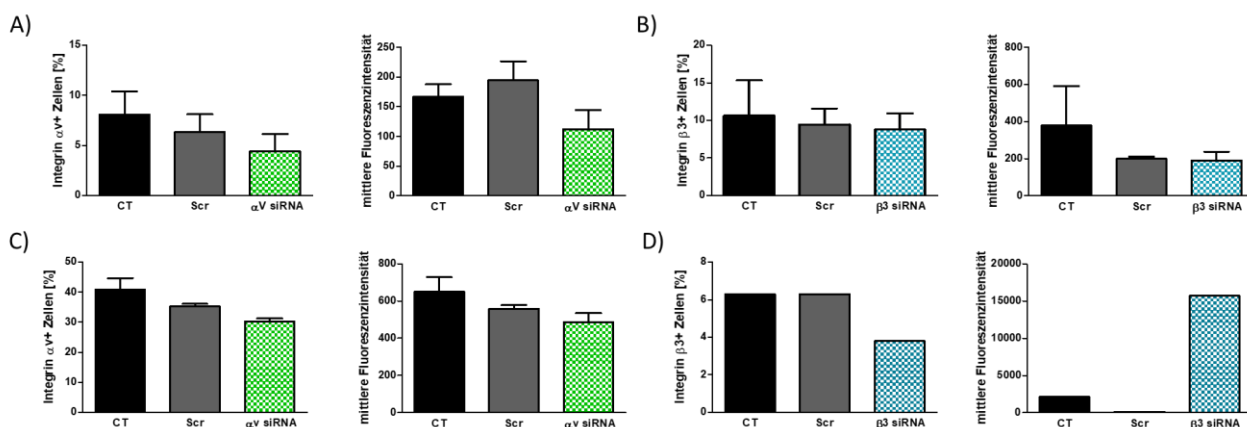


**Abbildung 11: Extrazelluläre Matrixproteine beeinflussen die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in Osteoblasten.** **(A)** Durch die 24-stündige Kultivierung auf den Matrixproteinen Fibronectin, Laminin, Kollagen I und IV, sowie VCAM-I und Tenascin C kam es in den Osteoblasten zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu Poly-L-Lysin (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 17/21/21/21/17/13/13/13/8$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). **(B)** Stimuliert man die Osteoblasten mit den entsprechenden Matrixproteinen für 10 h, wurde die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression durch die Zugabe von Laminin und Tenascin C reduziert (One-way ANOVA: \*\*  $p < 0,01$ ;  $n = 8$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Es ist bekannt, dass Tenascin C von den Osteoblasten sekretiert wird und dessen Differenzierung und Mineralisierung fördert (Li et al., 2016; Mackie and Ramsey, 1996). Somit weist die Anwesenheit von Tenascin C und die Reduzierung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den MSCs und Osteoblast bei der Tenascin C-Stimulation daraufhin, dass es inhibierend auf die Adipogenese wirkt. Betrachtet man nun die aus Abbildung 9 veränderten Integrine und die passenden Matrixliganden von Tenascin C (Tabelle 12), gibt es eine Übereinstimmung mit dem Integrin  $\alpha\beta 3$ , welches in den folgenden Experimenten weiter analysiert wurde.

### 3.1.4 Reduzierung der Integrine $\alpha\text{v}$ und $\beta 3$ mittels siRNA

Um weitere Aussagen über den Einfluss der Integrine auf die PPAR $\gamma$ -Expression treffen zu können und die Ergebnisse der Adhäsionsexperimente zu bestätigen, wurde in MSCs und primären Osteoblasten das Integrin  $\alpha\text{v}$  und das Integrin  $\beta 3$  mittels siRNA vermindert. Die siRNA wurde mittels Transfektion in die Zellen eingebracht und die erfolgreiche Reduktion der Integrine nach 24 h auf Proteinebene mit Hilfe des Durchflusszytometers überprüft. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit dem Transfektions-Reagenz (CT) behandelt wurden oder die mit einer Kontroll-siRNA (Scr; engl.: scrambled) transfiziert wurden.



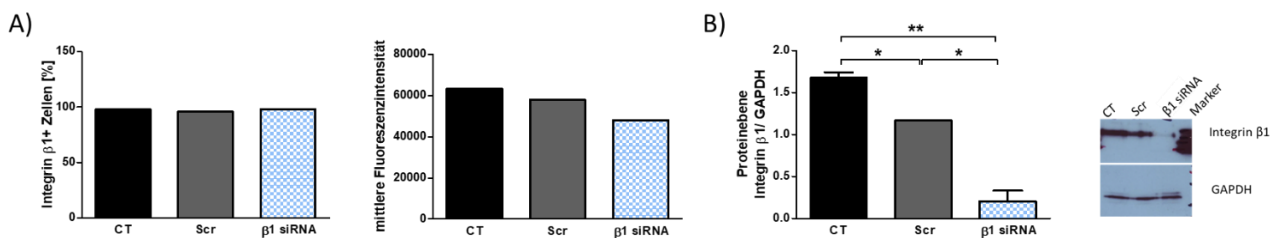
**Abbildung 12: Die Effizienz der  $\alpha\text{v}$  und  $\beta 3$  siRNA in MSCs und Osteoblasten**

Die durchflusszytometrische Untersuchungen der siRNA-Transfektion zeigten in den MSCs **(A)** eine nicht signifikante Verminderung des Integrins  $\alpha\text{v}$  an der Zelloberfläche im Vergleich zu CT und mit Scr siRNA transfizierten Zellen bei der prozentualen Anzahl positiver Zellen und bei der sogenannten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI, engl.: mean fluorescence intensity) ( $n = 3$ ). **(B)** Kein Unterschied war bei der Transfektion der siRNA gegen das Integrin  $\beta 3$  in den MSCs zu erkennen ( $n = 4$ ). **(C-D)** Die Integrin-Expression von  $\alpha\text{v}$  ( $n = 5$ ) und  $\beta 3$  ( $n = 1$ ) war in den primären Osteoblasten ebenfalls nicht signifikant reduziert.

Die Reduktion der Integrin-Expression mit Hilfe der siRNAs blieb erfolglos, da die Überprüfung im Durchflusszytometer kaum eine Verminderung des jeweiligen Integrins im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Scr) zeigte. Bei der Transfektion der MSCs mittels des Transfektionsreagenz RNAiMax kam es nur zu einer schwachen Runterregulierung des Integrins  $\alpha\text{v}$  oder  $\beta 3$  im Vergleich zu den Kontrollen CT oder mit Scr siRNA transfizierten Zellen (Abbildung 12A und B). Den gleichen Effekt zeigten die primären Osteoblasten, welche für 24 h mit Hilfe des Transfektionsreagenz TurboFect transfiziert wurden (Abbildung 12C-D). Es wurde für beide Zelltypen versucht weitere Integrine, wie beispielsweise  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 1$ , mittels siRNA zu reduzieren, jedoch ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass entweder die Transfektion der siRNAs in diesen

Zelltypen nicht funktioniert hat oder der Nachweis mit dem Durchflusszytometer nicht geeignet ist, um eine starke Verminderung in den Zellen erkennen zu können.

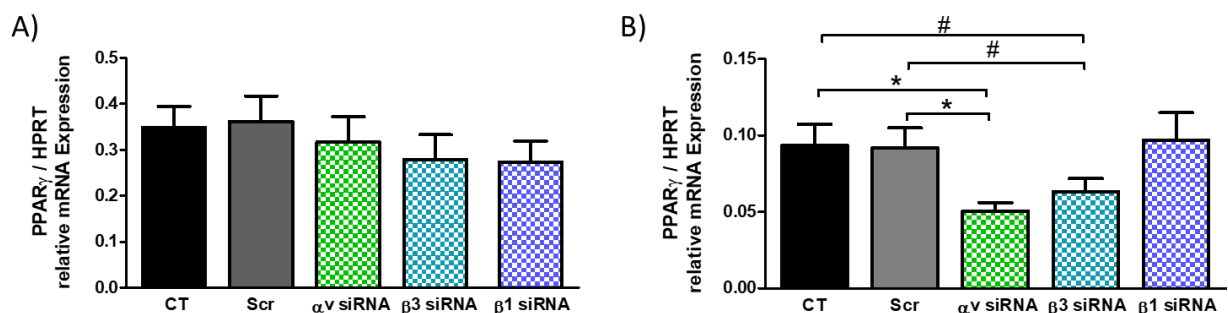
Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde versucht das Integrin  $\beta 1$  in Osteoblasten, welches zu ca. 95 % auf den Osteoblasten produziert wird, mit Hilfe von siRNA zu reduzieren. Die Anwesenheit des Integrins  $\beta 1$  wurde im Durchflusszytometer und mittels Western Blot untersucht. Dabei zeigte nur der Western Blot, dass es zu einer Verminderung des Integrins  $\beta 1$  kam (Abbildung 13A-B). Dies bestätigt, dass auf Proteinebene die Durchflusszytometrie nicht die beste Methode für den Nachweis der siRNA-vermittelten Integrin-Reduzierung ist.



### Abbildung 13: Überprüfung der Effizienz der $\beta 1$ siRNA in Osteoblasten

Die Überprüfung der siRNA-Transfektion zeigte in **(A)** bei der Durchflusszytometrie in Osteoblasten keine verminderte Anwesenheit des  $\beta 1$  Integrins an der Zelloberfläche (n = 1). **(B)** Jedoch konnte in der Western Blot Analysen eine Verminderung des Integrins  $\beta 1$  in mit  $\beta 1$  siRNA transfizierten Osteoblasten nachgewiesen werden (n = 2; \* p<0,05, \*\* p<0,01). Alle Western Blot Proben wurden zu GAPDH normalisiert.

Parallel zu der Transfektionsüberprüfung wurden RNA Proben von MSCs und Osteoblasten, welche mit der  $\alpha v$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 1$  siRNA transfiziert wurden, entnommen und die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  untersucht. In den MSCs waren keine Unterschiede bei der mRNA-Expression des Adipozytenmarkers für die  $\alpha v$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 1$  siRNA Behandlung zu erkennen (Abbildung 14A). Die Transfektion der primären Osteoblasten führte jedoch zu einer signifikanten Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression, wenn die  $\alpha v$  siRNA eingebracht wurde. Bei der Einbringung der  $\beta 3$  siRNA schien die PPAR $\gamma$ -Expression vermindert zu sein, war jedoch nicht signifikant verändert (p=0,0932; Abbildung 14B). Die siRNA-vermittelte verminderte Expression des  $\beta 1$  Integrins zeigte keinen Effekt auf die Expression des Adipozytenmarker.



### Abbildung 14: Beeinflussung der PPAR $\gamma$ mRNA-Expression durch die spezifische siRNA-Transfektion

**(A)** Die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  wurde durch die Transfektion der siRNA gegen  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  in den MSCs nicht verändert (CT/Scr/ $\alpha v$ / $\beta 3$ / $\beta 1$ : n = 23/24/20/20/20). **(B)** Eine Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression zeigten die primären Osteoblasten, welche mit der  $\alpha v$  siRNA transfiziert wurden (CT/Scr/ $\alpha v$ : n = 6/6/6, \* p<0,05; CT/Scr/ $\beta 3$ : n = 6/6/6, # p=0,0941, p=0,0932). Durch die spezifische  $\beta 1$  siRNA Transfektion wurde PPAR $\gamma$  nicht verändert (CT/Scr/ $\beta 1$ : n = 6/6/6). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

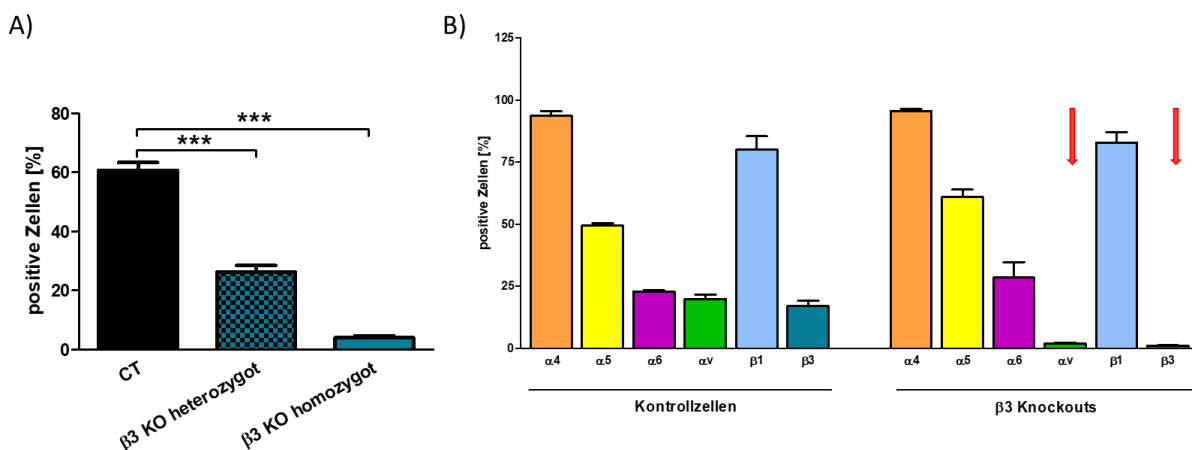
Aufgrund der Adhäsionsexperimente in den MSCs, welche zeigten, dass die Tenascin C-Stimulation inhibierend auf die Adipogenese wirkte, war zu erwarten, dass in Abwesenheit der  $\alpha v$  und  $\beta 3$  Integrine die mRNA-Expression des Adipozytenmarkers PPAR $\gamma$  ansteigt. Dies war jedoch weder bei

den MSCs noch bei den WtOB der Fall. Zusammengefasst, zeigte die Transfektion mit den siRNAs gegen die Integrine  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_1$  in der Durchflusszytometrie keine nachweisbaren Effekte und sollte auf einem anderen Weg, zum Beispiel mit der Immunoblot-Methode quantifiziert werden.

### 3.1.5 $\beta_3$ Knockout-Mäuse

Da die Inhibierung mit siRNAs *in vitro* keinen verlässlichen Effekt zeigte, wurden  $\beta_3$  Knockout-Mäuse (KO) herangezogen und die PPAR $\gamma$ -Expression *ex vivo* charakterisiert. In Vorarbeiten, die von Carla Sens durchgeführt wurden (Sens, 2016), konnte in diesen Knockouts bereits eine Verminderung der kortikalen Knochendichte in drei Wochen alten Mäusen und eine verschlechterte Mineralisierung der  $\beta_3$  KO Osteoblasten beobachtet werden. Damit erwies sich dieses Modell für die Untersuchungen der Integrine und deren Rolle bei der Osteoblasten- und Adipozytendifferenzierung als geeignet, da es beschrieben wurde, dass im Allgemeinen die Knochendichte im Alter vermindert und die Anzahl der Adipozyten meist erhöht ist.

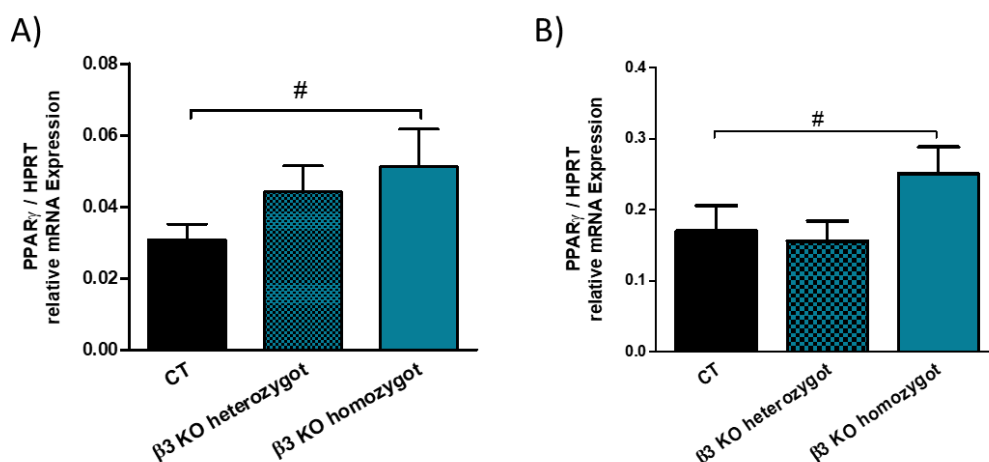
Als erstes wurde mittels Durchflusszytometrie die Ausschaltung des  $\beta_3$  Integrins im Blut und im Knochenmark validiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl im Blut (Abbildung 15A) als auch im Knochenmark das Integrin  $\beta_3$  stark reduziert war (Abbildung 15B). Zusätzlich zeigte das Integrinprofil, der aus dem Knochenmark isolierten MSCs der  $\beta_3$  KO Mäusen, im Vergleich zu den CTs nicht nur das Integrin  $\beta_3$  vermindert war, sondern auch das Integrin  $\alpha_v$  (rote Pfeile, Abbildung 15B).



#### Abbildung 15: Integrinprofil der MSCs aus $\beta_3$ KO-Mäusen

**(A)** Die durchflusszytometrische Bestätigung des Integrin  $\beta_3$  Knockouts im Blut (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/ $\beta_3$  heterozygot/ $\beta_3$  homozygot:  $n = 12/12/11$ ). **(B)** Das Integrinprofil der CT und KO Mäuse zeigte eine Verminderung der  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  Integrin-Expression an der Zelloberfläche der MSCs (rote Pfeile; CT/KO:  $n = 5/4$ ).

Anschließend wurde von den MSCs und Osteoblasten der CT und KO Mäuse die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  analysiert. Die frisch isolierten MSCs (Abbildung 16A) und primären Osteoblasten (Abbildung 16B) zeigten einen Trend der Erhöhung von PPAR $\gamma$  zwischen den CTs und den homozygoten  $\beta_3$  KOs (A:  $p = 0,0679$  und B:  $p = 0,0932$ ).



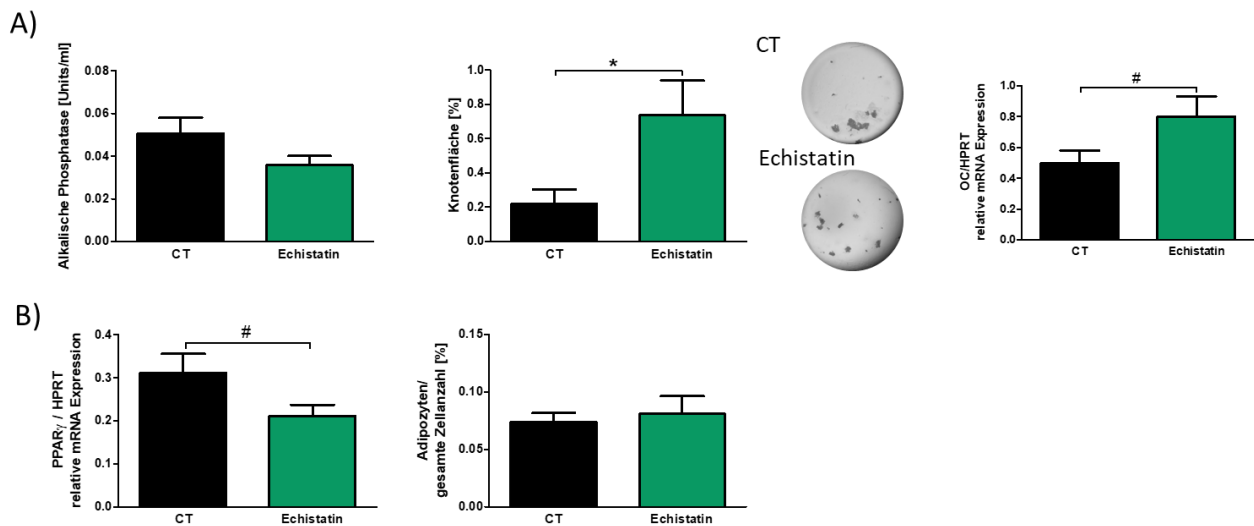
### Abbildung 16: Der Einfluss des Integrin $\beta 3$ Knockouts auf die PPAR $\gamma$ -Expression

(A-B) Die relative mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  zeigte in den MSCs (A) und Osteoblasten (B) einen Trend zur Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den KOs (MSC: CT/ $\beta 3$  heterozygot/ $\beta 3$  homozygot: n = 12/13/10, # p=0,0679; OB: CT/ $\beta 3$  heterozygot/ $\beta 3$  homozygot: n = 8/6/5, # p=0,0932). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Damit zeigen die Daten, dass durch einen Knockout des  $\beta 3$  Integrins das Integrin  $\alpha v$  ebenfalls in den MSCs vermindert wurde und die relative mRNA-Expression des Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  in den MSCs und Osteoblasten tendenziell erhöht wird. Dies lässt vermuten, dass in Abwesenheit von  $\alpha v\beta 3$  PPAR $\gamma$  aktiviert und die adipogenen Differenzierung *in vitro* gefördert wird.

### 3.1.6 Echistatin stimuliert die Osteogenese und inhibiert die Adipogenese

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass das Disintegrin Echistatin nicht inhibierend, sondern stimulierend auf die Differenzierung der Osteoblasten wirkte. Des Weiteren wurden durch die Bindung von Echistatin an das Integrin  $\alpha v\beta 3$  die Moleküle FAK, AKT und ERK stärker phosphoryliert und der Integrin-Signalweg somit stimuliert (Sens et al., 2017a). Anhand dieser Ergebnisse wurden primäre Osteoblasten in Anwesenheit von 0,27 nM Echistatin für 10-14 Tage zu Osteoblasten differenziert und zusätzlich die Anzahl der Zellen, welche Lipid-Tropfen beinhalten, als Präadipozyten quantifiziert.



**Abbildung 17: Der Einfluss von Echistatin auf die osteogene und adipogene Differenzierung von Osteoblasten.** (A) Die osteogene Differenzierung von Osteoblasten in Anwesenheit von Echistatin führte zu einer erhöhten Knotenbildung im Vergleich zu Kontrollzellen (CT) (CT/Echistatin: n = 8/8; \* p<0,05) und zeigte einen Trend zur Erhöhung der relativen mRNA-Expression von Osteokalzin (CT/Echistatin: n = 6/6, # p=0,0865). (B) Im Gegensatz hierzu wurde die PPAR $\gamma$ -Expression bei der Differenzierung mit Echistatin reduziert (CT/Echistatin: n = 6/6; # p=0,0698) und die Adipozytenanzahl zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den CTs (CT/Echistatin: n = 6/6). Alle qPCR Proben wurden zu HPRT normalisiert.

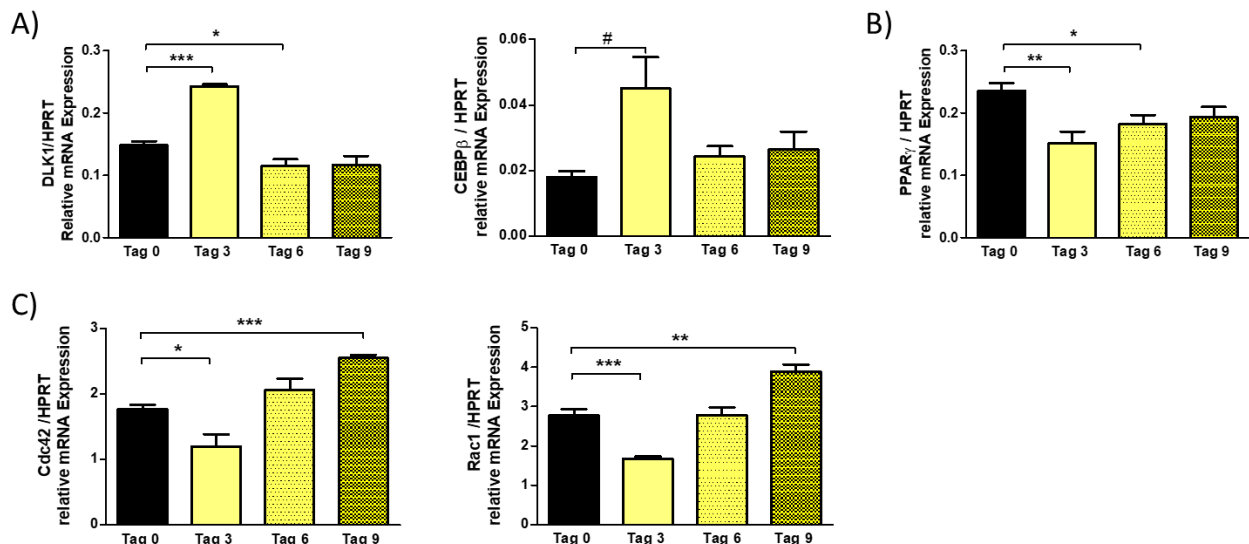
Die Anwesenheit von Echistatin führte, wie erwartet, zu einer verstärkten Knotenbildung und einem Anstieg der Osteokalzin mRNA-Expression in osteogen differenzierten Osteoblasten (Abbildung 17A). Im Gegensatz hierzu reduzierte sich die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ . Die Anzahl der Adipozyten blieb in den Osteoblastenkulturen mit Echistatin unbeeinflusst im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 17B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Echistatin und somit auch das Integrin  $\alpha\beta 3$  vermutlich eine Rolle bei der Differenzierung der MSCs spielen und die Adipogenese auf diesem Wege möglicherweise verhindert wird.

### 3.1.7 Charakterisierung der Adipozytenmarker in Osteoblasten

PPAR $\gamma$  wird während der Adipogenese aktiviert (Gregoire et al., 1998). Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, wie sich die Adipozytenmarker DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  sowie die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei Osteoblasten unter den Bedingungen einer osteogenen oder adipogenen Differenzierung verhalten. Die beiden RhoGTPasen sind Teil des Integrin-Signalweges und wichtige Regulatoren der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und damit auch an der Formgebung der Zellen beteiligt, welche zur Entscheidung des Zellschicksals beiträgt. Dabei wurde zu Beginn untersucht, wie sich der Verlauf der mRNA-Expression der adipogenen Marker in Osteoblasten während der adipogenen Differenzierung verändert (Abbildung 18). Um eine adipogene Differenzierung zu erzwingen wurde eine bestimmte Abfolge von Medienzusammensetzungen verwendet. Tag 0 beschreibt den Ausgangswert ohne Substanzzugaben und dient als Kontrollwert. An Tag 1 und 3 wurden IBMX, Insulin und Dexamethason hinzugegeben. An Tag 5 und 7 nur noch Insulin und ab Tag 9 wurde das Differenzierungsmedium durch das Standardmedium für Osteoblasten ohne Zusätze ausgetauscht (siehe 2.3.5).





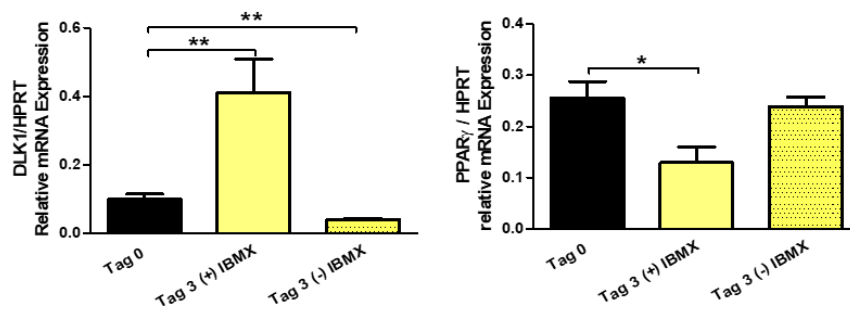
**Abbildung 18: Charakterisierung der Adipozytenmarker in Osteoblasten unter adipogenen Bedingungen auf mRNA-Ebene. (A)** Die Differenzierung der primären Osteoblasten zu Adipozyten zeigte, dass an Tag 3 die relative mRNA-Expression der frühen Adipozytenmarker DLK1 (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ) und C/EBP $\beta$  (One-way-ANOVA:  $p = 0,0726$ ;  $n = 4$ , #  $p = 0,0800$ ) erhöht waren und **(B)** die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  zu Beginn reduziert war (One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) und im Verlauf der Differenzierung stetig anstieg. **(C)** Die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 waren in der Initiationsphase ebenfalls vermindert und stiegen mit Abwesenheit der adipogenen Substanzen wieder an (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Nach Tag 3 ist in den Osteoblasten der frühe Adipozytenmarker DLK1, sowie die im Signalweg folgende C/EBP $\beta$  mRNA-Expression erhöht (Abbildung 18A). Die mRNA-Expression des Hauptinitiators der Adipozytendifferenzierung, PPAR $\gamma$ , stieg nach einem anfänglichen Abfall über die neun Tage stetig an. Insulin erhöht im Normalfall die PPAR $\gamma$ -Expression (Rieusset et al., 1999), da Insulin schon ab Tag 1 gegeben wurde, aber mit weiteren Substanzen kombiniert wurde, stieg die PPAR $\gamma$ -mRNA Expression vermutlich nur langsam an (Abbildung 18B). Die mRNA-Expression der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 war zu Beginn der Initiationsphase der Adipogenese reduziert und erhöhten sich wieder, sobald keine zusätzlichen adipogenen Substanzen mehr hinzugefügt wurden (Abbildung 18C).

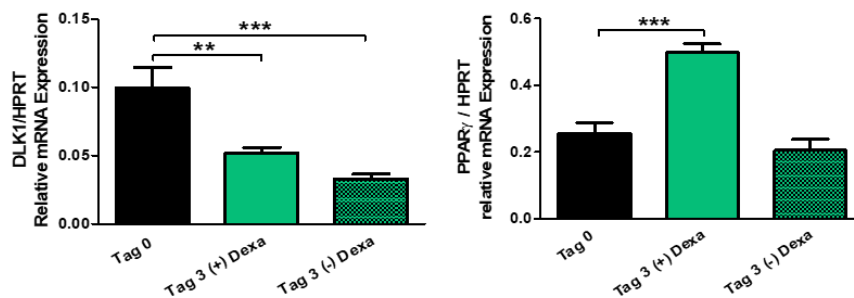
Als nächstes wurden einzelne Substanzen der Differenzierungsmedien in die Osteoblasten-Kultur hinzugegeben und nach drei Tagen die mRNA-Expression der bereits untersuchten Adipozytenmarker analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass Dexamethason und IBMX gegensätzliche Effekte auf die Differenzierungsmarker der Adipogenese haben. Die Zugabe von IBMX erhöht zu Beginn DLK1 und reduziert PPAR $\gamma$  (Abbildung 19A). Wohingegen die Anwesenheit von Dexamethason DLK1 vermindert und PPAR $\gamma$  nach drei Tagen erhöht wurde (Abbildung 19B).



A)



B)



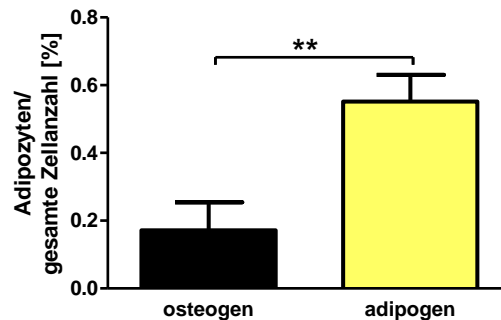
### Abbildung 19: Adipozytenmarker reagieren auf die Zugabe von IBMX und Dexamethason

**(A)** Durch die Zugabe von IBMX wurde die DLK1 mRNA-Expression initiiert und PPAR $\gamma$  reduziert (One-way ANOVA: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 6$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). **(B)** Durch die Zugabe von Dexamethason, welches für die Osteoblastendifferenzierung notwendig ist, wurde der frühe Adipozytenmarker DLK1 vermindert, jedoch die PPAR $\gamma$ -Expression mit Dexamethason erhöht (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 6$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Zugabe von adipogenen Substanzen wie IBMX die Expression von frühen Adipozytenmarker initiieren und zu Beginn PPAR $\gamma$  inhibiert bzw. zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert wird. Dabei ist zu beachten, dass die Zugabe von Dexamethason, welches für die Osteoblastendifferenzierung relevant ist, und mit IBMX im Adipozytenmedium eingesetzt wurde, die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  an Tag 3 erhöht. Die mRNA-Expression der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 während der Adipozytendifferenzierung lassen vermuten, dass diese beiden Moleküle bei der Adipogenese eine Rolle spielen.

### 3.1.8 Die Differenzierung von Osteoblasten zu Adipozyten

Zur Überprüfung, ob primäre Osteoblasten zu Adipozyten differenzieren können, wurden primäre Osteoblasten aus der Calvaria isoliert, konfluent ausgesät und osteogen oder adipogen differenziert. Anschließend wurde die Anzahl der Adipozyten nach ca. 9-12 Tagen ausgezählt (Abbildung 20).



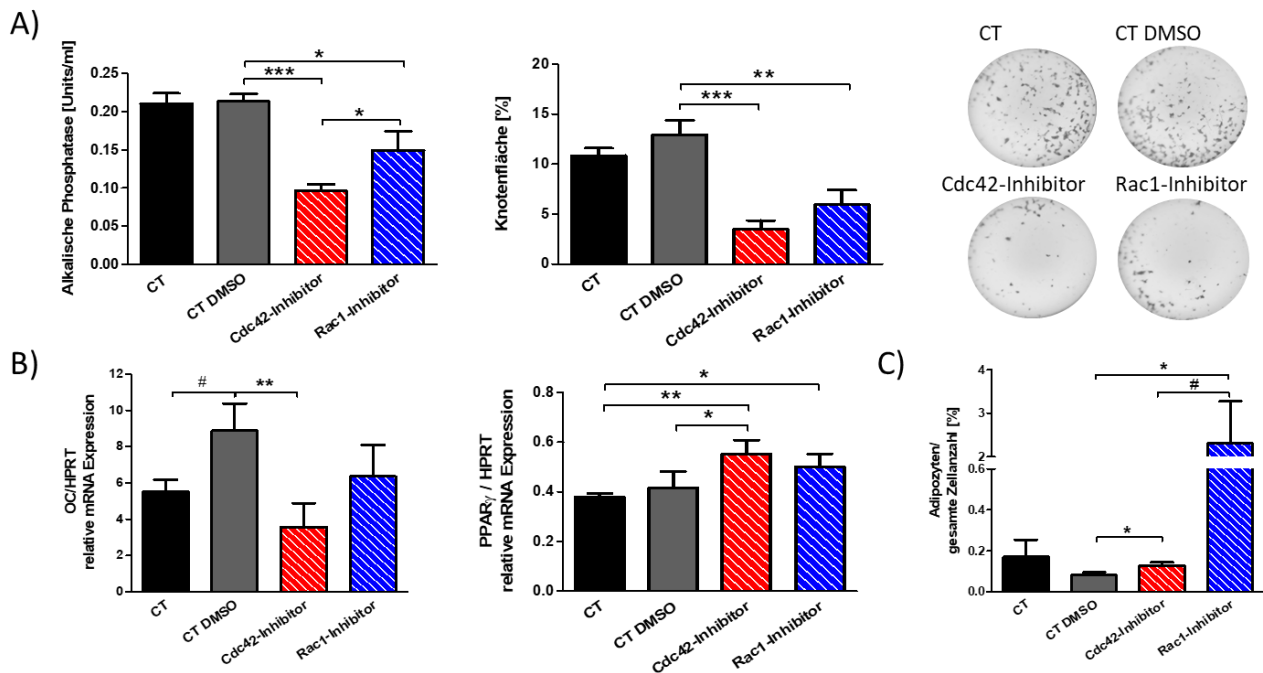
#### Abbildung 20: Differenzierung von Osteoblasten zu Adipozyten

Die Kultivierung von Osteoblasten unter osteogenen und adipogenen Bedingungen zeigte, dass unter osteogenen Bedingungen auch eine Differenzierung zu Adipozyten stattfindet, die allerdings unter adipogenen Kulturbedingungen anstieg (CT-OB/CT-Ac: n = 9/8, \*\* p<0,01).

Die gesamte Anzahl der Adipozyten stieg unter adipogenen Differenzierungsbedingungen an und zeigte, dass es möglich ist Zellen, die klassisch als Osteoblasten und Präosteoblasten verwendet werden, zu Lipid-haltigen Zellen (möglicherweise Adipozyten) zu differenzieren.

### 3.1.9 Die Inhibition von Cdc42 und Rac1 stimulieren die Adipogenese

Da die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 integrin-abhängige Effektoren sind und wie in 3.1.7 gezeigt vermutlich eine Rolle bei der Adipogenese spielen können, wurden diese beiden Moleküle mit chemischen Inhibitoren in Osteoblasten ausgeschaltet. Hierfür wurden WtOB in Anwesenheit der beiden Inhibitoren ML141 (Cdc42) und EHT1864 (Rac1) zu Osteoblasten differenziert und anschließend die Aktivität der alkalischen Phosphatase, die Knotenbildung und die Anzahl der Lipid-haltigen Zellen (ab hier als Adipozyten bezeichnet), sowie die Expression des Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  analysiert. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde als Negativkontrolle bei der Differenzierung DMSO hinzugegeben.

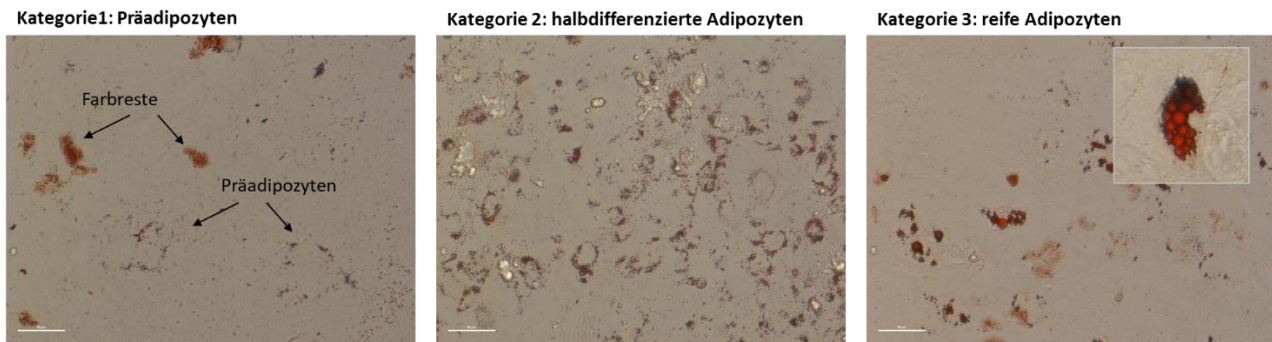


### Abbildung 21: Inhibition von Cdc42 und Rac1 fördert die Adipogenese

**(A)** Durch die Differenzierung der WtOB in Anwesenheit von Cdc42 und Rac1-Inhibitoren war die Aktivität der alkalischen Phosphatase (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/Cdc42/Rac1:  $n = 19/19/24$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ) und die Knotenbildung vermindert im Vergleich zu den CTs (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/Cdc42/Rac1:  $n = 10/15/15$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). **(B)** Die Inhibition führte auch zu einer Reduzierung der Osteokalzin mRNA (One-way ANOVA:  $p = 0,0749$ ; CT/DMSO:  $n = 9/9$ , #  $p = 0,0582$ ; DMSO/Cdc42:  $n = 9/9$ , \*\*  $p < 0,01$ ) und zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ ; CT/DMSO/Cdc42:  $n = 9/9/8$ ; CT/Rac1:  $n = 9/9$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. **(C)** Mittels der Oil Red O Färbung konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Adipozyten im Verhältnis zur gesamten Zellanzahl pro Vertiefung ebenfalls signifikant erhöht war (One-way ANOVA: \*\*  $p < 0,01$ ; DMSO/Cdc42/Rac1:  $n = 9/8/6$ , \*  $p < 0,05$ , #  $p = 0,0736$ ).

Durch die Zugabe der beiden Cdc42 und Rac1-Inhibitoren während der osteogenen Differenzierung, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zu den CT DMSO Kontrollen reduziert, wobei die Inhibition von Cdc42 einen stärkeren Effekt auf die Enzymaktivität zeigte als der Rac1 Inhibitor. Des Weiteren wurde die Mineralisierung der Osteoblasten durch die Anwesenheit der Inhibitoren, sowie die mRNA-Expression des Osteoblastenmarker Osteokalzin beeinträchtigt (Abbildung 21A/B). Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe des Cdc42-Inhibitors während der Differenzierung zu einem Anstieg der relativen mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ . Bei der Auszählung der Adipozyten kam es ebenfalls im Verhältnis zu der gesamten Zellanzahl pro Vertiefung der Lochplatte zu einem Anstieg der Adipozytenanzahl bei der Anwesenheit von Cdc42- und Rac1-Inhibitoren. Jedoch zeigte der Rac1-Inhibitor hier einen stärkeren Effekt auf die Adipogenese als der Cdc42-Inhibitor (Abbildung 21C).

Die Abbildung 22 soll zur Veranschaulichung dienen, wie die Anzahl der Adipozyten bestimmt und quantifiziert wurde. Hierfür wurden die Adipozyten in drei Kategorien eingeteilt und optisch mit dem Mikroskop pro Vertiefung ausgezählt. Kategorie 1 sind die Präadipozyten, diese besitzen nur sehr kleine rote angefärbte Lipidtropfen und sind somit die Vorläuferzellen, nicht zu verwechseln mit den Farbreifen. Kategorie 2 entspricht den schon fast ausdifferenzierten Adipozyten und sind ein Zwischenstadium zu Kategorie 3 den reifen Adipozyten. Alle zusammen entsprechen der gesamten Anzahl der Adipozyten pro Vertiefung.



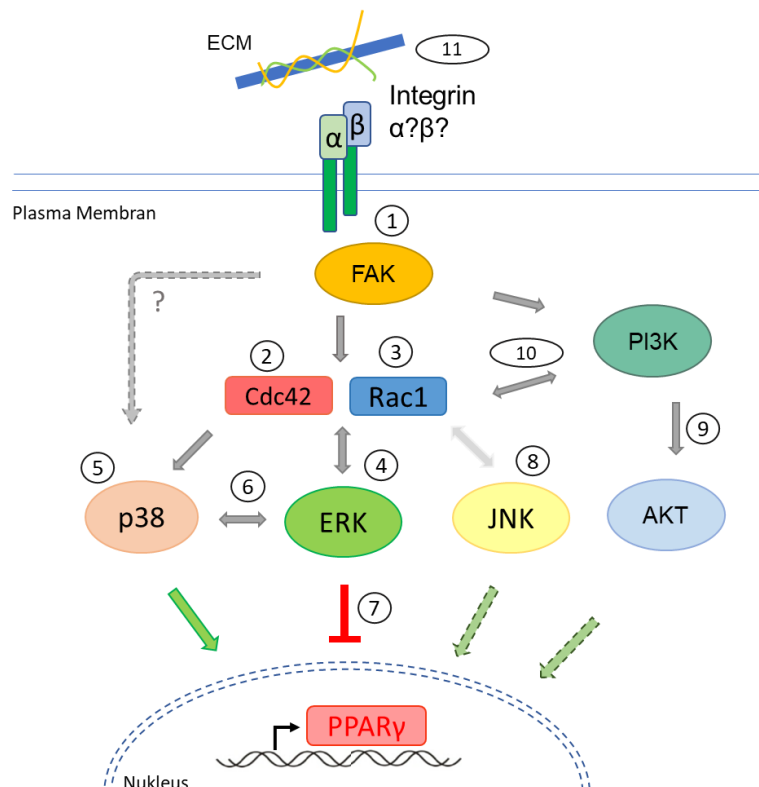
### Abbildung 22: Kategorisierung der Adipozyten

Kategorie 1 zeigt die Präadipozyten mit den kleinen Lipidtropfen und sind nicht mit den Farbüberresten in den Kulturen zu verwechseln. Kategorie 2 stellt die halbdifferenzierten Adipozyten dar, die ein Zwischenstadium zu den reifen Adipozyten in Kategorie 3 sind. Der Maßstab entspricht jeweils 50 µm.

Somit zeigen die Daten, dass die Inhibition einer der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 während der Differenzierung zu einer Verminderung der Mineralisierung der Osteoblasten führt und die Adipogenese durch die Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression gefördert wurde. Somit lässt dies vermuten, dass die Anwesenheit der beiden RhoGTPasen notwendig ist, damit die Adipogenese inaktiv bleibt, oder dass diese beiden Moleküle für die Osteoblastendifferenzierung benötigt werden und in der Abwesenheit von einem der beiden RhoGTPasen keine Osteoblastendifferenzierung bzw. eine sogenannte Fehldifferenzierung zu Adipozyten, voranschreitet.

### 3.1.10 Welche Moleküle sind an dem Signalweg zur Aktivierung bzw. Inhibierung der PPAR $\gamma$ mRNA-Expression beteiligt?

Einige Studien konnten bereits zeigen, dass die Integrine und die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 an dem FAK, PI3K/AKT und MAPK-Signalweg im Zusammenhang mit der Osteoblastendifferenzierung beteiligt sind (Legate et al., 2009; Marie et al., 2014; Yamamoto et al., 2015). Um zu überprüfen, welche Moleküle einen Einfluss auf die Differenzierung der MSCs haben und somit auch entscheiden, welcher Differenzierungsweg eingeschlagen wird, wurde mit Hilfe verschiedener Literaturangaben ein Signalweg erstellt (Abbildung 23) und die wichtigsten Moleküle, welche für die Adipogenese relevant sein könnten, gezielt inhibiert (Abbildung 24).

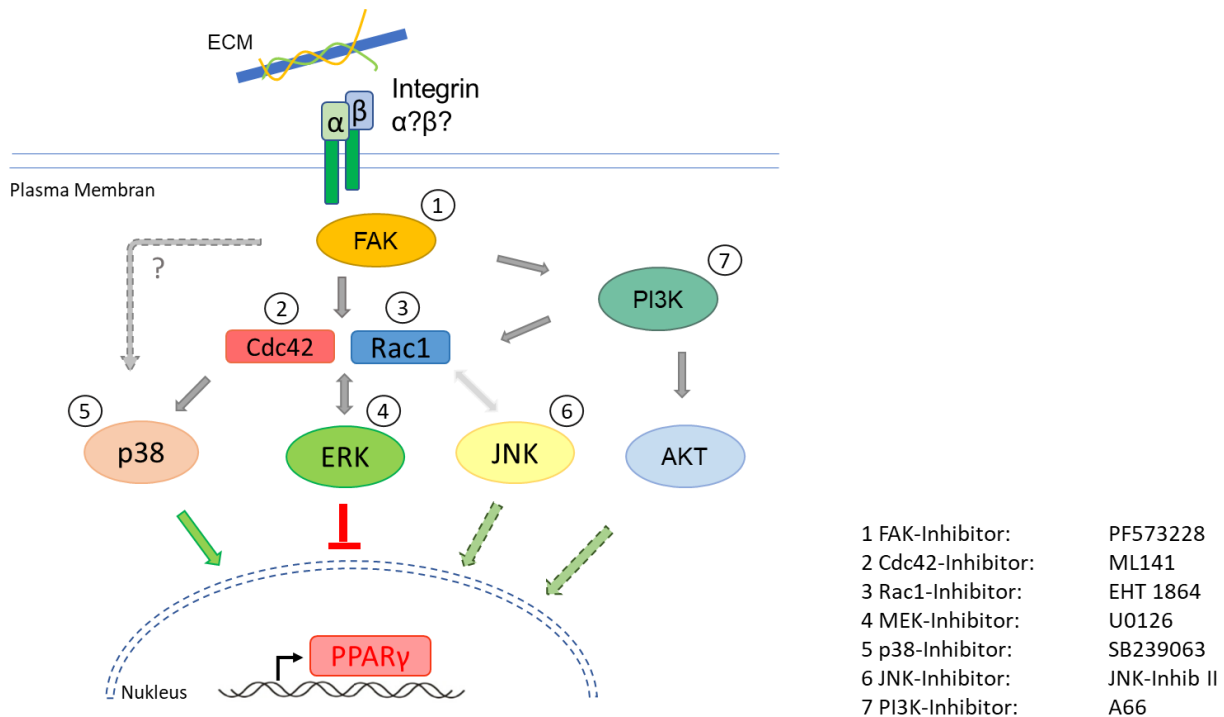


**Abbildung 23: Darstellung des Signalweges, welcher PPAR $\gamma$  aktiviert oder inhibiert**

Das Schema zeigt einen möglichen Signalweg zur Aktivierung bzw. Inhibierung der PPAR $\gamma$ -Expression. D.h. ein Integrin aktiviert FAK und führt das Signal weiter entweder über PI3K/AKT oder die MAPK-Kaskade und inhibiert oder stimuliert die Adipogenese. Referenzen: **(1)** Ichida M. et al. 2011; Hanna & El-Sibai 2013; Marie PJ. et al. 2014; **(2-3)** Schwartz M. 2004; Liu J. et al. 2005; Nakajima A. et al. 2008; Ichida M. et al. 2011; Shah PP. et al. 2012; Louis F. et al. 2015; **(4)** Prusty D. et al. 2002; Bost F. et al. 2005; Rosen & MacDougald 2006; Gehart H. et al. 2010; Marie PJ. et al. 2014; Dong X. et al. 2014; **(5)** Rosen & Spiegelman 2000; Bost F. et al. 2005; Rosen & MacDougald 2006; Muruganandan S. et al. 2009; Sonowal H. et al. 2013; Dong X. et al. 2014; **(6)** Bost F. et al. 2005; Rosen & MacDougald 2006; Volloch & Olsen 2013; Dong X. et al. 2014; **(7)** Bost F. et al. 2005; Burgermeister & Seger 2008; Wang Y. et al. 2010; **(8)** Rosen & Spiegelman 2000; Bost F. et al. 2005; James AW. 2013; **(9)** Yavropoulou & Yovos 2007; Kim SP. et al. 2010; Marie PJ. et al. 2014; **(10)** Yavropoulou & Yovos 2007; Chen L. et al. 2006; Hanna & El-Sibai 2013; **(11)** Gregoire FM. et al. 1998; Liu J. et al. 2005; Marie PJ. et al. 2014; **(1-11)** Cell Signaling Technology - www.cellsignal.com – MAPK/ERK und SAPK/JNK Signalweg.

Für die Runterregulation der Moleküle des Signalweges wurden gezielt spezielle Inhibitoren eingesetzt (Nummerierung, Abbildung 24) und die Beeinflussung der Adipogenese genauer untersucht. Für das Experiment wurden MSCs aus dem Knochenmark und primäre Osteoblasten aus der Calvaria isoliert und über Nacht in 96-Lochplatten kultiviert und am nächsten Tag für 6 h ohne FCS mit den Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde von diesen Zellen RNA Proben

entnommen und die relative mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  bestimmt. Da auch hier die Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde als Negativkontrolle DMSO hinzugegeben und die Proben mit den Inhibitoren zu CT DMSO verglichen.



#### Abbildung 24: Schematische Darstellung der verwendeten Inhibitoren im Signalweg

Zur Untersuchung des adipogenen Signalweges wurden primäre MSCs und Osteoblasten mit sieben verschiedenen Inhibitoren, welche rechts in der Abbildung dargestellt sind, behandelt. Anschließend wurde die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  analysiert.

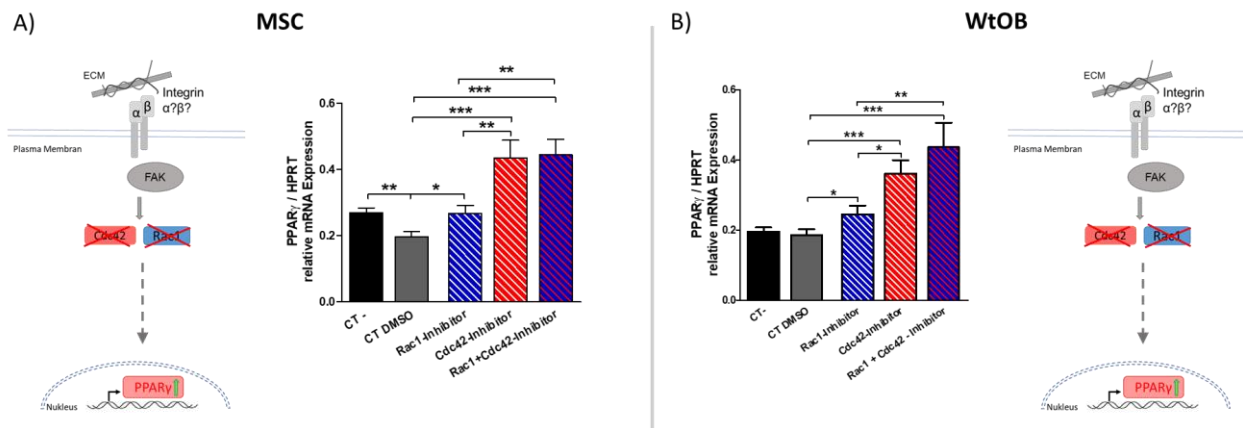
#### *Integrine sind wegweisend für die MSC Differenzierung*

Um herauszufinden, ob die Integrin-Aktivierung für die Adipogenese benötigt wird, wurde eines der ersten Signalmoleküle, FAK, inhibiert. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 zeigten, dass es bei einer Inhibition zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression kam (Abbildung 8A) und die Integrine eine Rolle bei der Differenzierung der MSCs spielen könnten. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei einer Runterregulierung von FAK vermutlich alle nachfolgenden Moleküle des Signalweges beeinträchtigt und somit alle durch FAK regulierten Gene reduziert werden. Da FAK jedoch von den Integrinen stimuliert werden kann, zeigen die Daten, dass Integrine maßgebend sind, für den Weg, den die MSCs für ihre Differenzierung einschlagen können.

#### *Die Abwesenheit der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 fördert die Adipogenese*

Die beiden RhoGTPasen spielen eine Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung und eine kurzzeitige Inhibition dieser beiden Moleküle führte zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Expression in den primären MSCs und Osteoblasten (Abbildung 25A-B). Dies bestätigte die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.9.





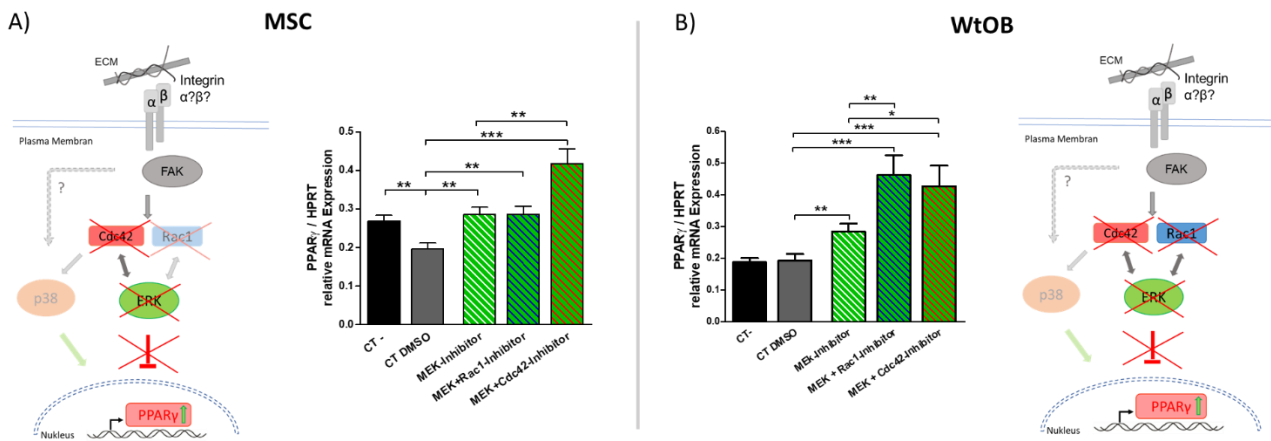
### Abbildung 25: Inhibition von Cdc42 und Rac1 beeinflusst die Adipogenese

**(A)** Durch die Behandlung der MSCs mit dem Cdc42- und Rac1-Inhibitoren kam es zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA im Vergleich zu CT DMSO (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/Rac1/Cdc42/Rac1+Cdc42:  $n = 19/23/23/20$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ ). Die Cdc42-Inhibition zeigte eine stärkere Hochregulation als Rac1 (\*\*  $p < 0,01$ ). DMSO führte im Vergleich zu CT wiederum zu einer Reduzierung von PPAR $\gamma$  (CT/DMSO:  $n = 22/19$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). **(B)** Die Inhibition der beiden RhoGTPasen führte in den primären Osteoblasten ebenfalls zu einer Erhöhung der Expression von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu CT DMSO (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/Rac1/Cdc42/Rac1+Cdc42:  $n = 55/56/55/25$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ ). DMSO schien keinen Einfluss auf die Osteoblasten zu haben im Vergleich zu den MSCs. Die Inhibition von Cdc42 zeigte auch im Vergleich zu Rac1 in den WtOB eine höhere Expressionsrate von PPAR $\gamma$  (\*  $p < 0,05$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Die schematischen Darstellungen links und rechts geben einen Überblick über die mögliche Abfolge des Signalweges während der Modulation von Cdc42 und Rac1.

Insbesondere fiel auf, dass die Inhibition von Cdc42 und die Kombination der beiden Inhibitoren einen stärkeren Effekt auf die PPAR $\gamma$ -Expression hatten als der Rac1-Inhibitor in den MSCs und WtOB. Dies könnte an der Effektivität der Inhibitoren liegen oder daran, dass die Anwesenheit von Cdc42 für die Inaktivierung der Adipogenese wichtiger ist als Rac1. Des Weiteren hatte DMSO einen negativen Einfluss auf die Adipogenese in den MSCs, wobei die WtOB keinen Unterschied zeigten. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die Abwesenheit von Cdc42 oder Rac1 die adipogene Differenzierung fördert.

### Der MAPK-Signalweg beeinflusst die PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs und WtOB

Zur Untersuchung der Bedeutung des MAPK-Signalweges in der Adipogenese wurde in den nächsten Schritten spezifische Inhibitoren für die relevanten Moleküle ERK, p38 und JNK verwendet. Als erstes wurde die Phosphorylierung von ERK durch den MEK-Inhibitor verhindert und dessen Wirkung auf den Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  in den MSCs und WtOB analysiert (Abbildung 26). Hierfür wurden MSC aus dem Knochenmark und Osteoblasten aus der Calvaria von Wildtypmäusen isoliert, in 96-Lochplatten ausgesät und am nächsten Tag für 6 h mit dem jeweiligen Inhibitor ohne FCS behandelt.



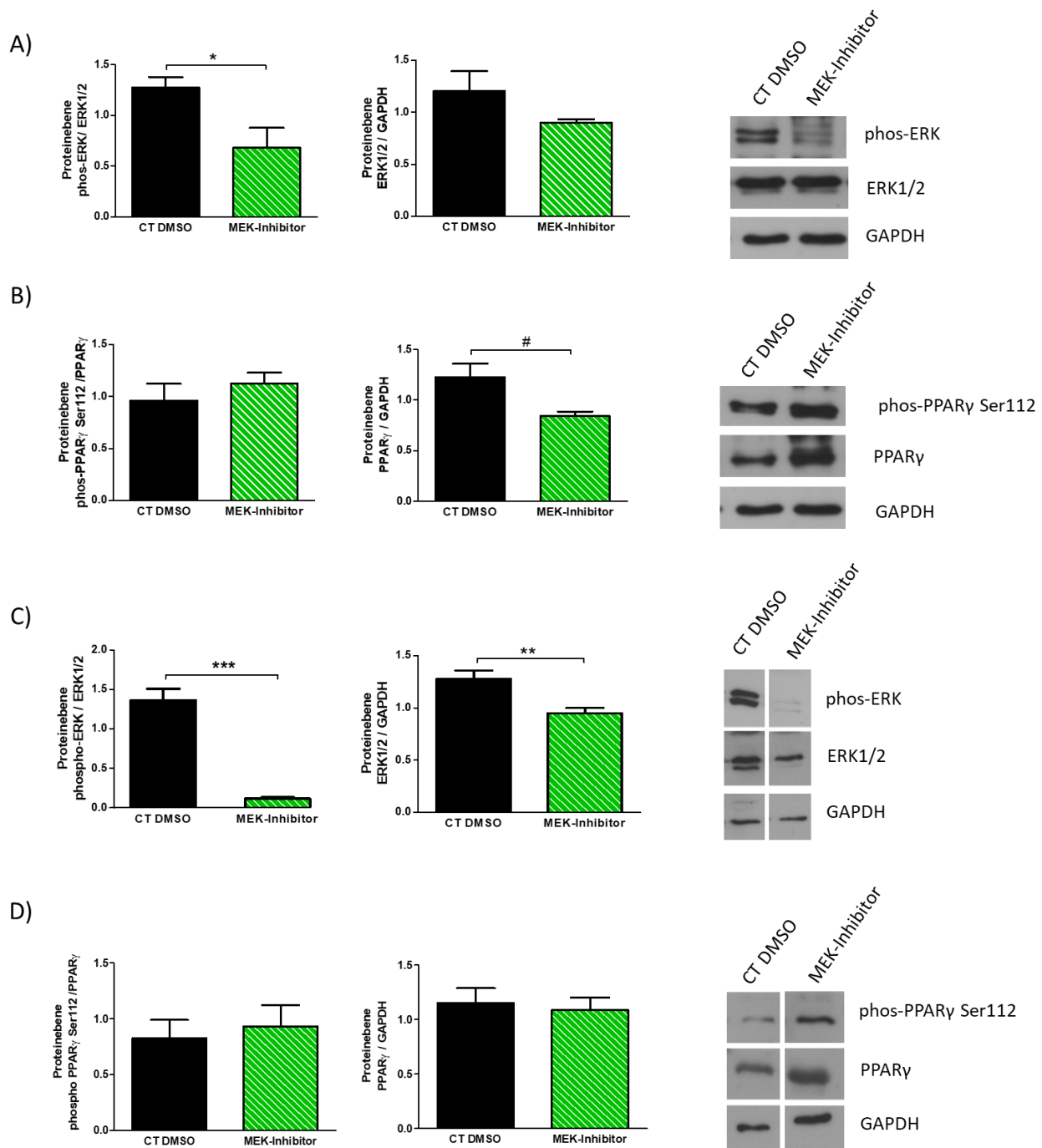
**Abbildung 26: Der MEK-Inhibitor führt zur Aktivierung der Adipogenese**

(A) Bei einer Inhibierung der ERK-Phosphorylierung kam es in den MSCs zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/MEK-Inhib:  $n = 19/23$ , \*\*  $p < 0,01$ ). In Kombination des MEK-Inhibitors mit den Inhibitoren Rac1 und Cdc42, zeigte nur die Kombination mit Cdc42 (DMSO/MEK+Cdc42:  $n = 19/16$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ) einen noch stärkeren Effekt auf die PPAR $\gamma$ -Expression als die MEK- und Rac1-Inhibition. (B) In den WtOB führte die Verhinderung der ERK-Phosphorylierung ebenfalls zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression im Vergleich zu CT DMSO (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/MEK-Inhib:  $n = 37/37$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Die Kombination des Inhibitors mit den Cdc42 und Rac1 Inhibitoren zeigten bei beiden eine höhere Expression von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu dem MEK-Inhibitor und CT DMSO (DMSO/MEK/MEK+Rac1/MEK+Cdc42:  $n = 37/37/26/26$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Schemata links und rechts stellen den Verlauf der Signalweiterleitung während der Modulation von ERK, Cdc42 und Rac1 dar.

Die Inhibierung der ERK-Phosphorylierung mittels des MEK-Inhibitors zeigte in den MSCs eine erhöhte mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ . In Kombination mit dem Rac1- und Cdc42-Inhibitor kam es nur mit der Cdc42-Inhibition zu einer weiteren Verstärkung der Expression des Adipozytenmarkers (Abbildung 26A). In den WtOB erhöhte sich die relative mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  in Gegenwart des MEK-Inhibitors. Im Gegensatz zu den MSCs führte die kombinierte Inhibition mit beiden Inhibitoren, dem Rac1- und Cdc42-Inhibitor zu einem verstärkten Anstieg der mRNA-Expression in den WtOB (Abbildung 26B).

Des Weiteren konnten Western Blot Analysen bestätigen, dass die ERK-Phosphorylierung durch den MEK-Inhibitor in den MSCs und WtOB verhindert wurde (Abbildung 27A/C). Jedoch wurde die Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  nur in den MSCs in einem Experiment leicht erhöht (Abbildung 27B) und zeigte in den WtOB keinen Unterschied (Abbildung 27D).





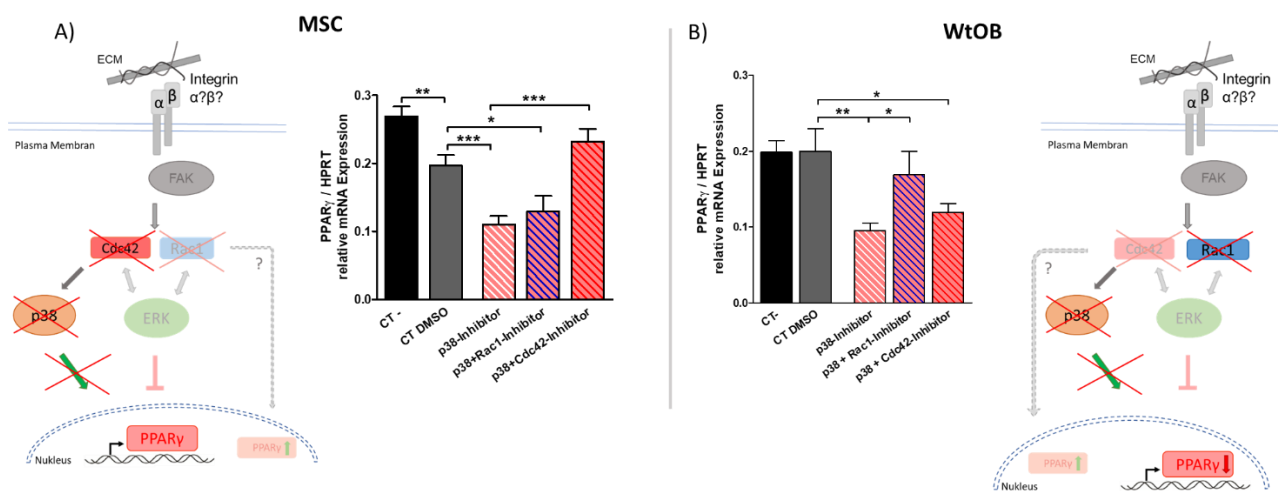
### Abbildung 27: MEK-Inhibitor beeinflusst die ERK und PPAR $\gamma$ Phosphorylierung in den MSCs

Die Analyse der Proteinproduktion in den MSCs und WtOB nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor zeigte eine starke Verminderung der ERK-Phosphorylierung in den MSCs **(A)** ( $n = 4/3$ ;  $* p < 0,05$ ) und WtOB **(C)** ( $n = 6/6$ ,  $*** p < 0,005$ ). Die PPAR $\gamma$ -Phosphorylierung blieb in den MSCs **(B)** ( $n = 4/3$ ) und WtOB **(D)** ( $n = 5/5$ ) unverändert. Die Proben wurden zu GAPDH normalisiert.

Damit zeigen die Daten, dass die Inhibierung der ERK-Phosphorylierung zu einem Anstieg der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression führte. Dies ist vereinbar mit einer normalerweise inhibierenden Wirkung wie bereits von Gehart et al. und Bost et al. berichtet (Bost et al., 2005; Gehart et al., 2010). Jedoch war noch kein Unterschied auf Proteinebene zu erkennen. Die verstärkte Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den MSCs mit der kombinierten Inhibition von MEK und Cdc42 lässt vermuten, dass entweder die ERK-Phosphorylierung abhängig von der Cdc42 Aktivierung ist, dass Cdc42 einen direkten Einfluss auf die PPAR $\gamma$  Expression hat oder dass Cdc42 p38 aktiviert um PPAR $\gamma$  zu erhöhen. Rac1 zeigte zwar nur eine schwache Wirkung, aber interagiert auch mit dem ERK-

Signalweg (Darstellung links, Abbildung 26). Im Gegensatz hierzu könnten in den WtOB beide RhoGTPasen für die Aktivierung des ERK-Signalweges notwendig sein, da sowohl durch die Abwesenheit von MEK und Rac1 als auch von MEK und Cdc42, die Expression des Adipozytenmarkers verstärkt wurde (Abbildung 26B).

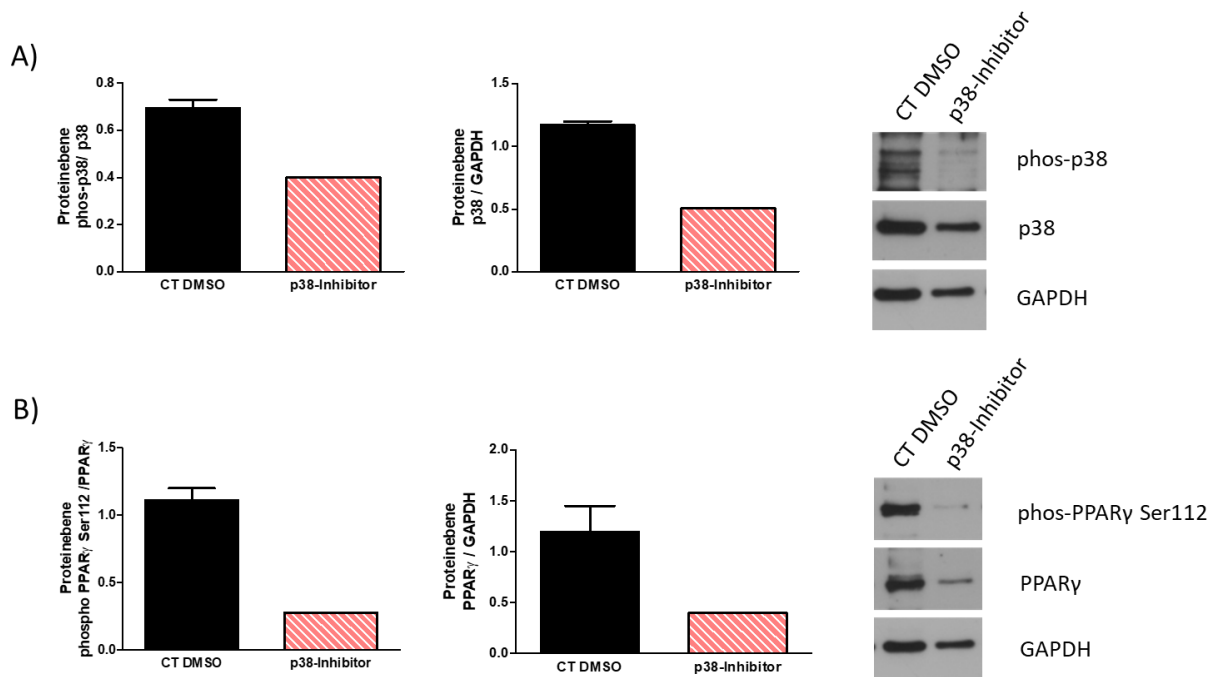
Im Gegensatz zur ERK-Inhibierung führte eine Inhibition der p38-Kinase zu einer Verminderung der mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  in den MSCs und WtOB. Jedoch stieg die Expression von PPAR $\gamma$  in den MSCs in Kombination von p38 und Cdc42-Inhibitoren im Vergleich zu p38-Inhibitor an und hob den Effekt im Vergleich zu CT DMSO wieder auf (Abbildung 28A). In den WtOB wurde der Effekt der reduzierten Expression von PPAR $\gamma$  in Kombination mit dem Rac1-Inhibitor aufgehoben und zeigte keine Unterschiede mehr im Vergleich zu CT DMSO (Abbildung 28B).



### Abbildung 28: Die Inhibition der p38-Kinase vermindert die PPAR $\gamma$ -Expression

**(A)** Durch die Inhibition der p38-Kinase wurde die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den MSCs vermindert (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/p38-Inhib:  $n = 19/21$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). In Kombination mit den Inhibitoren Rac1 und Cdc42 zeigte nur die Kombination mit Cdc42 eine stärkere Erhöhung der Expression im Vergleich zur p38- und Rac1-Inhibition (DMSO/p38+Cdc42:  $n = 19/14$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Die Zugabe von DMSO führte auch zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression im Vergleich zu CT (CT/DMSO:  $n = 22/19$ , \*\*  $p < 0,01$ ). **(B)** In den WtOB kam es ebenfalls zu einer Verminderung der relativen PPAR $\gamma$ -Expression (One-way ANOVA: \*\*  $p < 0,01$ ; DMSO/p38-Inhib:  $n = 26/24$ , \*\*  $p < 0,01$ ). In Kombination mit dem Rac1-Inhibitor wurde dieser Effekt wieder aufgehoben und zeigte keinen Unterschied zu CT DMSO, im Vergleich zu dem p38-Inhibitor war PPAR $\gamma$  jedoch signifikant höher exprimiert (p38/p38+Rac1:  $n = 24/22$ , \*  $p < 0,05$ ). Die kombinierte Inhibition von p38 und Cdc42 verminderte die PPAR $\gamma$ -Expression (DMSO/p38+Cdc42:  $n = 26/20$ , \*  $p < 0,05$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Die schematischen Darstellungen des Signalweges links und rechts zeigen die mögliche Abfolge des Signalweges während der Modulation von p38, Cdc42 und Rac1.

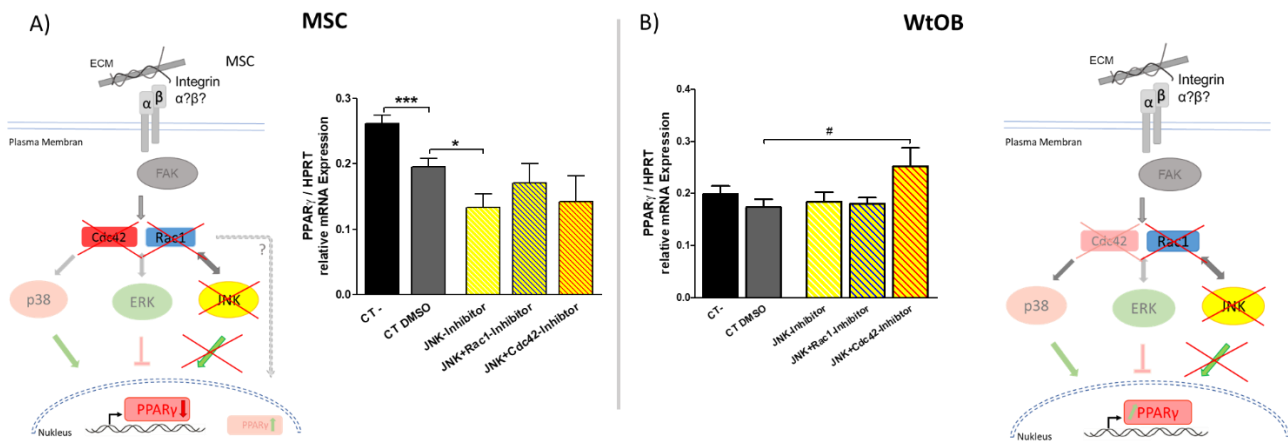
Damit weisen die Ergebnisse des modulierten p38-Signalweges daraufhin, dass in den MSCs die Anwesenheit von Rac1 und p38 für die Adipogenese benötigt wird und dass die Cdc42 Erhöhung von PPAR $\gamma$  vermutlich durch ERK, zumindest zum Teil, vermittelt wird (Abbildung 28, Signalwege). Um zu kontrollieren, ob die Inhibition von p38 auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurden Western Blots mit den MSCs, welche mit dem p38-Inhibitor behandelt wurden, durchgeführt. Die Western Blot Daten zeigten, dass die Phosphorylierung und die Produktion des gesamten p38 Proteins durch die Inhibition beeinträchtigt wurde (Abbildung 29A). Des Weiteren verminderte sich durch die p38-Inhibition, die Phosphorylierung von PPAR $\gamma$ , was die qPCR Daten bestätigt (Abbildung 29B).



### Abbildung 29: p38-Inhibitor vermindert p38- und PPAR $\gamma$ -Phosphorylierung in den MSCs

Die Analyse der Proteinbiosynthese in den MSCs nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor zeigte **(A)** eine starke Verminderung der p38-Phosphorylierung in den MSCs ( $n = 2/1$ ). **(B)** Die PPAR $\gamma$  Phosphorylierung verminderte sich ebenfalls in den MSCs ( $n = 2/1$ ). Die Proben wurden zu GAPDH normalisiert.

Um zu überprüfen, ob auch eine JNK-Inaktivierung die Adipogenese beeinflusst, wurde als nächstes die JNK-Kinase inhibiert und die PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA Ebene untersucht. Durch die Behandlung mit dem JNK-Inhibitor kam es in den MSCs zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression. Die kombinierte Inhibition mit den beiden RhoGTPasen zeigte jedoch keinen Unterschied zu der Kontrolle CT DMSO (Abbildung 30A). In den WtOB führte sowohl die JNK-Inhibition als auch die kombinierte Inhibition mit Rac1 zu keiner Veränderung der PPAR $\gamma$ -Expression. In den Osteoblasten wurde jedoch PPAR $\gamma$  in Anwesenheit der Inhibitoren JNK und Cdc42 im Vergleich zu CT DMSO verstärkt exprimiert (Abbildung 30B).



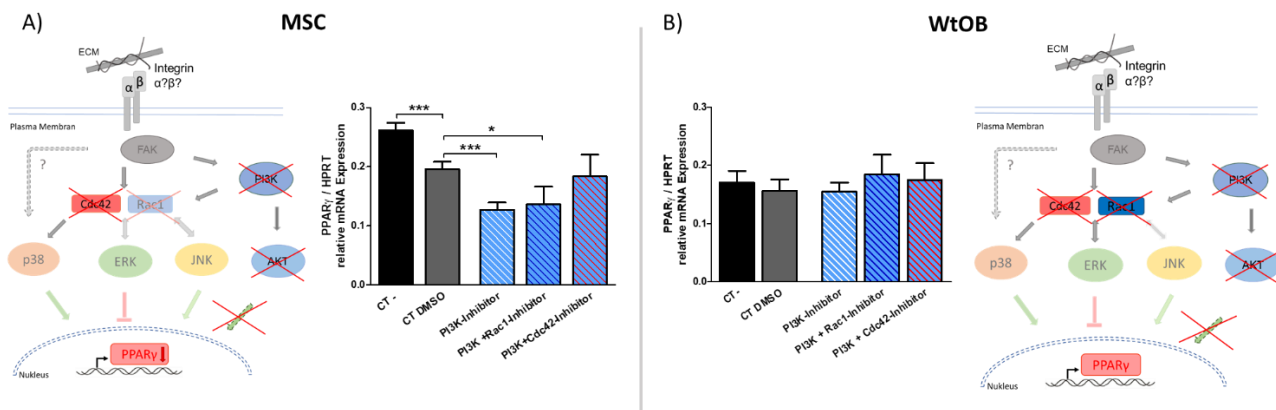
### Abbildung 30: JNK-Inaktivierung reguliert die Adipogenese in den MSCs

**(A)** Die Inhibition von JNK führte in den MSCs zu einer Verminderung der mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/JNK-Inhib:  $n = 23/26$ , \*  $p < 0,05$ ). Die Kombination von JNK mit den Inhibitoren Rac1 und Cdc42 zeigten keinen Effekt auf die PPAR $\gamma$ -Expression im Vergleich zu CT DMSO. Die Zugabe von DMSO verminderte im Vergleich zu CT ebenfalls die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (CT/DMSO:  $n = 26/23$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). **(B)** In den WtOB zeigte die JNK-Inhibition, sowie die kombinierte Inhibition mit Rac1 keinen Effekt auf den Adipozytenmarker PPAR $\gamma$ . In Kombination mit dem Cdc42-Inhibitor kam es allerdings zu einer leichten Erhöhung des Adipozytenmarkers (One-way ANOVA:  $p = 0,0717$ ; DMSO/JNK+Cdc42:  $n = 10/10$ , #  $p = 0,0562$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Schemata links und rechts stellen den Verlauf der Signalweiterleitung während der Modulation von JNK, Cdc42 und Rac1 in MSCs und WtOB dar.

Damit lassen die Daten vermuten, dass die JNK-Inaktivierung die Adipogenese in den MSCs beeinträchtigt, jedoch keinen Einfluss auf die PPAR $\gamma$ -Expression in den WtOB hat. Die Erhöhung der mRNA-Expression in Abwesenheit von JNK und Cdc42 in den Osteoblasten führt vermutlich über einen anderen Signalweg, d.h. die Cdc42-Inhibition könnte möglicherweise die ERK Phosphorylierung inaktivieren und erhöht somit PPAR $\gamma$  (Abbildung 30, Signalweg B).

### PI3K Inaktivierung beeinflusst die PPAR $\gamma$ -Expression in den MSCs

Als letztes wurde ein weiterer Zweig des Signalweges die PI3K/AKT-Kaskade im Zusammenhang mit dem Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  analysiert. Insbesondere fiel auf, dass die Inhibition der PI3K-Kinase in den MSCs die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  vermindert hatte, jedoch keinen Einfluss auf die Adipogenese in den primären Osteoblasten zeigte (Abbildung 31A-B). In Kombination mit dem Rac1-Inhibitor blieb die mRNA-Expression in den MSCs vermindert. In Kombination von Cdc42 wurde dieser Effekt wieder aufgehoben (Abbildung 31A).



**Abbildung 31: PI3K Inhibition beeinträchtigt die relative mRNA-Expression von PPAR $\gamma$**

**(A)** In den MSCs führte sowohl eine PI3K Inaktivierung als auch eine kombinierte Inhibition mit Rac1, zu einer Reduzierung der PPAR $\gamma$ -Expression im Vergleich zu CT DMSO (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; DMSO/PI3K/PI3K+Rac1:  $n = 23/25/7$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Die kombinierte Inhibition von PI3K und Cdc42 hob den Effekt wieder auf. Die Zugabe von DMSO verminderte im Vergleich zu CT ebenfalls die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (CT/DMSO:  $n = 26/23$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). **(B)** In den WtOB zeigte sich kein Effekt auf die Adipogenese durch die PI3K-Inhibition, auch nicht in Kombination mit den Rac1- und Cdc42-Inhibitoren (CT/DMSO/PI3K/PI3K+Rac1/PI3K+Cdc42:  $n = 11/10/11/9/11$ ). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert. Die schematischen Darstellungen des Signalweges links und rechts stellen den Verlauf der Signalweiterleitung während der Modulation von PI3K, Cdc42 und Rac1 in den MSCs und WtOB dar.

Zusammengefasst, lassen die Daten vermuten, dass die PI3K-Kinase und somit auch die AKT Aktivierung im Zusammenhang mit der RhoGTPase Cdc42 bei der MSC Differenzierung eine Rolle für die Adipogenese spielen könnte.

### 3.1.11 Fazit: *in vitro* Experimente

Integrine sind maßgebend für den Weg, den die MSCs für ihre Differenzierung einschlagen können. Dabei ist zu beachten, dass sich das Expressionsmuster der Integrine von MSCs und Osteoblasten verändert. Insbesondere fiel auf, dass die Integrinuntereinheiten  $\alpha_v$  und  $\beta_3$ , die die Osteoblastendifferenzierung stimulieren können (Sens et al., 2017a), in Abwesenheit die Adipogenese *in vitro* fördern. Des Weiteren können Integrine durch weitere Moleküle wie z.B. die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 und MAPK-Kinasen wirken. In Abwesenheit der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 kam es zu einer Aktivierung der Adipogenese und Inaktivierung der Osteogenese. Durch die Modulation des MAPK-Signalweges wurde die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression und Proteinproduktion in den MSCs und WtOB beeinflusst. Rac1 scheint hier allerdings nur eine kleine Rolle zu spielen im Gegensatz zu Cdc42, da es bei einer Inhibition von Cdc42 immer zu einem verstärkten Anstieg der PPAR $\gamma$ -Expression kommt. Hervorzuheben ist, dass in den MSCs alle untersuchten Wege den Adipozytenmarker beeinflussen, wohingegen in den WtOB nur die MAP-Kinasen ERK und p38 eine Rolle bei der Veränderung von PPAR $\gamma$  spielen könnten (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Übersicht über die Wirkung der Inhibitoren auf die PPAR $\gamma$ -mRNA Expression in MSCs und Osteoblasten (= ist unverändert; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,005; # p=0,0562)

Inhibitoren	Mesenchymale Stromazellen	Osteoblasten
FAK-Inhibitor	↓ **	=
Rac1-Inhibitor	↑ *	↑ *
Cdc42-Inhibitor	↑ ***	↑ ***
Rac1+Cdc42-Inhibitor	↑ ***	↑ ***
MEK-Inhibitor	↑ **	↑ **
MEK + Rac1 - Inhibitor	↑ **	↑ ***
MEK + Cdc42 - Inhibitor	↑ ***	↑ ***
p38-Inhibitor	↓ ***	↓ **
p38 + Rac1 - Inhibitor	↓ *	=
p38 + Cdc42 - Inhibitor	=	↓ *
JNK-Inhibitor	↓ *	=
JNK + Rac1 - Inhibitor	=	=
JNK + Cdc42 - Inhibitor	=	↑ #
PI3K-Inhibitor	↓ ***	=
PI3K + Rac1 - Inhibitor	↓ *	=
PI3K + Cdc42 - Inhibitor	=	=

## 3.2 Auswirkungen des konditionellen Knockouts mittels des Osterix Promotors auf die Knochen- und Adipozytenentwicklung *ex vivo*

Um die Interaktion zwischen Osteoblasten und Adipozyten im Zusammenhang mit den RhoGTPasen und deren Integrin-Aktivierung an einem Mausmodell zu untersuchen, wurden konditionelle Knockout-Modelle (cKO) verwendet. Hierfür wurden Mäuse, die einen tetrazyklin-regulierten Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle des Osterix (Osx) Promotors und ein von tetO (tetracycline responsive element; TRE) kontrolliertes GFP/Cre Fusionsprotein besitzen, verwendet (Rodda and McMahon, 2006). Mit Hilfe dieser Eigenschaften können gewünschte Bereiche eines Genes mittels dem aktivierten Enzym Cre-Rekombinase in Osteoblasten ausgeschnitten und somit ausgeschaltet werden (Davey et al., 2012). Zum einen wurden die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 jeweils einzeln homozygot (Osx cdc42 fl/fl rac1 +/+; Osx cdc42 +/+ rac1 fl/fl) und zum anderen doppelt homozygot (Osx cdc42 fl/fl rac1 fl/fl), sowie heterozygot (Osx cdc42 fl/+ rac1 fl/fl; Osx cdc42 fl/fl rac1 fl/+) mittels des Osterix (Osx)- Promotor ausgeschaltet. Als Negativkontrolle diente ein Modell, das alleinig die Osx-GFP::Cre Mutation (Osx +/+) beinhaltet.

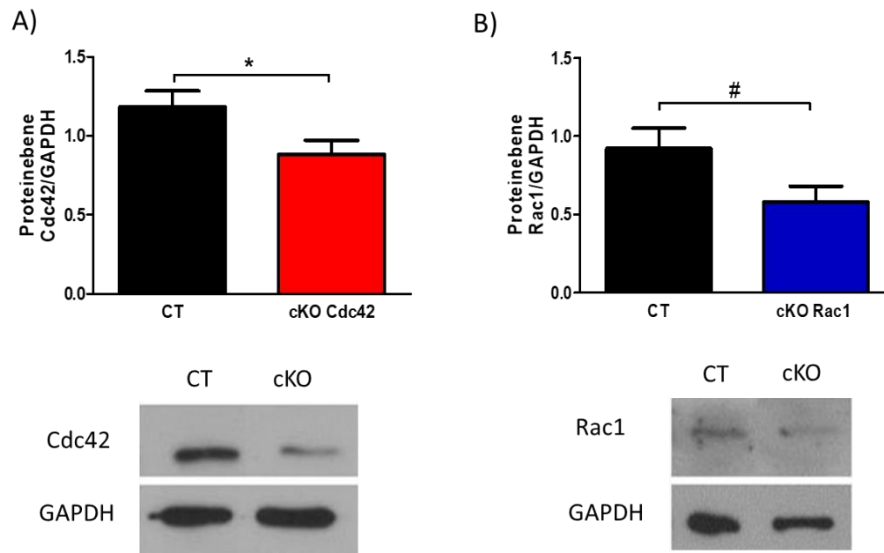
### 3.2.1 Vorarbeiten

In Vorarbeiten, die von Carina Würfel (Würfel, 2015) durchgeführt wurden, wurden die Knockout-Modelle charakterisiert. Hierbei waren die Mineralisierung und Anzahl der Adipozyten, sowie die mRNA-Expression bei der Kultivierung von cKO Osteoblasten *in vitro* verändert. Ebenso fand eine Analyse der Knochendichte, der Knochenhistomorphometrie und der Skelettentwicklung in den cKO Mäusen *ex vivo* statt, wobei auch hier eine Verminderung der Osteoblastenaktivität und eine Erhöhung der Adipozytenanzahl deutlich zu erkennen war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewonnenen Erkenntnisse nochmals bestätigt und durch die zusätzliche Untersuchung der Negativkontrolle Osx +/+ erneut quantifiziert. Ziel sollte sein, die Auswirkungen der aktivierten Cre-Rekombinase und die Details zu den Effekten der Ausschaltung der beiden RhoGTPasen, in den Knochenzellen besser zu verstehen.

### 3.2.2 Nachweis der Cdc42 und Rac1 Ausschaltung in den cKO Osteoblasten

Zunächst wurde die Ausschaltung der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in den primären Osteoblasten, welche aus der Calvaria isoliert wurden, untersucht. Hierfür wurden die Osteoblasten drei Tage nach der Isolierung geerntet und die Produktion beider Proteine mittels Western Blot analysiert (Abbildung 32).



### Abbildung 32: Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 in primären Osteoblasten

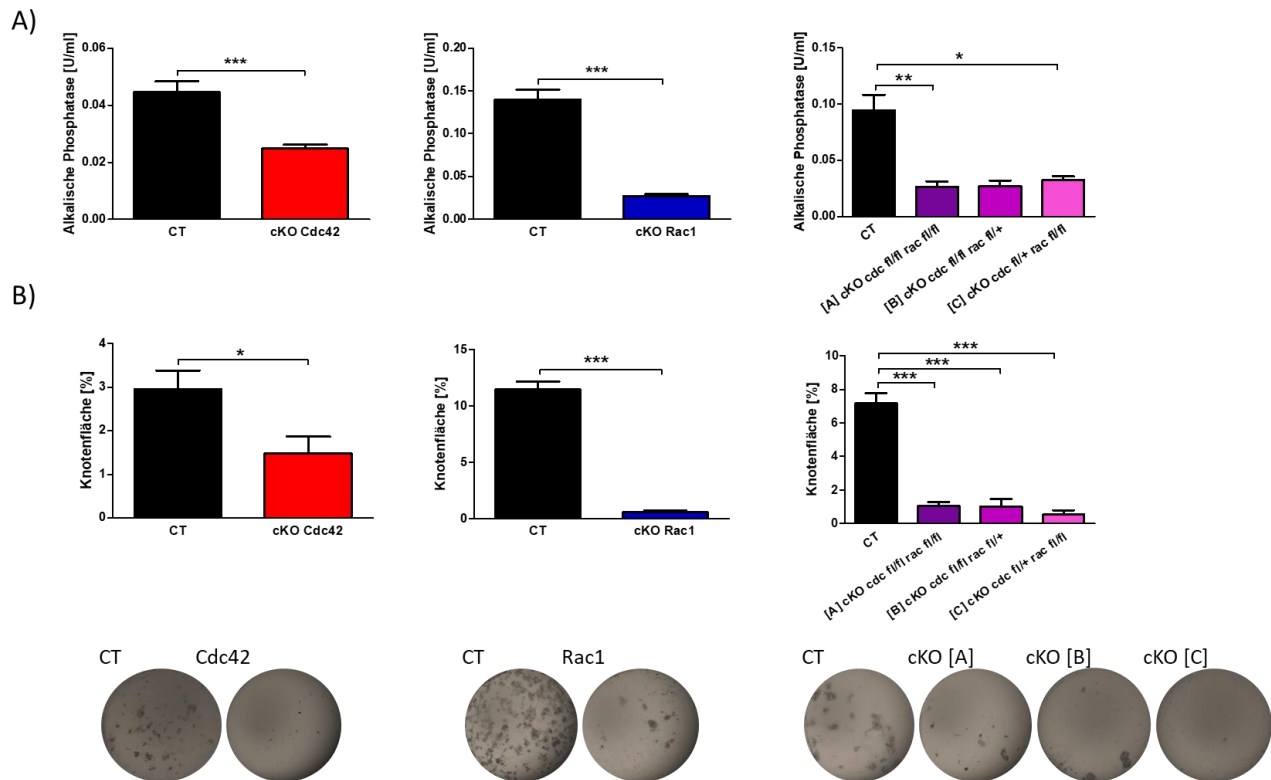
Die Proteinmenge von Cdc42 und Rac1 (21 kDa) wurde mittels Western Blot im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH (36 kDa) quantitativ bestimmt. Die Auswertung und die dargestellten Western Blots zeigten eine Reduzierung der beiden RhoGTPasen **(A)** Cdc42 (CT/Cdc42:  $n = 15/16$ ;  $* p < 0,05$ ) und **(B)** Rac1 (CT/Rac1:  $n = 14/12$ ;  $\# p = 0,0525$ ). Alle Proben wurden zu GAPDH normalisiert.

Durch die quantitative Auswertung der Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass es in den Osteoblasten zu einer reduzierten Proteinproduktion der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 kommt und somit der Osx-Promotor bzw. die aktive Cre-Rekombinase die Synthese der beiden RhoGTPasen in den Osteoblasten unterdrückt.

### 3.2.3 Die Differenzierung von konditionellen Knockout Osteoblasten zu Osteoblasten

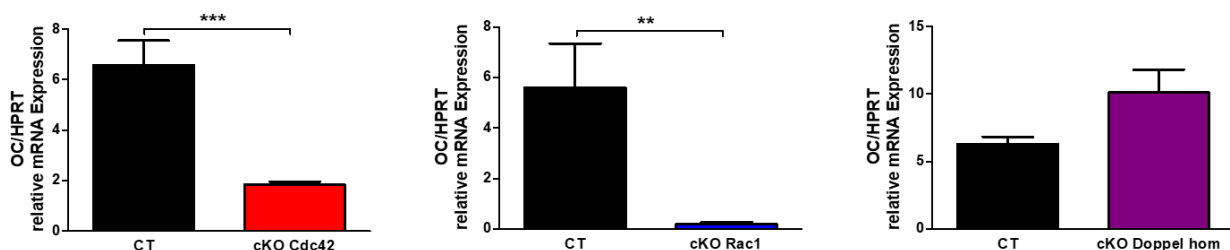
Für die Differenzierung wurden die Präosteoblasten konfluent ausgesät und am folgenden Tag mit Differenzierungsmedium für etwa 14-21 Tage zu Osteoblasten differenziert. Anschließend wurden die konditionierten Medien der Zellen zur Untersuchung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) verwendet und die differenzierten Osteoblasten zum einen mit Von Kossa und zum anderen mit Oil Red O gefärbt. Weiter wurden Zelllysate für die mRNA-Isolation und anschließender mRNA-Expressionsanalyse für pro-osteoblastische bzw. pro-adipogene Marker abgenommen (Abbildung 33).





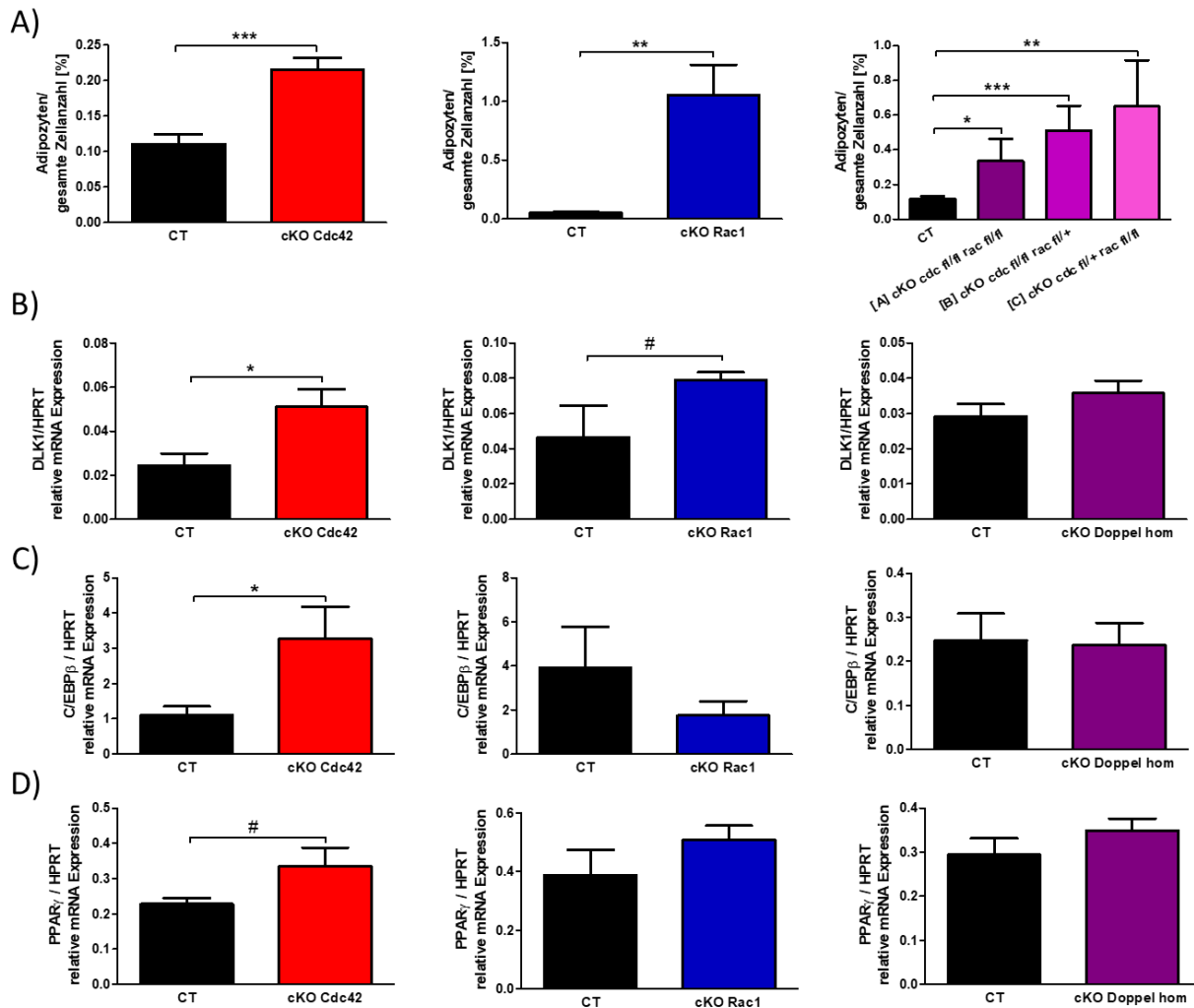
**Abbildung 33: Die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Mineralisierung von Osteoblasten**  
 Nach der ca. 14-21 tägigen Differenzierung der Kontroll- und cKO-Osteoblasten zeigten (A) die cKO Osteoblasten im Vergleich zu den Kontrollen eine Verminderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (CT/Cdc42: n = 14/17; CT/Rac1: n = 16/17; CT/A/B/C: n = 21/10/7/7; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001) und (B) eine Reduzierung der Knotenbildung in den cKO-Osteoblasten (CT/Cdc42: n = 15/16; CT/Rac1: n = 12/19; CT/A/B/C: n = 23/11/6/7; \* p<0,05, \*\*\* p<0,001). Die Bilder zeigen die von Kossa Färbung der jeweiligen Genotypen.

Die Differenzierung von Cdc42, Rac1, sowie doppelt homozygot oder kombinierte homozygot/heterozygot ausgeschalteten Osteoblasten führten zu einer Reduzierung der Aktivität der ALP (Abbildung 33A). Ebenso konnte eine Verminderung der Mineralisierung und somit auch eine verschlechterte Bildung von hydroxyapatithaltigen Knoten in den Kulturplatten (Abbildung 33B) nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die cKO-Osteoblasten eine Verminderung der Osteokalzin (OC) mRNA (Abbildung 34). Bei der doppelt homozygoten Ausschaltung schien der Effekt der Expression der OC mRNA nicht mehr vorhanden zu sein (Abbildung 34, violett).



**Abbildung 34: Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 vermindert die mRNA-Expression von Osteokalzin**  
 Durch die Ausschaltung der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 wurde die mRNA-Expression von Osteokalzin vermindert (CT/Cdc42: n = 6/6; CT/Rac1: n = 4/5; \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001). Die Expression der Osteokalzin mRNA in den doppelt homozygoten cKO-Osteoblasten wurde im Vergleich zu den CT-Osteoblasten leicht erhöht (CT/Doppel hom: n = 6/9). Alle Proben wurden zu HPRT normalisiert.

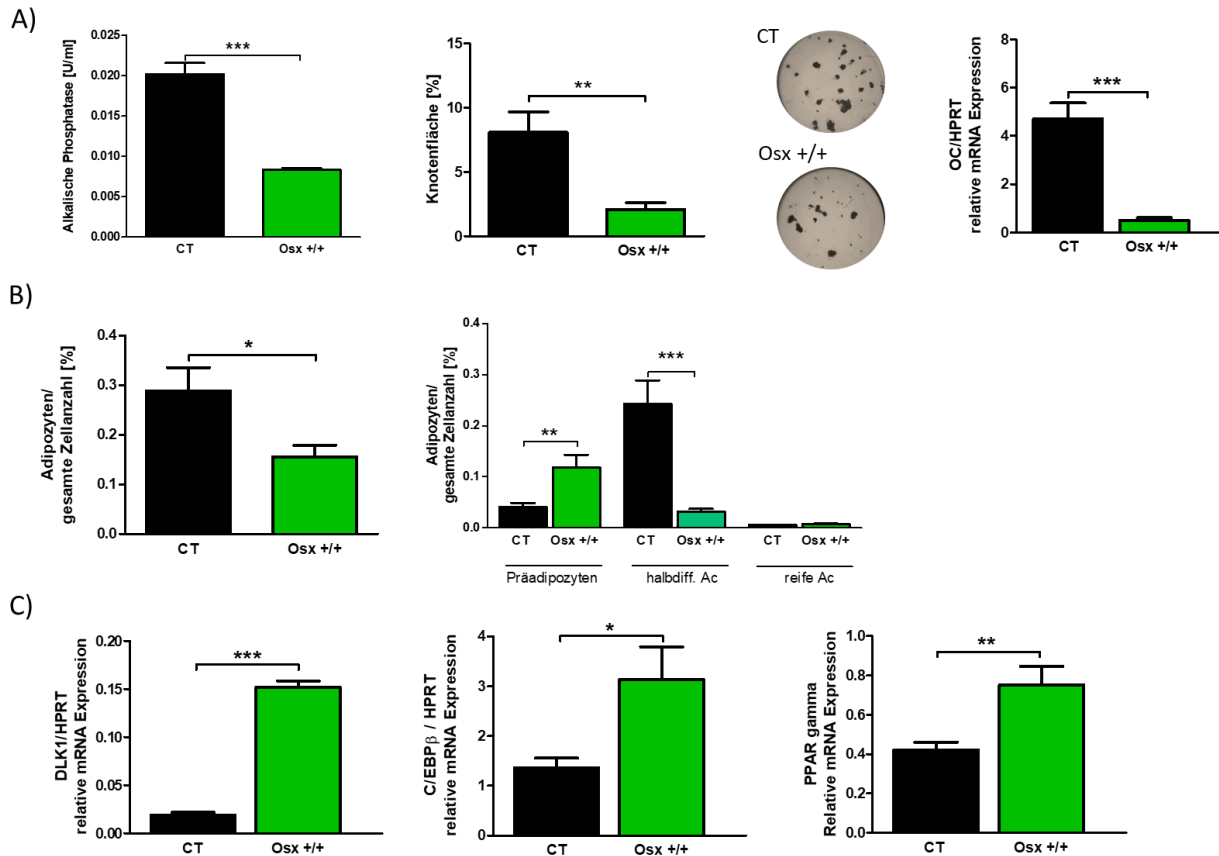
Im Weiteren wurde die Anzahl der Adipozyten in den Osteoblastenkulturen im Verhältnis zu der Zellkernanzahl pro Vertiefung optisch ausgezählt und prozentual bestimmt (siehe Abbildung 22). Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Adipozyten, insbesondere die Präadipozyten, in allen cKO Kulturen erhöht war (Abbildung 35A). Ebenso war die mRNA-Expression adipozyten-spezifischer Gene, wie DLK1 (Pref-1), C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  in den Cdc42 cKOs angestiegen (Abbildung 35B-D, rot). Die mRNA-Expression von DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  zeigten keine Veränderungen in den cKO Rac1 und cKO Doppel homozygoten Osteoblasten (Abbildung 35B-D, blau/violett).



**Abbildung 35: Der Einfluss der RhoGTPasen auf die Adipozytenanzahl und die mRNA-Expression der Adipozytenmarker. (A)** Die Osteoblastenkulturen mit den konditionell ausgeschalteten RhoGTPasen wies nach der Differenzierung eine höhere Anzahl der Adipozyten pro gesamter Zellanzahl pro Vertiefung auf (CT/Cdc42: n = 7/7; CT/Rac1: n = 10/16; CT/A/B/C: n = 18/8/4/6; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001). **(B)** Die relative mRNA-Expression von DLK1 und C/EBP $\beta$  stieg in den Cdc42 cKO-Osteoblasten an (CT/Cdc42: n = 6/6; \* p<0,05). Für die Rac1 war nur ein leichter Anstieg der DLK1 mRNA-Expression zu erkennen (CT/Rac1: n = 4/6, p = 0,0662). **(C)** und blieb unverändert bei der Expression von C/EBP $\beta$  mRNA (CT/Rac1: n = 4/6, p = 0,1985). **(D)** Die Expression der PPAR $\gamma$  mRNA wurde nur in den Cdc42 cKO-Osteoblasten leicht erhöht (CT/Cdc42: n = 6/6, # p=0,0629). Alle mRNA Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Die Daten von Abbildung 33 bis 35 bestätigen die Ergebnisse von Carina Würfel (Würfel, 2015). Jedoch wurde als nächstes die Negativkontrolle *Osx* +/+ mit den gleichen Methoden untersucht und es zeigte sich, dass alleinig der *Osx*-Promotor einen negativen Einfluss auf die Aktivität der ALP und Mineralisierung hat, sowie auf die Osteokalzin mRNA-Expression (Abbildung 36A). Die Anzahl der gesamten Adipozyten im Vergleich zur gesamten Zellanzahl pro Vertiefung war in den *Osx* +/+

Osteoblasten reduziert. Kategorisiert man jedoch die Adipozyten nach dem Reifestadium der Zellen, stieg die Anzahl der Präadipozyten in den Osx +/+ Osteoblastenkulturen an, wobei die Anzahl der halbdifferenzierten Adipozyten vermindert blieb (Abbildung 36B). Somit war wie bei den Cdc42 und Rac1 cKOs, die Anzahl der Präadipozyten in den Kulturen erhöht. Zusätzlich war die mRNA der adipozytären Marker DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  stärker exprimiert als in den CTs (Abbildung 36C).



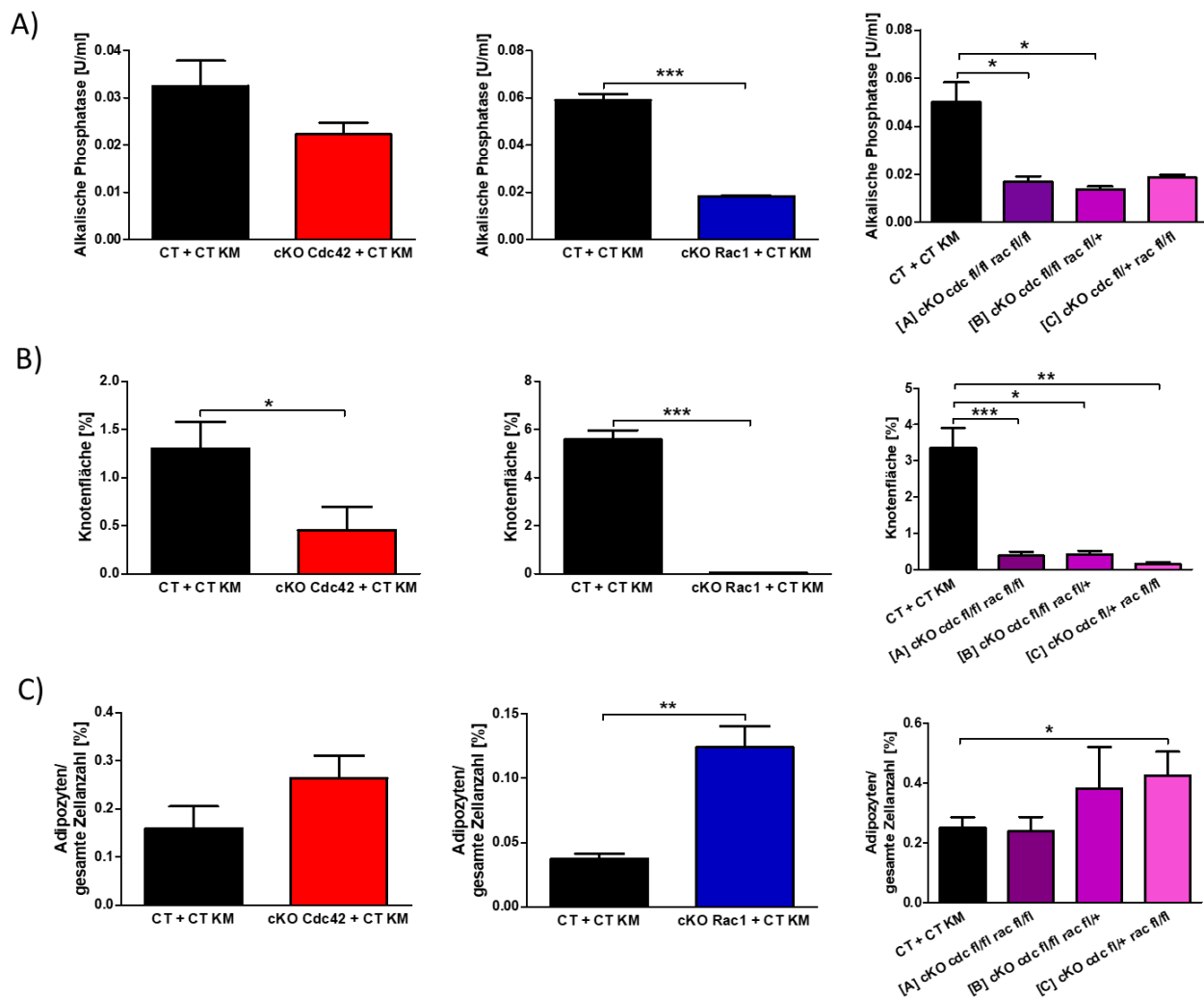
### Abbildung 36: Osterix-Promotor beeinflusst die Differenzierung der Osteoblasten

**(A)** Die Alkalische Phosphatase (CT/Osx: n = 6/6, \*\*\* p<0,001), sowie die Fläche der hydroxylapatit-haltigen Knoten (CT/Osx: n = 8/6, \*\* p<0,01) und die relative mRNA-Expression von OC (CT/Osx: n = 4/4, \*\*\* p<0,001) wurde in den Kulturen, in denen nur der Osx-Promotor (Osx +/+) aktiv war, vermindert. **(B)** Die Anzahl der gesamten Adipozyten im Vergleich zur gesamten Zellanzahl wurde in den Osx-Osteoblasten signifikant reduziert (CT/Osx: n = 8/8, \* p<0,05). Kategorisiert man die Adipozyten nach dem Reifestadium der Zellen, stieg die Anzahl der Präadipozyten in den Osx +/+ Zellen an, die halbdifferenzierten Adipozyten hingegen sind vermindert (CT/Osx: n = 8/8, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001). **(C)** Der Osx-Promotor erhöhte die relative mRNA-Expression der adipozytären Marker DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  (CT/Osx: n = 4/4, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001). Alle mRNA Proben wurden zu HPRT normalisiert.

Damit zeigen die Ergebnisse, dass nur durch die Aktivität des Osterix-Promotors bzw. der Cre-Rekombinase die Osteoblastendifferenzierung negativ beeinflusst und die Adipozyten-differenzierung *in vitro* gefördert wird.

### 3.2.4 Knochenmarkszellen haben keinen Einfluss auf die Differenzierung der Osteoblasten *in vitro*

Da Expressionsveränderungen bei den MSCs dazu beitragen könnten zu bestimmen, in welchen Zelltyp sich die Nachbarzellen differenzieren, war es zunächst interessant heraus zu finden, ob es bei einer Ko-Kultivierung von Gesamtknochenmark aus Kontrollmäusen und cKO-Osteoblasten die verminderte Mineralisierung und erhöhte Adipozytenanzahl aufgehoben wird (Abbildung 37).

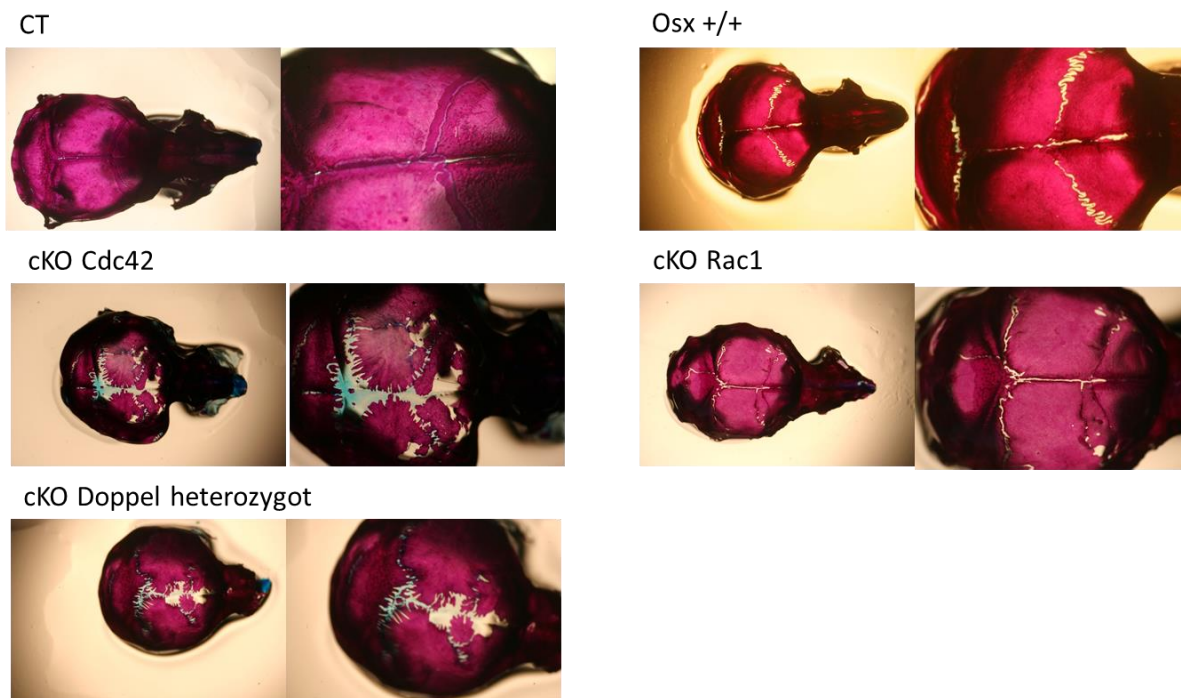


**Abbildung 37: Die Ko-Kultivierung von CT-Knochenmarkszellen und Osteoblasten reduziert den Effekt des konditionellen Knockouts nicht. (A)** Die cKO Kulturen zeigten weiterhin eine Verminderung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (CT/Cdc42: n = 8/7, p=0,1207; CT/Rac1: n = 8/8, \*\*\* p<0,001; CT/A/B/C: n = 21/10/5/6, \* p<0,05) und **(B)** eine Reduzierung der von Kossa Färbung (CT/ Cdc42: n = 15/12, \* p<0,05; CT/Rac1: n = 8/11, \*\*\* p<0,001; CT/A/B/C: n = 23/11/6/6, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001). **(C)** Die Oil Red O Färbung zeigte auch in den Ko-Kulturen mit CT-Knochenmark eine Erhöhung der gesamten Adipozytenanzahl (CT/Cdc42: n = 6/4, p = 0,1640; CT/Rac1: n = 6/8, \*\* p<0,01; CT/A/B/C: n = 18/7/4/4; \* p<0,05).

Die Ko-Kultivierung mit Gesamtknochenmark von Kontrollmäusen zeigte jedoch ebenfalls eine Reduzierung der ALP Aktivität und Mineralisierung, sowie eine erhöhte Anzahl von Adipozyten. Dies lässt vermuten, dass die Zellen im Knochenmark in diesem Versuchsaufbau womöglich den Effekt nicht aufheben können. Hierbei war jedoch zu beachten, dass viele Knochenmarkszellen, während der Differenzierung abstarben, insbesondere die Negativkontrolle ohne Osteoblasten, vermutlich durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten.

### 3.2.5 Die Skelettentwicklung ist in Mäusen mit aktiven Osterix-Promotor gestört

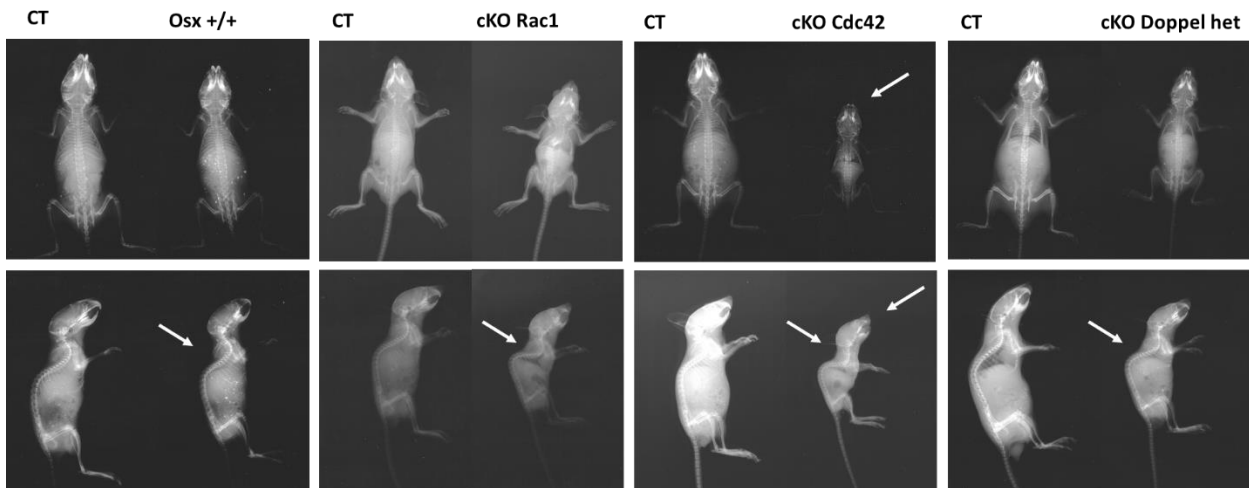
Bei der Untersuchung der Entwicklung der langen Knochen und der Schädelknochen konnte bereits Carina Würfel (Würfel 2015) zeigen, dass es in den cKO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren erhebliche Unterschiede gibt. Hierbei zeigte sich eine Deformation des Femurkopfes und der Knochenlänge, sowie eine Fehlentwicklung der Kiefer- und Zahnformation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewonnen Erkenntnisse nochmals *ex vivo* bestätigt und durch die zusätzliche Untersuchung der Negativkontrolle *Osx +/+* erneut untersucht.



**Abbildung 38: Der Osterix-Promotor führt zur Fehlentwicklung der Schädeldecke in 3 Wochen alten Mäusen.** Durch die Skelettfärbung mittels Alzianblau und Alizarinrot wurde ein unvollständiger Verschluss der Fontanelle und Deformierung der Kopfform in den 3 Wochen alten Mäusen, in denen der Osterix-Promotor aktiv ist, sichtbar (n = 5).

Die histologische Färbung mit Alzianblau und Alizarinrot, welche Knorpel- und Knochengewebe anfärbt, verwies, sowohl in den *Osx +/+* Mäusen als auch in den mit den RhoGTPasen konditionell ausgeschalteten Mäusen im Vergleich zu den CT-Mäusen, auf eine Fehlentwicklung und einen unvollständigen Verschluss der Fontanelle und Schädelnähte (Abbildung 38).

Die Deformierungen der Skelette sind besonders gut in den Röntgenbildern zu beobachten (Abbildung 39). Insgesamt waren die cKO wie auch die *Osx +/+* Mäuse im Verhältnis zu den Kontrollmäusen kleiner, die cKOs wiesen zusätzlich eine rundliche Kopfform und eine Verschlechterung der Zahnanlage, sowie eine stark gekrümmte Wirbelsäule auf.

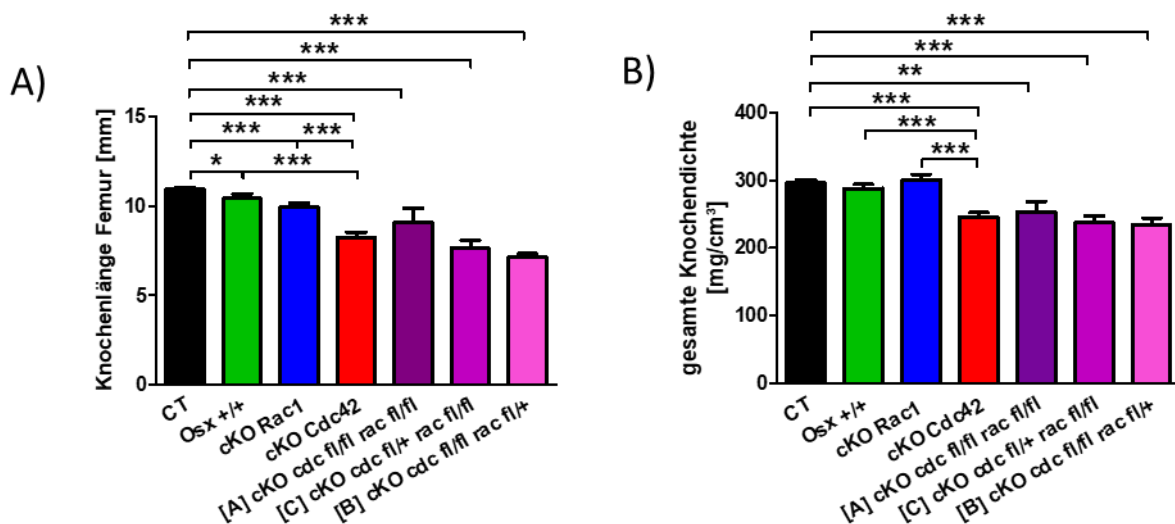


**Abbildung 39: Osterix-Promotor führt zu Deformationen im Skelettbau**

Die Röntgenaufnahmen zeigen in den cKO Mäusen dorsal und lateral eine Verminderung der Körpergröße und eine sehr starke Wirbelsäulenkrümmung (weiße Pfeile). Des Weiteren weisen die Mäuse mit einem aktiven Osterix-Promotor eine rundlichere Kopfform auf und haben einen stark verkürzten Ober- und Unterkiefer, gut erkennbar bei den cKO Cdc42 Mäusen (n = 5).

Wie bereits erwähnt, waren die Mäuse mit einem aktiven Osx-Promotor bzw. einer aktiven Cre-Rekombinase kleinwüchsig im Vergleich zu den Kontrollmäusen und hatten in allen Genotypen eine messbar kürzere Knochenlänge des Femurs als in den CT-Mäusen (Abbildung 40A).

Aufgrund der beobachteten Fehlentwicklungen der Knochen in den cKO-Mäusen wurde als nächstes die Auswirkung der RhoGTPasen und des Osx-Promotors auf die Knochendichte untersucht. Hierfür wurden die Femora der Hinterläufe der Versuchstiere für die Knochendichtemessung mittels pQCT verwendet (Abbildung 40B).



**Abbildung 40: Knochenlänge und Knochendichte der Femora der Knockout Mäuse**

(A) Die Knochenlänge der Femora war in den, mit dem Osterix-Promotor konditionell ausgeschalteten Mäusen vermindert (One-way ANOVA \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Osx/Rac1/Cdc42/[A]/[B]/[C]: n = 48/15/15/20/6/5/5; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). (B) Die gesamte Knochendichte der Femora war ebenfalls reduziert, jedoch nicht in den Femora der cKO Rac1 Mäuse (One-way ANOVA \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Osx/Rac1/Cdc42/[A]/[B]/[C]: n = 49/15/18/16/6/5/5; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



Die Knochendichtedaten zeigten, dass die Ausschaltung der RhoGTPase Cdc42 und beide zusammen mit einer Verminderung der gesamten Knochendichte einhergeht, auch im Vergleich zu *Osx +/+* und *cKO Rac1* (Abbildung 40B). *Osx* und *Rac1 cKO*-Mäuse blieben unverändert und beeinflussten die gesamte Knochendichte nicht. Damit konnten die *ex vivo* Daten, die eine verminderte Gesamtknochendichte in den *Cdc42 cKO*s aufwiesen, die *in vitro* Daten, bei denen eine verschlechterte Aktivität der Osteoblastenfunktion nachgewiesen wurde, bestätigen.

Ebenfalls auffällig war, dass die Mäuse bereits vor dem Absetzen von der Mutter einen geschwächteren Eindruck machten als die Kontrolltiere aus dem gleichen Wurf. Aufgrund der veränderten Kopfform, Körperhaltung und der Fehlentwicklung der Zähne (z. B. Elefantenzähne) waren die *cKO Cdc42* und *Rac1* Mäuse ab der dritten Woche kaum überlebensfähig und konnten sich meist nicht selbstständig von Trockenfutter ernähren. Die Tabelle 14 zeigt, wie viele homozygote Nachkommen und wie viele der homozygot ausgeschalteten Mäuse Winzlinge waren und den oben beschriebenen Phänotyp zeigten und aus heterozygoten Verpaarungen erzeugt wurden (z.B.: *Osx cdc fl/+ rac +/+* wird mit *CT cdc fl/fl rac +/+* verpaart). Diese Knockout-Mäuse wurden meist nicht älter als 4-6 Wochen (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Übersicht über die Nachkommen von heterozygot verpaarten *cKO* Mäusen und die Anzahl der phänotypischen *cKO* Mäuse (Winzlinge), die nicht älter als 4-6 Wochen wurden.

<b>cKO Cdc42</b>			
Neugeborene [N]		<b>cdc fl/fl rac +/+</b>	<b>cdc fl/+ rac +/+</b>
144 (erwartet 25 %/Gruppe bzw. 36 Mäusen)	<b>Osx</b>	34	42
	<b>CT</b>	39	27
<b>Winzlinge aus Osx</b>		31 von 34	6 von 42

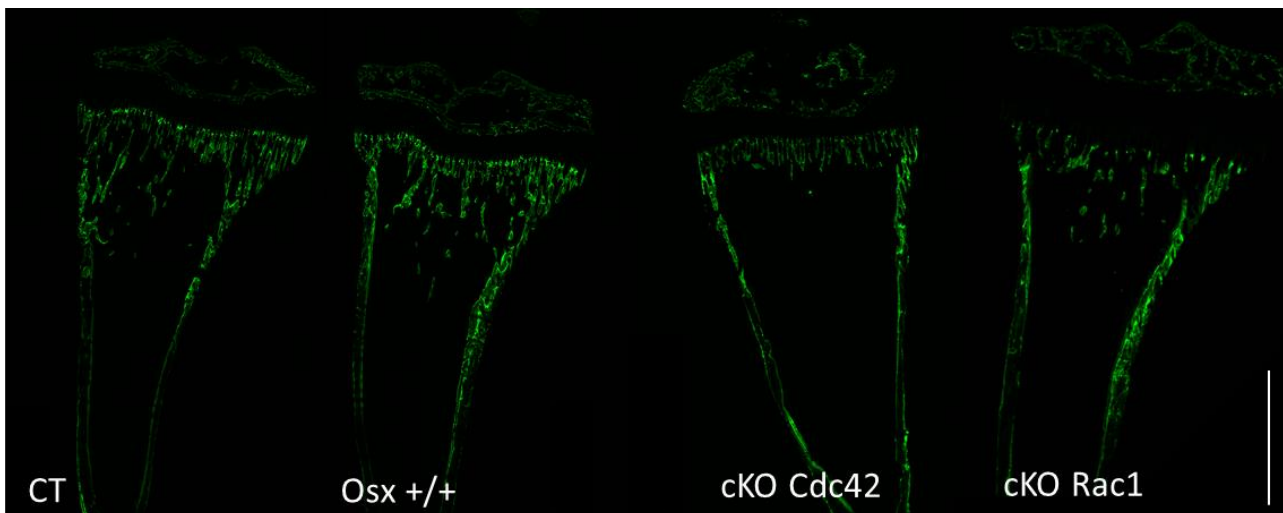
<b>cKO Rac1</b>			
Neugeborene [N]		<b>cdc +/+ rac fl/fl</b>	<b>cdc +/+ rac fl/+</b>
106 (erwartet 25 %/Gruppe bzw. 26-27 Mäuse)	<b>Osx</b>	24	26
	<b>CT</b>	31	27
<b>Winzlinge aus Osx</b>		12 von 24	2 von 26

<b>cKO Doppel</b>					
Neugeborene [N]		<b>cdc fl/fl rac fl/fl</b>	<b>cdc fl/+ rac fl/fl</b>	<b>cdc fl/fl rac fl/+</b>	<b>cdc fl/+ rac fl/+</b>
186 (erwartet 25%/Gruppe bzw. 46-47 Mäuse)	<b>Osx</b>	12	19	15	21
	<b>CT</b>	27	19	26	36
<b>Winzlinge aus Osx</b>		7 von 12	19 von 19	15 von 15	14 von 21

Zusammengefasst kann vermutet werden, dass bereits der Osterix-Promotor bzw. die aktive Cre-Rekombinase alleine ein Auslöser für die skelettalen Fehlentwicklungen ist und durch die zusätzliche Ausschaltung der RhoGTPasen *Cdc42* und *Rac1* die Effekte noch verstärkt werden.

### 3.2.6 Der Osterix-Promotor hat keinen Einfluss auf die histomorphometrischen Parameter im Knochen

Aufgrund der veränderten Knochendichte in den Cdc42 cKO-Tieren, sowie der erhöhten Adipozytenanzahl in den Osteoblastenkulturen, wurden im nächsten Schritt histomorphometrische Untersuchungen an der Tibia durchgeführt. Zunächst sollte dargestellt werden, welche Effekte Osterix bzw. die Cre-Rekombinase und auch die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 auf die Knochenneubildung und auf die daran beteiligten Zelltypen hat. Dafür wurde im ersten Schritt den drei Wochen alten Kontroll- und konditionell ausgeschalteten Mäusen zweimalig im Abstand von drei Tagen intraperitoneal Kalzein injiziert, Knochenschnitte angefertigt und mittels dynamischer Histomorphometrie ausgewertet. Kalzein wird bei der Mineralisierung in das neugebildete Osteoid eingebaut und markiert diese Stellen grün fluoreszierend. In der exemplarischen Darstellung (Abbildung 41) von Kontroll-, Osx +/+, Cdc42 und Rac1 cKO-Mäusen zeigte sich, dass der Fluoreszenzfarbstoff Kalzein vor allem in den CTs und Osx +/+ verstärkt im Kortex und den Trabekeln eingebaut war. Im Gegensatz hierzu waren bei den cKO Cdc42 kaum Trabekel und bei den cKO Rac1 weniger Trabekel vorhanden.



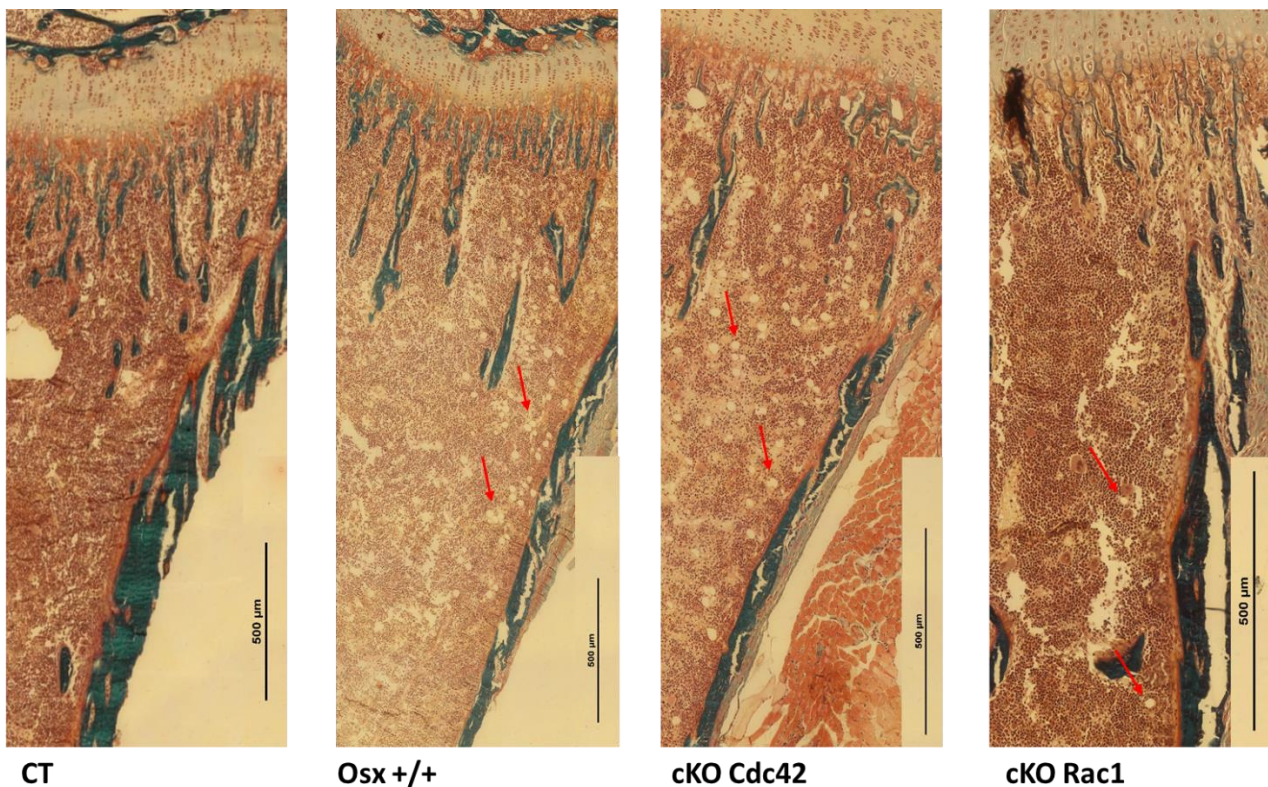
**Abbildung 41: Exemplarische Darstellung des Kalzeineinbaus im Knochen**

Die exemplarischen Knochenschnitte der Tibia zeigen den Einbau von Kalzein in neugebildetem Osteoid. Im Vergleich zu den CT- und Osx-Schnitten waren in den cKO Cdc42 Knochen keine Trabekel zu erkennen und die Kalzeinintensität im Kortex geringer. Der Maßstab entspricht 1000  $\mu\text{m}$ .

Für eine vollständige Untersuchung der Knochenzellen wurde zusätzlich zu der dynamischen noch eine statische Histomorphometrie mittels der Masson Goldner Färbung durchgeführt und weitere Parameter in den jeweiligen Knochenschnitten ausgemessen. Bei der Betrachtung (Abbildung 42) der gefärbten Knochenschnitte fällt auf, dass die Anzahl der Trabekel, wie auch in den Kalzein fluoreszierenden Schnitten, in den CTs und der negativ Kontrolle Osx +/+ gleich, allerdings bei den cKO Cdc42 und cKO Rac1 Knochen vermindert war. Überraschenderweise war sowohl in den Osx +/+ Mäusen als auch in den cKO Cdc42 im Vergleich zu den CT-Mäusen die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark erhöht. Im Knochenmark der Rac1 cKO-Tiere waren auch mehr



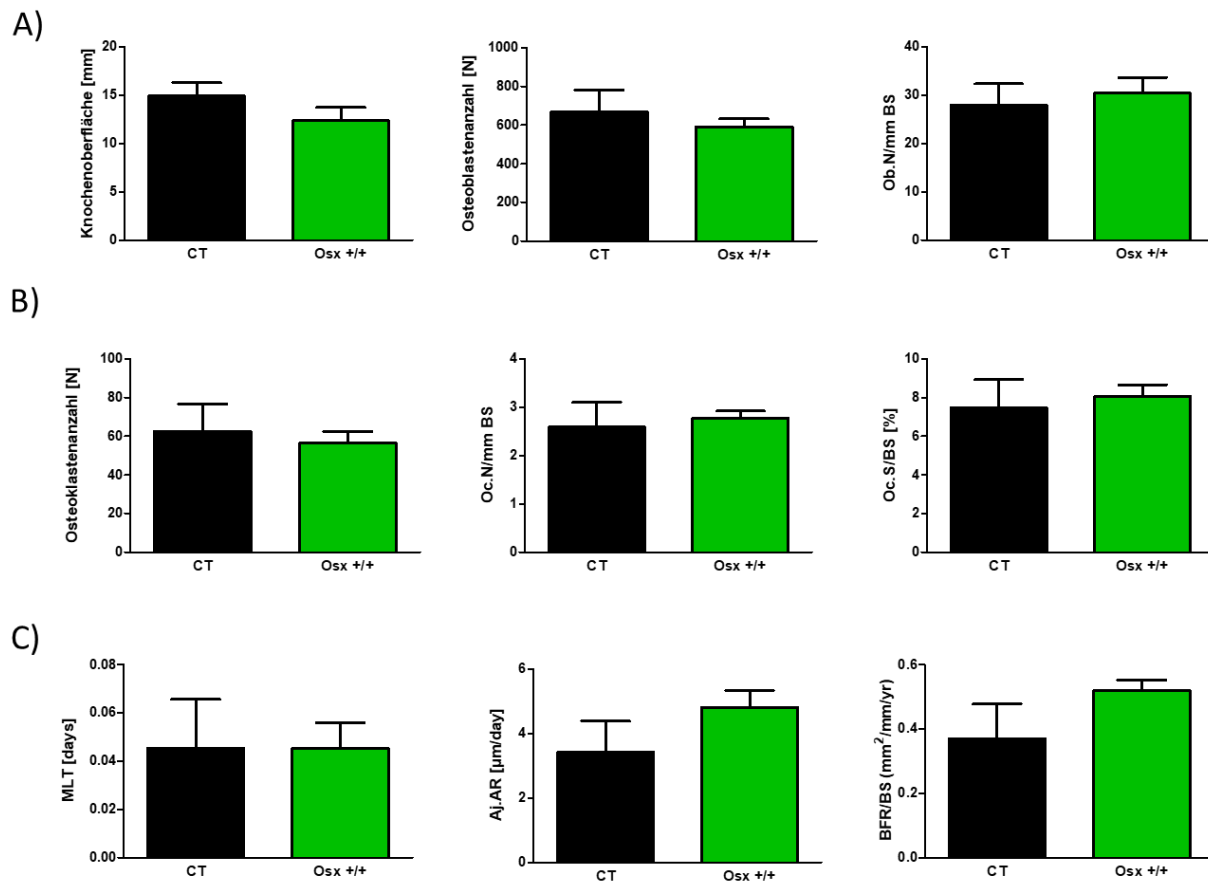
Adipozyten zu sehen, jedoch nicht so viele wie bei den *Osx +/+* und *Cdc42* cKO-Mäusen (rote Pfeile, Abbildung 42).



**Abbildung 42: Masson Goldner Färbung der Kunststoff-Knochenschnitte**

Die repräsentativen Abbildungen zeigen die Masson Goldner Färbung der Knochenschnitte der unterschiedlichen Genotypen. Dabei ist die Anzahl der Trabekel in der Spongiosa in den *cKO Cdc42* und *cKO Rac1* reduziert und die Anzahl der Adipozyten (rote Pfeile) in den *Osx +/+*, *cKO Cdc42* und möglicherweise der *cKO Rac1* Mäusen erhöht. Der Maßstab entspricht jeweils 500 µm.

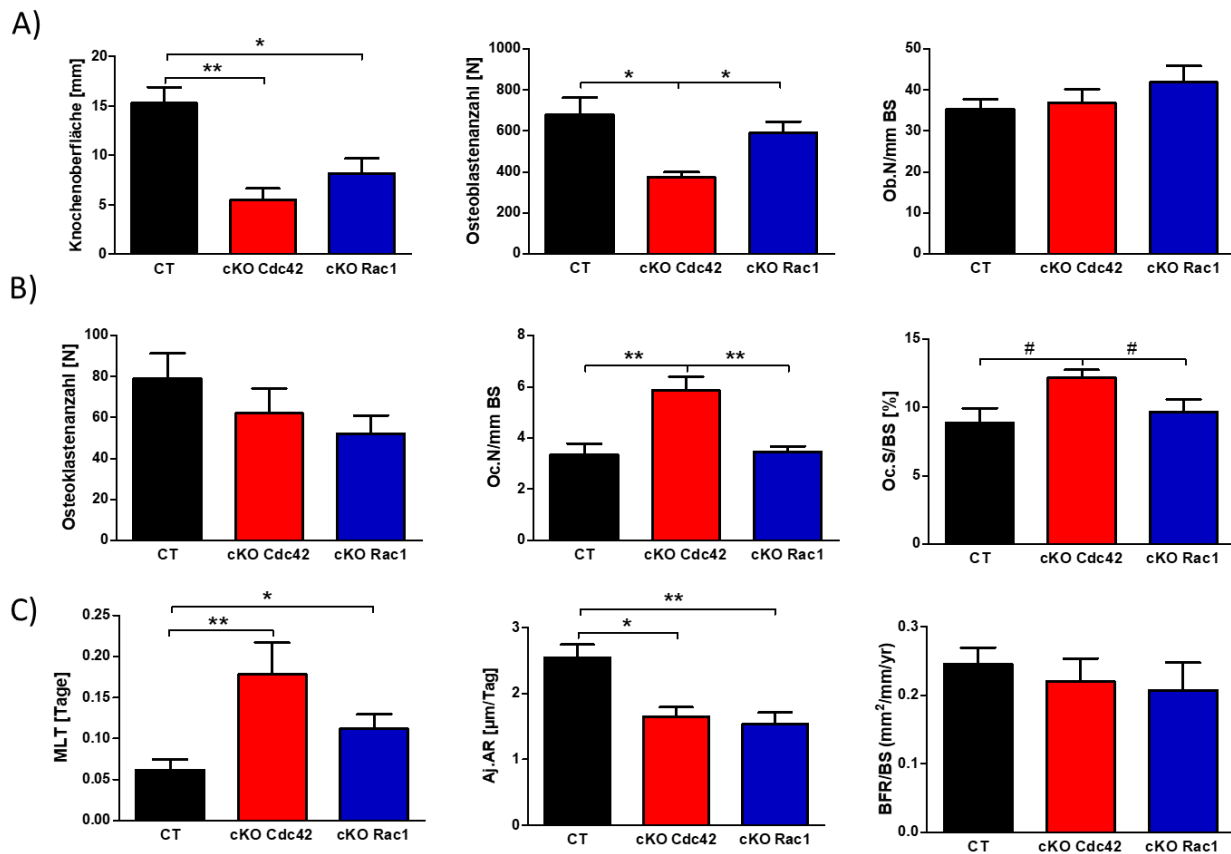
Als erstes wurden die Parameter der *Osx +/+* Knochen ausgewertet um den möglichen Einfluss des Promotors ausschließen zu können. Hierbei zeigte sich, dass der Osterix- Promotor keinen Einfluss auf die Knochenoberfläche und die Anzahl der Osteoblasten oder Osteoklasten hatte, sowie auf die Mineralisierungsrate (Abbildung 43A-C).



#### Abbildung 43: Osterix hat keinen Einfluss auf die histomorphometrischen Parameter

Die Auswertung der dynamischen und statischen Histomorphometrie stellt dar, dass **(A)** die Knochenoberfläche ( $p = 0,2652$ ) und die Anzahl der Osteoblasten ( $p = 0,4499$ ), sowie die Anzahl der Osteoblasten zur Gesamtoberfläche (Ob.N/mm BS;  $p = 0,6704$ ) nicht signifikant verändert waren. **(B)** Die Anzahl der Osteoklasten ( $p = 0,6452$ ), sowie die Anzahl zur Gesamtoberfläche (Oc.N/mm BS;  $p = 0,6535$ ) und die Fläche der Osteoklasten im Verhältnis zur gesamten Knochenoberfläche (Oc.S/BS;  $p = 0,6508$ ) zeigten keine Unterschiede. **(C)** Die Mineralisierungsdauer (MLT, engl.: Mineralization Lag Time;  $p = 0,9920$ ), die Ablagerungsrate von Osteoid (Aj.AR, engl.: Adjusted Apposition rate;  $p = 0,1961$ ) und der Knochenaufbau (BFR/BS; engl.: bone formation rate;  $p = 0,1198$ ) blieben ebenfalls unverändert (CT/Osx:  $n = 4/8$ ).

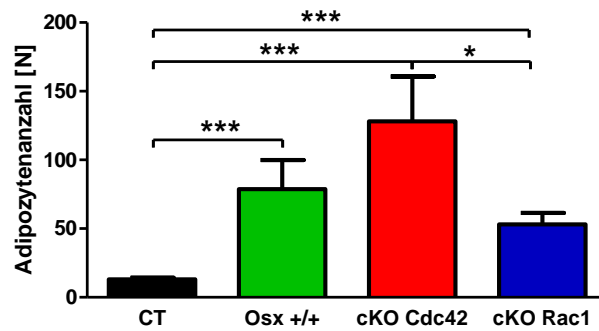
Die Cdc42 und Rac1 cKOs zeigten dagegen eine Verminderung der Knochenoberfläche und bei den Cdc42 cKOs fand sich eine kleinere Osteoblastenzahl. Die Osteoblastenzahl blieb in den cKO Rac1 Schnitten unverändert. Die Anzahl der Osteoblasten im Verhältnis zur gesamten Knochenoberfläche war bei beiden nicht verändert (Abbildung 44A). Die Cdc42 cKO-Mäuse zeigten eine höhere Anzahl an Osteoklasten im Verhältnis zur Gesamtknochenfläche als CT und Rac1 cKO-Tiere. Dies könnte die Abnahme der Spongiosa in den cKO Tibien erklären (Abbildung 44B). Des Weiteren bestätigte die verlangsamte Mineralisierung (MLT) und die Verminderung der Knochenneubildung (Aj.AR) in beiden cKO Modellen eine schlechtere Osteoblastenfunktion, die aber korrigiert zur verminderten Knochenoberfläche nicht mehr signifikant war (BFR/BS; Abbildung 44C).



#### Abbildung 44: Die Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 beeinflusst die Knochenneubildung

Die Auswertung der dynamischen und statischen Histomorphometrie zeigte, dass **(A)** die Knochenoberfläche (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) und die Anzahl der Osteoblasten vermindert waren (\*  $p < 0,05$ , Rac1:  $p = 0,4898$ ). Die Anzahl der Osteoblasten zur Gesamtoberfläche (Ob.N/mm BS; Cdc42:  $p = 0,7403$ ; Rac1:  $p = 0,168$ ) blieb in den cKOs unverändert. **(B)** Die Anzahl der Osteoklasten wurde nicht signifikant vermindert (Cdc42:  $p = 0,4373$ ; Rac1:  $p = 0,1727$ ). Die Osteoklastenzahl im Verhältnis zur Gesamtoberfläche (Oc.N/mm BS) war in den cKO Cdc42 erhöht (\*\*  $p < 0,01$ ), jedoch blieb die Fläche der Osteoklasten im Verhältnis zur gesamten Knochenoberfläche (Oc.S/BS) unverändert (Cdc42: #  $p = 0,0930$ ). **(C)** Bei der Mineralisierungsdauer (MLT) kam es zu einem Anstieg (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ), wohingegen die Ablagerungsrate von Osteoid (Aj.AR) reduziert wurde (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Die Knochenaufbaurrate blieb im Vergleich zu den CTs unverändert (BFR/BS, CT/Cdc42/Rac1:  $n = 10/4/5$ ; Cdc42:  $p = 0,5710$ ; Rac1:  $p = 0,4028$ ).

Wie bereits erwähnt, konnte im Knochenmark der Kontrollmäuse mit dem aktiven Osterix-Promotor und der cKO Cdc42 Tiere vermehrt Adipozyten gesehen werden. Deshalb wurden die Adipozyten ausgezählt und zu den CTs und der Negativkontrolle verglichen (Abbildung 45). Dabei zeigte sich, dass die Negativkontrolle *Osx* +/+, cKO Cdc42 und Rac1 im Vergleich zu den CTs signifikant mehr Adipozyten im Knochenmark besaßen, jedoch nur die Ausschaltung von Cdc42 den Effekt im Vergleich zu der Negativkontrolle *Osx* +/+ verstärkte. cKO Rac1 wies in diesem Fall nicht mehr Adipozyten auf als die *Osx* +/+ Tiere.



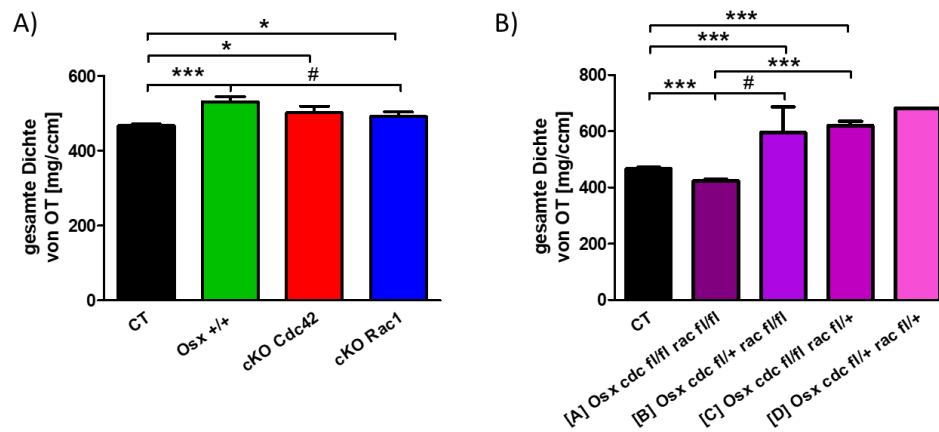
#### Abbildung 45: Adipozytenanzahl im Knochenmark

Die Auszählung der Adipozyten in der Spongiosa ergaben, dass Osx +/+ (CT/Osx:  $n = 14/8$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), cKO Cdc42 (CT/Cdc42:  $n = 14/4$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) und Rac1 (CT/Rac1:  $n = 14/5$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) mehr Adipozyten im Vergleich zu den Kontroll-Tibien besaßen. Nur die Ausschaltung von Cdc42 im Vergleich zu der Negativkontrolle Osx +/+ erhöhte die Adipozytenanzahl, jedoch nicht signifikant (Osx/Cdc42:  $n = 8/4$ ,  $p = 0,2202$ ).

Zusammengefasst zeigen die histomorphometrischen Untersuchungen, dass die Osteoblastenfunktion in den cKO-Tieren beeinträchtigt ist und die Differenzierung der Adipozyten aus den MSCs in Anwesenheit des aktiven Osx-Promotors bzw. der Cre-Rekombinase erhöht ist.

### 3.2.7 Osmiumtetroxid Färbung

Für eine weitere Quantifizierung der Adipozyten im Knochenmark wurde eine Osmiumtetroxid Färbung, welche Lipide schwarz anfärbt, nach der Methode von Scheller (Scheller et al., 2014) durchgeführt. Hierfür wurden Femora, von denen vorher die Knochendichte gemessen wurde, verwendet. Nach der Färbung wurde ebenfalls die gesamte Dichte des Osmiumtetroxid in den Femora mit dem pQCT gemessen und quantifiziert. Auch hier zeigte sich, dass der Anteil von Lipiden sowohl in der Negativkontrolle Osx +/+ als auch in den konditionellen Knockouts von Cdc42 und Rac1 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war (Abbildung 46A). Die doppelte Ausschaltung der beiden RhoGTPasen führte überraschenderweise zu einer Verminderung der Lipideinlagerung. Im Gegensatz zu den heterozygot bzw. teilweise heterozygot ausgeschalteten Mäusen, welche eine Tendenz zur Erhöhung der Osmiumtetroxideinlagerung im Vergleich zu den CTs zeigten (Abbildung 46B).



**Abbildung 46: Konditioneller Knockout mit Osterix-Promotor führt zu einer Erhöhung der Lipide im Knochenmark.** (A) Die Osmiumtetroxid Färbung zeigte einen Anstieg der Lipideinlagerung in den Femora der Negativkontrolle *Osx +/+*, *cKO Cdc42* und *cKO Rac1* im Vergleich zu CT (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/*Osx/Cdc42/Rac1*:  $n = 26/8/11/11$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Die Lipidfärbung der *cKO Rac1* Mäuse war im Vergleich zu der Negativkontrolle *Osx +/+* vermindert (#  $p = 0,0557$ ). (B) Bei einer konditionellen Ausschaltung beider RhoGTPasen *Cdc42* und *Rac1* zeigte sich einer Reduzierung der Lipidfärbung in den Femora (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/[A]:  $n = 26/4$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Waren die RhoGTPasen nur teilweise heterozygot [B]-[C] ausgeschaltet, war die Osmiumtetroxid Färbung erhöht im Vergleich zu CT und der homozygoten Doppelausschaltung (CT/[A]/[B]/[C]:  $n = 26/4/3/3$ ; #  $p = 0,0743$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ).

Damit zeigen die Ergebnisse der Osmiumtetroxideinlagerung, dass durch die konditionelle Ausschaltung mit Hilfe des Osterix-Promotors die Anzahl der Adipozyten und somit der Lipidanteil im Knochenmark anstieg. Die Daten der doppelt homozygot ausgeschalteten RhoGTPasen lassen vermuten, dass die Abwesenheit beider RhoGTPasen dazu führen, dass weder die Osteoblastendifferenzierung noch die Adipogenese stattfinden kann. Sobald eine RhoGTPase teilweise aktiv bleibt scheint dies wiederum die Bildung von Adipozyten im Knochenmark zu fördern.

### 3.2.8 Durchflusszytometrische Analysen der mesenchymalen Stromazellen (MSCs) im Knochenmark

Die Quantifizierung der MSCs im Knochenmark, die sowohl zu Osteoblasten als auch zu Adipozyten differenzieren können erfolgte mit dem Durchflusszytometer und betraf alle Zellen, die für die Oberflächenmarker CD45- Ter119- und Sca-1+ (engl.: stem cell antigen 1) markiert wurden. CD45 negative Zellen sind alle nicht-hämatopoetischen Zellen im murinen Knochenmark. Da die roten Blutzellen im Laufe der Differenzierung den CD45 Marker verlieren wurde der Ter119 Marker zugefügt um diese ebenfalls auszuschließen. MSCs beinhalten unter anderem Zellen, die die Fähigkeit besitzen zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren.

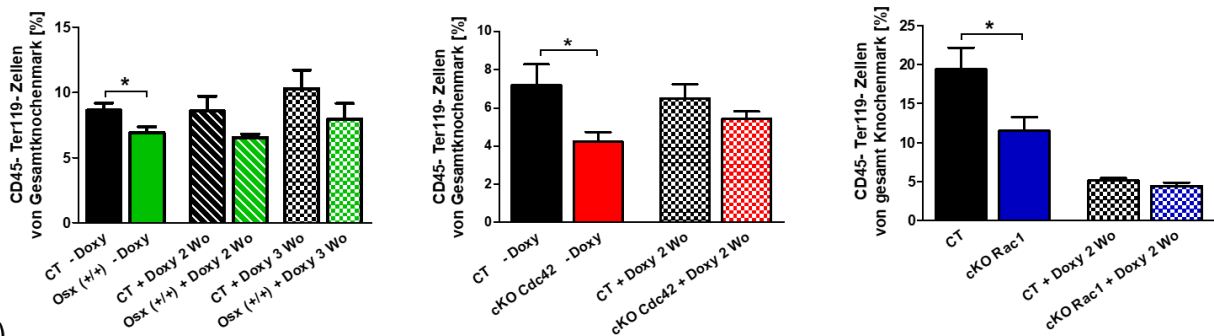
Einem Teil der trächtigen Versuchstiere wurde Doxyzyklin verabreicht. Doxyzyklin ist ein Antibiotikum und führt zu einer Hemmung des Promotors und letztendlich der Cre-Rekombinase-Aktivität. Somit ist der Promotor nicht mehr in der Lage die geflochtenen Gene aus zu schalten. Das Doxyzyklin wurde den trächtigen Versuchstieren ab dem Embryonalstadium E13.5 und nach Geburt weitere zwei Wochen im Trinkwasser verabreicht. Eine Woche vor der Euthanasie, die im Alter von 3 Wochen durchgeführt wurde, wurde das Doxyzyklin (Doxy 2 Wo) abgesetzt, um zu überprüfen, ob die beiden RhoGTPasen trotz allem einen Effekt zeigen, wenn die Cre-Rekombinase für eine Woche aktiv ist. Den Negativkontrollen *Osx +/+* wurde zusätzlich das Doxyzyklin bis zur Tötung (Doxy 3



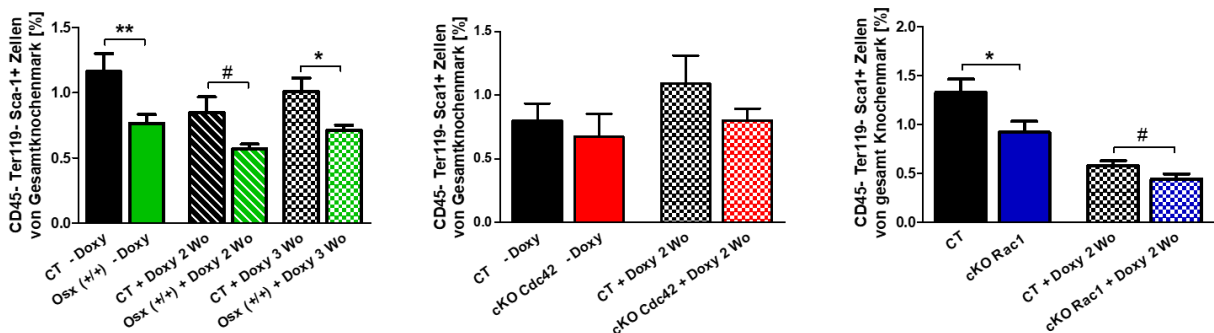
Wo) verabreicht, damit man hier zeigen kann, dass das Doxozyklin die Aktivität der Cre-Rekombinase auch wirklich unterdrückt.

Die Analyse der MSCs zeigte für jeden Genotyp eine Verminderung der mesenchymalen Stromazellen mit den Oberflächenmarker CD45- Ter119- (Abbildung 47A). Die 2-wöchige Zugabe von Doxozyklin hob diesen Effekt in allen Linien vollständig auf. Die Sca-1+ Zellen waren sowohl ohne als auch durch die 2-wöchige bzw. 3-wöchige Doxozyklin-Verabreichung in den Osx +/- reduziert (Abbildung 47B, grün).

A)



B)



#### Abbildung 47: Osx-Promotor beeinträchtigt die mesenchymalen Stromazellen

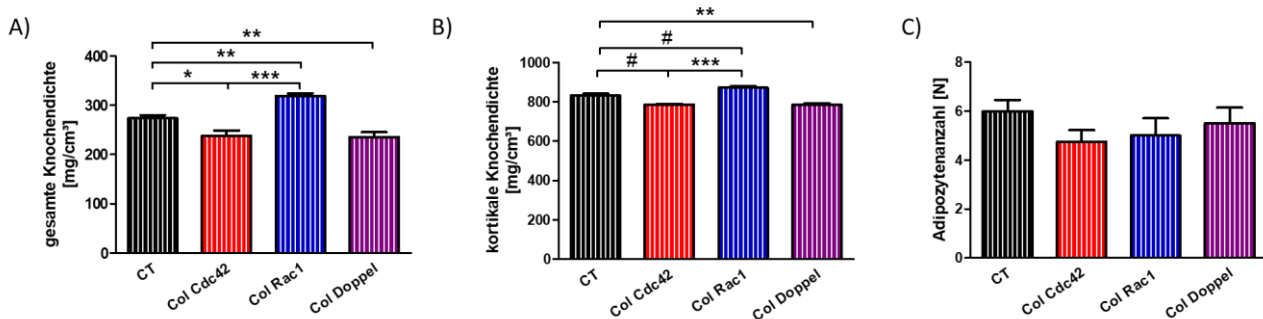
Die Detektion der MSCs mit Hilfe der Oberflächenmarker **(A)** CD45- Ter119- führte in allen Genotypen zu einer Verminderung dieser Vorläuferzellen. Die Doxozyklin-Zugabe verhinderte diesen Effekt. (One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ ; CT/Osx/CT+Doxy 2Wo/Osx+Doxy 2Wo/ CT+Doxy 3Wo/Osx+Doxy 3Wo:  $n = 10/15/8/5/6/6$ , CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy:  $n = 24/25/6/8$ , CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy:  $n = 34/33/11/10$ , \*  $p < 0,05$ ). **(B)** Die Sca-1+ Zellen waren sowohl ohne als auch mit Doxozyklin in den Osx +/- reduziert (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Osx +/-: #  $p = 0,0516$ ).

Zusammengefasst zeigen auch diese Daten, dass der Osx-Promotor bzw. die Cre-Rekombinase die Anzahl der MSCs im Knochenmark vermindert und die RhoGTPasen keinen Einfluss auf die mesenchymalen Stromazellen haben.

### 3.2.9 Col-Cre Promotor hat keinen Einfluss auf die Adipogenese

Osterix wird in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung aktiviert (Zhang, 2010), wie auch hier gezeigt wurde, nämlich während die MSCs sich für einen Differenzierungsweg entscheiden (Abbildung 3 und 47). Um heraus zu finden, ob die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 ebenfalls einen Einfluss auf die Osteoblasten, die bereits mit der Differenzierung begonnen haben, ausüben, wurden konditionelle Knockout-Mäuse, welche unter der Kontrolle des Kollagen- $\alpha 1$  (I) -Promotors (Col) stehen untersucht. Dieser Promotor ist in reifen Osteoblasten und Osteozyten aktiv.

Die Ausschaltung von Cdc42 und beiden RhoGTPasen (Col Doppel) mittels des Col-Promotors verminderte die gesamte und kortikale Knochendichte, wohingegen der Knockout von Rac1 überraschenderweise zu einem Anstieg der Knochendichte führte (Abbildung 48A-B). Es konnten keine Unterschiede der Adipozytenanzahl in den cKO-Tieren im Vergleich zu den CTs im Knochenmark festgestellt werden (Abbildung 48C).



**Abbildung 48: Cdc42 und Rac1 beeinflussen die Knochendichte unter der Kontrolle des Col-Promotors. (A-B)** Die gesamte und kortikale Knochendichte der Femora war in den Col Cdc42 und Col Doppel reduziert, jedoch nicht in den Femora von den Col Rac1 Mäusen, da führte die Ausschaltung zu einer Erhöhung der Knochendichte. (A: One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Cdc42/Rac1/Doppel:  $n = 23/4/6/11$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; B: One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; #1  $p = 0,0599$ ; #2  $p = 0,0539$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). (C) Die Anzahl der Adipozyten blieb in den Col Mäusen im Vergleich zu CT unverändert (CT/Cdc42/Rac1/Doppel:  $n = 8/4/4/4$ ).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Ausschaltung der beiden RhoGTPasen unter der Kontrolle des Col-Promotors zwar einen Einfluss auf die Knochendichte zeigte, allerdings wider Erwartens für Rac1 in gegensätzlicher Richtung. Die Adipogenese wurde durch die Ausschaltung der RhoGTPasen in reifen Osteoblasten im Knochenmark nicht beeinflusst. Dies spricht dafür, dass die Auswirkungen auf die Bildung der Adipozyten im frühen Stadium der Osteoblastendifferenzierung stattfindet.

### 3.2.10 Fazit ex vivo Experimente

Zusammengefasst bestätigen die *ex vivo* Daten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche und zeigen, dass durch die Ausschaltung von Cdc42 und Rac1 mittels des Osterix-Promotors die Osteoblastenfunktion beeinträchtigt ist und somit die Reduzierung der Knochendichte, der Kleinwuchs und die unvollständige Verschließung der Fontanellen an der Schädeldecke erklärt. Des Weiteren war die Anzahl der Adipozyten sowohl in den Osteoblasten-Kulturen als auch im Knochenmark erhöht und die Osteoblastenanzahl bzw. die Aktivität der Osteoblasten beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen den Adipozyten und Osteoblasten während der Knochenentwicklung gibt.

Allerdings ist zu beachten, dass das Cre/loxP System mit dem Osterix-Promotor kein geeignetes Modell für die Untersuchung der Interaktion zwischen Adipozyten und Osteoblasten ist, da alleinig der Osx-Promotor bzw. die Cre-Rekombinase einen Effekt auf die Adipozytenentwicklung im Knochenmark und in Osteoblastenkulturen hatte.

### 3.3 Der Einfluss der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in den MSCs auf die hämatopoetischen Stammzellen

Im Knochenmark befinden sich die hämatopoetischen Stammzellen in sogenannten Nischen deren Zusammensetzung noch unklar ist. Die endostale (osteoblastische) Zellen sollen ein Bestandteil dieser Nische sein und sowohl Osteoblasten als auch vermutlich die Adipozyten können, wie in der Einleitung aufgeführt (siehe 1.3.3 und 1.3.6), die Hämatopoese beeinflussen. Dabei könnten die Integrine und die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Interaktion der Osteoblasten mit Adipozyten und HSCs von Bedeutung sein. Deshalb wurde im nächsten Abschnitt die Hämatopoese in den cKO Cdc42, Rac1-Mäusen und der Negativkontrolle *Osx* *+/+* im Alter von 3 Wochen, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgrund der Ergebnisse von Abschnitt 3.2, dass die *Osx*-GFP::*Cre* Mutation alleine eine Auswirkung auf die Knochenzellen hatte, wurden parallel Mäuse untersucht, welche mit Doxyzyklin behandelt wurden. So sollte wie in Abschnitt 3.2.8 heraus gefunden werden, ob die Effekte der Ausschaltung beider RhoGTPasen echt sind oder nur durch die *Osx*-GFP::*Cre* Mutation verursacht wurden

#### 3.3.1 Durchflusszytometrische Analysen der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark

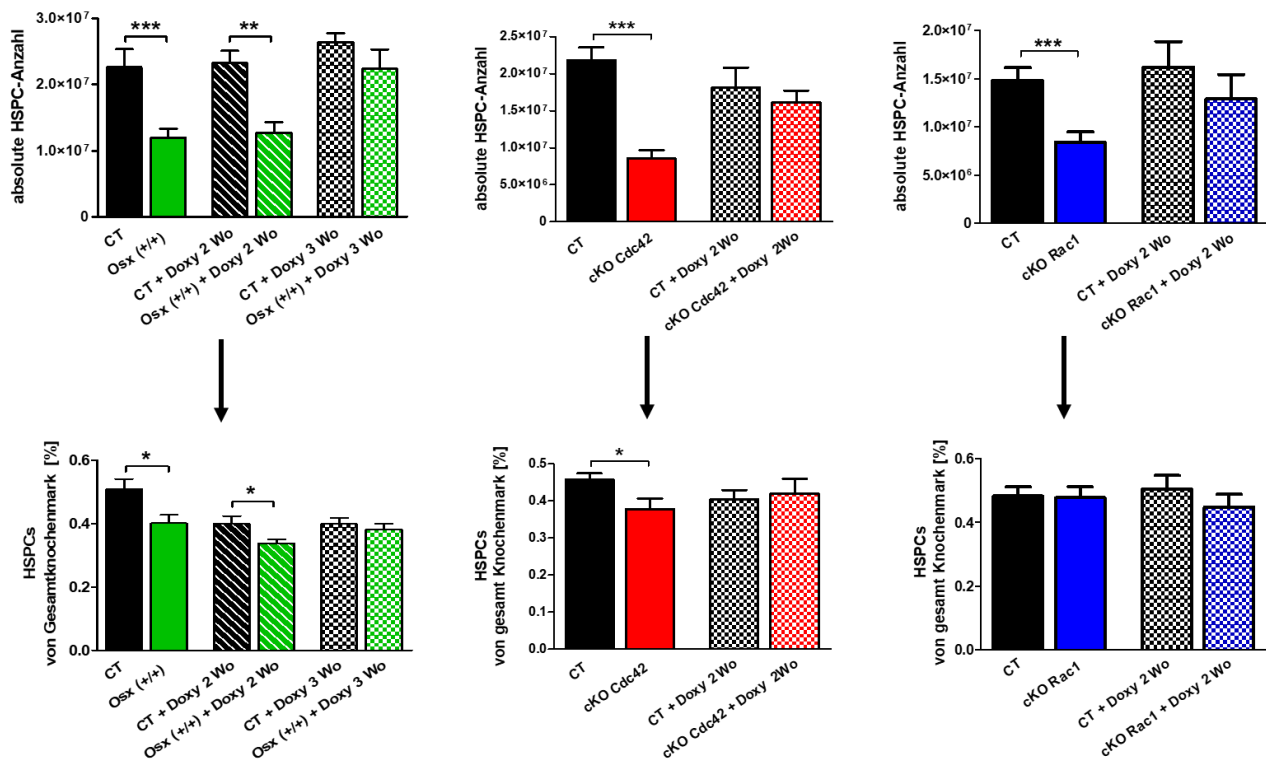
Es wurden die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs; engl.: hematopoietic stem and progenitor cells) mittels der Oberflächenmarker *Sca1* (*Sca1*<sup>+</sup>) und *c-kit* (*c-kit*<sup>+</sup>) nach Ausschluss von den Differenzierungsmarkern *Lineage* (*Lin*<sup>-</sup>) und *CD127* (*CD127*<sup>-</sup>) durchflusszytometrisch überprüft. Mit Hilfe von Oberflächenmarkern an den Zellmembranen können die weiteren Progenitoren in verschiedene Stadien der Differenzierung unterteilt und phänotypisch untersucht werden (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Übersicht über die Oberflächenmarker der hämatopoetischen Stammzellpopulationen

Stammzellstadium	Abkürzung	Oberflächenmarker
Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen	HSPC	<i>Lin</i> <sup>-</sup> <i>CD127</i> <sup>-</sup> <i>Sca1</i> <sup>+</sup> <i>c-kit</i> <sup>+</sup>
Gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen	CLP	<i>Lin</i> <sup>-</sup> <i>CD127</i> <sup>-</sup> <i>Sca1</i> <sup>+</sup> <i>c-kit</i> <sup>+</sup>
Gemeinsame myeloische Vorläuferzellen	CMP	<i>Lin</i> <sup>-</sup> <i>CD127</i> <sup>-</sup> <i>Sca1</i> <sup>+</sup> <i>c-kit</i> <sup>+</sup> <i>CD34</i> <sup>+</sup> <i>CD16/32</i> <sup>-</sup>
Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer	MEP	<i>Lin</i> <sup>-</sup> <i>CD127</i> <sup>-</sup> <i>Sca1</i> <sup>+</sup> <i>c-kit</i> <sup>+</sup> <i>CD34</i> <sup>-</sup> <i>CD16/32</i> <sup>-</sup>
Granulozyten-Makrophagen Vorläufer	GMP	<i>Lin</i> <sup>-</sup> <i>CD127</i> <sup>-</sup> <i>Sca1</i> <sup>+</sup> <i>c-kit</i> <sup>+</sup> <i>CD34</i> <sup>+</sup> <i>CD16/32</i> <sup>+</sup>

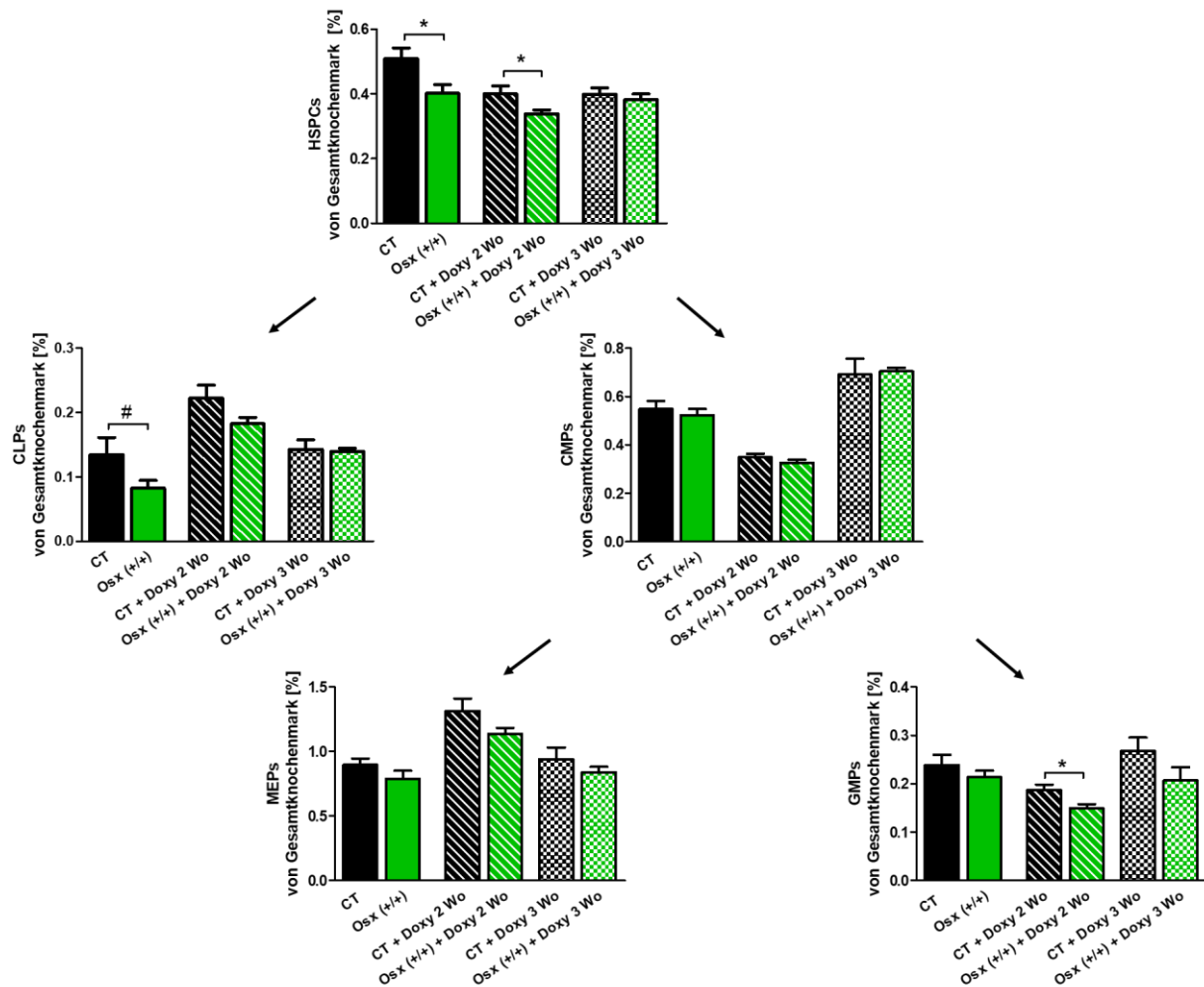
Des Weiteren ist zu beachten, dass nur der prozentuale Anteil der positiven Zellen im Knochenmark gewertet wurde. Die cKO Mäuse und die Negativkontrolle *Osx* *+/+* waren im Vergleich zu den CT Mäusen kleiner und hatten somit weniger Zellen (Abbildung 49).





**Abbildung 49: Vergleich absolute HSPC Anzahl zu prozentual positiver Zellen der HSPCs vom gesamten Knochenmark.** Die Abbildung soll zeigen, dass die absolute Anzahl der HSPCs in den cKOs (oben) immer reduziert war im Vergleich zu den CTs, da die cKOs immer kleiner waren und weniger Zellen hatten. Wohingegen die prozentuale Veränderung der HSPCs (unten) aus dem gesamten Knochenmark das relative Verhältnis der HSPCs der cKOs im Vergleich zu den CTs zeigte.

Als nächstes wurde die Negativkontrolle *Osx +/+* analysiert (Abbildung 50). Die Gabe von Doxyzyklin korrigierte nicht nur die HSPCs, sondern auch die CLPs (Abbildung 51). Die Anzahl der CLPs verminderte sich bei der Anwesenheit des *Osx*-Promotors ohne Doxyzyklin ebenfalls, während bei der Doxyzyklin-Verabreichung keinen Unterschied mehr zu finden war. Die CMPs und somit auch die MEPs und GMPs waren in den *Osx +/+* Mäusen unverändert.

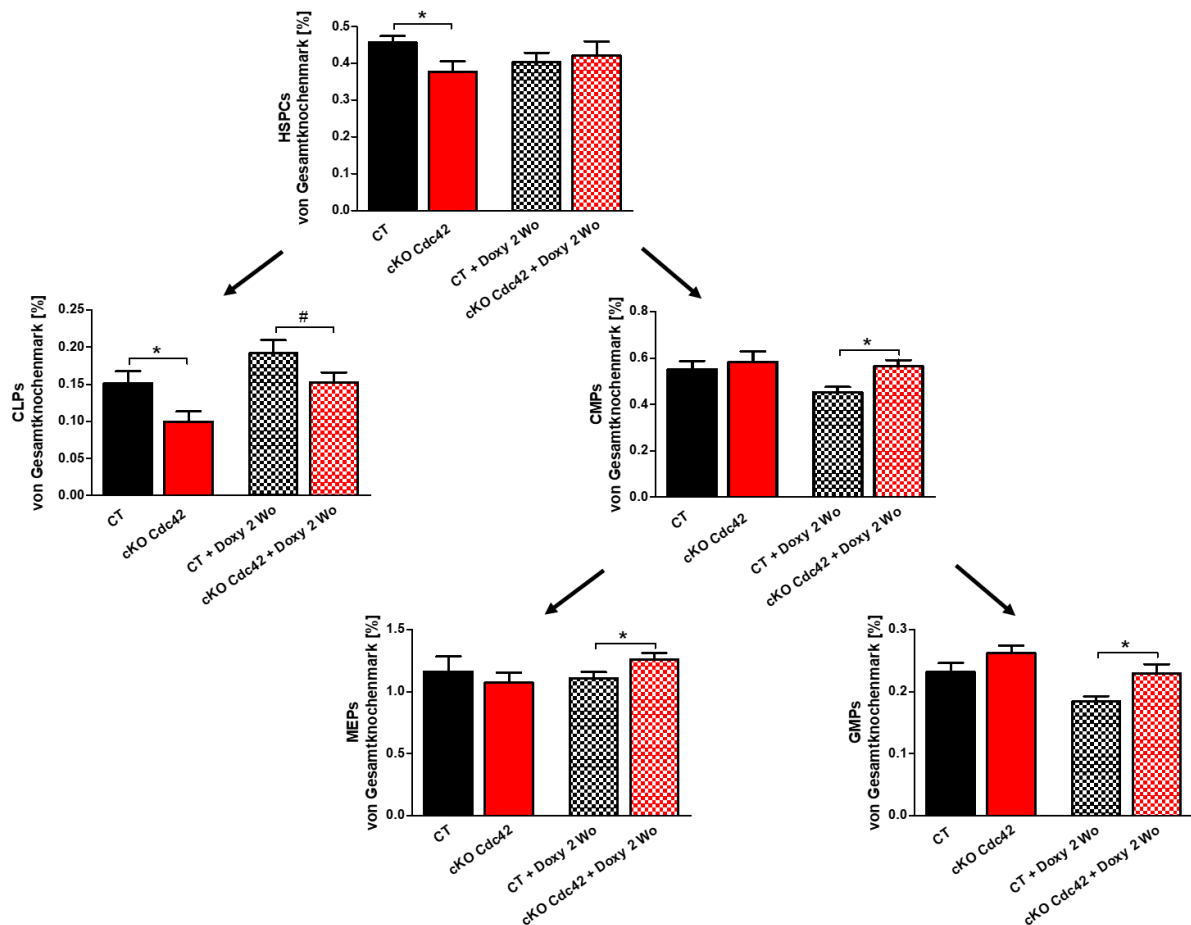


### Abbildung 50: Osx-Promotor beeinflusst die HSPCs Population im Knochenmark

Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte in den Negativkontrollen Osx +/+ sowie in den Mäusen mit Doxyzyllinzugabe eine prozentuale Verminderung der HSPCs im Vergleich zu den CTs (CT/Osx/CT+Doxy 2Wo/Osx+Doxy 2Wo/CT+Doxy 3Wo/Osx+Doxy 3Wo: n = 10/15/6/6/8/5; \* p<0,05). Jedoch wurde dieser Effekt durch die durchgängige Zugabe von Doxyzyklin verhindert. Die CLPs waren ebenfalls reduziert (# p=0,0574), während die 3-wöchigen Doxyzyklin-Verabreichung keinen Unterschied aufwies. Die CMPs, MEPS und GMPs waren in den Osx +/+ Mäusen unverändert.

Diese Daten lassen vermuten, dass der Osterix-Promotor einen Einfluss auf die Hämatopoese hat und die HSPCs und gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs) bereits ausschließlich in Anwesenheit der aktivierten Cre-Rekombinase vermindert sind. Aufgrund der Beeinflussung der HSPCs durch die aktive Cre-Rekombinase in den MSCs (Abbildung 49B und 50) konnten die Daten, in denen der Osx-Promotor aktiv in den MSCs war, nicht weiter für Rückschlüsse auf die Funktion der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in den MSCs verwendet werden. Im Folgenden wurden deshalb zwar alle Ergebnisse gezeigt, aber nur die Ergebnisse mit der Doxyzyklinverabreichung näher betrachtet.

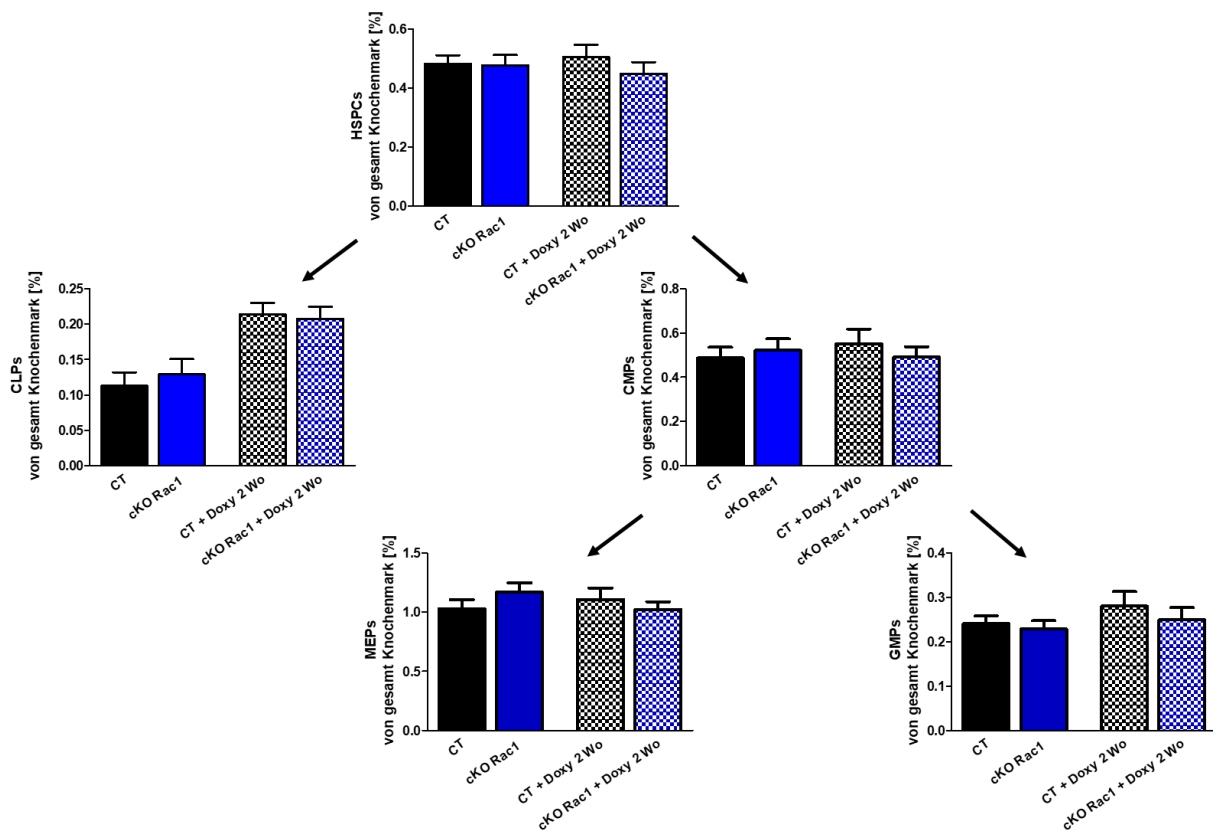
Als nächstes wurde das Knochenmark der drei Wochen alten cKO Cdc42 und Rac1-Mäuse durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten in den Cdc42 cKOs keine prozentuale Verminderung der HSPCs im Vergleich zu den CTs. Der prozentuale Anteil der CLPs war mit der 2-wöchigen Doxyzyklin-Zugabe vermindert. Interessanterweise zeigte die Abwesenheit von Cdc42, dass die CMPs und somit auch die MEPS und GMPs anstiegen (Abbildung 51, Doxy 2Wo).



### Abbildung 51: Die Ausschaltung von Cdc42 beeinflusst die HSPCs

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine Verminderung der HSPCs und CLPs in den cKO Cdc42 im Vergleich zu den CTs (One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ ; CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy:  $n = 29/29/6/8$ , \*  $p < 0,05$ ), wohingegen durch die Zugabe von Doxyzyklin keine Unterschiede zu erkennen waren. Allerdings führte eine 2-wöchige Zugabe von Doxyzyklin in den cKO Cdc42 zu einem Anstieg der CMPs, MEPs und GMPs (\*  $p < 0,05$ ).

Die Abwesenheit von Rac1 hatte keinen Einfluss auf die HSPCs oder die weiteren Entwicklungsstadien im Vergleich zu den CTs (Abbildung 52).



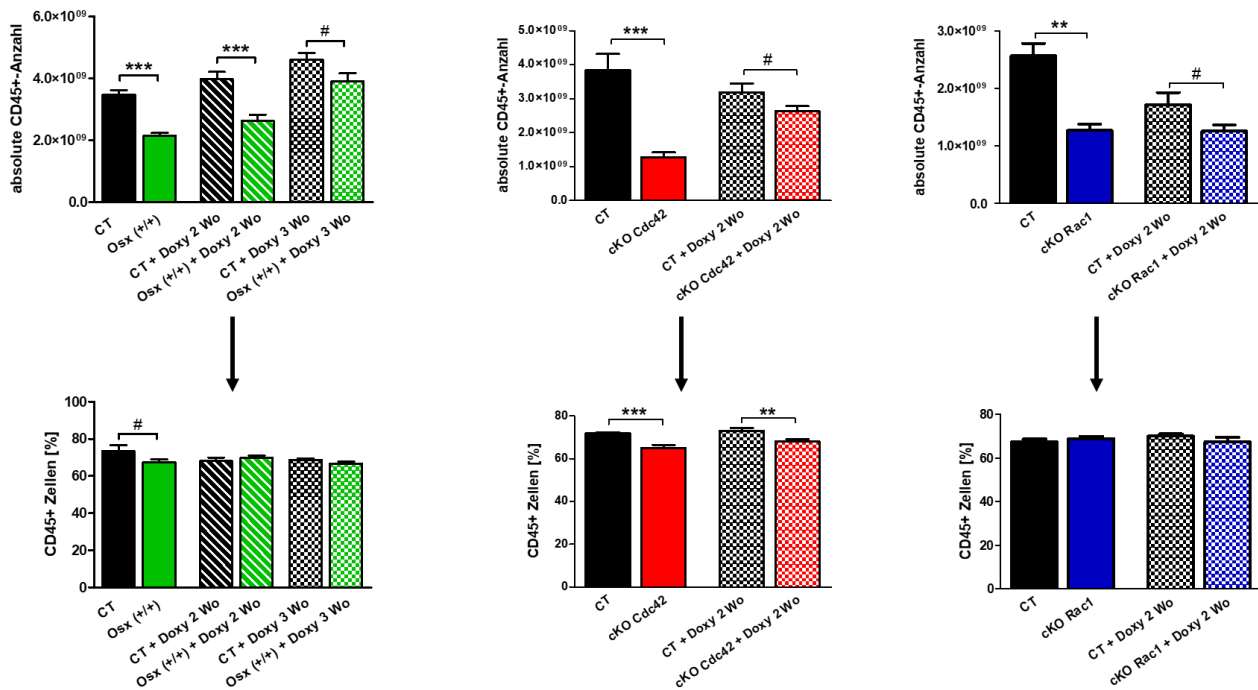
#### Abbildung 52: Rac1 Knockout hat keinen Einfluss auf die hämatopoetischen Progenitoren

Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte in den cKO Rac1-Mäusen keinen Einfluss auf die HSPCs in Ab- und Anwesenheit von Doxyzyklin (CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy: n = 34/33/11/10). Des Weiteren konnten keine Effekte auf die nachfolgenden Stammzellpopulationen CLPs und CMPs durch die Abwesenheit von Rac1 quantifiziert werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Ausschaltung von Cdc42 zu einer Erhöhung der CMPs, MEPs und GMPs führt.

### 3.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen im Knochenmark

Als nächstes wurden die verschiedenen hämatopoetischen Zellen quantifiziert. Auch hier war zu beachten, dass nur der prozentuale Anteil der positiven Zellen im Knochenmark gewertet wurde, da die absolute Anzahl der CD45+ Zellen (Abbildung 53) wegen des Kleinwuchs der transgenen Mäuse immer vermindert war (siehe Abbildung 39, 40A und 49). Tatsächlich zeigten alle Genotypen zumindest einen Trend zur Verminderung der absoluten Anzahl, jedoch keine Veränderungen im Prozentsatz.

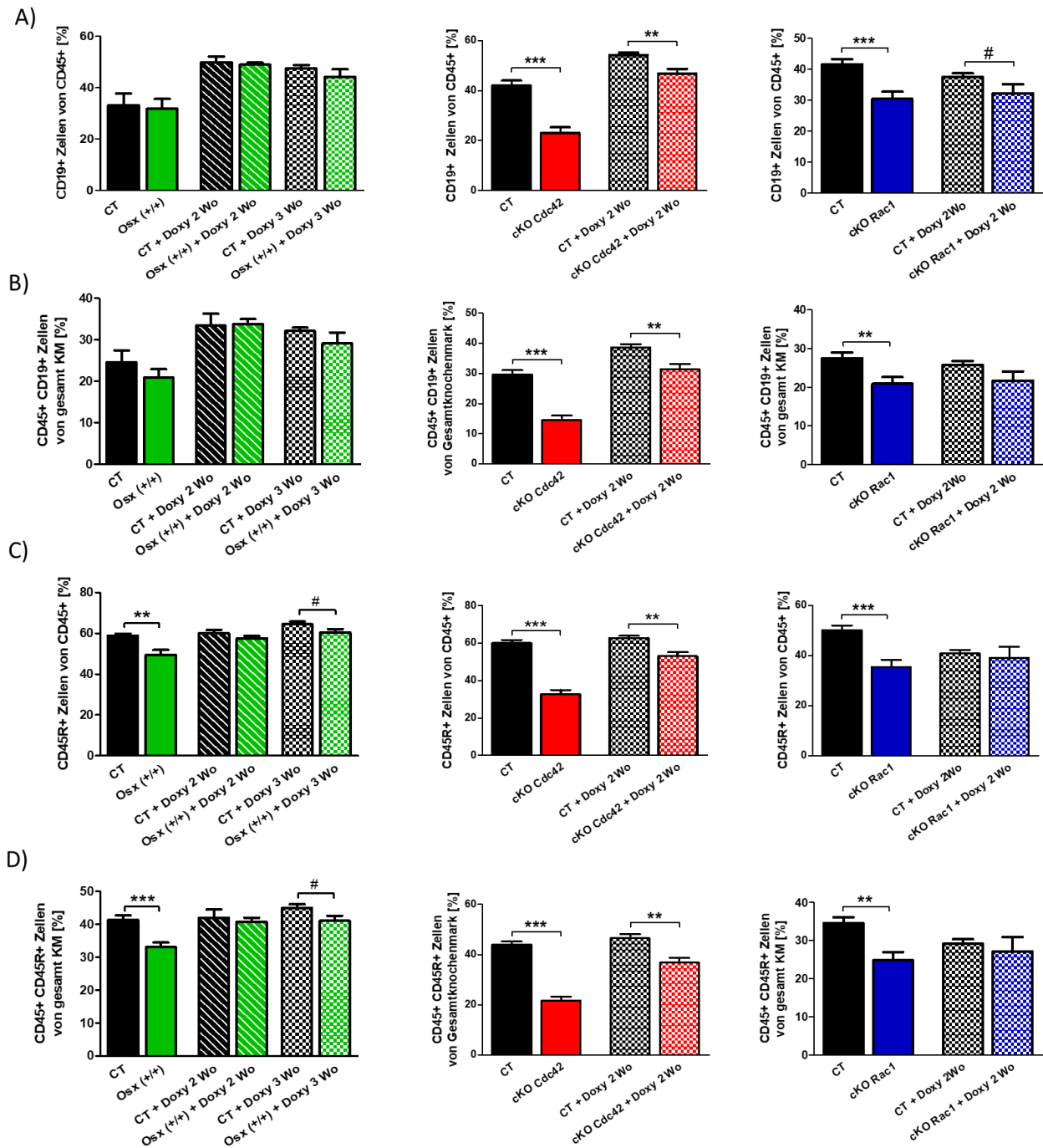


**Abbildung 53: Vergleich absolute Anzahl der CD45+ Zellen zu prozentual CD45+ Zellen vom gesamten Knochenmark.** Die absolute Anzahl der CD45+ Zellen zeigte in den cKOs (oben) eine Verminderung im Vergleich zu den CTs, da die cKOs aufgrund ihres Kleinwuchses weniger Zellen hatten (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Osx/CT+Doxy 2Wo/Osx+Doxy 2Wo/ CT+Doxy 3Wo/Osx+Doxy 3Wo:  $n = 16/21/12/12/16/10$ , #  $p = 0,0528$ ; CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy:  $n = 48/44/11/14$ ; #  $p = 0,0748$ ; CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy:  $n = 30/39/22/20$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Wohingegen die prozentuale Bestimmung der CD45+ Zellen im Knochenmark in den Osx +/+ und cKO Cdc42 im Vergleich zu CT vermindert war (CT/Osx+/+: #  $p = 0,0748$ ; CT/Cdc42: \*\*\*  $p < 0,005$ ). Bei Zugabe von Doxyzyklin waren die CD45+ Zellen in den cKO Cdc42 weiterhin reduziert (\*\*  $p < 0,01$ ).

Damit zeigen die Ergebnisse, dass die aktive Cre-Rekombinase einen Einfluss auf die absolute Anzahl der CD45+ Zellen, jedoch nicht auf den prozentualen Anteil hat, und dass die Abwesenheit von Cdc42 den prozentualen Anteil der CD45+ Zellen vermindert.

### Analyse der Zellen mit Oberflächenmarkern für B-Zellen im Knochenmark

Im Knochenmark entstehen und bilden sich die Immunzellen aus. Sowohl die B- als auch die T-Zellen wurden evaluiert. Die B-Zellen wurden mittels der Oberflächenmarker CD19 und CD45R (B220) im Verhältnis zu den CD45+ Zellen und im Verhältnis zum Gesamtknochenmark überprüft. Dabei war zu beachten, dass der Oberflächenmarker CD45R (B220) nicht nur auf B-Zellen exprimiert wird, sondern zum Teil auch auf Untergruppen von T-Zellen vorhanden ist. Dabei waren die B-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD19 nur in den Cdc42 cKO Mäusen vermindert (Abbildung 54, rot/+Doxy 2Wo). Die Negativkontrolle Osx +/+ und cKO Rac1 wiesen keine Veränderungen in den B-Zellen auf (Abbildung 54, grün/ blau).



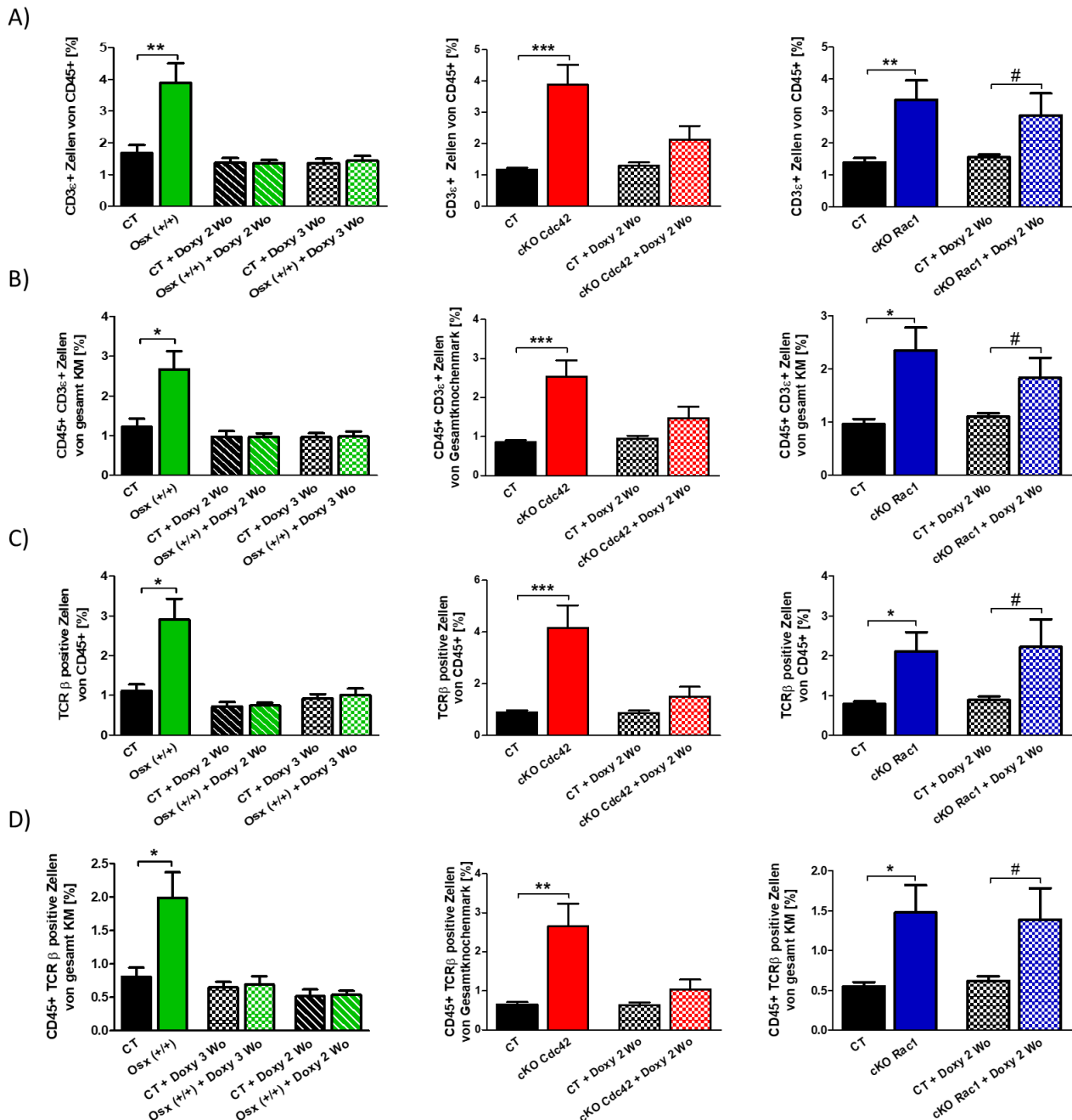
**Abbildung 54: Die RhoGTPase Cdc42 beeinflusst die CD19+ Zellen**

Die Detektion der CD19+ Zellen zeigte nur in den Cdc42 cKO Mäusen eine Reduzierung dieser Zellen in Anwesenheit von Doxyzyklin in den im Verhältnis zu **(A)** den CD45+ Zellen und **(B)** dem Gesamtknochenmark (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy:  $n = 24/25/6/8$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Die Negativkontrolle Osx +/+ führte zu keinen Veränderungen bei den CD19+ Zellen (grün). **(C-D)** Des Weiteren waren die CD45R+ Zellen in den Osx +/+ und cKO Cdc42 vermindert (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Osx/CT+Doxy 2Wo/Osx+Doxy 2Wo/CT+Doxy 3Wo/Osx+Doxy 3Wo:  $n = 8/11/6/6/8/5$ ; C#  $p = 0,0832$ , D#  $p = 0,0644$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Anwesenheit von Cdc42 in den MSCs bzw. Osteoblasten fördernd für die B-Zelldifferenzierung ist.

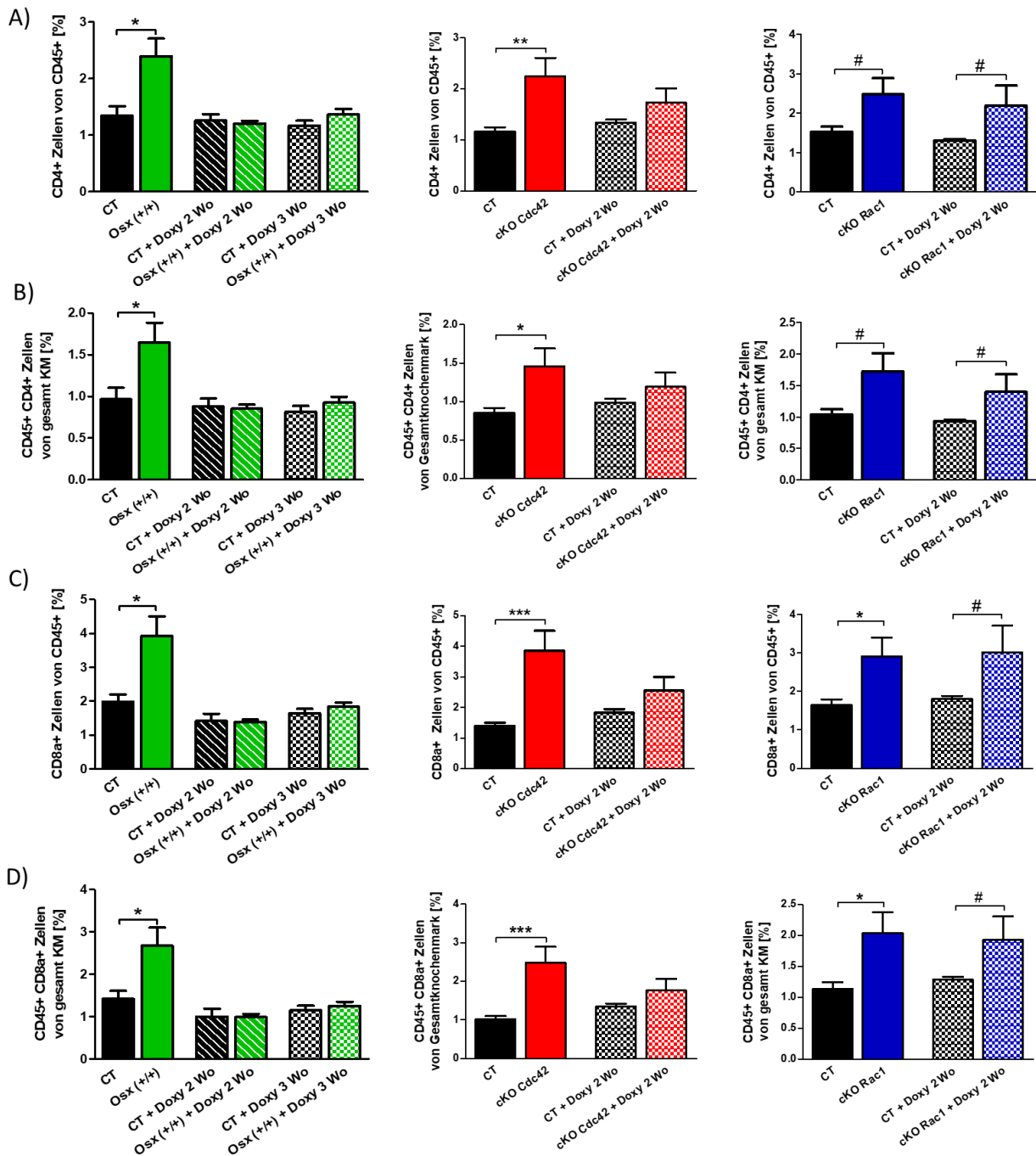
### Untersuchung der Zellen mit Oberflächenmarkern für T-Zellen im Knochenmark

Untersucht wurden T-Zellen mit den Oberflächenmolekülen CD3 $\epsilon$  und der T-Zell-Rezeptor (TCR)  $\beta$ , diese beiden sind Proteine des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und auf frühen Stadien der  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zellen exprimiert (Murphy et al., 2014), und die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8a, welche sogenannte Corezeptormoleküle sind und auf reiferen T-Zellen vorkommen. Besonders auffällig war, dass in den Rac1 cKO-Mäusen ein Trend zur Erhöhung der verschiedenen Zellen, die T-Zellmarker exprimieren, vorhanden war, während in den Negativkontrollen Osx +/+ und cKO Cdc42 Mäusen keine Veränderungen zu finden waren (Abbildung 55 A-D und 56 A-D; CT/Rac1+Doxy: # p<0,10).



**Abbildung 55: RhoGTPase Rac1 beeinflusst die Thymozytensubpopulation mit den Oberflächenmarkern CD3 $\epsilon$  und TCR $\beta$ .** (A-D) Die durchflusszytometrische Analyse der Thymozytensubpopulationen zeigte in den cKO Rac1 Mäusen für CD3 $\epsilon$ + und TCR $\beta$ + Zellen im Verhältnis zu den CD45+ Zellen (A+C) und dem Gesamtknochenmark (B+D) eine Erhöhung in Gegenwart von Doxyzyklin (One-way-ANOVA: \*\*\* p<0,005; CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy: n=13/18/11/10; \* p<0,05, \*\* p<0,01; A: # p=0,0592; B: # p=0,0599; C: # p=0,0580; D: # p=0,0546).





**Abbildung 56: RhoGTPase Rac1 beeinflusst die T-Zellsubpopulation mit den Oberflächenmarkern CD4 und CD8a. (A-D)** Die durchflusszytometrische Analyse der Subpopulation von T-Zellen, welche die Oberflächenmarkern CD4 und CD8a exprimieren, zeigte in den Rac1 cKOs im Verhältnis zu den CD45+ Zellen **(A+C)** und dem Gesamtknochenmark **(B+D)** eine Erhöhung in Anwesenheit von Doxyzyklin (CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy: n = 15/20/11/10; A: # p=0,0591, # p=0,0864; B: # p=0,0537, # p=0,0966; : # p=0,0823; D: # p=0,0912; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,005).

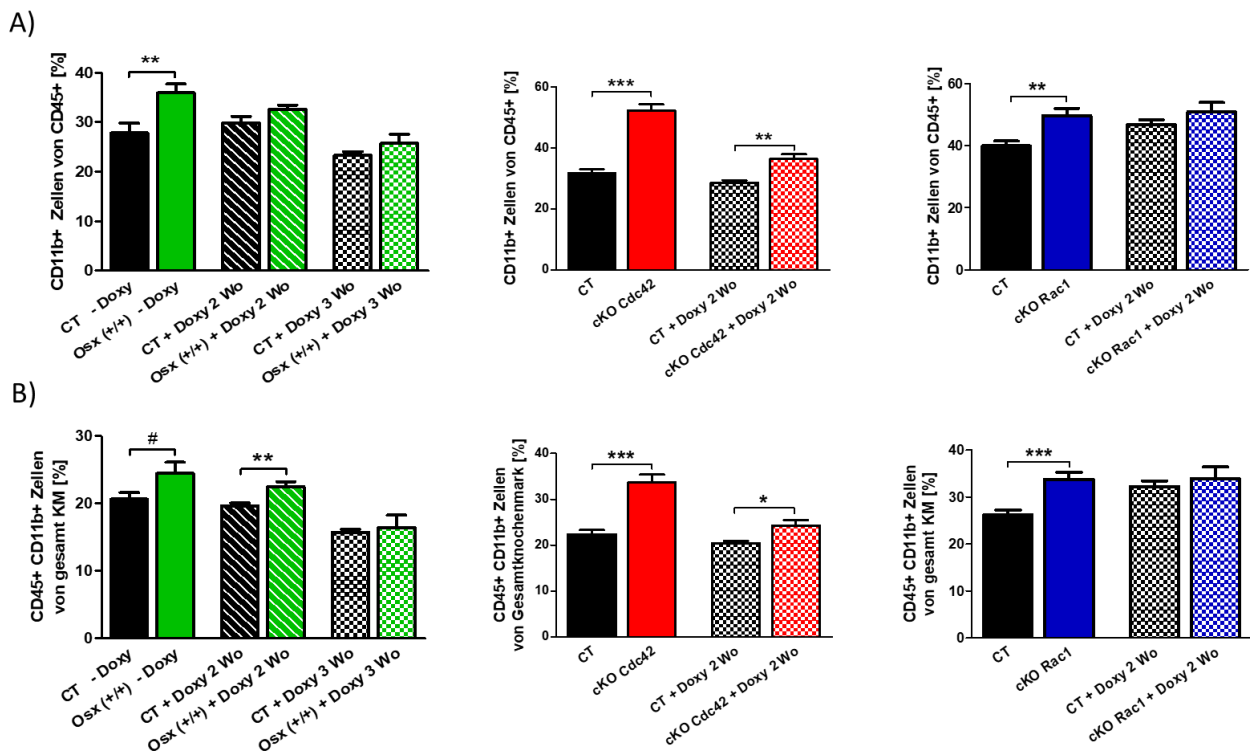
Die Daten lassen somit vermuten, dass die Abwesenheit von Rac1 die T-Zellanzahl im Knochenmark beeinflussen könnte. Jedoch war keines der Ergebnisse statistisch signifikant.

### Untersuchung der myeloischen Vorläuferzellen (CMPs) im Knochenmark

Zuletzt wurden die myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark mittels des Oberflächenmarkers CD11b der myeloischen Zellen im Knochenmark kennzeichnet.



Passend zu der Erhöhung der GMPs in den Cdc42 cKO Mäusen (Abbildung 51) konnte eine Erhöhung der myeloischen Zellen im Knochenmark der Cdc42 cKOs nachgewiesen werden, welche nicht auf den Osx-Promotor zurück zu führen und ebenfalls nicht in den Rac1 cKOs Mäusen vor zu finden war (Abbildung 57).



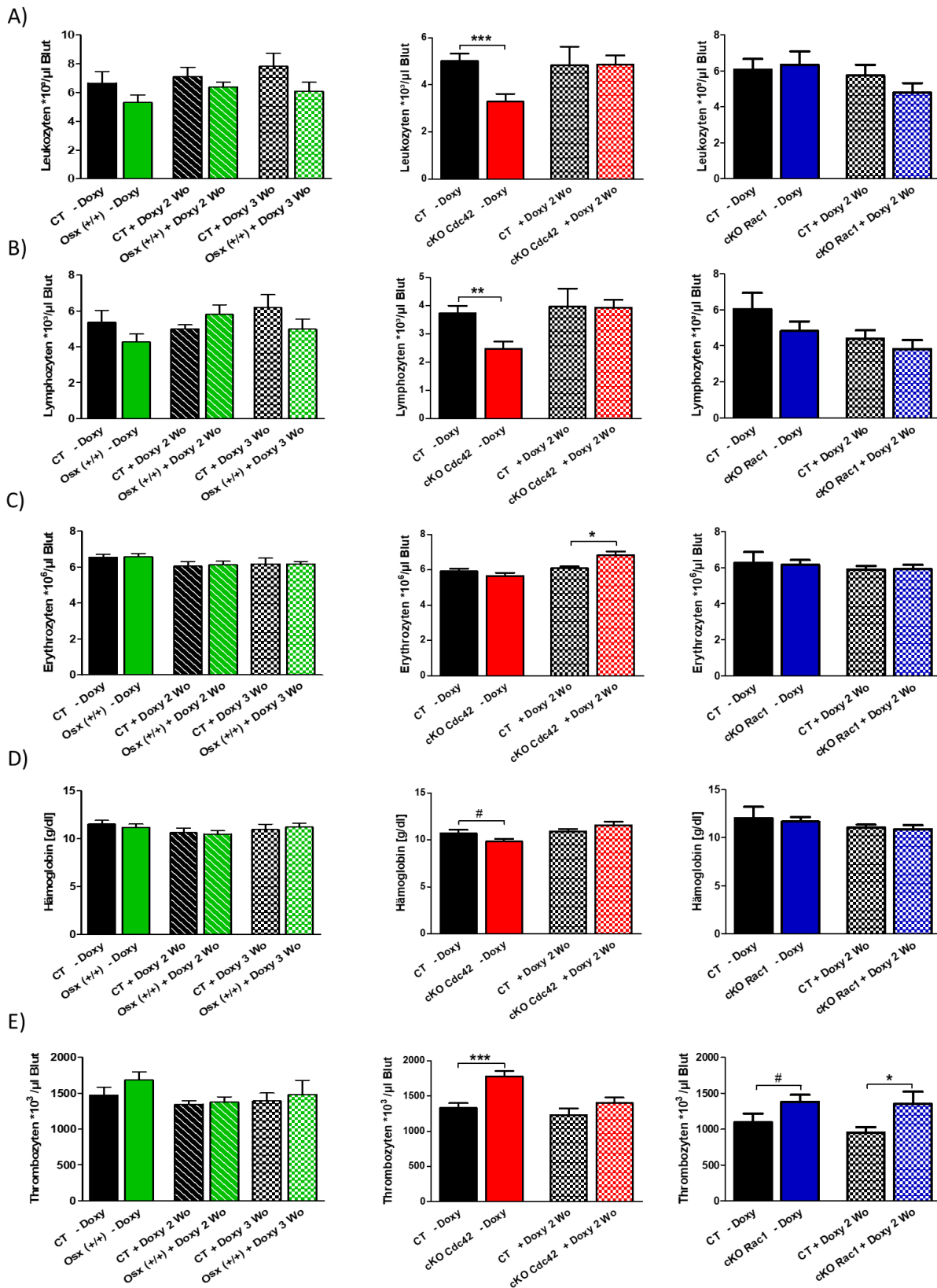
### Abbildung 57: Die Osx-Promotor erhöht die myeloischen Vorläuferzellen

Die Detektion der CD11b+ Zellen zeigte in allen Genotypen eine Erhöhung dieser Vorläuferzellen in Abwesenheit von Doxyzyklin im Verhältnis zu den CD45+ Zellen (A) und dem Gesamtknochenmark (B) (One-way ANOVA: \*\*\*  $p < 0,005$ ; CT/Osx/CT+Doxy 2Wo/Osx+Doxy 2Wo/CT+Doxy 3Wo/Osx+Doxy 3Wo:  $n = 8/11/6/6/8/5$ , #  $p = 0,0809$ ; CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy:  $n = 24/22/6/8$ ; CT/Rac1/CT+Doxy/Rac1+Doxy:  $n = 15/19/11/10$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ). Die Negativkontrolle Osx +/+ (grün) führte zu einem Anstieg bei den CD11b+ Zellen, die 3-wöchige Zugabe von Doxyzyklin korrigierte diesen Effekt. In den cKO Cdc42 stieg auch in Gegenwart von Doxyzyklin die Anzahl der CD11b+ Zellen an.

Zusammenfassend, erhöht die Abwesenheit von Cdc42 die myeloische Zelldifferenzierung.

### 3.3.3 Analyse von zirkulierenden Blutzellen in den cKO-Mäusen

Zuletzt wurden die Blutzellen in der Zirkulation mittels des Hämatologie-Systems CELL-DYN Emerald analysiert. Die Untersuchung des peripheren Blutes zeigte in den Negativkontrollen Osx +/+ weder ohne noch mit Doxyzyklin Zugabe signifikante Unterschiede (Abbildung 58A-D, grün). Im Gegensatz zu den Osx +/+ Mäusen führte der konditionelle Knockout von Cdc42 zu einem Effekt auf die peripheren Blutzellen (Abbildung 58, rot), welche eine Erhöhung der Erythrozyten im Vergleich zu den CTs aufwiesen. Dies ist vereinbar mit der Erhöhung der MEPs (Abbildung 51). Die Ausschaltung von Rac1 (Abbildung 58, blau) zeigte wiederum keinen Effekt auf die Blutzellen in der Peripherie, bis auf eine Erhöhung der Thrombozyten. Dies war in Anbetracht der nicht veränderten MEPs in den Rac1 cKO Tieren jedoch nicht zu erwarten (Abbildung 52).



**Abbildung 58: Analyse der Blutzellen in der Peripherie**

Die Blutanalyse in der Peripherie wurde mit dem Hämatologie-System CELL-DYN Emerald durchgeführt und zeigte weder in den Mäusen mit aktiven noch mit inaktiven Osx-Promotor (grün) Unterschiede in den Leukozyten (A), Lymphozyten (B), Erythrozyten (C) und Thrombozyten (D) (CT/Osx/CT+Dox/Osx+Dox: n = 13/18/8/5). Die Cdc42 Ausschaltung (rot) führte zu einer Erhöhung der Erythrozyten im Vergleich zu den CTs (One-way ANOVA: \*\* p<0,01; CT/Cdc42/CT+Doxy/Cdc42+Doxy: n = 24/24/6/8, \* p<0,05). Der konditionelle Knockout von Rac1 (blau) zeigte, bis auf eine nur Erhöhung in den Thrombozyten, keine Veränderungen im peripheren Blutbild (CT/Rac/CT+Doxy/Rac+Doxy: n = 19/29/11/9, # p=0,0698, \* p<0,05).

Damit hatte die alleinige Anwesenheit des Osterix-Promotors und der Cre-Rekombinase keine relevante Auswirkung auf die peripheren Blutzellen. Die homozygote Ausschaltung von Cdc42 führte allerdings zu einer Erhöhung der Erythrozyten und der cKO von Rac1 zu einer Erhöhung der Thrombozyten.

### **3.3.4 Fazit Untersuchungen der Hämatopoese**

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass durch die Ausschaltung von Cdc42 mittels des Osterix-Promotors die Hämatopoese im Knochenmark beeinflusst wird. Die erhöhte CMPs und MEPs führten letztendlich zu einer Erhöhung der Erythrozyten, während die erhöhte CMPs und GMPs die Myelopoese stimulierten.

Im Gegensatz dazu, könnte die Abwesenheit der RhoGTPase Rac1 in Stromazellen die T-Zellbildung möglicherweise beeinträchtigen. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die signifikante Erhöhung in den Thrombozyten war nicht auf eine veränderte Blutbildung zurückzuführen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Relevanz der Adipogenese im Knochenmark

Adipozyten sind wichtige Regulatoren des Energiestoffwechsels und werden in verschiedene Klassen unterteilt. Dazu gehören Adipozyten des weißen und braunen Fettgewebes sowie des Knochenmarkfetts (Scheller and Rosen, 2014). Weißes Fettgewebe speichert die Energie und reguliert über die Sekretion von Adipokinen den Fettstoffwechsel. Das braune mitochondrien-reiche Fettgewebe dient zur Umwandlung von Energie in Wärme. Das subkutane Depot stellt ca. 85 % des gesamten Fettgewebes dar und beinhaltet vor allem weißes Fett, wohingegen das braune Fett in kleinen Depots verteilt vorliegt (Hardouin et al., 2016b). Das Knochenmarkfett beträgt nur ca. 5 % des Fettdepots im Körper.

Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Knochenmarkadipozyten und dem restlichen Fettgewebe können Aufschlüsse über die Funktionen dieser Zellen geben. Eine erhöhte Anzahl der Adipozyten im Knochenmark korreliert nicht mit dem Gewicht und Körperfettanteil, was durch das Krankheitsbild Anorexia nervosa bestätigt werden kann (Ecklund et al., 2010; Justesen et al., 2001). Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Gewicht der konditionellen Cdc42 und Rac1 Knockout-Mäuse (cKO) unabhängig von der Adipozytenanzahl im Knochenmark ist. Diese Mäuse waren kleinwüchsig und aufgrund der skelettalen Deformationen am Kopf vermutlich meist unterernährt (Abbildung 38-39) und wiesen trotz allem eine erhöhte Anzahl von Adipozyten im Knochenmark auf (Abbildung 45). Knochenmarkadipozyten sind im gesamten Knochenmark verstreut und besitzen andere Fettsäurenkomponenten als das subkutane Fettgewebe (Griffith et al., 2009; Hardouin et al., 2014). Vereinbar mit diesen Literaturangaben konnte in Abbildung 42 gezeigt werden, dass in Knochenschnitten die Adipozyten überall im Knochenmark verteilt waren.

Bei der Differenzierung der Adipozyten im Knochenmark oder bei anderem Fettgewebe wird eine gemeinsame Signalkaskade aktiviert, in denen die Moleküle DLK1, C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$  und FABP4 eine elementare Rolle spielen. Zum Teil sind die frühen Adipozytenmarker DLK1 und C/EBP $\beta$  in den Knochenmarkadipozyten stärker und der PPAR $\gamma$  und FABP4 schwächer exprimiert als in Zellen des allgemeinen Fettgewebes (Gregoire et al., 1998; Liu et al., 2011). Allerdings steigt die Expression von PPAR $\gamma$  im Knochenmark im Alter an, was auch in anderen Fettgeweben der Fall ist. Damit ist die Untersuchung des Adipozytenmarkers PPAR $\gamma$  im Knochenmark vielversprechend für weitere Erkenntnisse, um dies auch auf das systemische Fettgewebe reproduzieren zu können. Im Abschnitt 3.1.9 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  durch unterschiedliche Faktoren anstieg und die Osteogenese dabei gehemmt wurde.

Adipozyten und Osteoblasten stammen im Knochenmark von multipotenten Progenitorzellen, den sogenannten mesenchymalen Stammzellen, ab. Nur ein kontrollierter Differenzierungsprozess dieser Zellen gewährleistet die Stabilität und hält die Funktion eines gesunden Knochens aufrecht (Florencio-Silva et al., 2015). Das Altern und unterschiedlichste Krankheitsbilder, wie Anorexia nervosa, Diabetes mellitus, Osteoporose und Fettleibigkeit zeigen einen Zusammenhang zwischen den mesenchymalen Stromazellen (MSCs) des Knochenmarks, den Adipozyten und Osteoblasten, unabhängig von dem subkutanem Fettgewebe (Belaid-Choucair Zakia et al., 2008; Ecklund et al., 2010; Hardouin et al., 2014). Des Weiteren bestätigen Studien, dass der Anstieg der Adipozyten im Knochenmark mit einem Verlust der Knochenmasse einhergeht und unter anderem mit Osteoporose assoziiert ist (Fazeli et al., 2013). Die Daten der Knochendichtemessung (Abbildung 40) und der Adipozytenanzahl bzw. Osmiumtetroxiddichtemessung (Abbildung 46) in den Femora der Cdc42

cKO Versuchstiere bestätigen diesen Zusammenhang, die Daten der Rac1 cKO-Mäusen jedoch nicht.

Da Adipozyten, wie die Osteoblasten, von den mesenchymalen Stammzellen abstammen, ist es ebenfalls wichtig nachzuweisen, ob es sich bei der Vermehrung der Adipozyten im Knochenmark um eine Fehldifferenzierung der Präosteoblasten oder eine Transdifferenzierung der Osteoblasten handelt. In Abbildung 20 war es möglich die Präosteoblasten zu Adipozyten zu differenzieren, womit gezeigt werden konnte, dass die Vorläuferzellen dieser Kulturen zu Adipozyten reifen können. Die Gründe für den Anstieg der Adipozytenanzahl im Knochenmark im Alter ist noch nicht ausreichend erforscht. Knochenmarkadipozyten interagieren mit ihrer Mikroumgebung im Knochenmark und verursachen durch die Sekretion von Adipokinen pro-inflammatorische Effekte, die wiederum die osteoblastischen Vorläuferzellen und die hämatopoetische Nische beeinträchtigen und die Differenzierung von Adipozyten weiter fördert (Naveiras et al., 2009). Weitere Studien zeigten, dass Adipozyten beispielsweise RANKL exprimieren können und damit die Osteoklastendifferenzierung vorantreiben oder durch die Lipolyse Fettsäuren abbauen, die die Mineralisierung der Osteoblasten beeinträchtigt und somit zu einem gestörten Knochenstoffwechsel führen (Goto et al., 2011; Wang et al., 2013). In Abbildung 44 zeigt sich bei den Cdc42 cKO-Mäusen eine Erhöhung der Osteoklasten im Verhältnis zur gesamten Knochenoberfläche, was auf den beschriebenen Mechanismus der Adipozyten zurück zu führen sein könnte. Dieser Effekt scheint jedoch bei den Rac1 cKO-Tieren irrelevant zu sein, da diese keinen Unterschied in der Anzahl der Osteoklasten aufwiesen.

## 4.2 Die Rolle der Osteoblasten bei der Adipogenese

Mesenchymale Stromazellen können wie auch Osteoblasten und Adipozyten den Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  exprimieren. Die Anwesenheit spezieller Transkriptionsfaktoren entscheidet darüber, welchen Weg die MSCs in ihrer Differenzierung einschlagen können. Dazu gehören, wie in Abbildung 3 gezeigt, die wichtigsten adipogenen Moleküle C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  für die Adipogenese und Runx2 und Osx (Sp7) für die Osteogenese (Chen et al., 2016; Takada et al., 2009a; Zhuang et al., 2016). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass subkutane Präadipozyten zu knochenbildenden Zellen transdifferenzieren können und dass 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> die Transdifferenzierung der Osteoblasten zu Adipozyten durch die Runterregulation von Runx2 induziert (Justesen et al., 2004; Kim et al., 2016c). In Abschnitt 3.1.8 dieser Arbeit war es ebenfalls möglich, dass die Anzahl der Adipozyten in den Osteoblastenkulturen anstieg, sobald man diese zu Adipozyten differenzierte (Abbildung 20). Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der Osteoblastenisolierung aus der Calvaria, trotz Säuberung der Schädeldecken, um eine Mischkultur handelt, welche möglicherweise Vorläuferzellen von Osteoblasten und Fibroblasten aufweist. Diese Vorläuferzellen besitzen möglicherweise noch die Fähigkeit, angeregt durch adipogene Medienzusätze, zu Adipozyten zu differenzieren. Außerdem können relevante Gene für die Proliferation und Transdifferenzierung durch die Zugabe von chemischen Reagenzien aktiviert oder inhibiert werden. Dies zeigten die Ergebnisse der Charakterisierung der Adipozytenmarker in Osteoblastenkulturen (Abbildung 18-19). In Anwesenheit von IBMX wurden die frühen Adipozytenmarker DLK1 und C/EBP $\beta$  in den Osteoblasten aktiviert und die PPAR $\gamma$ -Expression zu Beginn noch unterdrückt. Nach der Initiationsphase stieg die Expression stetig an (Abbildung 18). Dies entspricht dem Ablauf der Adipogenese wie sie in der Literatur beschrieben ist und konnte in dieser Arbeit in Osteoblastenkulturen reproduziert werden (Gregoire et al., 1998). Durch die Zugabe von Dexamethason, welches wichtig für die Osteogenese ist, wurden wiederum die frühen

Adipozytenmarker inhibiert und überraschenderweise der später folgende Marker PPAR $\gamma$  aktiviert (Abbildung 19B). Studien zeigen, dass Dexamethason in Abhängigkeit von der Konzentration oder dem Differenzierungsstatus einer Zelle, sowohl die Differenzierung von Osteoblasten als auch von Adipozyten induzieren kann. (Ghali et al., 2015; Li et al., 2013). Damit spielen chemische Faktoren eine wichtige Rolle für die Differenzierung bei der Aktivierung relevanter Gene und haben somit einen Einfluss auf das Zellschicksal bei der Kultivierung von MSCs.

Der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  gilt als ein Hauptregulator der Adipozytendifferenzierung. Mehrere Studien haben nachgewiesen, dass durch die Inhibierung dieses Moleküls die Adipogenese nicht stattfinden kann bzw. die Präadipozyten nicht in die benötigte Arrest-Phase übergehen und zu reifen Adipozyten differenzieren können (Gregoire et al., 1998; Takada et al., 2007a; Tang and Lane, 2012). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit, wie bereits in anderen Studien (Moerman et al., 2004; Takada et al., 2009a), gezeigt werden, dass eine Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression und der Adipozytenanzahl mit einer Verminderung der Mineralisierung der Osteoblasten assoziiert ist (Abbildung 21; Abbildung 33-35). Aufgrund dessen wurde in allen weiteren Untersuchungen der Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  für die Adipogenese in unserem Modell herangezogen und analysiert.

### 4.3 Die Rolle der Integrine in der Adipogenese

Die Differenzierung der MSCs ist nicht nur von den chemischen Faktoren abhängig, sondern wird auch von physikalischen Faktoren wie der Zellform, äußeren mechanischen Kräfte, der extrazellulären Matrix und der geometrischen Form der Zellen, beeinflusst (Chen et al., 2016). In dieser Arbeit wurden vor allem die Einflüsse der extrazellulären Matrix und deren Rezeptoren, den Integrinen, näher untersucht. Zahlreiche Studien belegen die Relevanz der Integrine, die mitunter dafür verantwortlich sein können, welchen Differenzierungsweg die MSCs einschlagen.

MSCs, Osteoblasten und Adipozyten exprimieren unter anderem die gleichen Integrine, allerdings entscheidet die Differenzierungsphase der Zellen und die Expressionsstärke eines Integrins darüber, um welchen Zelltypen es sich handelt (Cristancho and Lazar, 2011; Liu et al., 2005; Moursi et al., 1997; Schneider et al., 2001; Volloch and Olsen, 2013). Die durchflusszytometrischen Analysen des Integrinsprofils wiesen in den MSCs ein differentes Expressionsmuster bzw. -stärke eines jeden Integrins im Vergleich zu den Osteoblasten auf (Abbildung 9). Dabei kam es zu einer Verminderung der Integrinuntereinheiten  $\alpha 4$  und  $\beta 3$  und zu einem Anstieg der Integrinuntereinheiten  $\alpha 5$  und  $\alpha v$ , sobald die MSCs zu Osteoblasten differenzieren. Integrine sind bei der Differenzierung von Zellen relevant, da es bei der Aktivierung eines Integrins durch extrazelluläre Matrixproteine zu einer Signalweiterleitung in das Zellinnere kommt und so die Transkription verschiedener Gene beeinflusst werden kann (Alberts et al., 2002; Legate et al., 2009).

Um zu identifizieren, welche Matrixproteine und deren Rezeptoren an der Adipogenese in MSCs beteiligt sind, wurden Adhäsionsexperimente durchgeführt (Abbildung 10-11). Als erstes wurde untersucht, ob der Integrin-Signalweg in der Differenzierung zu Adipozyten in den MSCs und WtOB eine Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Integrinen zu einer Phosphorylierung von FAK führt und damit eine Reihe von weiteren Signalproteinen wie RhoGTPasen, MAPK und PI3K stimuliert (Chen et al., 2016; Marie et al., 2014). Eine Inhibierung von FAK resultierte in einer Verminderung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (Abbildung 8). Vermutlich beeinträchtigt die verminderte Phosphorylierung von FAK die nachfolgenden Moleküle und verhindert dadurch die

Transkription von PPAR $\gamma$ . Allerdings spricht diese Beobachtung dafür, dass die integrin-vermittelte Aktivierung von FAK die Genexpression von PPAR $\gamma$  beeinflusst.

Die Adhäsionsexperimente und die Stimulation der MSCs und Osteoblasten mit den Matrixproteinen demonstrierten, dass die Anwesenheit des Matrixproteins Tenascin C vermutlich inhibierend für die Adipogenese ist, da PPAR $\gamma$  runterreguliert wurde (Abbildung 10A-B/ 11B). Dies unterstützt eine Studie von Li et al. (2016), die zeigen konnten, dass Tenascin C die Mineralisierung der Osteoblasten fördert. Dadurch ist möglicherweise der Signalweg, welcher PPAR $\gamma$  aktiviert, in Anwesenheit von Tenascin C in den MSCs und Osteoblasten gehemmt. Da das Integrin  $\alpha$ v und  $\beta$ 3 den Liganden Tenascin C (Tabelle 12) binden können und deren Expressionsmuster von MSCs zu Osteoblasten verändert war (Abbildung 9), wurde das Integrin ( $\alpha$ v)  $\beta$ 3 in den MSCs in Abschnitt 4.3.1 näher betrachtet.

#### 4.3.1 Der Knockout des Integrins $\beta$ 3 fördert die PPAR $\gamma$ -Expression

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die EDB-haltige Isoform von Fibronectin das Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 bindet und die Osteogenese aktiviert. Des Weiteren fanden wir heraus, dass durch die Stimulation der Osteoblastendifferenzierung das Integrin  $\alpha$ v reduziert und  $\beta$ 3, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene erhöht wurde (Sens et al., 2017b, 2017a). In einem anderen Ansatz wurde deshalb die Expression des Integrins  $\beta$ 3 mittels spezifischer shRNA unterdrückt, was zu einer Verminderung der Mineralisierung, der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Osteokalzin mRNA-Expression führte. Der gleiche Effekt wurde bei den Osteoblasten aus  $\beta$ 3 KO-Mäusen erzielt (Sens et al., 2017a). Aufgrund der inhibierenden Wirkung auf die Osteogenese in Abwesenheit des Integrins  $\beta$ 3 war zu erwarten, dass die PPAR $\gamma$ -Expression in diesen KO-Mäusen erhöht war.

Bei der Überprüfung der  $\beta$ 3-Ausschaltung in den MSCs mittels Durchflusszytometrie zeigte sich, dass nicht nur die  $\beta$ 3-Expression reduziert war, sondern auch das Integrin  $\alpha$ v (Abbildung 15). Tatsächlich zeigten die frisch isolierten MSCs und die nicht-differenzierten Osteoblasten der  $\beta$ 3 KO-Mäuse einen Trend zur Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (Abbildung 16). Theoretisch sollte nun bei einer Differenzierung der  $\beta$ 3 KO-Osteoblasten die Anzahl der Adipozyten erhöht werden. Um dies zu bestätigen, müssen noch weitere Versuche mit diesen KO-Mäusen durchgeführt werden.

Einen gegensätzlichen Effekt konnte wiederum mittels einer Stimulation von Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 mit Hilfe des Disintegrins Echistatin erreicht werden. Es wurde publiziert, dass Echistatin ein Inhibitor des Integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 ist, allerdings nur im Zusammenhang mit der Adhäsion der Osteoklasten an die Knochenmatrix (Nakamura et al., 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass die Anwesenheit von Echistatin die Differenzierung von Osteoblasten stimuliert und die Integrin-Signalkaskade durch die verstärkte Phosphorylierung von FAK, AKT und ERK aktiviert wurde (Sens et al., 2017a). Um zu ergründen, ob die Adipogenese durch die Stimulation von  $\alpha$ v $\beta$ 3 reduziert wird, wurden Präosteoblasten in Anwesenheit von Echistatin zu Osteoblasten differenziert und der Adipozytenmarker PPAR $\gamma$  auf mRNA-Ebene untersucht. Echistatin unterstützte wie erwartet die Knotenbildung der Osteoblasten und verminderte die PPAR $\gamma$ -Expression. Allerdings war die Anzahl der Adipozyten in den Kulturen am Ende der Differenzierung unverändert (Abbildung 17).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse mit den Integrin  $\beta$ 3 KO-Zellen und den Echistatin-Stimulationen in Osteoblasten, dass das Integrin ( $\alpha$ v)  $\beta$ 3 sowohl eine Rolle bei der Osteogenese als vermutlich auch bei der Adipogenese spielen kann. Eine Publikation von Morandi et al. (2016) unterstützt diese Aussage dahingegen, dass sie zeigen konnten das humane adipogene

Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe mit der Mikroumgebung über die extrazelluläre Matrix bzw. Zell-Zell-Kontakte mittels Integrine interagieren können. Sie fanden heraus, dass alle RGD-Motiv bindende Integrine, dazu gehört auch das Integrin  $\alpha\beta3$ , während der Adipogenese *in vivo* unterdrückt waren. Des Weiteren konnten sie mit Hilfe einer pharmakologischen Inhibition und einem Knockdown von Integrin  $\alpha\beta3$  die Adipozytendifferenzierung *in vitro* fördern (Morandi et al., 2016).

#### **4.4 Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 als Vermittler der Differenzierung der MSCs**

Integrine und der daraufhin aktivierte Signalweg sind entscheidend für das Zellschicksal der MSCs. Sowohl bei den MSCs als auch bei Osteoblasten und Adipozyten führt die Aktivierung eines Integrins, wie beispielsweise  $\alpha\beta3$ , zur Phosphorylierung des Moleküls FAK, welches dann eine Reihe von weiteren Proteinen wie die RhoGTPasen, MAP-Kinasen und PI3K/AKT stimuliert und die Transkription von osteogenen oder adipogenen Genen reguliert (Chen et al., 2016; Marie et al., 2014; Morandi et al., 2016; Sens et al., 2017a; Volloch and Olsen, 2013).

##### **4.4.1 Die Abwesenheit der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 fördert die Adipogenese**

Die beiden RhoGTPasen sind aufgrund ihres Wirkens bei der Zellpolarität, Zellform und Zellteilung wichtige Regulatoren für die Entscheidung des Zellschicksals (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Vor allem die Organisation des Zytoskeletts durch die RhoGTPasen kann die Differenzierung und Migration der MSCs zu Präadipozyten oder Präosteoblasten regulieren (McBeath et al., 2004; Sonowal et al., 2013; Spiegelman and Ginty, 1983). Die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 wurden daher im Zusammenhang mit der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten oder Adipozyten untersucht. Studien berichten von Aktivierungen dieser RhoGTPasen durch den FAK-Src-Komplex und Interaktionen mit Integrinen, wie  $\alpha\beta3$ , und mit zahlreichen Proteinen aus den unterschiedlichsten Signalwegen, unter anderem dem Wnt- und MAPK-Signalweg (Huveneers and Danen, 2009; Schlessinger et al., 2009b; Wan et al., 2013).

Um die Rolle der RhoGTPasen in den MSCs besser verstehen zu können, wurden Cdc42 und Rac1 in MSCs und Osteoblasten *in vitro* inhibiert. Dies führte sowohl in den MSCs als auch in den Osteoblasten zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Expression (Abbildung 25). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Adipozyten in Gegenwart der Cdc42- und Rac1-Inhibitoren sowie die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  anstieg (Abbildung 21B-C). Wie zu erwarten wurde die Differenzierung der Osteoblasten durch die Inhibitoren gehemmt (Abbildung 21A-B). Damit scheint die Unterdrückung der Aktivität der beiden RhoGTPase Cdc42 und Rac1 notwendig zu sein, damit sich aus Präosteoblasten Adipozyten bilden bzw. Präosteoblasten transdifferenzieren können. Das ist vereinbar mit Daten von Sordella et al., die bereits zeigten, dass die Inaktivierung von RhoGTPasen notwendig ist, um MEF-Zellen (engl.: mouse embryo-derived fibroblast) zu Adipozyten differenzieren zu können (Sordella et al., 2003).



#### 4.4.2 Die MAP-Kinasen beeinflussen die PPAR $\gamma$ -Expression auf unterschiedliche Weise in MSCs und Osteoblasten

Die Moleküle FAK, Cdc42 und Rac1 zeigten eine Auswirkung auf die Differenzierung (Abbildung 8/25). Deshalb wurden nachfolgend die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK, welche durch die oben genannten Moleküle aktiviert werden können, untersucht. MAP-Kinasen sind für die Zellproliferation und Differenzierung von großer Bedeutung (Gehart et al., 2010). Einige Studien konnten zeigen, dass vor allem die Moleküle ERK und p38 eine komplexe Rolle bei der Adipogenese spielen (Rosen and MacDougald, 2006).

Bekannt ist, dass ERK und p38 die Phosphorylierung von Runx2 stimulieren können und damit die Osteoblastendifferenzierung und Knochenentwicklung positiv beeinflussen. Beide Moleküle, ERK und p38, stehen dabei im direkten Kontakt zueinander und können sich dadurch gegenseitig regulieren (Ge et al., 2009, 2012; Greenblatt et al., 2010; Marie et al., 2014; Volloch and Olsen, 2013).

Eine Studie von Bost et al. konnte in 3T3-L1 Zellen zeigen, dass ERK unterschiedliche Wirkungen in der Differenzierung von Adipozyten hatte, je nach dem in welcher Phase sich die Zelle befand. ERK aktiviert in der frühen Proliferationsphase C/EBP $\beta$ , welches wiederum PPAR $\gamma$  stimuliert. In der terminalen Phase inhibiert ERK die Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  und muss in dieser Differenzierungsphase deaktiviert werden, um die Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  weiterhin gewährleisten zu können (Bost et al., 2002, 2005, 2005; Gehart et al., 2010; Kim et al., 2007). In den Osteoblasten konnte durch die Inhibierung von MEK der ERK-Signalweg auf Proteinebene gehemmt werden (Abbildung 27) und zeigte sowohl in den MSCs als auch in den Osteoblasten eine Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression (Abbildung 26). Dies spricht dafür, dass ERK in den MSCs und Osteoblasten eine inhibierende Wirkung auf die Adipozyten hat, wie auch in der terminalen Differenzierungsphase von adipozytären Zelllinien. Da die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 Aktivatoren von MAPKs sein können, wurden diese ebenfalls in Kombination mit dem MEK-Inhibitor analysiert. In den MSCs führte die Inhibition von MEK und Cdc42 zu einem stärkeren Anstieg der PPAR $\gamma$ -Expression als in Kombination mit Rac1 (Abbildung 26A). Dies lässt vermuten, dass die ERK-Phosphorylierung in den MSCs abhängig von der Cdc42-Aktivierung ist oder Cdc42 direkt auf PPAR $\gamma$  wirken kann und somit wichtig für die Inhibierung der adipogenen Marker ist. In den Osteoblasten führte die kombinierte Cdc42- oder Rac1-Inhibition mit dem MEK-Inhibitor zu einer verstärkten PPAR $\gamma$ -Expression (Abbildung 26B). Wang et al. konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Rac1 und ERK in 3T3-L1 Zellen feststellen, wobei die Aktivierung von ERK abhängig von der DLK1-Aktivierung durch Rac1 ist (Gehart et al., 2010; Wang et al., 2010). Damit ist die Adipogenese in den MSCs vermutlich auch von der ERK-Aktivierung durch Cdc42 und Rac1 abhängig.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des ERK-Signalweges führte eine p38-Inhibierung zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den MSCs und Osteoblasten (Abbildung 28). Engelman et al. beschrieben erstmals eine positive Funktion von p38 auf die Adipozytendifferenzierung in 3T3-L1 Zellen, indem sie zeigten, dass eine Inhibition von p38 in der frühen Differenzierungsphase der 3T3-L1 Zellen zu einer Reduzierung der Adipozytenbildung führte (Engelman et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von Hata et al. fand ebenfalls heraus, dass p38 für die Adipozytendifferenzierung in der pluripotenten mesenchymalen Zelllinie C3H10T1/2 notwendig ist (Hata et al., 2003). Allerdings berichten weitere Studien von einer inhibierenden Wirkung von p38, indem das Signalmolekül durch die Phosphorylierung von NFAT4c die Adipogenese in den NIH3T3

Zellen hemmt (Bost et al., 2005; Yang et al., 2002). Vermutlich ist die Wirkung von p38, ob es die Adipogenese fördert oder hemmt, vom Zelltypen abhängig. In den MSCs und Osteoblasten in dieser Arbeit ist das aktivierte p38 möglicherweise für die Stimulierung der PPAR $\gamma$ -Transkription verantwortlich. Auch der p38-Signalweg zeigte eine Abhängigkeit von den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, da in den MSCs durch Cdc42 und in den Osteoblasten durch Rac1 die Verminderung von PPAR $\gamma$  aufgehoben wurde (Abbildung 28). Somit sind die beiden RhoGTPasen von Bedeutung, ob p38 aktiviert wird und die Adipogenese daraufhin in den MSCs oder (Prä-) Osteoblasten gefördert werden kann.

Die genaue Bedeutung von JNK bei der Adipogenese ist noch ungeklärt. Veröffentlichungen berichten, dass JNK im Insulin-Signalweg involviert ist. Der Knockout von JNK kann zu einer Reduzierung der Adipositas und einer Insulin-Überempfindlichkeit in Mausmodellen führen (Hirosumi et al., 2002). Die JNK-Inhibition in dieser Arbeit führte nur in den MSCs zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression. In Kombination mit den beiden Inhibitoren von Cdc42 und Rac1 waren keine Effekte zu erkennen (Abbildung 30A). Damit stimuliert JNK die Adipogenese in den MSCs. Eine ebenfalls stimulierende Eigenschaft von JNK auf die Adipogenese konnten auch die Arbeitsgruppen Wang et al. und Gu et al. nachweisen. Sie konnten zeigen, dass die JNK Aktivierung sowohl in humanen MSCs aus der Nabelschnur als auch in MSCs aus dem Fettgewebe die Adipozytendifferenzierung fördert (Gu et al., 2015; Wang et al., 2017). Allerdings wurde auch eine inhibierende Wirkung von JNK auf die Adipogenese in den MSCs aus Knochenmark bei Zugabe von Alendronat beschrieben, die durch die Aktivierung von ERK und JNK hervorgerufen wurde (Fu et al., 2008).

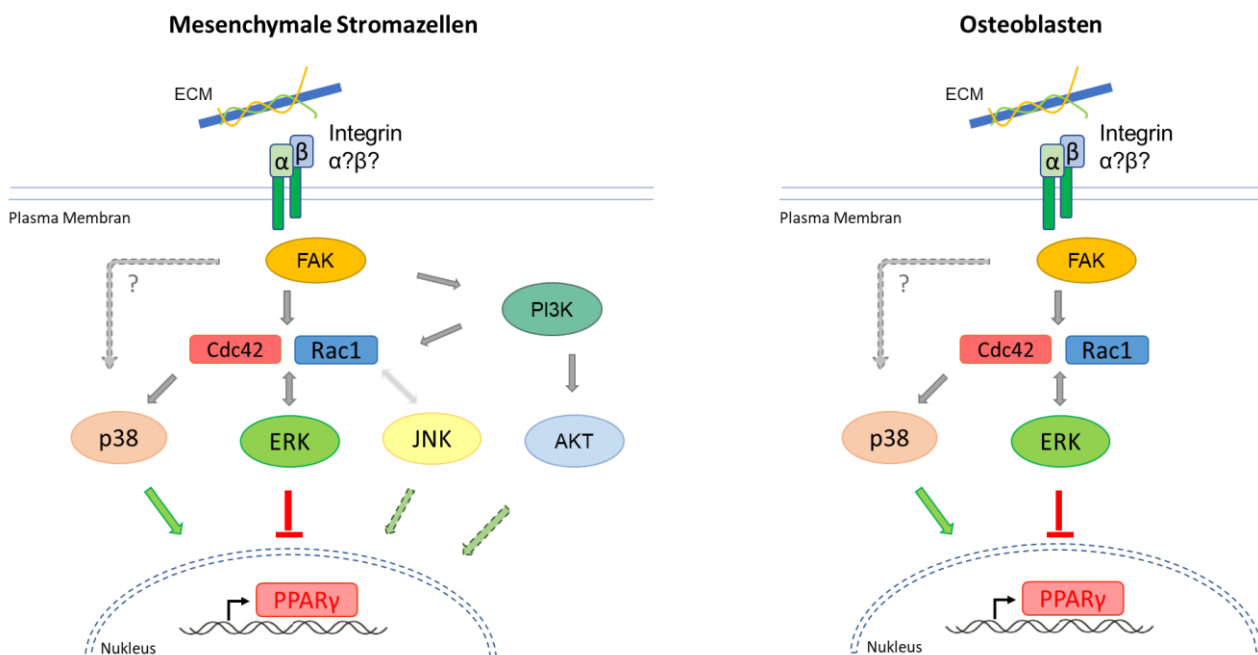
#### 4.4.3 PI3K/AKT Signalweg hat Auswirkungen auf die Adipogenese in den MSCs

Ein weiterer Signalweg der durch die Integrin-FAK-Signalkaskade aktiviert werden kann ist der PI3K/AKT-Signalweg. Die Inhibition von PI3K in den MSCs führte auch in Kombination mit dem Rac1-Inhibitor zu einer Verminderung der PPAR $\gamma$ -Expression. Die kombinierte Inhibition mit Cdc42 zeigte keine Unterschiede (Abbildung 31A). Auch in der Osteoblastenkultur hatte der PI3K-Inhibitor keinen Einfluss auf die PPAR $\gamma$ -Expression (Abbildung 31B). PI3K und auch die AKT Aktivierung kann somit die Adipogenese durch Rac1 fördern. Xu and Liao konnten ebenfalls zeigen, dass in 3T3-L1 Präadipozyten die Inhibition von PI3K zu einer kompletten Blockade der Adipozytendifferenzierung führt (Xu and Liao, 2004). Des Weiteren bewies die Arbeitsgruppe von Peng et al. mit ihrem Doppel Knockout von AKT1 und AKT2, dass die Fähigkeit der MEF-Zellen zu Adipozyten zu differenzieren beeinträchtigt war; unter anderem da AKT1/2 für die Induktion der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression verantwortlich sind (Peng et al., 2003).

Insgesamt lässt sich aus den *in vitro* Untersuchungen der Schluss ziehen, dass sowohl chemische als auch physikalische Faktoren die Adipogenese in den MSCs beeinflussen können. Dabei spielt zum einen die Substanzzugabe von IBMX oder Dexamethason eine Rolle bei der Aktivierung von PPAR $\gamma$ , zum anderen der Einfluss von physikalischen Faktoren, welche bedingt durch die Matrix-Integrin-Interaktionen weitere intrazelluläre Signalproteine, wie die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, die MAP-Kinasen und PI3K/AKT aktivieren und somit die Transkription von PPAR $\gamma$  unterdrücken oder fördern. Dabei kann das Integrin  $\alpha\beta 3$  unter anderem den FAK-MAP-Kinase Signalweg aktivieren (Rathinam and Alahari, 2010; Schneider et al., 2011) und stimulieren vermutlich die Mineralisierung der Osteoblasten und inhibiert die Adipogenese in den Osteoblastenkulturen. Dies konnte auch in Abwesenheit des Integrins  $\alpha\beta 3$  durch die erhöhte

PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den  $\beta$ 3 Knockout MSCs und Osteoblasten bestätigt werden (Abbildung 16).

Nicht nur die Inhibition von RhoA (Lin and Farmer, 2016), sondern auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Inhibition von entweder Cdc42 oder Rac1 führen zu einer Adipozytendifferenzierung. ERK und p38 beeinflussen die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in den MSCs und Osteoblasten gleichermaßen, allerdings werden sie nicht zu gleichen Teilen von den RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 aktiviert. Des Weiteren wirkt p38 vermutlich in einer frühen Phase und ERK in einer späteren Differenzierungsphase, da die ERK-Inhibition zu einer Erhöhung der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression führte (Abbildung 26). Dieser Effekt ist notwendig damit die terminale Adipozytendifferenzierung voranschreiten kann. JNK und PI3K haben nur in den MSCs eine stimulierende Funktion auf die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression, mitunter durch die Aktivierung von Cdc42 oder Rac1 (Abbildung 59).



**Abbildung 59: Darstellung des Integrin-Signalweges in MSCs und Osteoblasten, welcher PPAR $\gamma$  aktiviert oder inhibiert.** Das Schema zeigt einen möglichen Signalweg zur Aktivierung bzw. Inhibition der PPAR $\gamma$ -Expression in MSCs und Osteoblasten. Durch die Bindung eines extrazellulären Liganden kommt es zur Stimulation eines Integrindimers, wodurch FAK aktiviert und das Signal weiter entweder über PI3K/AKT und/oder Cdc42 und Rac1 geleitet wird, stimuliert die MAP-Kinasen p38 und JNK, die die Adipogenese anregen. Eine ERK Aktivierung führt in MSCs und Osteoblasten zu einer Inhibition der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression. Die Aktivierung von JNK und PI3K hat keine Auswirkung auf die Transkription von PPAR $\gamma$  in Osteoblasten.

#### 4.5 Osterix beeinflusst die MSCs und damit die Knochen- und Adipozytenentwicklung in den konditionellen Knockout-Mäusen

Das Cre/loxP-System ist eine häufig verwendete Methode um gewebe-spezifische Knockout-Mäuse zu generieren. Insbesondere wenn die Ausschaltung eines bestimmten Gens auf Keimbahn-Ebene während der embryonalen Entwicklung letal ist. Hierfür werden Mäuse, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors exprimieren, mit Mäusen, die auf beiden Allelen ein mit loxP-Stellen (floxed sites) markiertes Zielgen besitzen, verpaart. Das Enzym Cre-Rekombinase bindet die loxP-Stellen, schneidet den DNA-Bereich des Zielgens heraus und verbindet die DNA-Enden miteinander. In dieser Arbeit wurden Mäuse des Jackson Laboratory verwendet, die einen

tetracyclin-regulierenden Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle des Osterix (Osx) Promotors und ein von tetO (tetracycline responsive element; TRE) kontrolliertes GFP/Cre Fusionsprotein besitzen (Rodda and McMahon, 2006). Der Osterix-Promotor verhindert somit die Bildung eines Zielgenes in den frühen Osteoblasten, ab dem Embryonaltag E13.5 (Nakashima et al., 2002). Das Osx-GFP::Cre-System wird bevorzugt in der Forschung im Bereich der Osteogenese und Osteopathie eingesetzt. Studien von Wang et al. (2015) und Huang et al. (2015) konnten bereits zeigen, dass die Untersuchungen der Knochenentstehung mittels des Osx-GFP::Cre-Systems unerwartete Auswirkungen hatte. Sie stellten fest, dass durch die aktive Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Osx-Promotors, die intramembranöse Knochenentwicklung vor allem am Kopfbereich des Skelettes defekt war. Dies führt zu einem Gewichtsverlust, einer Hypomineralisierung am Schädel und einer verspäteten Calvaria-Ossifikation in einem Alter von einer Woche (Huang and Olsen, 2015; Wang et al., 2015). Der Effekt verlor sich im Alter von 21 Tagen bis auf die Fontanellen, die sich weiterhin nicht vollständig verschlossen. Des Weiteren kommt es direkt nach der Geburt zu einer höheren Expression von Cre im Vergleich zu Tag 21 (Wang et al., 2015).

In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Osx-GFP::Cre (Osx +/-) und der Osteogenese, sowie auch der Adipogenese gezeigt werden. Die Sklettfärbung Alzianblau und Alizarinrot machten den unvollständigen Verschluss der Fontanellen in den Osx +/- Mäusen sichtbar (Abbildung 38) und die Röntgenaufnahmen zeigten eine Deformation der Wirbelsäule (Abbildung 39). Des Weiteren führte die Aktivität des Osx-Promotors auch zu einer Reduzierung der Femurlänge im Vergleich zu den CT-Mäusen (Abbildung 40A); allerdings hatte die Cre-Rekombinase keinen Einfluss auf die gesamte Knochendichte dieser Mäuse (Abbildung 40B). Auch bei der Anzahl der Trabekel und den histomorphometrischen Parametern kam es zu keinen Veränderungen in Gegenwart der Cre-Rekombinase im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 41-43). Wang et al. und weitere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls keine Effekte der trabekulären Parameter in solchen Mäusen feststellen (Davey et al., 2012; Wang et al., 2015). Vermutlich hat sich die Auswirkung des Osterix-Promotors in unserem Mausmodell ebenfalls nach 21 Tagen im Bereich der Langknochen zum Teil aufgehoben. Die Unterschiede zwischen Osx-GFP::Cre und CT sind in der Histomorphometrie im Alter von drei Wochen nicht mehr vollständig vorhanden. Überraschenderweise stieg die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark der Osx +/- Mäuse an und auch die Dichte von Osmiumtetroxid (Lipidfärbung) in den Femora war erhöht (Abbildung 45-46). Chen et al. stellten fest, dass Osx-GFP::Cre nicht nur die Osteoblasten, Osteozyten und zum Teil die Chondrozyten beeinflussen, sondern auch auf zahlreiche Zellen im Knochenmark wie die Stromazellen, die Adipozyten und Perizyten, Auswirkungen haben können. Sie konnten eine Co-Lokalisation von eGFP und Perilipin, ein adipozyten-spezifischer Marker, in Knochenschnitten der Tibia ausfindig machen (Chen et al., 2014a). Damit scheint der Osx-Promotor für die erhöhte Anzahl im Knochenmark in den Osx +/- Mäusen verantwortlich zu sein, indem er die Stromazellen oder die Adipozyten im Knochenmark direkt beeinflusst und sich vermutlich auf die Zellproliferation und Differenzierung dieser Zellen auswirkt.

Im Gegensatz zu Wang et al. (2015) war in dieser Arbeit auch die Osteoblastenfunktion *in vitro* beeinträchtigt. Sowohl die Aktivität der alkalischen Phosphatase als auch die Knotenbildung und die mRNA-Expression von Osteokalzin waren vermindert. Tatsächlich waren die Anzahl der Präadipozyten und die adipozytenmarker DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  erhöht (Abbildung 36). Da die Neugeborenen der Osx-Cre-Kontrollen bereits eine verspätete Ossifikation der Calvaria *in vivo* zeigen und die Osteoblasten meist 1-2 Tage nach der Geburt isoliert werden, ist es verständlich, dass die primären Osteoblasten *in vitro* in ihrer Differenzierung, Proliferation und osteogenen Funktion beeinträchtigt sind (Huang and Olsen, 2015). Damit führt *in vitro* der Osx-Promotor

ebenfalls zu einer Verschlechterung der Mineralisierung der Osteoblasten und fördert die Adipogenese (Abbildung 36).

In dieser Arbeit sollte die Funktion der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Adipogenese im Knochen untersucht werden, welche mittels des *Osx*-Promotors in frühen Osteoblasten ausgeschaltet werden. Die Ausschaltung der beiden RhoGTPasen Cdc42 und/oder Rac1 ergab, ebenso wie die *Osx* *+/+* Osteoblastendifferenzierung, eine Verminderung der Mineralisierung und eine Erhöhung der Adipozyten *in vitro* (Abbildung 33-35). Des Weiteren zeigte die Untersuchung der Schädeldecken sowohl in den Cdc42 und Rac1 cKOs als auch in den Negativkontrollen keine verschlossenen Schädelnähte in 3 Wochen alten Tieren (Abbildung 38). Bei der Knochendichtemessung und der Histomorphometrie scheinen die Effekte von cKO Cdc42 und Rac1 allerdings echt zu sein, da die Negativkontrolle *Osx* *+/+* in den 3 Wochen alten Tieren keine Unterschiede aufwies. Hier führte der cKO von Cdc42 zu einer Verminderung in der gesamten Knochendichte, der Knochenoberfläche und der Anzahl der Osteoblasten (Abbildung 40B/ 44, rot). Im Gegensatz dazu zeigten die Rac1 cKOs keine Veränderungen in der Knochendichte und der Osteoblastenzahl (Abbildung 40B/ 44, blau). Des Weiteren ist die Mineralisierung der cKO Cdc42 und Rac1 Mäuse verlangsamt und die Knochenneubildung vermindert; allerdings konnte keine tatsächliche Verschlechterung der Osteoblastenfunktion nachgewiesen werden, da die Knochenneubildungsrate nicht mehr signifikant verändert war (BFR/BS; Abbildung 44C).

Wie bereits erwähnt, steigt durch die Anwesenheit der Cre-Rekombinase die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark. Weder Cdc42 noch Rac1 hatten einen Einfluss auf die Adipogenese im Vergleich zu *Osx* *+/+* (Abbildung 45). Im Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die durchflusszytometrische Untersuchung der MSCs (CD45- Ter119- Sca1+ Zellen) ebenfalls eine Beeinträchtigung dieser Zellen durch die Aktivität der Cre-Rekombinase stattfindet, die nicht durch die Doxyzyklinverabreichung korrigiert werden konnte (Abbildung 47B, grün). Damit ist das *Osx*-GFP::Cre System für die Untersuchung der Osteogenese und Adipogenese *in vitro*, bei der Knochenentwicklung an der Schädeldecke und im Wirbelsäulenbereich sowie bei der Adipogenese *ex vivo* nicht geeignet. Nur durch die Quantifizierung der Histomorphometrie lassen sich Rückschlüsse auf die Ausschaltung der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 im Knochen ziehen, die nicht auf die Aktivität der Cre-Rekombinase zurück zu führen sind.

Viele Arbeitsgruppen analysieren die Cre-Kontrolle (*Osx* *+/+*) nicht. Da Cre-Kontrollen nicht im gleichen Wurf generiert werden können, wie die Gen-spezifischen Knockouts und man zusätzlich eine Mauslinie parallel vorhalten müsste, wird meist nur die floxed-Kontrolle ohne aktiver Cre-Rekombinase untersucht. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sollte jede Arbeitsgruppe, die mit diesem System arbeitet, die Cre-Kontrolle zusätzlich zu den konditionellen Knockouts eines Zielgenes untersuchen. Beispielsweise zeigen zwei Studien von Razidlo et al. und Wu et al., die an zwei unterschiedlichen Modellen gearbeitet haben (die einen haben den Hdac3 (Histon Deacetylase 3) cKO und die anderen mit einem  $G_{\alpha}$  cKO unter der Kontrolle des *Osx*-Promotors untersucht), exakt die gleichen Auswirkungen auf die Knochenentwicklung wie die *Osx* *+/+* Daten dieser Arbeit und anderen oben genannten Studien. Beide Arbeitsgruppen beschreiben eine Kleinwüchsigkeit, eine verringerte Überlebensrate, verkürzte Femora, eine defekte Knochenentwicklung der Calvaria und eine geringere Osteoblastenzahl (Razidlo et al., 2010; Wu et al., 2011). Razidlo et al. konnten sogar eine erhöhte Anzahl von Adipozyten im Knochenmark nachweisen und haben irrtümlicherweise anhand der *in vivo* Befunde den Rückschluss gezogen, dass die Abwesenheit von Hdac3 für die fehlerhafte Differenzierung der MSCs verantwortlich ist. Dies ist vermutlich nur ein Effekt der Cre-Rekombinase. Durch die Zugabe von Doxyzyklin (Abschnitt 4.6) und die

Wiederholung dieser Experimente könnte diese Aussage ergänzt und auf die Hämatopoese erweitert werden.

Außerdem wurden im Zuge dieser Arbeit konditionelle Knockout-Mäuse für die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, welche unter der Kontrolle des Kollagen- $\alpha 1$  (I) -Promotors (Col) stehen analysiert. Im Gegensatz zu dem Osx-Promotor wirkt dieser hauptsächlich in den reifen Osteoblasten und Osteozyten und ist damit zu einem späteren Zeitpunkt der Knochenentwicklung aktiv (Elefteriou and Yang, 2011). Um herauszufinden, ob die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in differenzierten Osteoblasten eine Auswirkung auf die Osteoblasten haben, wurden diese mit dem Col-Promotor ausgeschaltet und die Knochendichte, sowie die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark quantifiziert. Die Ausschaltung von Cdc42 und beider RhoGTPasen mittels des Col-Promotors verminderte die gesamte Knochendichte, wohingegen die Knochendichte des Rac1 Knockouts überraschenderweise anstieg (Abbildung 48A-B). Somit spielt Rac1 vermutlich keine Rolle bei der späten Differenzierung. Wie zu vermuten war, stieg hier die Adipozytenanzahl in den cKO-Tieren im Vergleich zu den CTs im Knochenmark nicht an (Abbildung 48C).

Damit wäre das System mit dem Col-Promotor wahrscheinlich ein optimiertes und vorzuziehendes Modell für die Untersuchung der Osteoblastenfunktion in Abwesenheit der beiden RhoGTPasen. Allerdings nicht im Bezug auf die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten oder Adipozyten, da der Col-Promotor nicht im frühen Stadium der Osteoblasten und dessen Vorläuferzellen aktiv ist und auch keinen Effekt auf die Adipozyten zeigte. Damit lässt sich auch eine Transdifferenzierung der Osteoblasten zu Adipozyten ausschließen, da vermutlich nur ein früher Eingriff in die Differenzierung der Osteoblasten und dessen Vorläuferzellen, wie bei dem Osx-Promotor, zu den adipogenen Veränderungen führt. Das heißt genetische oder chemische Einflüsse in den osteoblastischen Vorläuferzellen bzw. MSCs führen vermutlich zu Veränderungen in der Transkription-Maschinerie und verschieben damit das Differenzierungspotential der MSCs in Richtung der Adipogenese.

#### **4.6 Die Cre-Rekombinase beeinflusst die Hämatopoese**

Die Zellen im Knochenmark kommunizieren miteinander und können die Differenzierung der sich in der Nähe befindenden Vorläuferzellen beeinflussen. Einige Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass das Altern, Mangelernährung, Osteoporose, Typ1 Diabetes und „skeletal unloading“ - bedingt durch einen Weltraumflug - zu einer Erhöhung der Adipozyten und einer Verminderung der Osteoblasten führen können, was wiederum einen negativen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der HSPCs hat (Ambrosi et al., 2017; Bethel et al., 2011b; Devlin and Rosen, 2015; Naveiras et al., 2009). In dieser Arbeit wurde auch die Beeinflussung der HSPCs untersucht, da sich das Osx-GFP::Cre Mausmodell auf die MSCs (Abbildung 47) und Osteoblasten negativ und die Adipozyten positiv auswirkte (Abbildung 36/45). Parallel zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen der HSPCs aus den Negativkontrolle Osx +/- und den RhoGTPasen Knockouts, wurde weiteren Versuchstieren Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht. Wie bereits erwähnt besitzen die im Versuch verwendeten Mäuse einen tetrazyklin-regulierten Transaktivator unter der Kontrolle des Osterix-Promotors und ein von tetO (tetracyclin responsive element; TRE) kontrolliertes GFP/Cre Fusionsprotein (Rodda and McMahon, 2006). Damit kontrolliert das Antibiotikum Tetracyklin bzw. Doxyzyklin das Zielgen, wobei es in Abwesenheit zu einer Aktivierung der Cre-Rekombinase führt und das geflochte Gen ausschaltet. Im Gegensatz dazu kommt es in Anwesenheit von Doxyzyklin zu einer Hemmung der Cre-Rekombinase Aktivität und die Fähigkeit bestimmte Gene aus zu schalten geht verloren (Elefteriou and Yang, 2011). Dies soll die Frage beantworten,

ob nur der *Osx*-Promotor bzw. die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Osx*-Promotors für diese Ergebnisse verantwortlich ist oder doch die Ausschaltung der beiden RhoGTPasen. Hierfür wurde den weiblichen Versuchstieren im schwangeren Zustand, ab dem Embryonalstadium E13.5 bis zur Tötung im Alter von 3 Wochen bzw. bis eine Woche vor der Tötung, Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht.

Die HSPC Daten aus der Abbildung 50 demonstrieren, dass der aktivierte *Osx*-Promotor in den MSCs auch einen negativen Effekt auf die HSPCs und auf die gemeinsamen lymphatischen Vorläufer (CLPs) hat, welcher durch die durchgängige Zugabe von Doxyzyklin korrigiert wurde (Abbildung 50). Bei den B-Zellen mit dem Oberflächenmarkern CD19 und CD45R (B220) zeigte die *Osx*-GFP::Cre-Expression nur bei den CD45R+ Zellen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Doxyzyklin eine Verminderung an (Abbildung 54, grün). Dabei ist zu beachten, dass der Oberflächenmarker CD45R (B220) zum Teil auch auf Untergruppen von T-Zellen vorzufinden ist (Murphy et al., 2014) und damit nicht ausschließlich als Oberflächenmarker der B-Zellen zugeordnet werden kann. Des Weiteren ergab die Untersuchung der Zellen, welche T-Zelloberflächenmarker exprimieren, wiederum eine Erhöhung der CD3 $\epsilon$ +, TCR $\beta$ +, CD4+, CD8a+ Zellen im Knochenmark in Anwesenheit der Cre-Rekombinase. Dieser Effekt wurde wieder durch Doxyzyklin vollständig korrigiert und führte zu keinen Veränderungen im Vergleich zu den CTs (Abbildung 55-56, grün). Auch die myeloischen Vorläuferzellen (CD11b+) wurden allein durch den *Osx*-Promotor erhöht und verloren diesen Effekt, sobald Doxyzyklin verabreicht wurde (Abbildung 57, grün). Damit scheint die *Osx*-GFP::Cre-Expression auch für die Hämatopoese toxisch zu sein. Schmidt-Supprian and Rajewsky beschrieben ebenfalls eine toxische Wirkung der Cre-Rekombinase, indem sie die genomische DNA von Zellen attackiert (Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007). Aufgrund dessen sollten die Daten, in denen der *Osx*-Promotor aktiv war, nicht ohne weiteres für Rückschlüsse auf die Funktion der RhoGTPasen *Cdc42* und *Rac1* verwendet werden. Hierbei könnte eine Verwendung eines neuen Knockout-Systems wie *Crispr/Cas9 in vitro und in vivo* überdacht werden, so dass die Toxizität der Cre-Rekombinase keine Rolle mehr spielt. Im Folgenden wurden deshalb ausschließlich die Ergebnisse mit der Doxyzyklinverabreichung näher betrachtet.

#### 4.7 Der Einfluss von *Cdc42* und *Rac1* in MSCs auf HSPCs im Knochenmark

Um nun herauszufinden, welche Einflüsse der RhoGTPasen *Cdc42* und *Rac1* auf die Hämatopoese zurück zu führen sind, wurde die Verabreichung von Doxyzyklin eine Woche vor der Tötung gestoppt, damit die Ausschaltung von *Cdc42* und *Rac1* untersucht werden kann und die Toxizität von der Cre-Rekombinase in den Zellen möglichst gering gehalten wird.

Der konditionelle Knockout von *Cdc42* führte zu keinen Veränderungen der HSPCs und CLPs, jedoch kam es in den CMPs, MEPs und GMPs zu einem Anstieg (Abbildung 51). Yang et al. berichten, dass eine Deletion von *Cdc42* mittels des *Mx1*-Cre Promotors in den hämatopoetischen Zellen zu einer Reduzierung der HSPCs im Ruhezustand führte, aber die Aktivität von Vorläuferzellpopulationen anstieg (Yang et al., 2007b). Es ist bekannt, dass HSPCs meist im Ruhezustand im Knochenmark verweilen und durch eine Stimulation beginnen zu differenzieren und daraufhin über das sinusoidale vaskuläre System das Knochenmark verlassen (Uccelli et al., 2008). Des Weiteren verursachte die Ausschaltung von *Cdc42* auch eine Erhöhung der gemeinsamen myeloischen Zellen, allerdings kommt es dabei dann zu einer Unterdrückung der Erythropoese (Yang et al., 2007a). Dies bestätigen die Daten von den *Cdc42* cKO-Mäusen, welche auch in Abwesenheit von *Cdc42* in den MSCs zu einem Anstieg der CMPs und CD11b+ Zellen führt

(Abbildung 51+57). Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass Osteoblasten eine EDA-haltige Fibronektinisoform produzieren, die die Myelopoese durch die Aktivierung des Integrins  $\alpha 5 \beta 1$  fördern können (Rosnagl et al., 2016). Die Abwesenheit von Cdc42 in den MSCs in dieser Arbeit führte auch zu einer Erhöhung der Erythrozyten im peripheren Blut und zeigte hier keine Verminderung (Abbildung 58C), was vermutlich mit der Erhöhung der MEPs in den Cdc42 cKO-Mäusen einhergeht (Abbildung 51). Damit hat der konditionelle Knockout von Cdc42 in den MSCs bzw. Präosteoblasten einen positiven Effekt auf die Myelopoese und Erythropoese.

Die Rac1 cKO-Mäuse wiesen keine Veränderungen in den HSPCs auf (Abbildung 52). Laut Literatur ist Rac1 in den hämatopoetischen Zellen verantwortlich für die Organisation des Aktinzytoskelett von Erythrozyten und ist hauptsächlich für die Retention und Proliferation der HSCs in der Knochenmarknische von Bedeutung, aber nicht für die Aufrechterhaltung der HSPCs im Ruhezustand im Knochenmark (Mulloy et al., 2010; Yang et al., 2007b). Die Arbeitsgruppe von Lane et al. wiederum wiesen in ihrem Mausmodell, in denen Rac mit *Osx-GFP::Cre* ausgeschaltet wurde, ebenfalls nach, dass Rac notwendig für die Osteoblastendifferenzierung *in vitro* und für die Knochenentwicklung *in vivo* ist; allerdings keine Rolle bei der Funktion der HSPCs spielt (Lane et al., 2012). Dies konnte auch in diesem Modell durch Anwendung adäquater Kontrollen beobachtet werden.

Den RhoGTPasen in den hämatopoetischen Zellen werden auch Funktionen bei der Lymphozytenentwicklung zugeschrieben. Dabei sind sie verantwortlich für die Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung und Aktivierung der T- und B-Lymphozyten. Genetische Veränderungen der beiden RhoGTPasen führen in diesen Bereichen zu Defekten, welche zu Abnormitäten bei der Entwicklung von Blutzellen bzw. in der Immunantwort führen können (Mulloy et al., 2010). Der konditionellen Knockout von Cdc42 in den MSCs bzw. Präosteoblasten verminderte die B-Zellen, welche den Oberflächenmarker CD19 exprimieren, im Knochenmark (Abbildung 54A-B, rot). Guo et al. konnten zeigen, dass zwar durch eine Deletion von Cdc42 die CLP Produktion nicht beeinflusst wird, aber die Differenzierung und Proliferation der B-Zellentwicklung von Pro-B- und Prä-B-Zellen reduziert war (Guo et al., 2009). Rac1 spielt ebenfalls eine Rolle bei der B-Zellentwicklung. Es kommt bei einer Rac1-Deletion in Kombination mit Rac2 ebenfalls zu einer Verminderung der B-Zellproliferation (Tybulewicz and Henderson, 2009; Walmsley et al., 2003). Allerdings konnte in dieser Arbeit kein Unterschied in der B-Zelldifferenzierung durch den Einfluss der MSCs der Rac1 cKO-Mäusen gefunden werden (Abbildung 54A-D, blau). Dies lässt vermuten, dass ausschließlich Cdc42 in den MSCs bzw. Präosteoblasten dafür verantwortlich ist, dass die B-Zelldifferenzierung gefördert wird.

Die Thymozytensubpopulationen mit den Oberflächenmarkern CD3 $\epsilon$ , TCR $\beta$ , CD4 und CD8a waren in den cKO Cdc42 und Rac1 Versuchstieren nicht verändert (Abbildung 55-56, blau). Rac1 ist in der frühen T-Zellentwicklung relevant und führt bei einer Deletion in Kombination mit Rac2 in T-Zelllinien zu einer Verminderung der CD4+ und CD8+ Zellen und verhindert somit die Differenzierung von frühen T-Zellen zu reifen T-Zellen (Dumont et al., 2009; Tybulewicz and Henderson, 2009). Der Knockout von Rac1 alleine beeinflusst die T-Zellentwicklung nur schwach (Morales et al., 2015; Saoudi et al., 2014). In dieser Arbeit führte die verminderte Expression von Rac1 in den MSCs zu keinem signifikanten Unterschied (Abbildung 55-56, blau). Dies bedeutet, dass die Expression von Rac1 in den MSCs nicht relevant für die T-Zell-Differenzierung ist.

Obwohl die Abwesenheit von Cdc42 in den hämatopoetischen Zellen die Differenzierung der CD4+ und CD8+ Zellen unterdrückt (Guo et al., 2011), waren in den cKO Cdc42 Mäuse in dieser Arbeit



ebenfalls keine Veränderungen in den T-Zell-typischen Oberflächenmarkern zu sehen (Abbildung 55-56, rot).

Die Auswirkungen auf die HSPCs und Lymphozyten könnten ebenso durch die verminderte Osteoblastenfunktion und/oder durch die Erhöhung der Adipozyten verursacht worden sein. Es ist bekannt, dass Osteoblasten durch die Produktion von Zytokinen wie IL-6 die Proliferation der HSCs fördern und durch TNF- $\alpha$  inhibieren (Naveiras et al., 2009; Taichman and Emerson, 1998b). Des Weiteren exprimieren unreife Osteoblasten verstärkt Runx2, welches ebenfalls die Proliferation und Funktion der HSCs fördert (Calvi et al., 2003b; Chitteti et al., 2010). Da in diesem Modell die Differenzierung der Osteoblasten gestört ist (Abbildung 36), würde dies mit unter erklären, warum die HSPC-Anzahl ebenfalls vermindert ist.

Im Gegensatz hierzu können auch Adipozyten Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Adipokine wie Adiponektin sekretieren, die die Hämatopoese inhibieren (Gimble, 2012; Naveiras et al., 2009). Kajkenova et al. berichten in ihrem SAMP6 Mausmodell, welches ein beschleunigten Alterungsprozess aufweist, wiederum von einer reduzierten Osteogenese und einer Erhöhung der Adipozyten und Myelopoese (Kajkenova Oumitana et al., 2009). Dies spiegelt sich auch in diesem Modell wieder (Abbildungen 45 und 57) und zeigt somit, dass es wichtig ist zu verstehen, was bei der Differenzierung der MSCs im Alter passiert und wie dies auch die Hämatopoese beeinflussen kann. Einige Studien demonstrieren, dass im Alter das Risiko einer Anämie steigt und das adaptive Immunsystem geschwächt wird (Beghé et al., 2004; Hakim and Gress, 2007). Gründe hierfür können gealterte HSCs sein, welche die Erythropoese nicht mehr fördern, die Generierung der B- und T-Lymphozyten beeinträchtigt und die Selbsterhaltung und das Einwandern der HSCs in die Knochenmarknische durch den einnehmenden Platz der erhöhten Adipozytenanzahl, reduziert. Nur die Produktion der myeloischen Vorläuferzellen wird zu diesem Zeitpunkt stärker unterstützt (Cho et al., 2008; Dykstra et al., 2011; Geiger and Zheng, 2014), was auch der Fall war in den Cdc42 cKO-Mäusen (Abbildung 57).

Es konnte gezeigt werden, dass Wnt die Präadipozyten in einem undifferenzierten Stadium behält und dazu beiträgt, dass die HSC Nische aufrechterhalten bleibt, in dem die Adipozytendifferenzierung im Knochenmark unterdrückt wird (Ross et al., 2000). Damit könnte die Manipulation der beiden RhoGTPasen und deren Signalkaskaden durch pharmakologische Substanzen im Alter dazu beitragen, dass das ausbalancierte Zusammenspiel der Osteoblasten, Adipozyten und der HSPCs in der Knochenmarknische wieder vollständig gewährleistet ist.

## 4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Rolle der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 im Zusammenhang mit der Differenzierung der MSC zu Osteoblasten oder Adipozyten, sowie dem Zusammenspiel mit der hämatopoetischen Stammzellnische untersucht.

Zum einen zeigte sich, dass die Expression verschiedener Integrine dazu beiträgt, in welchen Zelltyp, Osteoblast oder Adipozyt, sich die MSCs differenzieren können. Im Weiteren führt die Abwesenheit bestimmter Integrine, wie dem Integrin  $\beta$ 3, sowie die Abwesenheit der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 zu einer Veränderung bzw. Blockierung des MAPK-Signalweg und fördert damit die Differenzierung der MSCs zu Adipozyten *in vitro*. Rac1 spielt hier vermutlich nur eine kleine Rolle im Gegensatz zu Cdc42, da eine Inhibition von Cdc42 stets zu einer verstärkten mRNA-Expression des Adipozytenmarkers PPAR $\gamma$  führte.

Zum anderen verursacht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Osterix-Promotors *in vivo* skelettale Fehlentwicklungen des Schädels und der Wirbelsäule. Des Weiteren war die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark erhöht und die Hämatopoese beeinträchtigt. Damit konnte gezeigt werden, dass dieses Cre/loxP-System unter der Kontrolle des Osx-Promotors für die Untersuchung der Interaktion zwischen Osteoblasten, Adipozyten und der Hämatopoese nicht geeignet ist, und es notwendig ist Cre-Kontrollen stets parallel zu den jeweiligen konditionellen Knockouts mit zu analysieren. Weitere Untersuchungen in diesem Mausmodell mit der Zugabe von Doxyzyklin zeigten z.B., dass die Expression von Cdc42 in MSCs die Erythropoese inhibiert und verhalfen somit zu einem besseren Verständnis der MSC-Rolle. Dabei konnte ein Erkenntnisgewinn zur Funktion dieser beiden RhoGTPasen in den MSCs und in der hämatopoetischen Nische erzielt werden. Es ist zu hoffen, dass diese Erkenntnisse zu neuen therapeutischen Möglichkeiten für die Behandlung der Osteoporose im Alter beitragen können.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* *99*, 557–566.
- Åkerblad, P., Lind, U., Liberg, D., Bamberg, K., and Sigvardsson, M. (2002). Early B-Cell Factor (O/E-1) Is a Promoter of Adipogenesis and Involved in Control of Genes Important for Terminal Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 8015–8025.
- Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., et al. (2004). PPAR  $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* *113*, 846–855.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Integrins.
- Ambrosi, T.H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.-M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D.W., Schürmann, A., et al. (2017). Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* *20*, 771-784.e6.
- Anderson, H.C. (1989). Mechanism of mineral formation in bone. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *60*, 320–330.
- Anthony, B.A., and Link, D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* *35*, 32–37.
- Antras, J., Hilliou, F., Redziniak, G., and Pairault, J. (1989). Decreased biosynthesis of actin and cellular fibronectin during adipose conversion of 3T3-F442A cells. Reorganization of the cytoarchitecture and extracellular matrix fibronectin. *Biol. Cell* *66*, 247–254.
- Aspenström, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem. J.* *377*, 327–337.
- Avioli, L.V., and Krane, S.M. (2013). *Metabolic Bone Disease* (Academic Press).
- Ballane, G., Cauley, J.A., Luckey, M.M., and El-Hajj Fuleihan, G. (2017). Worldwide prevalence and incidence of osteoporotic vertebral fractures. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* *28*, 1531–1542.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* *339*, 269–280.
- Baron, R., and Kneissel, M. (2013a). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* *19*, 179–192.
- Baron, R., and Kneissel, M. (2013b). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* *19*, 179–192.
- Bassan, J., Frame, B., and Frost, H. (1963). Osteoporosis: a review of pathogenesis and treatment. *Ann. Intern. Med.* *58*, 539–550.
- Batra, N., Burra, S., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Xia, X., Weber, G.F., DeSimone, D., Bonewald, L.F., Lafer, E.M., Sprague, E., et al. (2012). Mechanical stress-activated integrin  $\alpha 5\beta 1$  induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3359–3364.
- Beghé, C., Wilson, A., and Ershler, W.B. (2004). Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: a systematic review of the literature. *Am. J. Med.* *116 Suppl 7A*, 3S-10S.

- Belaid-Choucair Zakia, Lepelletier Yves, Poncin Géraldine, Thiry Albert, Humblet Chantal, Maachi Mustapha, Beaulieu Aurore, Schneider Elke, Briquet Alexandra, Mineur Pierre, et al. (2008). Human Bone Marrow Adipocytes Block Granulopoiesis Through Neupilin-1-Induced Granulocyte Colony-Stimulating Factor Inhibition. *STEM CELLS* 26, 1556–1564.
- Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K.W., Harrison, S.D., and MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 30998–31004.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (2005a). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3324–3329.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (2005b). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3324–3329.
- Bennett, C.N., Ouyang, H., Ma, Y.L., Zeng, Q., Gerin, I., Sousa, K.M., Lane, T.F., Krishnan, V., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (2007). Wnt10b Increases Postnatal Bone Formation by Enhancing Osteoblast Differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1924–1932.
- Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S., and Owen, M.E. (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* 102, 341–351.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 47–82.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., and Brock, M.J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Bethel, M., Srour, E.F., and Kacena, M.A. (2011a). Hematopoietic Cell Regulation of Osteoblast Proliferation and Differentiation. *Curr. Osteoporos. Rep.* 9, 96–102.
- Bethel, M., Srour, E.F., and Kacena, M.A. (2011b). Hematopoietic Cell Regulation of Osteoblast Proliferation and Differentiation. *Curr. Osteoporos. Rep.* 9, 96–102.
- Bethel, M., Chitteti, B.R., Srour, E.F., and Kacena, M.A. (2013). The Changing Balance Between Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Aging and its Impact on Hematopoiesis. *Curr. Osteoporos. Rep.* 11, 99–106.
- Birbrair, A., and Frenette, P.S. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1370, 82–96.
- Blair, H.C., Zaidi, M., and Schlesinger, P.H. (2002). Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem. J.* 364, 329–341.
- Bleibler, F., Konnopka, A., Benzinger, P., Rapp, K., and König, H.-H. (2013). The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany—a demographic simulation model. *Osteoporos. Int.* 24, 835–847.
- Boettiger, D., Lynch, L., Blystone, S., and Huber, F. (2001). Distinct Ligand-binding Modes for Integrin  $\alpha\beta 3$ -Mediated Adhesion to Fibronectin versus Vitronectin. *J. Biol. Chem.* 276, 31684–31690.
- Bonewald, L.F. (2007). Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 281–290.

- Bonnet, N., Conway, S.J., and Ferrari, S.L. (2012). Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15048–15053.
- Borges, E., Jan, Y., and Ruoslahti, E. (2000). Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\beta$  and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Bind to the  $\beta$ 3Integrin through Its Extracellular Domain. *J. Biol. Chem.* 275, 39867–39873.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y., and Binétruy, B. (2002). Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem. J.* 361, 621–627.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., and Binétruy, B. (2005). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87, 51–56.
- Calvi, L.M., and Link, D.C. (2014). Cellular Complexity of the Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Calcif. Tissue Int.* 94, 112–124.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003a). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003b). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.
- Cancelas, J.A., Lee, A.W., Prabhakar, R., Stringer, K.F., Zheng, Y., and Williams, D.A. (2005). Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat. Med.* 11, 886–891.
- Cao, J.J. (2011). Effects of obesity on bone metabolism. *J. Orthop. Surg.* 6, 30.
- Cao, J., Ou, G., Yang, N., Ding, K., Kream, B.E., Hamrick, M.W., Isales, C.M., and Shi, X.-M. (2015). Impact of targeted PPAR $\gamma$  disruption on bone remodeling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 410, 27–34.
- Center, J.R., Nguyen, T.V., Schneider, D., Sambrook, P.N., and Eisman, J.A. (1999). Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* 353, 878–882.
- Chang, J., Sonoyama, W., Wang, Z., Jin, Q., Zhang, C., Krebsbach, P.H., Giannobile, W., Shi, S., and Wang, C.-Y. (2007). Noncanonical Wnt-4 Signaling Enhances Bone Regeneration of Mesenchymal Stem Cells in Craniofacial Defects through Activation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 282, 30938–30948.
- Charo, I.F., Nannizzi, L., Smith, J.W., and Cheresch, D.A. (1990). The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J. Cell Biol.* 111, 2795–2800.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., et al. (2000). Cdc42 is required for PIP2-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr. Biol.* 10, 758–765.
- Chen, J., Shi, Y., Regan, J., Karuppaiah, K., Ornitz, D.M., and Long, F. (2014a). Osx-Cre Targets Multiple Cell Types besides Osteoblast Lineage in Postnatal Mice. *PLoS ONE* 9.

- Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Xu, C., Zheng, C., Han, Y., Li, W., Huang, Y., Zhang, X., Shao, C., et al. (2014b). An Osteopontin-Integrin Interaction Plays a Critical Role in Directing Adipogenesis and Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 327–337.
- Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., et al. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 23, 1128–1139.
- Chen, Z.-L., Shao, W.-J., Xu, F., Liu, L., Lin, B.-S., Wei, X.-H., Song, Z.-L., Lu, H.-G., Fantus, I.G., Weng, J.-P., et al. (2015). Acute Wnt pathway activation positively regulates leptin gene expression in mature adipocytes. *Cell. Signal.* 27, 587–597.
- Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269–309.
- Chitteti, B.R., Cheng, Y.-H., Streicher, D.A., Rodriguez-Rodriguez, S., Carlesso, N., Srour, E.F., and Kacena, M.A. (2010). Osteoblast lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J. Cell. Biochem.* 111, 284–294.
- Cho, R.H., Sieburg, H.B., and Muller-Sieburg, C.E. (2008). A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111, 5553–5561.
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 16–24.
- Chrostek, A., Wu, X., Quondamatteo, F., Hu, R., Sanecka, A., Niemann, C., Langbein, L., Haase, I., and Brakebusch, C. (2006). Rac1 Is Crucial for Hair Follicle Integrity but Is Not Essential for Maintenance of the Epidermis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6957–6970.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., and Hynes, R.O. (1998). Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases. *J. Cell Biol.* 142, 573–586.
- Clover, J., Dodds, R.A., and Gowen, M. (1992). Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 1), 267–271.
- Congdon, K.L., Voermans, C., Ferguson, E.C., DiMascio, L.N., Uqoezwa, M., Zhao, C., and Reya, T. (2008). Activation of Wnt Signaling in Hematopoietic Regeneration. *STEM CELLS* 26, 1202–1210.
- Craft, C.S., and Scheller, E.L. (2017). Evolution of the Marrow Adipose Tissue Microenvironment. *Calcif. Tissue Int.* 100, 461–475.
- Crane, J.L., and Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling. *J. Clin. Invest.* 124, 466–472.
- Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 722–734.
- Croke, M., Ross, F.P., Korhonen, M., Williams, D.A., Zou, W., and Teitelbaum, S.L. (2011). Rac deletion in osteoclasts causes severe osteopetrosis. *J. Cell Sci.* 124, 3811–3821.
- D'Alimonte, I., Lannutti, A., Pipino, C., Tomo, P.D., Pierdomenico, L., Cianci, E., Antonucci, I., Marchisio, M., Romano, M., Stuppia, L., et al. (2013). Wnt Signaling Behaves as a “Master Regulator” in the Osteogenic and Adipogenic Commitment of Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* 9, 642–654.
- Damsky, C.H. (1999). Extracellular matrix–integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* 25, 95–96.

- Datta, A., Shi, Q., and Boettiger, D.E. (2001). Transformation of Chicken Embryo Fibroblasts by v-src Uncouples  $\beta$ 1 Integrin-Mediated Outside-in but Not Inside-out Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7295–7306.
- Davey, R.A., Clarke, M.V., Sastra, S., Skinner, J.P., Chiang, C., Anderson, P.H., and Zajac, J.D. (2012). Decreased body weight in young Osterix-Cre transgenic mice results in delayed cortical bone expansion and accrual. *Transgenic Res.* *21*, 885–893.
- Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., and Parfitt, A.M. (2013). Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *28*, 2–17.
- Devlin, M., and Rosen, C.J. (2015). The Bone Fat Interface: Basic and Clinical Implications of Marrow Adiposity. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *3*, 141–147.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* *264*, 16378–16382.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997a). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* *89*, 747–754.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997b). *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* *89*, 747–754.
- Dumont, C., Corsoni-Tadrzak, A., Ruf, S., de Boer, J., Williams, A., Turner, M., Kioussis, D., and Tybulewicz, V.L.J. (2009). Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* *113*, 3990–3998.
- Dykstra, B., Olthof, S., Schreuder, J., Ritsema, M., and de Haan, G. (2011). Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* *208*, 2691–2703.
- Ecklund, K., Vajapeyam, S., Feldman, H.A., Buzney, C.D., Mulkern, R.V., Kleinman, P.K., Rosen, C.J., and Gordon, C.M. (2010). Bone Marrow Changes in Adolescent Girls With Anorexia Nervosa. *J. Bone Miner. Res.* *25*, 298–304.
- Eleftheriou, F., and Yang, X. (2011). Genetic mouse models for bone studies—Strengths and limitations. *Bone* *49*, 1242–1254.
- Engelman, J.A., Lisanti, M.P., and Scherer, P.E. (1998). Specific Inhibitors of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Block 3T3-L1 Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *273*, 32111–32120.
- Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* *20*, 1–5.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42 - the centre of polarity. *J. Cell Sci.* *117*, 1291–1300.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *36*, 461–470.
- Fazeli, P.K., Horowitz, M.C., MacDougald, O.A., Scheller, E.L., Rodeheffer, M.S., Rosen, C.J., and Klibanski, A. (2013). Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 935–945.

- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., and Cerri, P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 421746.
- Florian, M.C., Dörr, K., Niebel, A., Daria, D., Schrezenmeier, H., Rojewski, M., Filippi, M.-D., Hasenberg, A., Gunzer, M., Scharffetter-Kochanek, K., et al. (2012). CDC42 ACTIVITY REGULATES HEMATOPOIETIC STEM CELL AGING AND REJUVENATION. *Cell Stem Cell* 10, 520–530.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Fu, L., Tang, T., Miao, Y., Zhang, S., Qu, Z., and Dai, K. (2008). Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via ERK and JNK activation. *Bone* 43, 40–47.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 5, 1321–1328.
- Gahmberg, C.G., Fagerholm, S.C., Nurmi, S.M., Chavakis, T., Marchesan, S., and Grönholm, M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 431–444.
- Ganten, D., and Ruckpaul, K. (2006). *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen* (Springer Science & Business Media).
- Gao, B., Yang, L., and Luo, Z.-J. (2014). Transdifferentiation between bone and fat on bone metabolism. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 1834–1841.
- Gao, L., McBeath, R., and Chen, C.S. (2010). Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic versus Myogenic Fate through Rac1 and N-cadherin. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 564–572.
- Garrett, R.W., and Emerson, S.G. (2009). Bone and Blood Vessels: The Hard and the Soft of Hematopoietic Stem Cell Niches. *Cell Stem Cell* 4, 503–506.
- Gauthier, A., Kanis, J.A., Martin, M., Compston, J., Borgström, F., Cooper, C., McCloskey, E., Advisors, O. behalf of the C. of S., and Foundation, I.O. (2011). Development and validation of a disease model for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 22, 771–780.
- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N.E., Roca, H., and Franceschi, R.T. (2009). Identification and Functional Characterization of ERK/MAPK Phosphorylation Sites in the Runx2 Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* 284, 32533–32543.
- Ge, C., Yang, Q., Zhao, G., Yu, H., Kirkwood, K.L., and Franceschi, R.T. (2012). INTERACTIONS BETWEEN EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2 AND P38 MAP KINASE PATHWAYS IN THE CONTROL OF RUNX2 PHOSPHORYLATION AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 538–551.
- Gehart, H., Kumpf, S., Ittner, A., and Ricci, R. (2010). MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 11, 834–840.
- Geiger, H., and Zheng, Y. (2014). Regulation of hematopoietic stem cell aging by the small RhoGTPase Cdc42. *Exp. Cell Res.* 329, 214–219.
- Geiger, H., Koehler, A., and Gunzer, M. (2007). Stem Cells, Aging, Niche, Adhesion and Cdc42: A Model for Changes in Cell-Cell Interactions and Hematopoietic Stem Cell Aging. *Cell Cycle* 6, 884–887.



- Ghali, O., Broux, O., Falgayrac, G., Haren, N., van Leeuwen, J.P., Penel, G., Hardouin, P., and Chauveau, C. (2015). Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation. *BMC Cell Biol.* 16.
- Ghali, O., Al Rassy, N., Hardouin, P., and Chauveau, C. (2016). Increased Bone Marrow Adiposity in a Context of Energy Deficit: The Tip of the Iceberg? *Front. Endocrinol.* 7.
- Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028–1032.
- Gimble, J.M. (2012). Adipocytes, Lipid Metabolism, and Hematopoiesis. In *Energy Balance and Hematologic Malignancies*, (Springer, Boston, MA), pp. 31–45.
- Gimble, J.M., Zvonic, S., Floyd, Z.E., Kassem, M., and Nuttall, M.E. (2006). Playing with bone and fat. *J. Cell. Biochem.* 98, 251–266.
- Goto, H., Hozumi, A., Osaki, M., Fukushima, T., Sakamoto, K., Yonekura, A., Tomita, M., Furukawa, K., Shindo, H., and Baba, H. (2011). Primary human bone marrow adipocytes support TNF- $\alpha$ -induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine* 56, 662–668.
- Greenblatt, M.B., Shim, J.-H., Zou, W., Sitara, D., Schweitzer, M., Hu, D., Lotinun, S., Sano, Y., Baron, R., Park, J.M., et al. (2010). The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2457–2473.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783–809.
- Griffith, J.F., Yeung, D.K.W., Ahuja, A.T., Choy, C.W.Y., Mei, W.Y., Lam, S.S.L., Lam, T.P., Chen, Z.-Y., and Leung, P.C. (2009). A study of bone marrow and subcutaneous fatty acid composition in subjects of varying bone mineral density. *Bone* 44, 1092–1096.
- Gronthos, S., Simmons, P.J., Graves, S.E., and Robey, P.G. (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28, 174–181.
- Gu, H., Huang, Z., Yin, X., Zhang, J., Gong, L., Chen, J., Rong, K., Xu, J., Lu, L., and Cui, L. (2015). Role of c-Jun N-terminal kinase in the osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 339, 112–121.
- Guo, F., Velu, C.S., Grimes, H.L., and Zheng, Y. (2009). Rho GTPase Cdc42 is essential for B-lymphocyte development and activation. *Blood* 114, 2909–2916.
- Guo, F., Zhang, S., Tripathi, P., Mattner, J., Phelan, J., Sproles, A., Mo, J., Wills-Karp, M., Grimes, H.L., Hildeman, D., et al. (2011). Distinct Roles of Cdc42 in Thymopoiesis and Effector and Memory T Cell Differentiation. *PLOS ONE* 6, e18002.
- Hakim, F.T., and Gress, R.E. (2007). Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens* 70, 179–189.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 159–163.
- Hardouin, P., Pansini, V., and Cortet, B. (2014). Bone marrow fat. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 81, 313–319.
- Hardouin, P., Marie, P.J., and Rosen, C.J. (2016a). New insights into bone marrow adipocytes: Report from the First European Meeting on Bone Marrow Adiposity (BMA 2015). *Bone* 93, 212–215.

- Hardouin, P., Rharass, T., and Lucas, S. (2016b). Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front. Endocrinol.* 7.
- Hata, K., Nishimura, R., Ikeda, F., Yamashita, K., Matsubara, T., Nokubi, T., and Yoneda, T. (2003). Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol. Biol. Cell* 14, 545–555.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Hesslein, D.G.T., Fretz, J.A., Xi, Y., Nelson, T., Zhou, S., Lorenzo, J.A., Schatz, D.G., and Horowitz, M.C. (2009). Ebf1-Dependent Control of the Osteoblast and Adipocyte Lineages. *Bone* 44, 537–546.
- Hill, T.P., Später, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W., and Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes. *Dev. Cell* 8, 727–738.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.
- Hodivala-Dilke, K.M., McHugh, K.P., Tsakiris, D.A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Culleré, M., Ross, F.P., Collier, B.S., Teitelbaum, S., and Hynes, R.O. (1999).  $\beta$ 3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.* 103, 229–238.
- Hoffman, C.M., and Calvi, L.M. (2014). Minireview: Complexity of Hematopoietic Stem Cell Regulation in the Bone Marrow Microenvironment. *Mol. Endocrinol.* 28, 1592–1601.
- Holmen, S.L., Giambenedi, T.A., Zylstra, C.R., Buckner-Berghuis, B.D., Resau, J.H., Hess, J.F., Glatt, V., Bouxsein, M.L., Ai, M., Warman, M.L., et al. (2004). Decreased BMD and Limb Deformities in Mice Carrying Mutations in Both Lrp5 and Lrp6. *J. Bone Miner. Res.* 19, 2033–2040.
- Horowitz, M.C., and Lorenzo, J.A. (2004). The origins of osteoclasts. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 464–468.
- Horowitz, M.C., and Lorenzo, J.A. (2007a). Immunologic regulation of bone development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 602, 47–56.
- Horowitz, M.C., and Lorenzo, J.A. (2007b). B lymphocytes and the skeleton. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1117, 82–93.
- Horton, M.A., and Helfrich, M.H. (2013). Integrins and Development: Integrins in Skeletal Cell Function and Development (Landes Bioscience).
- Huang, W., and Olsen, B.R. (2015). Skeletal Defects in Osterix-Cre Transgenic Mice. *Transgenic Res.* 24, 167–172.
- Hudak, C.S., and Sul, H.S. (2013). Pref-1, a Gatekeeper of Adipogenesis. *Front. Endocrinol.* 4.
- Hughes, D. e., Salter, D. m., Dedhar, S., and Simpson, R. (1993). Integrin expression in human bone. *J. Bone Miner. Res.* 8, 527–533.
- Hultenby, K., Reinholt, F.P., and Heinegård, D. (1993). Distribution of integrin subunits on rat metaphyseal osteoclasts and osteoblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 86–93.

- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). INTEGRIN LIGANDS. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903.
- Humphries, M.J., Sheridan, J., Mould, A.P., and Newham, P. (1995). Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design. *Ciba Found. Symp.* 189, 177–191; discussion 191-199.
- Huveneers, S., and Danen, E.H.J. (2009). Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–1069.
- Ito, Y., Teitelbaum, S.L., Zou, W., Zheng, Y., Johnson, J.F., Chappel, J., Ross, F.P., and Zhao, H. (2010). Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulating RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization. *J. Clin. Invest.* 120, 1981–1993.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269.
- Jakob, F., and Felsenberg, D. (2013). Grundlagen des Knochenstoffwechsels und pharmakologische Daten. *MKG-Chir.* 6, 72–79.
- James, A.W. (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* 2013, e684736.
- Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. (2007). Perspective: Quantifying Osteoblast and Osteocyte Apoptosis: Challenges and Rewards. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1492–1501.
- Jimenez, M.A., Åkerblad, P., Sigvardsson, M., and Rosen, E.D. (2007). Critical Role for Ebf1 and Ebf2 in the Adipogenic Transcriptional Cascade. *Mol. Cell. Biol.* 27, 743–757.
- Jokinen, J., Dadu, E., Nykvist, P., Käpylä, J., White, D.J., Ivaska, J., Vehviläinen, P., Reunanen, H., Larjava, H., Häkkinen, L., et al. (2004). Integrin-mediated Cell Adhesion to Type I Collagen Fibrils. *J. Biol. Chem.* 279, 31956–31963.
- Jung, G.-Y., Park, Y.-J., and Han, J.-S. (2011). Mediation of Rac1 activation by kindlin-2: An essential function in osteoblast adhesion, spreading, and proliferation. *J. Cell. Biochem.* 112, 2541–2548.
- Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steiniche, T., and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165–171.
- Justesen, J., Pedersen, S.B., Stenderup, K., and Kassem, M. (2004). Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng.* 10, 381–391.
- Kajkenova Oumitana, Lecka-Czernik Beata, Gubrij Igor, Hauser Simon P., Takahashi Kenshirou, Parfitt A. Michael, Jilka Robert L., Manolagas Stavros C., and Lipschitz David A. (2009). Increased Adipogenesis and Myelopoiesis in the Bone Marrow of SAMP6, a Murine Model of Defective Osteoblastogenesis and Low Turnover Osteopenia. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1772–1779.
- Kang, S., Bennett, C.N., Gerin, I., Rapp, L.A., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (2007). Wnt Signaling Stimulates Osteoblastogenesis of Mesenchymal Precursors by Suppressing CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 282, 14515–14524.
- Kanis, J.A., Oden, A., Johnell, O., Laet, C.D., Jonsson, B., and Oglesby, A.K. (2003). The components of excess mortality after hip fracture. *Bone* 32, 468–473.

- Kennell, J.A., and MacDougald, O.A. (2005). Wnt Signaling Inhibits Adipogenesis through  $\beta$ -Catenin-dependent and -independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* *280*, 24004–24010.
- Kim, J., Jang, J., Yang, C., Kim, E.J., Jung, H., and Kim, C. (2016a). Vimentin filament controls integrin  $\alpha 5\beta 1$ -mediated cell adhesion by binding to integrin through its Ser38 residue. *FEBS Lett.* *590*, 3517–3525.
- Kim, J., Yang, C., Kim, E.J., Jang, J., Kim, S.-J., Kang, S.M., Kim, M.G., Jung, H., Park, D., and Kim, C. (2016b). Vimentin filaments regulate integrin–ligand interactions by binding to the cytoplasmic tail of integrin  $\beta 3$ . *J Cell Sci* *129*, 2030–2042.
- Kim, J.H., Seong, S., Kim, K., Kim, I., Jeong, B.-C., and Kim, N. (2016c). Downregulation of Runx2 by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Induces the Transdifferentiation of Osteoblasts to Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Kim, K.-A., Kim, J.-H., Wang, Y., and Sul, H.S. (2007). Pref-1 (Preadipocyte Factor 1) Activates the MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway To Inhibit Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2294–2308.
- Kjoller, L., and Hall, A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* *253*, 166–179.
- Knouff, C., and Auwerx, J. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Calls for Activation in Moderation: Lessons from Genetics and Pharmacology. *Endocr. Rev.* *25*, 899–918.
- Kovach, T.K., Dighe, A.S., Lobo, P.I., and Cui, Q. (2015). Interactions between MSCs and Immune Cells: Implications for Bone Healing. *J. Immunol. Res.* *2015*.
- Kreis, S., Schönfeld, H.-J., Melchior, C., Steiner, B., and Kieffer, N. (2005). The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin  $\alpha 2/\beta 1$  cytoplasmic tail complex and co-localizes with native  $\alpha 2/\beta 1$  in endothelial cell focal adhesions. *Exp. Cell Res.* *305*, 110–121.
- Lane, S.W., De Vita, S., Alexander, K.A., Karaman, R., Milsom, M.D., Dorrance, A.M., Purdon, A., Louis, L., Bouxsein, M.L., and Williams, D.A. (2012). Rac signaling in osteoblastic cells is required for normal bone development but is dispensable for hematopoietic development. *Blood* *119*, 736–744.
- Lecka-Czernik, B. (2010). PPARs in Bone: The Role in Bone Cell Differentiation and Regulation of Energy Metabolism. *Curr. Osteoporos. Rep.* *8*, 84–90.
- Lecka-Czernik, B., Moerman, E.J., Grant, D.F., Lehmann, J.M., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2002). Divergent Effects of Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma 2$  Ligands on Adipocyte Versus Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* *143*, 2376–2384.
- Lee, K., Villena, J.A., Moon, Y.S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H.S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor–1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* *111*, 453–461.
- Legate, K.R., Montañez, E., Kudlacek, O., and Füssler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 20–31.
- Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* *23*, 397–418.
- Lento, W., Congdon, K., Voermans, C., Kritzik, M., and Reya, T. (2013). Wnt Signaling in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a008011.
- Lerner, U.H., and Ohlsson, C. (2015). The WNT system: background and its role in bone. *J. Intern. Med.* *277*, 630–649.

- Li, C., Cui, Y., Luan, J., Zhou, X., Li, H., Wang, H., Shi, L., and Han, J. (2016). Tenascin C affects mineralization of SaOS2 osteoblast-like cells through matrix vesicles. *Drug Discov. Ther.* 10, 82–87.
- Li, J., Zhang, N., Huang, X., Xu, J., Fernandes, J.C., Dai, K., and Zhang, X. (2013). Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis.* 4, e832.
- Li, Y., Terauchi, M., Vikulina, T., Roser-Page, S., and Weitzmann, M.N. (2014). B Cell Production of Both OPG and RANKL is Significantly Increased in Aged Mice. *Open Bone J.* 6, 8–17.
- Lian, J.B., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Hassan, M.Q., Gaur, T., and Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 212–227.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349–360.
- Lin, J.Z., and Farmer, S.R. (2016). Morphogenetics in brown, beige and white fat development. *Adipocyte* 5, 130–135.
- Liu, H., Zhang, J., Liu, C.-Y., Hayashi, Y., and Kao, W.W.-Y. (2012a). Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1114–1124.
- Liu, J., DeYoung, S.M., Zhang, M., Zhang, M., Cheng, A., and Saltiel, A.R. (2005). Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 2, 165–177.
- Liu, L.-F., Shen, W.-J., Ueno, M., Patel, S., and Kraemer, F.B. (2011). Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes. *BMC Genomics* 12, 212.
- Liu, Y., Berendsen, A.D., Jia, S., Lotinun, S., Baron, R., Ferrara, N., and Olsen, B.R. (2012b). Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 122, 3101–3113.
- Lobb, R.R., Antognetti, G., Pepinsky, R.B., Burkly, L.C., Leone, D.R., and Whitty, A. (1995). A direct binding assay for the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) interaction with alpha 4 integrins. *Cell Adhes. Commun.* 3, 385–397.
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 27–38.
- Long, F. (2012). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 27–38.
- MacDougald, O.A., and Lane, M.D. (1995). Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 345–373.
- Mackie, E.J., and Ramsey, S. (1996). Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *J. Cell Sci.* 109, 1597–1604.
- Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., et al. (2012). Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat. Med.* 18, 405–412.
- Malaval, L., Liu, F., Roche, P., and Aubin, J.E. (1999). Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 74, 616–627.

- Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (1995). Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 332, 305–311.
- Marie, P.J. (2012). Signaling Pathways Affecting Skeletal Health. *Curr. Osteoporos. Rep.* 10, 190–198.
- Marie, P.J., Haÿ, E., and Saidak, Z. (2014). Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 567–575.
- Martino, M.M., Mochizuki, M., Rothenfluh, D.A., Rempel, S.A., Hubbell, J.A., and Barker, T.H. (2009). Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2-D and 3-D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials* 30, 1089–1097.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.
- McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.-H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O., and Teitelbaum, S.L. (2000). Mice lacking  $\beta 3$  integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 105, 433–440.
- Moerman, E.J., Teng, K., Lipschitz, D.A., and Lecka-Czernik, B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- $\gamma 2$  transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways. *Aging Cell* 3, 379–389.
- Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.-H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002). Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5585–5592.
- Morales, E.C., Song, Y., Marin, R., Khor, B., and Nguyen, D. (2015). Rac GTPases have opposite roles in T cells and dendritic cells in mucosal immune function (MUC8P.730). *J. Immunol.* 194, 204.10-204.10.
- Morandi, E.M., Verstappen, R., Zwierzina, M.E., Geley, S., Pierer, G., and Ploner, C. (2016). ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Sci. Rep.* 6.
- Moursi, A.M., Globus, R.K., and Damsky, C.H. (1997). Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell Sci.* 110, 2187–2196.
- Mulloy, J.C., Cancelas, J.A., Filippi, M.-D., Kalfa, T.A., Guo, F., and Zheng, Y. (2010). Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. *Blood* 115, 936–947.
- Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M. (2014). *Janeway Immunologie* (Springer Berlin Heidelberg).
- Muruganandan, S., and Sinal, C.J. (2014). The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation. *IUBMB Life* 66, 147–155.
- Muruganandan, S., Roman, A.A., and Sinal, C.J. (2009a). Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 236–253.
- Muruganandan, S., Roman, A.A., and Sinal, C.J. (2009b). Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 236–253.
- Nakamura, I., Pilkington, M.F., Lakkakorpi, P.T., Lipfert, L., Sims, S.M., Dixon, S.J., Rodan, G.A., and Duong, L.T. (1999). Role of  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J Cell Sci* 112, 3985–3993.

- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and Crombrugge, B. de (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17–29.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone marrow adipocytes as negative regulators of the hematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259–263.
- Nie, J., and Sage, E.H. (2009). SPARC Inhibits Adipogenesis by Its Enhancement of  $\beta$ -Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 1279–1290.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779.
- Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2006). Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin–integrin interactions using recombinant  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 4$  integrins. *Matrix Biol.* 25, 189–197.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* 395, 137.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., and Silberstein, L.E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 126–131.
- Oki, Y., Watanabe, S., Endo, T., and Kano, K. (2008). Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid. *Cell Struct. Funct.* 33, 211–222.
- Olson, M.F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270–1272.
- Pacifici, R. (2010). T CELLS: CRITICAL BONE REGULATORS IN HEALTH AND DISEASE. *Bone* 47, 461–471.
- Panaroni, C., and Wu, J.Y. (2013). Interactions Between B Lymphocytes and the Osteoblast Lineage in Bone Marrow. *Calcif. Tissue Int.* 93, 261–268.
- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861–3863.
- Peng, X., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., et al. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352–1365.
- Pietschmann, P., Mechtcheriakova, D., Meshcheryakova, A., Föger-Samwald, U., and Ellinger, I. (2016). Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology* 62, 128–137.
- Poncin, G., Beaulieu, A., Humblet, C., Thiry, A., Oda, K., Boniver, J., and Defresne, M.-P. (2012). Characterization of Spontaneous Bone Marrow Recovery after Sublethal Total Body Irradiation: Importance of the Osteoblastic/Adipocytic Balance. *PLOS ONE* 7, e30818.
- Porter, J., and Bhimji, S. (2017). Osteoporosis. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

- del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M., and Sánchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 3609–3620.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., and Bokoch, G.M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. *Mol. Biol. Cell* 9, 1863–1871.
- Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2008). The hematopoietic stem cell niche. In *StemBook*, (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.
- Rachner, T.D., Khosla, S., and Hofbauer, L.C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *The Lancet* 377, 1276–1287.
- Rathinam, R., and Alahari, S.K. (2010). Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 223–237.
- Razidlo, D.F., Whitney, T.J., Casper, M.E., McGee-Lawrence, M.E., Stensgard, B.A., Li, X., Secreto, F.J., Knutson, S.K., Hiebert, S.W., and Westendorf, J.J. (2010). Histone Deacetylase 3 Depletion in Osteo/Chondroprogenitor Cells Decreases Bone Density and Increases Marrow Fat. *PLOS ONE* 5, e11492.
- Reginster, J.-Y., and Burlet, N. (2006). Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38, S4-9.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850.
- Reya, T., O’Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. *Immunity* 13, 15–24.
- Ridley, A.J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471–477.
- Rieusset, J., Andreelli, F., Auboeuf, D., Roques, M., Vallier, P., Riou, J.P., Auwerx, J., Laville, M., and Vidal, H. (1999). Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 48, 699–705.
- Robinson, J.A., Chatterjee-Kishore, M., Yaworsky, P.J., Cullen, D.M., Zhao, W., Li, C., Kharode, Y., Sauter, L., Babij, P., Brown, E.L., et al. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Is a Normal Physiological Response to Mechanical Loading in Bone. *J. Biol. Chem.* 281, 31720–31728.
- Rodda, S.J., and McMahon, A.P. (2006). Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133, 3231–3244.
- Rosen, C.J., and Bouxsein, M.L. (2006). Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2, 35–43.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885–896.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145–171.
- Rosen, C.J., Ackert-Bicknell, C., Rodriguez, J.P., and Pino, A.M. (2009). Marrow Fat and the Bone Microenvironment: Developmental, Functional, and Pathological Implications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19, 109–124.
- Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 289, 950–953.



- Rosnagl, S., Altmann, E., Sens, C., Kraft, S., Rau, K., Milsom, M.D., Giese, T., Samstag, Y., and Nakchbandi, I.A. (2016). EDA-Fibronectin Originating from Osteoblasts Inhibits the Immune Response against Cancer. *PLoS Biol.* 14, e1002562.
- Rutkovskiy, A., Stensl kken, K.-O., and Vaage, I.J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 95–106.
- Sadok, A., and Marshall, C.J. (2014). Rho GTPases. *Small GTPases* 5.
- Sah, V.P., Seasholtz, T.M., Sagi, S.A., and Brown, J.H. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 459–489.
- Saidak, Z., Le Henaff, C., Azzi, S., Marty, C., Da Nascimento, S., Sonnet, P., and Marie, P.J. (2015). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Mediates Osteoblast Differentiation Triggered by Peptide-induced  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Priming in Mesenchymal Skeletal Cells. *J. Biol. Chem.* 290, 6903–6912.
- Saoudi, A., Kassem, S., Dejean, A., and Gaud, G. (2014). Rho-GTPases as key regulators of T lymphocyte biology. *Small GTPases* 5.
- Sch eele, S., Nystr m, A., Durbeej, M., Talts, J.F., Ekblom, M., and Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J. Mol. Med.* 85, 825–836.
- Scheller, E.L., and Rosen, C.J. (2014). What’s the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 14–30.
- Scheller, E.L., Troiano, N., VanHoutan, J.N., Bouxsein, M.A., Fretz, J.A., Xi, Y., Nelson, T., Katz, G., Berry, R., Church, C.D., et al. (2014). Use of Osmium Tetroxide Staining with Microcomputerized Tomography to Visualize and Quantify Bone Marrow Adipose Tissue In Vivo. *Methods Enzymol.* 537, 123–139.
- Scheller, E.L., Cawthorn, W.P., Burr, A.A., Horowitz, M.C., and MacDougald, O.A. (2016). Marrow adipose tissue: trimming the fat. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 27, 392–403.
- Schilling, T., K uffner, R., Klein-Hitpass, L., Zimmer, R., Jakob, F., and Sch tze, N. (2008). Microarray analyses of transdifferentiated mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 103, 413–433.
- Schlessinger, K., Hall, A., and Tolwinski, N. (2009a). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* 23, 265–277.
- Schlessinger, K., Hall, A., and Tolwinski, N. (2009b). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* 23, 265–277.
- Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting.
- Schneider, G.B., Zaharias, R., and Stanford, C. (2001). Osteoblast Integrin Adhesion and Signaling Regulate Mineralization. *J. Dent. Res.* 80, 1540–1544.
- Schneider, J.G., Amend, S.H., and Weilbaecher, K.N. (2011). Integrins and bone metastasis: Integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone* 48, 54–65.
- Schneller, M., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1997).  $\alpha 5\beta 3$  integrin associates with activated insulin and PDGF $\beta$  receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16, 5600–5607.
- Schwartz, A.V. (2015). Marrow Fat and Bone: Review of Clinical Findings. *Front. Endocrinol.* 6.
- Seibel, M.J., Robins, S.P., and Bilezikian, J.P. (2006). Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications (Elsevier).

- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653.
- Sens, C., Huck, K., Pettera, S., Uebel, S., Wabnitz, G., Moser, M., and Nakchbandi, I.A. (2017a). Fibronectins containing extradomain A or B enhance osteoblast differentiation via distinct integrins. *J. Biol. Chem.* 292, 7745–7760.
- Sens, C., Altmann, E., Rau, K., Klemis, V., von Au, A., Pettera, S., Uebel, S., Damm, T., Tiwari, S., Moser, M., et al. (2017b). An O-Glycosylation of Fibronectin Mediates Hepatic Osteodystrophy Through  $\alpha 4\beta 1$  Integrin. *J. Bone Miner. Res.* 32, 70–81.
- Sens, C., Altmann, E., Rau, K., Klemis, V., von Au, A., Pettera, S., Uebel, S., Damm, T., Tiwari, S., Moser, M., et al. (2017c). An O-Glycosylation of Fibronectin Mediates Hepatic Osteodystrophy Through  $\alpha 4\beta 1$  Integrin. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 32, 70–81.
- Sens, C. (2016). Die Rolle verschiedener Fibronectin-Isoformen im Knochen. Dissertation
- Sinha, K.M., and Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.* 114, 975–984.
- Sinha, S., and Yang, W. (2008). Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell. Signal.* 20, 1927–1934.
- Sonowal, H., Kumar, A., Bhattacharyya, J., Gogoi, P.K., and Jaganathan, B.G. (2013). Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *J. Biomed. Sci.* 20, 71.
- Sordella, R., Jiang, W., Chen, G.-C., Curto, M., and Settleman, J. (2003). Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell* 113, 147–158.
- Spiegelman, B.M., and Ginty, C.A. (1983). Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3t3-adipocytes. *Cell* 35, 657–666.
- Staal, F.J.T., and Clevers, H.C. (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 21–30.
- Stains, J.P., and Civitelli, R. (2005). Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 75, 72–80.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., et al. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427–3433.
- Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X., Suda, T., et al. (2012). Noncanonical Wnt Signaling Maintains Hematopoietic Stem Cells in the Niche. *Cell* 150, 351–365.
- Sul, H.S., Smas, C., Mei, B., and Zhou, L. (2000). Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 24 Suppl 4, S15-19.
- Svedbom, A., Hernlund, E., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E.V., Jönsson, B., Kanis, J.A., and EU Review Panel of IOF (2013). Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch. Osteoporos.* 8, 137.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R.M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468, 521–526.

- Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1998a). The Role of Osteoblasts in the Hematopoietic Microenvironment. *STEM CELLS* 16, 7–15.
- Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1998b). The Role of Osteoblasts in the Hematopoietic Microenvironment. *STEM CELLS* 16, 7–15.
- Takada, I., Suzawa, M., Matsumoto, K., and Kato, S. (2007a). Suppression of PPAR Transactivation Switches Cell Fate of Bone Marrow Stem Cells from Adipocytes into Osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 182–195.
- Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M.-Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., et al. (2007b). A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- $\gamma$  transactivation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1273–1285.
- Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M.-Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., et al. (2007c). A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- $\gamma$  transactivation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1273–1285.
- Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009a). Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 593–603.
- Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009b). Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447.
- Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009c). Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007d). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.
- Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012). Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 715–736.
- Trombetti, A., Herrmann, F., Hoffmeyer, P., Schurch, M.A., Bonjour, J.P., and Rizzoli, R. (2002). Survival and Potential Years of Life Lost After Hip Fracture in Men and Age-matched Women. *Osteoporos. Int.* 13, 731–737.
- Tucker, R.P., and Chiquet-Ehrismann, R. (2015). Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65, 165–168.
- Tuckwell, D., and Humphries, M. (1996). Integrin–collagen binding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7, 649–657.
- Tybulewicz, V.L.J., and Henderson, R.B. (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 630–644.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.
- Ullah, M., Stich, S., Notter, M., Eucker, J., Sittinger, M., and Ringe, J. (2013). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. *Differentiation* 85, 78–90.
- Ullah, M., Sittinger, M., and Ringe, J. (2014). Transdifferentiation of adipogenically differentiated cells into osteogenically or chondrogenically differentiated cells: Phenotype switching via dedifferentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46, 124–137.

- Volloch, V., and Olsen, B.R. (2013). Why cellular stress suppresses adipogenesis in skeletal tissue, but is ineffective in adipose tissue: Control of mesenchymal cell differentiation via integrin binding sites in extracellular matrices. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 32.
- Walmsley, M.J., Ooi, S.K.T., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P., and Tybulewicz, V.L.J. (2003). Critical Roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B Cell Development and Signaling. *Science* 302, 459–462.
- Wan, Q., Cho, E., Yokota, H., and Na, S. (2013). Rac1 and Cdc42 GTPases regulate shear stress-driven  $\beta$ -catenin signaling in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 502–507.
- Wan, Y., Chong, L.-W., and Evans, R.M. (2007). PPAR- $\gamma$  regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* 13, 1496–1503.
- Wang, Y., and Sul, H.S. (2009). Pref-1 Regulates Mesenchymal Cell Commitment and Differentiation through Sox9. *Cell Metab.* 9, 287–302.
- Wang, Z., and Ema, H. (2016). Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. *Int. J. Hematol.* 103, 498–509.
- Wang, D., Haile, A., and Jones, L.C. (2013). Dexamethasone-induced lipolysis increases the adverse effect of adipocytes on osteoblasts using cells derived from human mesenchymal stem cells. *Bone* 53, 520–530.
- Wang, L., Mishina, Y., and Liu, F. (2015). Osterix-Cre transgene causes craniofacial bone development defect. *Calcif. Tissue Int.* 96, 129–137.
- Wang, Y., Kim, K.-A., Kim, J.-H., and Sul, H.S. (2006). Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis. *J. Nutr.* 136, 2953–2956.
- Wang, Y., Zhao, L., Smas, C., and Sul, H.S. (2010). Pref-1 Interacts with Fibronectin To Inhibit Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3480–3492.
- Wang, Y., Liu, Y., Fan, Z., Liu, D., Wang, F., and Zhou, Y. (2017). IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. *PLoS ONE* 12.
- Watabe, H., Furuhashi, T., Tani-Ishii, N., and Mikuni-Takagaki, Y. (2011). Mechanotransduction activates  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Exp. Cell Res.* 317, 2642–2649.
- Wein, M.N. (2017). Bone Lining Cells: Normal Physiology and Role in Response to Anabolic Osteoporosis Treatments. *Curr. Mol. Biol. Rep.* 3, 79–84.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* 117, 1301–1312.
- Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S.B., Aspenström, P., and Severinson, E. (2001). Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood* 98, 1086–1094.
- van de Wetering, M., de Lau, W., and Clevers, H. (2002). WNT Signaling and Lymphocyte Development. *Cell* 109, S13–S19.
- White, U.A., and Tchoukalova, Y.D. (2014). Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 377–392.
- Wier, M.L., and Scott, R.E. (1986). Regulation of the terminal event in cellular differentiation: biological mechanisms of the loss of proliferative potential. *J. Cell Biol.* 102, 1955–1964.

- Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S., and Stricker, S. (2009). Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr. Patterns* 9, 215–223.
- Wu, J.Y., Purton, L.E., Rodda, S.J., Chen, M., Weinstein, L.S., McMahon, A.P., Scadden, D.T., and Kronenberg, H.M. (2008). Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs $\alpha$ -dependent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16976–16981.
- Wu, J.Y., Aarnisalo, P., Bastepe, M., Sinha, P., Fulzele, K., Selig, M.K., Chen, M., Poulton, I.J., Purton, L.E., Sims, N.A., et al. (2011). Gs $\alpha$  enhances commitment of mesenchymal progenitors to the osteoblast lineage but restrains osteoblast differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3492–3504.
- Wu, X., Quondamatteo, F., Lefever, T., Czuchra, A., Meyer, H., Chrostek, A., Paus, R., Langbein, L., and Brakebusch, C. (2006). Cdc42 controls progenitor cell differentiation and  $\beta$ -catenin turnover in skin. *Genes Dev.* 20, 571–585.
- Würfel, C. (2015). Die Rolle der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 bei der Knochenentwicklung. Dissertation
- Xu, J., and Liao, K. (2004). Protein Kinase B/AKT 1 Plays a Pivotal Role in Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Signaling Induced 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 35914–35922.
- Xu, X., Li, R., Zhou, Y., Zou, Q., Ding, Q., Wang, J., Jin, W., Hua, G., and Gao, J. (2017). Dysregulated systemic lymphocytes affect the balance of osteogenic/adipogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells after local irradiation. *Stem Cell Res. Ther.* 8.
- Yamamoto, N., Otsuka, T., Kondo, A., Matsushima-Nishiwaki, R., Kuroyanagi, G., Kozawa, O., and Tokuda, H. (2015). Rac limits TGF- $\beta$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 405, 35–41.
- Yan, Y., Yan, Y., Sun, H., Sun, H., Gong, Y., Gong, Y., Yan, Z., Yan, Z., Zhang, X., Zhang, X., et al. (2016). Mechanical strain promotes osteoblastic differentiation through integrin- $\beta$ 1-mediated  $\beta$ -catenin signaling. *Int. J. Mol. Med.* 38, 594–600.
- Yang, F.-C., Atkinson, S.J., Gu, Y., Borneo, J.B., Roberts, A.W., Zheng, Y., Pennington, J., and Williams, D.A. (2001). Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5614–5618.
- Yang, L., Wang, L., Kalfa, T.A., Cancelas, J.A., Shang, X., Pushkaran, S., Mo, J., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2007a). Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis. *Blood* 110, 3853–3861.
- Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J.A., Mo, J., and Zheng, Y. (2007b). Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5091–5096.
- Yang, T.T.C., Xiong, Q., Enslin, H., Davis, R.J., and Chow, C.-W. (2002). Phosphorylation of NFATc4 by p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3892–3904.
- Yavropoulou, M.P., and Yovos, J.G. (2016). The molecular basis of bone mechanotransduction. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 16, 221–236.
- Zeng, Q., Guo, Y., Liu, Y., Li, R., Zhang, X., Liu, L., Wang, Y., Zhang, X., and Zou, X. (2015). Integrin- $\beta$ 1, not integrin- $\beta$ 5, mediates osteoblastic differentiation and ECM formation promoted by mechanical tensile strain. *Biol. Res.* 48.

Zhang, C. (2010). Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J. Orthop. Surg.* 5, 37.

Zhu, J., Garrett, R., Jung, Y., Zhang, Y., Kim, N., Wang, J., Joe, G.J., Hexner, E., Choi, Y., Taichman, R.S., et al. (2007). Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109, 3706–3712.

Zhu, M., Sun, B., Saar, K., Simpson, C., Troiano, N., Dallas, S.L., Tiede-Lewis, L.M., Nevius, E., Pereira, J.P., Weinstein, R.S., et al. (2016). Deletion of *Rac* in Mature Osteoclasts Causes Osteopetrosis, an Age-Dependent Change in Osteoclast Number, and a Reduced Number of Osteoblasts In Vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31, 864–873.

Zhuang, H., Zhang, X., Zhu, C., Tang, X., Yu, F., Shang, G.W., and Cai, X. (2016). Molecular Mechanisms of PPAR- $\gamma$  Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 11, 255–264.

Zuo, Y., Qiang, L., and Farmer, S.R. (2006). Activation of CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP)  $\alpha$  Expression by C/EBP $\beta$  during Adipogenesis Requires a Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$ -associated Repression of HDAC1 at the *C/ebpa* Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 281, 7960–7967.

Taschenlehrbuch Histologie - Lüllmann-Rauch, Renate.

#### **Webseiten:**

<https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>

Osteoporose: Leitlinien des Dachverbands der Deutschsprachigen wissenschaftlichen Gesellschaft e.V. 2014

## 6. Zusammenfassung

Die Tendenz im zunehmenden Alter an Osteoporose zu erkranken steigt jährlich in den entwickelten Ländern und führt zu enormen Kosten im Gesundheitswesen. Deshalb ist es notwendig den Auslöser einer solchen Erkrankung ausfindig zu machen und ein neues Verständnis auf zellbiologischer Ebene zu bekommen um pharmakologisch entgegen zu wirken. Im Knochenmark können mesenchymale Stromazellen (MSC) sowohl zu Adipozyten als auch zu Osteoblasten differenzieren. Beim Altern ist die Verminderung der Knochendichte mit einer Reduzierung der Osteoblasten und einer Zunahme der Adipozyten im Knochenmark assoziiert. Dabei kontrollieren Integrine die Interaktion der Zellen mit der Matrix. Dies wird durch eine Reihe weiterer Moleküle, wie die beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, moduliert. Ziel dieser Arbeit ist, die Integrin-Matrix-Interaktion bei der Differenzierung der MSCs zu Adipozyten oder Osteoblasten im Knochenmark zu charakterisieren und die Rolle der beiden RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 hierbei zu untersuchen.

In der Arbeit zeigte sich, dass sich das Expressionsmuster der Integrine von MSCs zu Osteoblasten verändert, dabei verringerte sich das Integrin  $\alpha 4$  und  $\beta 3$ , wohingegen  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  anstiegen. Eine Stimulation der MSCs und Osteoblasten durch das Matrixprotein Tenascin C, welches ein Ligand von dem Integrin  $\beta 3$  ist und  $\beta 3$  stimuliert, führte zu einer Verminderung des adipogenen Hauptregulators PPAR $\gamma$ . Durch eine genetische Ausschaltung von Integrin  $\beta 3$  stieg die PPAR $\gamma$ -mRNA Expression in den MSCs und Osteoblasten an, wohingegen durch die pharmakologische Stimulation mit Echistatin die osteogene Differenzierung erhöht und die adipogenen Faktoren *in vitro* beeinträchtigt wurden.

Im Weiteren wurden zwei relevante RhoGTPasen Cdc42 und Rac1, welche auch im Integrin-Signalweg involviert sind, untersucht. Die chemische Inhibition der beiden RhoGTPasen reduzierte die osteogene Differenzierung und führte zu einem Anstieg der mRNA Expression der adipogenen Marker DLK1, C/EBP $\beta$  und PPAR $\gamma$  und der Anzahl der Präadipozyten. Dabei aktiviert Cdc42 die MAP-Kinasen und kann somit die Adipogenese *in vitro* fördern oder inhibieren.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass die richtigen Kontrollen bei *in vivo* Experimenten von Mausmodellen unbedingt zu Rate gezogen werden müssen. Denn es zeigte sich, dass die osteogene Differenzierung der Osteoblasten aus der Calvaria von Neugeborenen Mäusen, welche nur die Osx-GFP::Cre Mutation tragen, *in vitro* vermindert und die adipogene erhöht wurde. Interessanterweise stieg die Anzahl der Adipozyten in diesen Mäusen im Alter von drei Wochen im Knochenmark an. Weitere histomorphometrische Parameter blieben allerdings unbeeinflusst. Jedoch wurden auch die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, sowie die lymphatischen Vorläuferzellen durch die Anwesenheit der Osx-GFP::Cre Mutation beeinträchtigt. Dieser Effekt konnte durch die Suppression von der Cre-Rekombinase durch Doxzyklin aufgehoben werden. Ebenfalls konnte festgehalten werden, dass die Expression von Cdc42 in den MSCs die Myelopoese und Erythropoese beeinflussen kann, da in ihrer Abwesenheit die Erythrozyten in der Peripherie erhöht waren. Einen Effekt der Rac1 Expression in den MSCs auf die Hämatopoese konnte nicht festgestellt werden

Damit konnte zum einen gezeigt werden, dass Integrine wie  $\beta 3$  und die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 in den MSCs dafür verantwortliche sein können, ob die osteogene oder adipogene Differenzierung gefördert wird. Zum anderen ist die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Osx-Promotors nicht geeignet für die Untersuchung der MSC Differenzierung zu Adipozyten oder Osteoblasten und der Hämatopoese im Knochenmark, und zuletzt, dass Cdc42 in den MSCs die Hämatopoese beeinflussen kann.

## 7. Tagungsbeiträge aus dieser Arbeit

- 09/2018  
Poster
- ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research)  
Montreal, Quebec, Kanada  
**K. Huck**, C. Sens-Albert, I. Nakchbandi  
Osterix-cre expression by itself enhances adipogenic differentiation of stromal cells and affects hematopoiesis
- ASBMR, Montreal, Quebec, Kanada  
**K. Huck**, C. Sens-Albert, I. Nakchbandi  
The role of the RhoGTPase cdc42 in the differentiation of mesenchymal stromal cells to osteoblasts and adipocyte
- 03/2018  
Vortrag
- Osteologie-Kongress, Dresden, Forum Junge Wissenschaft der DGO  
**K. Huck**, C. Sens, I. Nakchbandi  
Integrin  $\alpha\beta3$  übt eine duale Funktion auf die Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen zu Adipozyten oder Osteoblasten aus
- 03/2017  
Vortrag & Poster
- Osteologie-Kongress, Erlangen, Forum Junge Wissenschaft der DGO  
**K. Huck**, C. Sens, I. Nakchbandi  
Interaktionen intrazellulärer Signale in mesenchymalen Stromazellen entscheiden über dessen Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten
- 03/2017  
Poster
60. Deutscher Kongress der Endokrinologie, Würzburg  
**K. Huck**, C. Sens, I. Nakchbandi  
Cdc42 controls the differentiation of mesenchymal stroma cells to osteoblasts and adipocytes
- 03/2016  
Vortrag & Poster
- Osteologie-Kongress, Essen, Forum Junge Wissenschaft der DGO  
**K. Rau**, C. Würfel, C. Sens, C. Hoffmann, I. Nakchbandi  
Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 modulieren die Transdifferenzierung von Osteoblasten zu Adipozyten im Knochenmark



## 8. Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name: **Katrin Eva Huck (geb. Rau)**

### Ausbildungsweg:

---

seit 02/2014	<p><b>Promotion</b>  <b>Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Heidelberg</b>          bei Frau Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi, Translationale Medizin  <b>Thema:</b> <i>Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 modulieren die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark</i></p>
10/2011-01/2014	<p><b>Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main</b>  <b>International ausgerichteter Master of Science</b> in „Cell biology and Physiology“; Masterthesis bei Prof. Dr. med. Georg Auburger, an dem Institut für „Experimentelle Neurologie“ des interdisziplinären Zentrums für Neurowissenschaften Frankfurt (IZNF)  <b>Thema:</b> <i>Investigation of putative biomarker in Parkinson´s disease</i></p>
10/2008-09/2011	<p><b>Eberhard-Karls-Universität Tübingen</b>  <b>Bachelor of Science</b> in Biologie          Bachelorthesis bei Prof. Dr. med. Reinhild Klein, im „Immunpathologischen Labor“ an der Universitätsklinik Tübingen  <b>Thema:</b> <i>Der Einfluss von mitochondrialen Antigenen auf immunkompetente Zellen in vitro</i></p>
04/2008-06/2008	Ferienjob im Mercedes-Benz Werk Gaggenau, Abteilung Werkstoffprüfung
11/2007-03/2008	viermonatiger Besuch der Sprachschule Berlitz (Business English, CEF B1)
1998 – 2007	Ludwig-Wilhelm-Gymnasium Rastatt, Abschluss: Abitur
1994 – 1998	Hansjakob Grundschule, Rastatt

### Publikationen:

---

03/2017	<p>Sens, C.<sup>1</sup>, <b>Huck, K.</b><sup>1</sup>, Pettera, S., Uebel, S., Wabnitz, G., Moser, M., and Nakchbandi, I.A. (2017). Fibronectins containing extradomain A or B enhance osteoblast differentiation via distinct integrins. <i>J. Biol. Chem.</i> 292, 7745–7760.  <sup>1</sup> equal contribution</p>
01/2017	<p>Sens, C., Altmann, E., <b>Rau, K.</b>, Klemis, V., von Au, A., Pettera, S., Uebel, S., Damm, T., Tiwari, S., Moser, M., et al. (2017). An O-Glycosylation of Fibronectin Mediates Hepatic Osteodystrophy Through <math>\alpha 4\beta 1</math> Integrin. <i>J. Bone Miner. Res.</i> 32, 70–81</p>

- 09/2016 Rossnagl, S., Altmann, E., Sens, C., Kraft, S., **Rau, K.**, Milsom, M.D., Giese, T., Samstag, Y., and Nakchbandi, I.A. (2016). EDA-Fibronectin Originating from Osteoblasts Inhibits the Immune Response against Cancer. *PLoS Biol.* 14, e1002562.
- 09/2015 Brehm, N.<sup>1</sup>, **Rau, K.**<sup>1</sup>, Kurz, A., Gispert, S., and Auburger, G. (2015). Age-Related Changes of 14-3-3 Isoforms in Midbrain of A53T-SNCA Overexpressing Mice. *J. Park. Dis.* 5, 595–604.  
<sup>1</sup> equal contribution
- 08/2015 Gispert, S., Kurz, A., Brehm, N., **Rau, K.**, Walter, M., Riess, O., and Auburger, G. (2015). Complexin-1 and Foxp1 Expression Changes Are Novel Brain Effects of Alpha-Synuclein Pathology. *Mol. Neurobiol.* 52, 57–63

#### weitere Tagungsbeiträge:

---

- 03/2017  
Vortrag & Poster Osteologie-Kongress, Erlangen, Young Investigator Osteologie Symposium YIOSS  
**K. Huck**, S. Rossnagl, T. Todenhöfer, J. Hennenlotter, A. Stenzl, J. Kuhlmann, P. Wimberg, F. Jakob, I. Nakchbandi  
Die Modifikation der Stromazellen im Knochenmark beeinflusst die Tumoreinnistung und kann als Marker für DTCs verwendet werden
- 05/2016  
Poster ECTS (European Calcified Tissue Society) Kongress; Rom  
Sens C, **Rau K**, Altmann E, Klemis V, Kawelke N, Tiwari S, Nakchbandi IA  
An isoform of fibronectin is responsible for bone loss in hepatic osteodystrophy and its deleterious effects can be prevented by binding the mediating receptor  
  
Sens C, **Rau K**, Nakchbandi IA  
Two different domains of fibronectin stimulate osteoblast differentiation by activating distinct integrins
- 03/2016  
Vortrag Young Investigator Osteologie Symposium YIOSS  
Sens C, **Rau K**, Kawelke N, Nakchbandi IA  
EDA-Fibronectin moduliert die Osteoblastendifferenzierung in vitro und in vivo
- 10/2015  
Poster ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) Annual Meeting; Seattle, Washington, USA  
Sens C, **Rau K**, Klemis V, Nakchbandi IA: EDA and EDB Containing Fibronectin Stimulate Osteoblast Differentiation by Acting on  $\alpha 4\beta 1$  and  $\beta 3$  Integrins Respectively

#### Zusatzqualifikationen:

---

- 04/2014 FELASA-B Zertifikat für tierexperimentelles Arbeiten
- Fremdsprachen: Deutsch (Muttersprache)  
Englisch sehr gut in Wort und Schrift
- EDV-Kenntnisse: MS-Office, Adobe Photoshop, ImageJ, GraphPad Prism 5, BD Diva, NIS-Elements, NCBI-pubmed

**Stipendien:**

---

seit 02/2014	Stipendium des Max-Planck-Instituts für Biochemie
03/2017	Reisestipendium der DAdorW für den Osteologie-Kongress in Erlangen
03/2017	Reisestipendium der DGE für den Endokrinologie-Kongress in Würzburg

K.Huck  
Eppelheim, 14.05.2018

## 9. Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Möglichkeit meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Vielen Dank auch für die Unterstützung, Betreuung und die anregenden Gespräche, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenso einen Dank dafür, dass ich während der Promotion die Möglichkeit bekam meine Arbeit auf Kongressen vorstellen und vertreten zu können um mich dadurch auch auf der Präsentationsebene weiterzuentwickeln.

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee möchte ich besonders danken, dass er sich bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit zu betreuen und das Erstgutachten anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Reinhard Fässler vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für die finanzielle Unterstützung. Des Weiteren bei Prof. Dr. Stefan Meuer für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und für die Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen am Institut für Immunologie.

Bei Carina Würfel und Carla Sens-Albert bedanke ich mich für die Vorarbeiten, auf denen mein Projekt aufbaute. Vor allem möchte ich mich bei meinen teils ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Carina Würfel, Sabrina Kraft, Stephanie Rossnagl, Eva Altmann, Carla Sens-Albert, Verena Klemis, Hiba Ghura, Alexander Lubosch, Stefan Hamelmann und Franziska Wirth für das tolle und freundschaftliche Arbeitsklima bedanken - ihr habt die Zeit im Labor unvergesslich gemacht. Ein Dankeschön auch an Christiane Brenner und Juri Habicht, die an verschiedenen Stellen oft mit Tipps zur Seite standen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie und Freunde, insbesondere an meine Eltern Simone und Peter, meine Großeltern Eva und Fred und meine Tageseltern Uli und Thomas, die mich immer unterstützt haben und stets motivierende und aufbauende Worte in jeder Lebenslage für mich parat haben - ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Ein besonderer Dank geht dabei an Mario, der mich jeden Tag unterstützt und motiviert und einfach immer für mich da ist.

## 10. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 modulieren die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark*“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.05.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Heidelberg, den 27.07.2018

K. Huck

Katrin Huck