

Aus dem
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Michael Schütz

Habilitationsschrift

Lokale und systemische Regulations- und Kommunikationsmechanismen im Knochenstoffwechsel

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Johannes Keller
aus Illertissen**

Eingereicht: Februar 2017

Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries

1. Gutachterin: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Gutachterin: Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der relevanten Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
2. Ergebnisse	6
2.1. Die Rolle der Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules in der Regulation des Knochenstoffwechsels	6
2.2. Direkte Hemmung der Knochenresorption durch FZD8, einem WNT Co-Rezeptor	25
2.3. Regulation der Knochenformation durch den Serpentinrezeptor FZD9	38
2.4. Calcitonin kontrolliert die Knochenformation durch Reduktion der Freisetzung von Sphingosin-1-Phosphat aus Osteoklasten	58
2.5. Systemisch erhöhte IL17A Spiegel in Psoriasis bewirken den Verlust von Knochenmasse durch Hemmung des WNT Signalwegs in Osteoblasten	74
2.6. Osteocalcin ist assoziiert mit Testosteron in der allgemeinen Bevölkerung und in Patienten mit Knochenerkrankungen	87
3. Diskussion	95
3.1. Die molekulare Regulation der Knochenresorption	95
3.2. Der WNT Signalweg in der molekularen Kontrolle des Knochenumbaus	96
3.3. Kopplung der Knochenformation an die Knochenresorption	97
3.4. Systemische Regulation des Knochenumbaus durch periphere Entzündungen	98
3.5. Knochen als endokrines Organ	99
4. Zusammenfassung	100
5. Literaturangaben	101
6. Anhang	108
6.1. Danksagung	108
6.2. Erklärung	109

Abkürzungen

CEACAM Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule

COL1A1 Kollagen Typ I alpha 1

CT Calcitonin

CTR Calcitoninrezeptor

CTX C-terminale Crosslinks

FZD Frizzled

IBSP Integrin Binding Sialoprotein

ICAM1 Intercellular Adhesion Molecule 1

IL17A Interleukin-17A

ISG15 Interferon Stimulated Gene 15

LRP Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein

LYSM Lysozym M

M-CSF Macrophage colony-stimulating factor

OPG Osteoprotegerin

PTH Parathormon

RANKL Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

RUNX2 Runt-Related Transcription Factor 2

S1P Sphingosin-1-Phosphat

S1PR3 Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 3

SGPL1 Sphingosin-1-Phosphat Lyase 1

SMPD3 Sphingomyelin Phosphodiesterase 3

SPNS2 Spinster Homolog 2

VCAM1 Vascular Cellular Adhesion Molecule 1

WNT Wingless and Int-1

NFATC1 Nuclear Factor of Activated T-Cells, Cytoplasmic 1

1. Einleitung

Das Skelett besitzt zwei Hauptfunktionen im gesunden Organismus. Zum einen ist Knochen ein sehr stabiles und ausdauerndes Gewebe, das die Last des gesamten Körpers trägt, eine rasche Fortbewegung ermöglicht und als Schutz für innere Organe dient. Zum anderen repräsentiert Knochen das Hauptreservoir an Kalzium und fungiert als dynamischer Speicher, der unmittelbar auf intra- und extrazelluläre Veränderungen des Kalziumspiegels reagieren kann. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Aufrechterhaltung des Knochengewebes als entscheidende Überlebensfunktion zu betrachten, die von der Aktivität der beiden Schlüsselzellen im Knochen, den Osteoblasten und den Osteoklasten, abhängig ist (Karsenty, 2012).

Die Neubildung von Knochen (Knochenformation) wird durch Osteoblasten ausgeführt, die von mesenchymalen Stammzellen abstammen. Die osteogene Differenzierung dieser Vorläuferzellen ist besonders von den Transkriptionsfaktoren Runx-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) in frühen Stadien und später von Osterix abhängig (Zaidi, 2007). Osteoblasten sezernieren eine spezifische Kombination von extrazellulären Peptiden wie Kollagen Typ I alpha 1 (COL1A1), Osteocalcin und Alkalische Phosphatase. Diese Proteine bilden zuerst die nicht-mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid), die später unter dem Einfluss von Integrin Binding Sialoprotein (IBSP) und Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 (SMPD3) durch die Inkorporation von Kalziumphosphat mineralisiert und in der Formation von leichtem, jedoch äußerst stabilem Knochengewebe resultiert (Hunter und Goldberg, 1994; Aubin et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird die Knochenresorption durch Osteoklasten vermittelt, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen hervorgehen und hochspezialisierte, multinukleäre Riesenzellen repräsentieren. Diese Vorläuferzellen stellen auch den Ursprung von Zellen der Monozyten/Makrophagenlinie dar, die jedoch unter dem Einfluss von Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) und Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) zu Osteoklasten fusionieren (Kodama et al., 1991; Dai et al., 2002; Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998). Dieser Prozess ist von Transmembranproteinen wie Macrophage Fusion Receptor und Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein abhängig und wird durch Zelladhäsionsmoleküle wie Vascular Cellular Adhesion Molecule 1 (VCAM1) und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) potenziert (Michigami et al., 2000; Pearse et al., 2001). RANKL wird primär von Osteoblasten exprimiert, sodass eine unmittelbare Kopplung der Knochenresorption an die Knochenformation erfolgen kann.

Die kombinierte Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten wird als Knochenumbau beschrieben, der den grundlegenden zellulären Mechanismus zum Erhalt der Knochenmasse, -Struktur, und -Qualität darstellt (Abb. 1). Der Knochenumbau findet kontinuierlich an multiplen Lokalisationen innerhalb des Skelettsystems statt und unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. Mechanosensorische, autokrine und parakrine Signale sichern die Adaption des Knochengewebes an wechselnde mechanische Belastungen. Von besonderer Bedeutung auf dieser lokalen Ebene ist der WNT Signalweg, der die Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen sowie die Funktion ausdifferenzierter Knochenzellen entscheidend beeinflusst (Clevers und Nusse, 2012). Auf systemischer Ebene vermitteln im Blut zirkulierende Faktoren wie Parathormon (PTH) oder Calcitonin (CT) die Signale endokriner Organe und erlauben so die Anpassung des Organismus an unterschiedliche Stoffwechsellagen (Martin und Sims, 2015). Gemäß den Gesetzen der negativen Rückkopplung verschiedener Organsysteme bestehen darüber hinaus Hinweise, dass Knochen selbst

endokrine Funktionen ausübt und beispielsweise den Glukosestoffwechsel oder die Testosteronsynthese reguliert (Karsenty, 2012).

Durch die Komplexität der Regulations- und Kommunikationsmechanismen im Knochenstoffwechsel können diese Prozesse auf mehreren Ebenen empfindlich gestört werden und aus dem Gleichgewicht geraten. In der rheumatoiden Arthritis beispielsweise, der häufigsten entzündlichen Gelenkerkrankung weltweit, führt die lokale Inflammation zu einer Interleukin-17A (IL17A) vermittelten Steigerung der Osteoklastenformation, die eine gelenknahe Knochendestruktion verursacht (Schett und Gravallese, 2012). Im Falle der Osteoporose, der häufigsten Knochenerkrankung des Menschen mit hohen sozioökonomischen Auswirkungen, kommt es durch verschiedene lokale und systemische Alterationen zu einem Knochenmasseverlust und damit zu einer erhöhten Fraktur neigung (Cole et al., 2008). Obgleich heutzutage auch komplexe osteoporotische Frakturen technisch sicher und komplikationsarm versorgt werden können, ist die Hospitalisierung betroffener Patienten aufgrund Immobilität und nosokomialen Infektionen mit einer verhältnismäßig hohen Gesamtmorbidität und –Mortalität verbunden. Demnach besteht ein großes klinisches Interesse, dem Knochenmasseverlust präventiv zu begegnen und auch in älteren Patienten eine gesunde Knochenstruktur anzustreben. Hierfür ist das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Differenzierung und Funktion von Knochenzellen von höchster Bedeutung, um langfristig neuartige Therapieformen für Patienten mit Knochenerkrankungen etablieren zu können.

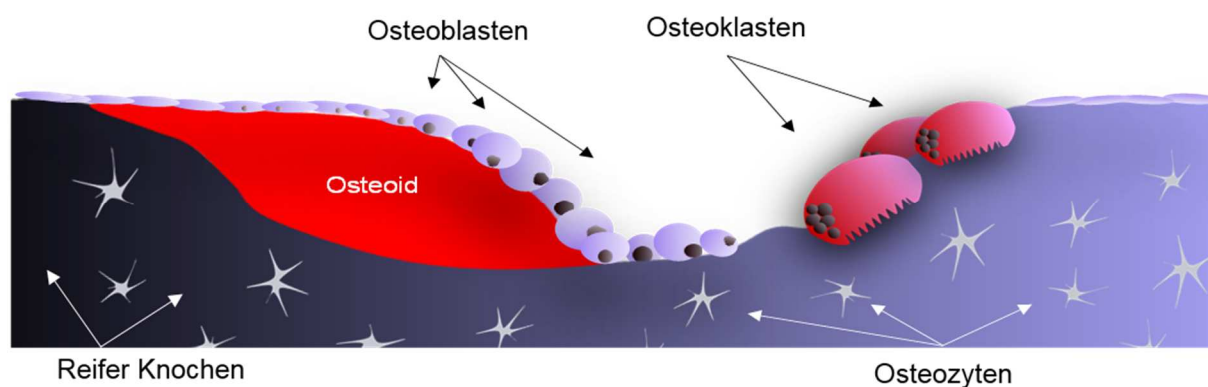


Abb. 1. Schematische Skizze des Knochenbaus. Osteoklasten, die einzigen Zellen im Organismus mit der Fähigkeit zur Knochenresorption, bauen gealtertes Knochengewebe ab und beginnen somit einen typischen Umbauzyklus im Knochen. Diese multinukleären Zellen sekretieren Salzsäure und proteolytische Enzyme in die Resorptionslakune, was zu der Freisetzung von Kalzium und der Degradation der organischen Knochenmatrix führt. Nachfolgend migrieren Osteoblasten zu der Stelle des Knochenabbaus und füllen den Defekt mit nicht-mineralisierter Knochenmatrix (Osteoid), die durch die Inkorporation von Kalziumphosphat im weiteren Verlauf mineralisiert. Osteoblasten, die im neu geformten Knochengewebe eingebettet werden, differenzieren zu Osteozyten. Modifiziert nach Keller, 2011.

2. Ergebnisse

2.1. Die Rolle der Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules in der Regulation der Knochenresorption.

Increased osteoclastogenesis in mice lacking the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1.

Heckt T, Bickert T, Jeschke A, Seitz S, Schulze J, Ito WD, Zimmermann W, Amling M, Schinke T, Horst AK, **Keller J**.

PLoS One. 2014, 9(12):e114360

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114360>

Im gesunden Organismus wird der Knochenumbau durch die balancierte Aktivität der knochenresorbierenden Osteoklasten und der knochenbildenden Osteoblasten aufrechterhalten. In der Osteoporose findet sich zumeist eine relative Erhöhung der Knochenresorption im Vergleich zur Knochenformation, was in einem kontinuierlichen Verlust an Knochenmasse resultiert. Nachdem eine exzessive Knochenresorption nicht nur in der Osteoporose, sondern auch im Falle des Morbus Paget oder tumorinduzierten Osteolysen beobachtet werden kann, ist es von hoher Bedeutung, die molekularen Regulationsmechanismen der Osteoklastenformation zu verstehen (Roodman, 1995; Goltzman, 2001). In der Vergangenheit konnten sowohl auf systemischer als auch auf lokaler Ebene entscheidende Regulatoren dieser Prozesse identifiziert werden. Hierzu zählen neben den langen bekannten und systemisch wirksamen Hormonen wie Estrogen, Testosteron, CT oder PTH auch die primär lokal sekretierten Zytokine wie beispielsweise M-CSF oder RANKL. Nachdem die Formation funktioneller Osteoklasten einen hochkomplexen Prozess darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass weitere, bislang unbekannte Moleküle eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung einnehmen. Erst vor wenigen Jahren konnte eine neuartige Funktion von Zelladhäsionsmolekülen in der Differenzierung und Funktion von Osteoklasten demonstriert werden. VCAM1, das auf Plasmazytomzellen exprimiert wird und mit Integrinen auf der Oberfläche von Osteoklasten interagiert, weist einen stimulierenden Effekt auf die Migration und Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen auf und fungiert somit als potenter Regulator der Knochenresorption (Michigami et al., 2000; Pearce et al., 2001). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass ICAM1 eine strukturelle Bindung zwischen Osteoblasten und Osteoklastenvorläuferzellen ermöglicht, und somit die pro-resorptive Wirkung von RANKL potenziert (Tanaka et al., 2000). Eine weitere Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die in den letzten Jahren für hohes wissenschaftliches und klinisches Interesse sorgte, sind die sogenannten Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAMs), eine Untereinheit der großen Immunglobulin Superfamilie. Obwohl die Rolle der CEACAM Familie in pathologischen Zuständen wie Entzündung, Infektion und Malignität intensiv untersucht wurde, war eine mögliche Funktion im Knochenstoffwechsel bislang unbekannt (Kuespert et al., 2006).

In tierexperimentellen Studien wurde daher zuerst die Expression der CEACAM Familie in Wildtyp (WT) Mäusen auf mRNA Ebene untersucht. Hier konnte eine verhältnismäßig starke Expression von *CEACAM1* und *CEACAM10* in Knochengewebe detektiert werden. Sowohl *CEACAM1* als auch *CEACAM10* wurden während der *in vitro* Differenzierung von Osteoblasten verstärkt exprimiert,

wohingegen die Expression zwar in hämatopoetischen Vorläuferzellen, nicht jedoch in ausdifferenzierten Osteoklasten nachweisbar war. Nachdem diese Beobachtung auf eine spezifisch Rolle von CEACAM1 und CEACAM10 im Knochenstoffwechsel hindeutete, wurde nachfolgend der Knochenphänotyp von Mäusen mit globaler *CEACAM1*- oder *CEACAM10*-Defizienz analysiert. *CEACAM1*-defiziente Mäuse wiesen eine erniedrigte Knochenmasse auf, wohingegen *CEACAM10*-defiziente Mäuse keine Veränderungen der strukturellen Knochenparameter zeigten. Der osteoporotische Knochenphänotyp von *CEACAM1*-defizienten Mäusen ließ sich nicht nur in der Wirbelsäule beobachten, sondern auch in den langen Röhrenknochen wie Femur und Tibia. Als Ursache konnte mittels quantitativer Knochenhistomorphometrie eine erhöhte Osteoklastenzahl nachgewiesen werden, die von normalen Knochenformationsparametern begleitet war. Weiterführende *in vitro* Untersuchungen zeigten übereinstimmend damit eine exzessive Osteoklastenformation in Knochenmarkszellen aus *CEACAM1*-defizienten Tieren, was mechanistisch durch eine erhöhte Expression von *Nuclear Factor of Activated T-Cells, Cytoplasmic 1 (NFATC1)* erklärt werden konnte, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der Osteoklastendifferenzierung.

In dieser Studie konnte demnach zum ersten Mal die Rolle der CEACAM Familie im Knochenstoffwechsel näher analysiert werden. Darüber hinaus wurde mit CEACAM1 ein Zelladhäsionsmolekül identifiziert, welches die Osteoklastenformation negativ beeinflusst und somit einen Ansatzpunkt zukünftiger antiresorptiver Therapieoptionen für Patienten mit überschießender Knochenresorption darstellen könnte.

2.2. Direkte Hemmung der Knochenresorption durch FZD8, einem WNT Co-Rezeptor

Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin.

Albers J*, Keller J*, Baranowsky A*, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, Amling M, Schinke T. (*equal contribution)

The Journal of Cell Biology. 2013, 200(4):537-49.

<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201207142>

CEACAM1-defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte Osteoklastenformation als Ursache für ihre erniedrigte Knochenmasse. Eine mögliche molekulare Erklärung könnte durch die Tatsache bedingt sein, dass *CEACAM1* als Regulator des WNT Signalweges fungiert, einem der wichtigsten Signalkaskaden im Knochenstoffwechsel (Leung et al., 2008; Jin et al., 2008). Neben anderen Signalkaskaden (nicht-kanonisch) vermittelt der WNT-Signalweg seine biologischen Effekte primär über das Protein β -Catenin (kanonisch), dessen Stabilisierung und intrazelluläre Akkumulation die Transkription multipler Zielgene steuert (Mosimann et al., 2009). Liganden der WNT Familie, die eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung sowie in vielen verschiedenen (patho-)physiologischen Vorgängen spielen, binden in Knochenzellen an einen Rezeptorkomplex, der aus einem Frizzled-Rezeptor (FZD) und einem der Co-Rezeptoren LRP5 oder LRP6 besteht (Clevers and Nusse, 2012; Abb. 2). Inaktivierende Mutationen im Gen für LRP5 resultieren in einer Osteoporose, wohingegen aktivierende Mutationen eine Osteosklerose verursachen (Gong et al., 2001; Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Obgleich diese Beobachtungen darauf hindeuten, dass der WNT Signalweg primär die Knochenformation reguliert, führte die selektive Inaktivierung von β -Catenin in Osteoblasten nicht zu der erwartenden Reduktion der Osteoblastenfunktion, sondern zu einer gesteigerten Osteoklastenformation. Dieser Effekt konnte molekular durch eine erniedrigte Synthese von Osteoprotegerin (OPG) erklärt werden (Glass et al., 2005; Holmen et al., 2005; Kramer et al., 2010), ein von Osteoblasten sezernierter Decoy-Rezeptor, der die Osteoklastendifferenzierung durch Neutralisation von RANKL inhibiert (Simonet et al., 1997).

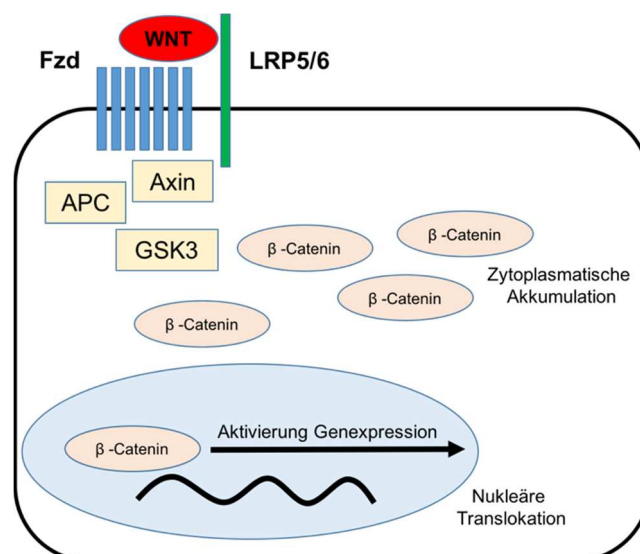


Abb. 2. Vereinfachte Darstellung des WNT Signalwegs. Durch Bindung von WNT Liganden an den WNT Rezeptorkomplex (LRP5/6 und FZD) kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von β -Catenin, das normalerweise durch den Proteinkomplex aus Axin, APC, und GSK3 abgebaut wird. Dies führt zu der Translokation von β -Catenin in den Nukleus, wo die Transkription mehrerer WNT-Zielgene initiiert und somit die Differenzierung und Funktion von Knochenzellen gesteuert wird. Modifiziert nach Han und Na, 2011.

In den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des WNT Signalwegs in Osteoklastenvorläuferzellen überraschenderweise einen osteoporotischen Knochenphänotyp bewirkt (Keller, 2014). Diese Mäuse, in denen eine Deletion von β -Catenin durch CRE/LOX-Rekombination mittels des Lysozym M (LYSM)-Promotors erfolgt war (Clausen et al., 1999), zeigten eine gesteigerte Osteoklastendifferenzierung bei normaler Knochenformationsrate.

Um hier die Rolle des WNT Signalweges in der Regulation der Osteoklastenformation detaillierter zu verstehen, wurde die Genexpression aller bekannten FZD-Rezeptoren in verschiedenen Geweben und Zelltypen analysiert. Hierbei konnte eine hohe Expression von *FZD8* in Osteoblasten und Osteoklasten detektiert werden. Die nachfolgende histomorphometrische Analyse *FZD8*-defizienter Mäuse zeigte einen osteoporotischen Knochenphänotyp aufgrund einer gesteigerten Osteoklastendifferenzierung bei normaler Knochenformationsrate. Interessanterweise wiesen *FZD8*-defiziente Knochenzellen eine intakte WNT Signalübertragung auf, was durch eine kompensatorische Erhöhung der FZD Rezeptoren *FZD1-7* und *FZD10* erklärt werden konnte. Weitere *in vitro* Untersuchungen demonstrierten, dass der hemmende Effekt von FZD8 unabhängig von der OPG oder RANKL Synthese in Osteoblasten vermittelt wird und FZD8 somit als direkter Inhibitor der Osteoklastendifferenzierung fungiert.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass FZD8 einen direkt hemmenden Effekt auf die Osteoklastendifferenzierung ausübt, der unabhängig von der OPG Synthese in Osteoblasten vermittelt wird. Nachdem FZD8 einen G-Protein gekoppelten Oberflächenrezeptor darstellt, dessen Aktivierung in einer Hemmung der Osteoklastenformation resultiert, konnte somit ein Ansatzpunkt für neuartige Therapieformen bei exzessiver Knochenresorption identifiziert werden. Obgleich diese Daten auf eine Alteration des WNT Signalweges als Ursache für den Knochenphänotyp von *CEACAM1*-defizienten Mäusen hinweisen, sind hier weitere mechanistische Untersuchungen notwendig.

2.3. Regulation der Knochenformation durch den Serpentinrezeptor FZD9.

Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9.

Albers J, Schulze J, Beil FT, Gebauer M, Baranowsky A, **Keller J**, Marshall RP, Wintges K, Friedrich FW, Priemel M, Schilling AF, Rueger JM, Cornils K, Fehse B, Streichert T, Sauter G, Jakob F, Insogna KL, Pober B, Knobloch KP, Francke U, Amling M, Schinke T.

The Journal of Cell Biology. 2011, 192(6):1057-72.

<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201008012>

Durch die oben geschilderten *in vitro* und *in vivo* Experimente konnte eine neue Funktion von CEACAM1 und des WNT Signalwegs in der direkten Regulation der Knochenresorption identifiziert werden. Obgleich diese Ergebnisse die Entwicklung neuartiger antiresorptiver Substanzen entscheidend beeinflussen könnten, stellt die Identifizierung von Signaltransduktionswegen mit regulatorischer Wirkung auf die Osteoblastenaktivität ein weiteres Ziel der translationalen Forschung dar. Dies ist besonders durch die Tatsache bedingt, dass abgesehen von täglichen PTH Injektionen (Teriparatid) momentan keine therapeutische Substanz zu Verfügung steht, die die Knochenformationsrate klinisch wirksam steigert (Black und Rosen, 2016). Biomechanisch ist dies ungünstig, da eine Steigerung der Osteoblastenfunktion im Gegensatz zu antiresorptiven Substanzen in einer verbesserten Qualität und Stabilität des Knochens resultiert. Die Beobachtung, dass sich Mutationen des WNT Signalwegs, insbesondere von LRP5, entscheidend auf die Aktivität knochenbildender Osteoblasten auswirkt (Gong et al., 2001; Boyden et al., 2002; Little et al., 2002), ist daher für die Erforschung zukünftiger Therapieformen von immenser Bedeutung. Nachdem LRP5 nur durch Komplexbildung mit einem FZD Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst (Cong et al., 2004), erscheint es erstaunlich, dass die Rolle der FZD Rezeptoren in der Regulation der Osteoblastenfunktion bislang nicht untersucht wurde.

Um diese Lücke zu schließen, wurde die Expression aller 10 bekannten FZD Gene während der Osteoblastendifferenzierung mittels Genchip-Analyse untersucht. Das einzige *FZD* Gen, das während der *in vitro* Differenzierung der Osteoblasten eine differentielle Expression zeigte, war *FZD9*. In der frühen Osteoblastendifferenzierung konnte eine rapid ansteigende Expression von *FZD9* detektiert werden, die nachfolgend während der terminalen Osteoblastenreifung graduell abnahm. Um eine potentielle Funktion in der Regulation der Knochenformation zu testen, wurde nachfolgend eine komplette histomorphometrische Charakterisierung *FZD9*-defizienter Mäuse durchgeführt. In der Tat wiesen *FZD9*-defiziente Tiere einen osteoporotische Knochenphänotyp auf, der ab dem Alter von 6 Monaten zu beobachten war. Als Ursache der verminderten Knochenmasse konnte eine reduzierte Knochenformationsrate bei normalen Knochenresorptionsparametern festgestellt werden. Übereinstimmend damit zeigten *FZD9*-defiziente Osteoblasten eine verminderte Mineralisationsleistung *in vitro*, wohingegen die Osteoklastendifferenzierung nicht beeinträchtigt war. Obgleich *FZD9* zuvor als Co-Rezeptor für LRP5 beschrieben wurde und somit als Mediator des WNT Signalwegs angesehen wird (Schulte und Bryja, 2007), war die intrazelluläre Signalkaskade sowie die Aktivierung WNT-spezifischer Zielgene nach Stimulation *FZD9*-defizienter Osteoblasten nicht beeinträchtigt. Weiterführende Genexpressionsanalysen in *FZD9*-defizienten Osteoblasten zeigten eine stark

erniedrigte Expression von *Interferon Stimulated Gene 15 (ISG15)*, einem Ubiquitin-like Modifier Protein mit unbekannter Funktion im Knochenstoffwechsel (Loeb und Haas, 1992; Skaug and Chen, 2010). *ISG15* zeigte ein vergleichbares Expressionsprofil wie *FZD9* während der Osteoblastendifferenzierung, und *ISG15*-defiziente Osteoblasten waren vergleichbar mit *FZD9*-defiziente Osteoblasten durch einen ausgeprägten Mineralisationsdefekt gekennzeichnet. Diese *in vitro* Beobachtungen konnten durch eine umfassende *in vivo* Analyse bestätigt werden, da *ISG15*-defiziente Mäuse eine Osteoporose aufgrund einer erniedrigten Knochenformationsrate aufwiesen und somit den Knochenphänotyp von *FZD9*-defizienten Tieren rekapitulierten.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie zum ersten Mal die Rolle eines FZD Rezeptors in der Regulation der Knochenformation demonstriert werden. Nachdem *FZD9* strukturell als Serpentinrezeptor mit extrazellulärer Bindungsdomäne fungiert und daher einen idealen Ansatzpunkt für Medikamente darstellt (Wise et al., 2002; Overington et al., 2006), könnte diese Studie langfristig zur Entwicklung osteoanaboler Therapieformen für Patienten mit Knochenmasseverlustsyndromen beitragen.

2.4. Calcitonin reguliert die Knochenformation durch Reduktion der Freisetzung von Sphingosin-1-Phosphat aus Osteoklasten.

Calcitonin controls bone formation by reducing sphingosine 1-phosphate release from osteoclasts.

Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, Heckt T, Lueth A, Krause M, Koehne T, Albers J, Schulze J, Schilling S, Haberland M, Denninger H, Neven M, Hermans-Borgmeyer I, Streichert T, Breer S, Barvencik F, Levkau B, Rathkolb B, Wolf E, Calzada-Wack J, Neff F, Gailus-Durner V, Fuchs H, de Angelis MH, Klutmann S, Tsourdi E, Hofbauer LC, Kleuser B, Chun J, Schinke T, Amling M.

Nature Communications. 2014, 5:5215.

<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6215>

Die bisherigen Ergebnisse konnten CEACAM1 und FZD8 als direkte Regulatoren der Osteoklastenformation identifizieren, wohingegen eine direkte Funktion von FZD9 in der Steuerung der Osteoblastenaktivität nachgewiesen wurde. Die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten erfolgt jedoch nicht nur durch zellautonome Mechanismen, sondern wird auch durch eine bilaterale Zellkommunikation mittels parakriner Signale reguliert. Dies wird an einer der Schlüsselentdeckungen im Knochenfeld ersichtlich, dass das von Osteoblasten sezernierte Peptid RANKL essentiell für die Formation und Funktion reifer Osteoklasten ist. Die Aufdeckung dieses molekularen Zellkommunikationsmechanismus führte zu der Entwicklung von Denosumab, einem hochspezifischen, RANKL-neutralisierenden Antikörper, der zur Therapie der Osteoporose im Menschen zugelassen ist (Martin und Sims, 2015). Unklarheit bestand jedoch bislang darüber, inwiefern Osteoklasten die Aktivität von Osteoblasten beeinflussen können (Sims und Martin, 2014). In den eigenen Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass das von der Schilddrüse sezernierte Hormon CT nicht wie bislang angenommen die Knochenresorption reguliert, sondern über den Calcitoninrezeptor (CTR) in Osteoklasten die Knochenformation steuert (Keller, 2010). Mäuse mit einer globalen oder Osteoklasten-spezifischen CTR Deletion weisen eine erhöhte Knochenmasse aufgrund gesteigerter Knochenformationsrate auf. Als möglichen molekularen Mediator konnte hierbei Sphingosin-1-Phosphat (S1P) identifiziert werden, das von Osteoklasten sezerniert wird und *in vitro* einen stimulierenden Effekt auf die Osteoblastenfunktion ausübt. Während diese Beobachtung durch die Arbeit anderer Autoren unterstützt wird (Ryu et al., 2006; Lotinun et al., 2013), blieben folgende Fragen bislang jedoch unbeantwortet:

- 1) Reguliert CT die Knochenformation über die Regulation der S1P Freisetzung *in vivo*?
- 2) Über welchen S1P Rezeptor und welche intrazelluläre Signalkaskade beeinflusst S1P die Aktivität von Osteoblasten?
- 3) Kann die Wirkung von S1P pharmakologisch genutzt werden, um die Knochenformationsrate und somit die Knochenmasse therapeutisch zu steigern?

In den weiterführenden Studien konnte demonstriert werden, dass CT über die verminderte Expression von *Spinster Homolog 2 (SPNS2)*, kodierend für ein transmembranöses Transporterprotein (Kawahara et al., 2009), die Freisetzung von S1P aus Osteoklasten reduziert. Von den bislang fünf bekannten S1P Rezeptoren S1PR1-5 zeigte *S1PR3* eine spezifische und während der Zellreifung dynamische

Expression in Osteoblasten. *S1PR3*-defiziente Mäuse wiesen einen osteoporotischen Knochenphänotyp aufgrund einer erniedrigten Knochenformation auf, sodass eine osteoanabole Funktion von S1P über S1PR3 im Organismus belegt werden konnte. Die Hypothese, dass CT über S1P und S1PR3 die Osteoblastenfunktion inhibiert, konnte nachfolgend *in vivo* verifiziert werden, nachdem die Deletion von *S1PR3* in CTR-defizienten Mäusen zu einer Normalisierung der Knochenformationsrate und der Knochenmasse führte (Abb. 3). Übereinstimmend mit der Tatsache, dass eine hohe Expression von SPNS2 und S1PR3 in humanen Knochenbiopsien detektiert werden konnte, ließ sich der hemmende Effekt von CT auf die Knochenformation auch in Patienten im Zustand nach totaler Thyreoidektomie beobachten. In diesen Patienten zeigte sich die Abwesenheit von CT mit dem Auftreten einer gegenüber dem Altersdurchschnitt erhöhten Knochenmasse assoziiert, sodass von einer biologisch relevanten Funktion von CT im Menschen ausgegangen werden kann.

Weitere Zellkulturexperimente demonstrierten, dass S1P in primären Osteoblasten über S1PR3 die Expression von *COL1A1*, *IBSP* und *SPMD3* steigert, die alle entscheidend an der Synthese der extrazellulären Knochenmatrix beteiligt sind (Hunter und Goldberg, 1994; Aubin et al., 2005; Glorieux 2008). Im Gegensatz dazu konnte ein *S1PR3*-unabhängiger Effekt auf die Expression von *RANKL* gezeigt werden. Um diese potenten Effekte von S1P *in vivo* zu überprüfen, wurden zudem Mäuse mit einem Defekt im Gen für *Sphingosine-1-Phosphat Lyase 1 (SGPL1)* analysiert, das normalerweise die Inaktivierung von S1P vermittelt. Diese Mäuse sind durch lokal und systemisch erhöhte S1P Spiegel charakterisiert und haben aufgrund verschiedener Komorbiditäten eine nur geringe Lebenserwartung (Vogel et al., 2009). *SGPL1*-defiziente Mäuse zeigten eine mehr als verdoppelte Knochenmasse im Alter von 6 Wochen, was durch einen erhöhten Knochenumbau mit einer simultan gesteigerten Knochenformation und Knochenresorption erklärt werden konnte. Um zu überprüfen, ob der anabole Effekt von S1P auf die Knochenformation auch pharmakologisch genutzt werden kann, wurden schlussendlich Mäuse mit FTY720 (Fingolimod) für die Dauer von vier Wochen behandelt. FTY720 stellt einen nicht-selektiven S1P Agonisten mit agonistischer Wirkung an S1PR3 dar, der seit wenigen Jahren zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt wird (Pitman et al., 2012). Die Behandlung mit FTY720 führte in WT Mäusen zu einer Steigerung der Knochenmasse aufgrund einer erhöhten Osteoblastenaktivität, was in *S1PR3*-defizienten Mäusen nicht zu beobachten war.

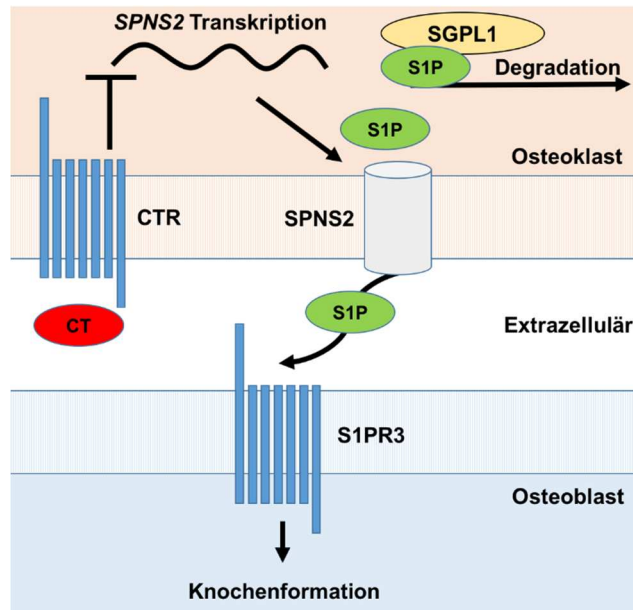


Abb. 3. Kopplung der Knochenformation an die Knochenresorption. Calcitonin hemmt die Expression von SPNS2 und reduziert somit die Sekretion von S1P aus Osteoklasten. S1P vermittelt einen osteoanabolen Effekt über S1PR3 in Osteoblasten. Intrazelluläres S1P wird durch SGPL1 abgebaut. Modifiziert nach Martin und Sims, 2015.

Zusammenfassend konnte diese Studie nachweisen, dass CT über den CTR die Sekretion von S1P aus Osteoklasten inhibiert. Hierdurch kommt es zu einer reduzierten Stimulation von S1PR3 auf Osteoblasten, dass normalerweise eine Steigerung der Knochenformation bewirkt. Dieser Mechanismus kann pharmakologisch genutzt werden, sodass die zukünftige Entwicklung von spezifischen S1PR3 Agonisten einen vielversprechenden Ansatzpunkt für Knochenmasseverlustsyndrome darstellen könnte.

2.5. Systemisch erhöhte IL17A Spiegel in Psoriasis bewirken den Verlust von Knochenmasse durch Hemmung des WNT Signalwegs in Osteoblasten.

Chronic skin inflammation leads to bone loss by IL-17-mediated inhibition of Wnt signaling in osteoblasts.

Uluçkan Ö, Jimenez M, Karbach S, Jeschke A, Graña O, **Keller J**, Busse B, Croxford AL, Finzel S, Koenders M, Berg W, Schinke T, Amling M, Waisman A, Schett G, Wagner EF.

Science Translational Medicine. 2016, 8(330):330ra37.

<http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8996>

Die Studien zur Funktion von CT zeigen, dass der Knochenstoffwechsel nicht nur durch lokale, sondern auch durch systemische Prozesse gesteuert wird. Diese Tatsache ist besonders vor dem Hintergrund bedeutsam, dass verschiedene extraskeletale Erkrankungen mit einer Alteration verschiedener Botenstoffe im Blut assoziiert sind und somit den Knochenstoffwechsel nachhaltig beeinflussen können. Eine dieser Erkrankungen stellt die Hauterkrankung Psoriasis dar, die in 2-3% der Bevölkerung auftritt und durch erhöhte IL17A Spiegel in betroffenen Hautarealen und im Blut der Patienten gekennzeichnet ist (Wagner et al., 2010). Durch experimentelle und klinische Beobachtung konnte in der oben genannten Studie gezeigt werden, dass die Psoriasis sowohl in Mäusen als auch in Menschen zu einer erniedrigten Knochenmasse führt. Hierbei korrelierte die Knochenmasse invers mit den systemischen erhöhten IL17A Spiegeln, die eine Erniedrigung der Knochenformationsrate bewirkten. Im Gegensatz dazu wurde die Knochenresorption nicht beeinträchtigt. *In vitro* führte die Stimulation von knochenbildenden Osteoblasten mit IL17A zu einer Hemmung des WNT Signalwegs, was in einer erniedrigten Osteoblastenfunktion resultierte (Abb. 4). Wurden an Psoriasis erkrankte Mäuse mit einem IL17A-neutralisierenden Antikörper behandelt, so konnte eine Normalisierung der Osteoblastenaktivität beobachtet werden.

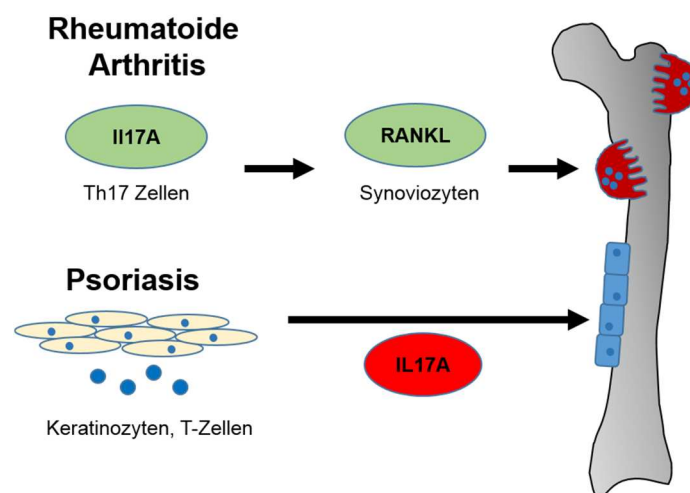


Abb. 4. Systemische Kontrolle des Knochenstoffwechsels durch IL17A. Hautentzündungen wie die Psoriasis führen zu systemisch erhöhten IL17A Spiegeln, die eine Hemmung der Knochenformation bewirken. Im Gegensatz dazu können lokal erhöhte IL17A Spiegel wie im Falle der rheumatoiden Arthritis eine RANKL-induzierte gesteigerte Knochenresorption bedingen. Modifiziert nach Uluçkan und Wagner, 2016.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die systemisch erhöhten IL17A Spiegel in Psoriasis über die Hemmung der Knochenformation einen Knochenmasseverlust verursachen. Darüber hinaus konnte mit dem Einsatz eines IL17A-neutralisierenden Antikörpers eine Behandlungsstrategie entwickelt werden, um betroffene Patienten vor Osteoporose zu schützen.

2.6. Osteocalcin ist assoziiert mit Testosteron in der allgemeinen Bevölkerung und in Patienten mit Knochenerkrankungen.

Hannemann A, Breer S, Wallaschofski, Nauck M, Baumeister S, Barvencik F, Amling M, Schinke T, Haring R, **Keller J.**

Osteocalcin is associated with testosterone in the general population and selected patients with bone disorders.

Andrology. 2013, 1(3):469-74.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00044.x>

Die bislang beschriebenen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass der Knochenstoffwechsel durch eine Vielzahl verschiedener Mechanismen sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene reguliert wird. Als eine der wichtigsten Erkenntnisse der letzten Jahre gilt in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Knochen nicht nur ein wichtiges Zielorgan darstellt, sondern selbst als endokrines Organ fungiert und andere Organsysteme reguliert (Karsenty und Olson, 2016). Hierzu zählt insbesondere das Peptidhormon Osteocalcin, das von Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebettet und durch knochenresorbierende Osteoklasten aktiviert und freigesetzt wird. Experimentelle und klinische Beobachtungen deuten mittlerweile auf eine relevante Rolle dieses Peptids in der Regulation des Glukosestoffwechsels hin. Eine 2011 erschienene Studie zeigte überraschenderweise, dass Osteocalcin darüber hinaus auch die Testosteronproduktion in männlichen Mäusen reguliert (Oury et al., 2011; Abb. 5). Im Gegensatz dazu konnte kein Effekt auf die Estrogenproduktion in Weibchen detektiert werden.

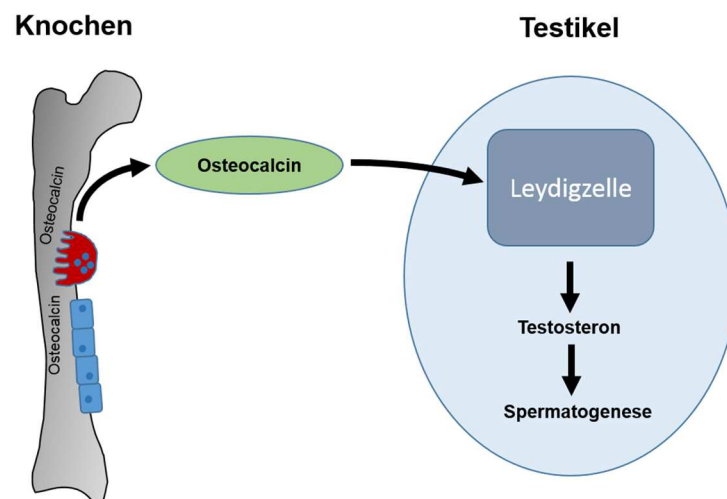


Abb. 5. Knochen als endokrines Organ. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass von Osteoblasten in die Knochenmatrix sezerniertes Osteocalcin durch Osteoklasten aktiviert wird und über die Blutbahn zu Leydigzellen im Testikel gelangt, wo es die Testosteronproduktion stimuliert. Modifiziert nach Oury et al., 2011.

Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung auch in Menschen nachzuvollziehen ist, wurde in einer Querschnittsstudie der Zusammenhang zwischen den Osteocalcin- und Testosteronspiegeln in 110 Patienten mit Knochenerkrankungen sowie in 1338 Männern einer repräsentativen populationsbasierten

Kohorte analysiert. In beiden untersuchten Populationen konnte eine positive und signifikante Korrelation zwischen Osteocalcin- und Testosteronspiegeln nachgewiesen und somit die in Mäusen beschriebene Assoziation in Menschen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde eine positive und signifikante Korrelation zwischen Testosteron und den Knochenumbauparametern Alkalische Phosphatase und Crosslaps detektiert, die die Aktivität knochenbildender Osteoblasten bzw. knochenresorbierender Osteoklasten anzeigen.

Zusammengefasst konnte durch diese Studie die im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse im Menschen reproduziert und Osteocalcin als möglichen Regulator der Testosteronproduktion verifiziert werden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Knochen als endokrines Organ die Funktion anderer Organsysteme reguliert und Knochengesundheit somit als zentraler Aspekt in der Pathogenese anderer Erkrankungen gewertet werden muss.

3. Diskussion

Knochen galt lange Zeit als starres und inertes Gewebe, das nur wenigen äußeren Einflüssen ausgesetzt ist und dessen Degeneration als physiologischer Alterungsprozess angesehen werden muss. Intensivierte klinische und tierexperimentelle Studien haben dieses Bild in den letzten Jahren entscheidend verändert und konnten durch die Entwicklung moderner diagnostischer und therapeutischer Ansätze erheblich zu einer zunehmenden Knochengesundheit auch in älteren Patienten beitragen. Heutzutage ist bekannt, dass Knochen trotz seiner mechanischen Festigkeit ein äußerst dynamisches Gewebe darstellt und komplexen zellulären und molekularen Regulationsmechanismen auf lokaler und systemischer Ebene unterworfen ist. Das Ziel dieser Arbeit war, das Verständnis der Regulationsmechanismen im Knochenstoffwechsel zu erweitern und insbesondere die Kommunikationswege zwischen Knochenzellen und/oder peripheren Organsystemen näher zu studieren.

3.1. Die molekulare Regulation der Knochenresorption

Das Verständnis der Knochenresorption ist weiterhin von hoher klinischer Relevanz, da die Therapieoptionen für Erkrankungen mit exzessiver Osteoklastenaktivierung limitiert sind. Hierzu zählt primär die Osteoporose, die häufigste Skeletterkrankung des Menschen, der Morbus Paget, sowie tumorinduzierte Osteolysen, die häufig mit einer konsekutiven Stabilitätsgefährdung und pathologischen Frakturen assoziiert sind. Für die medikamentöse Behandlung stehen aktuell zwei Klassen an antiresorptiven Medikamenten zur Verfügung (Eastell et al., 2016). Weit verbreitet sind die Bisphosphonate, die sich an die Knochenoberfläche anlagern und nach Aufnahme durch Osteoklasten entweder eine Hemmung von intrazellulären Schlüsselenzymen bewirken oder die Zellapoptose induzieren. Darüber hinaus steht seit mehreren Jahren der monoklonale Antikörper Denosumab zur Verfügung, der den für die Osteoklastogenese entscheidenden Differenzierungsfaktor RANKL neutralisiert und somit die Knochenresorption hemmt. Obwohl die Wirksamkeit beider Substanzklassen klinisch bewiesen werden konnte, ist deren Effektivität in einigen Patienten unzureichend und durch relevante Nebenwirkungen limitiert. Das fehlende Angebot an alternativen antiresorptiven Substanzen, besonders für den Einsatz bei tumorösen oder entzündlichen Knochenerkrankungen, ist durch ein mangelndes Verständnis der molekularen Mechanismen bedingt, die die Differenzierung und Funktion der Osteoklasten regulieren.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Rolle der CEACAMs in der Regulation des Knochenumbaus analysiert. CEACAMs üben pleiotrophe Funktionen im Organismus aus und sind insbesondere in der Tumorgenese und im Immunsystem von entscheidender Bedeutung, sodass sie ein geeignetes pharmakologisches Ziel für die Kontrolle der Knochenresorption in komplexen klinischen Situationen darstellen könnten (Kuespert et al., 2006; Tchoupa et al., 2014). Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass CEACAM1 als entscheidender Modulator des WNT-Signalweges beschrieben wurde (Leung et al., 2008, Jin et al., 2008). Bei der Analyse aller bekannter CEACAMs konnte in dieser Arbeit nur die Expression von CEACAM1 und CEACAM10 in Knochengewebe festgestellt werden. Obgleich diese Beobachtung eine potentielle Rolle anderer CEACAMs in der Regulation des Knochenstoffwechsels nicht ausschließt, deutete sie auf eine spezifische Funktion von CEACAM1 und CEACAM10 in Knochenzellen hin. Diese Hypothese konnte partiell bestätigt werden,

nachdem eine erniedrigte Knochenmasse in CEACAM1-defizienten Mäuse detektiert wurde. Die Beobachtung, dass CEACAM10-defiziente Mäuse keinen Knochenphänotyp aufweisen, verdeutlicht die Tatsache, dass verschiedene CEACAMs trotz vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlicher molekularer Struktur hochspezifische Funktionen innerhalb des Organismus ausführen. Während der Phänotyp CEACAM1-defizienter Mäuse unter normalen Haltungsbedingungen als unauffällig beschrieben wurde (Hemmila et al., 2004), konnte in dieser Arbeit erstmals eine physiologische Funktion von CEACAM1 als Regulator der Knochenresorption gezeigt werden. CEACAM1-defiziente Mäuse waren durch eine erniedrigte Knochenmasse aufgrund einer gesteigerten Knochenresorption gekennzeichnet, was durch einen zellautonomen Defekt knochenresorbierender Osteoklasten erklärt werden konnte. Im Gegensatz dazu führte in einer vorherigen Studie die leberspezifische Inaktivierung von CEACAM1 zu der Entwicklung einer erhöhten Knochenmasse aufgrund einer reduzierten Knochenresorption (Huang et al., 2010). Das entsprechende Mausmodell war jedoch durch eine Hyperinsulinämie und Glukoseintoleranz gekennzeichnet, was einen potenten Effekt auf die Funktion von Knochenzellen ausübt und die phänotypischen Diskrepanzen erklären kann. Obgleich die genauen molekularen Mechanismen weiterer Untersuchungen bedürfen, scheint eine globale CEACAM1-Defizienz die Effekte von hepatischer CEACAM1-Expression zu übertreffen. Vor diesem Hintergrund ist es von besonderer Bedeutung, dass eine kürzlich erschienene Studie einen Zusammenhang zwischen CEACAM1 und der Knochenmasse in Menschen demonstrieren konnte und die Beobachtungen im Mausmodell bestätigt (Ma et al., 2016). Die Autoren konnten eine positive und signifikante Assoziation zwischen den CEACAM1 Spiegeln und der Knochendichte in 350 postmenopausalen Frauen nachweisen. Darüber hinaus wurde eine positive und signifikante Assoziation zwischen CEACAM1 und β -Catenin demonstriert, die die zuvor beschriebene Interaktion von CEACAMs mit Komponenten des WNT-Signalweges unterstützt.

3.2. Der WNT Signalweg in der molekularen Kontrolle des Knochenbaus

Seit der Identifikation von LRP5 als einem der wichtigsten Regulatoren des Knochenstoffwechsels im Menschen steht der WNT Signalweg im Fokus vergangener und aktueller Forschungsbemühungen. Inaktivierende Mutationen im Gen für LRP5 resultieren in einer erniedrigten Knochenformationsrate, wohingegen aktivierende Mutationen eine Steigerung der Osteoblastenfunktion bedingen und somit die Entwicklung neuartiger, osteoanaboler Therapiestrategien für die Behandlung von Knochenmasseverlustsyndromen ermöglichen könnten (Gong et al., 2001; Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Obgleich der WNT Signalweg daher primär mit der Regulation der Osteoblastenfunktion assoziiert wurde, konnte eine direkte Funktion von FZD8 in der Kontrolle der Knochenresorption aufgedeckt werden. Die erhöhte Knochenresorption von *FZD8*-defizienten Mäusen zeigte sich unabhängig vom RANKL/OPG-System und rekapitulierte den osteoporotischen Knochenphänotyp, der in Mäusen mit einer Osteoklasten-spezifischen Deletion von β -Catenin beobachtet werden konnte. Demnach gelang hier die Identifikation eines potentiellen pharmakologischen Zielproteins, das durch seine Struktur als Oberflächenrezeptor einen idealen Ansatzpunkt für spezifische Agonisten darstellt (Wise et al., 2002). Die Beobachtung, dass die Aktivierung des WNT Signalwegs in Osteoklasten oder deren Vorläuferzellen eine direkte Hemmung der Knochenresorption bewirkt, wurde mittlerweile in verschiedene Studien bestätigt. Mit einem vergleichbaren Mausmodell zeigten sowohl Wei et al. als

auch Otero et al., dass die LYSM-CRE vermittelt Deletion von β -Catenin in Monozyten/Makrophagen in einer Osteopenie aufgrund einer gesteigerten Knochenresorption resultiert (Wei et al., 2011; Otero et al., 2012). In diesen Modellen wurde jedoch ein potentieller Einfluss des RANKL/OPG Systems nicht ausgeschlossen, sodass kein Beweis eines direkten Effekts auf die Osteoklastendifferenzierung erfolgen konnte. In einer weiteren Studie wurde demonstriert, dass die Deletion von β -Catenin in reifen Osteoklasten mittels CathepsinK-CRE zu einer ausgeprägten Osteoporose aufgrund fehlender Apoptose der Osteoklasten und damit unkontrollierten Knochenresorption führt (Ruiz et al., 2016). Demnach ist davon auszugehen, dass der WNT Signalweg nicht nur die Differenzierung der Osteoklasten im frühen Reifestadium, sondern auch deren Lebensdauer im reifen Zellstadium limitiert. Bei der Analyse von FZD-Rezeptoren mit hoher Expression in Knochengewebe konnte neben *FZD8* auch das verwandte Peptid FZD9 detektiert werden. *FZD9*-defiziente Mäuse zeigten wie *FZD8*-defiziente Versuchstiere einen osteoporotischen Knochenphänotyp auf, der jedoch nicht durch eine gesteigerte Knochenresorption, sondern durch eine verminderte Knochenformation bedingt war. FZD9 erlangte 1997 erstmalig klinische Aufmerksamkeit, nachdem die kodierende Sequenz innerhalb eines größeren Genabschnittes lokalisiert werden konnte, dessen Deletion im Menschen zum Williams-Beuren Syndrom (WBS) führt (Wang et al., 1997; Wang et al., 1999; Schubert et al., 2009). Das WBS ist durch geistige Retardierung, Fehlbildungen und Osteoporose charakterisiert. Von den phänotypischen Anomalien des WBS konnten bislang nur kognitive Einschränkungen in *FZD9*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Zhao et al., 2005). Die beobachtete Osteopenie in mutierten Mäusen identifiziert somit FZD9 als biologisch relevanten Rezeptor, der sowohl in Mäusen als auch in Menschen den Knochenstoffwechsel reguliert. Obgleich *FZD9*-defiziente Mäuse einen zellautonomen Osteoblastendefekt aufwiesen, konnte keine Alteration in der Aktivierung des WNT-Signalweges detektiert werden. Dies ist insofern erstaunlich, da FZD9 zuvor in 293T Zellen als notwendig für die Aktivierung von β -Catenin beschrieben wurde (Karasawa et al., 2002). Auf der Suche nach alternativen Signaltransduktionswegen, die den Osteoblastendefekt bei *FZD9*-Defizienz erklären, konnte eine signifikante Veränderung der Expression bestimmter Chemokine und Interferon-regulierter Gene identifiziert werden. Hier ist insbesondere die Beobachtung wichtig, dass *FZD9*-defiziente Osteoblasten eine verminderte Protein-ISGylierung durch verminderte Expression von *ISG15* aufweisen. Der osteoporotische Knochenphänotyp von *ISG15*-defizienten Mäusen deutet zudem auf eine entscheidende Rolle dieses Proteins in der Regulation der Knochenformation hin. Nachdem die physiologische Rolle von ISG15 bislang noch verhältnismäßig unbekannt ist (Hermann und Bogunovic, 2016), liefern diese Beobachtungen die Basis für eine weiterführende Charakterisierung dieses Proteins im Knochenstoffwechsel.

3.3. Kopplung der Knochenformation an die Knochenresorption

Während der WNT Signalweg einen Großteil seiner Effekte direkt in den entsprechenden Zielzellen vermittelt, so kann er über die Regulation der OPG Synthese in Osteoblasten indirekt die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten steuern. Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht überraschend, dass Osteoklasten über die Freisetzung spezifischer Faktoren die Aktivität knochenbildender Osteoblasten regulieren können (Sims et al., 2016). Dieses Phänomen ist klinisch im Falle der Bisphosphonate zu beobachten, die durch eine Hemmung der Knochenresorption eine Reduktion der Knochenformation

bewirken. In dieser Arbeit konnte der biologisch entscheidende Faktor S1P identifiziert werden, der von Osteoklasten sezerniert wird und sich positiv auf die Osteoblastenaktivität ausübt. S1P wird durch SPNS2 aus Osteoklasten herausgeschleust und vermittelt über den Rezeptor S1PR3 auf Osteoblasten einen osteoanabolen Effekt. Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtungen anderer Autoren bestätigt. Sato et al. konnten nachweisen, dass S1P den osteoanabolen Effekt von BMP2 auf die Osteoblastendifferenzierung verstärkt (Sato et al., 2012). Übereinstimmend dazu zeigten Higashi et al. einen stimulierenden Effekt auf den für Osteoblasten essentiellen Transkriptionsfaktor RUNX2 (Higashi et al., 2016). Gleichermaßen konnte demonstriert werden, dass der positive Einfluss von CathepsinK Inhibition auf die Knochenformation über die Freisetzung von S1P aus Osteoklasten vermittelt wird (Lotinun et al., 2013). Die Beobachtung, dass *in vivo* der osteoanabole Effekt von S1P über S1PR3 vermittelt wird, könnte langfristig entscheidend für die Therapie der Osteoporose sein, nachdem der nicht-selektive S1P Agonist FTY720 einen S1PR3-abhängigen osteoanabolen Effekt verursacht. Dies ist besonders vor dem Hintergrund interessant, dass FTY720 als neuartiges Therapeutikum der multiplen Sklerose mit gutem klinischem Erfolg eingesetzt wird. Nachdem S1PR3-defiziente Mäuse keine wesentlichen extraskeletalen Auffälligkeiten aufweisen (Ishii et al., 2001), könnten spezifische S1PR3-Agonisten mit einem niedrig zu erwartendem Nebenwirkungsspektrum einen neuartigen Therapieansatz für Patienten mit Knochenmasseverlustsyndrom darstellen.

3.4. Systemische Regulation des Knochenbaus durch periphere Entzündungen

Die Wirkung von CT auf den Knochenstoffwechsel repräsentiert einen klassischen endokrinen Wirkmechanismus, der durch periphere Effekte eines systemisch zirkulierenden Hormons gekennzeichnet ist. Vergleichbare Mechanismen sind jedoch nicht nur im gesunden Organismus von Bedeutung, sondern auch in verschiedenen Systemerkrankungen, die einen profunden Einfluss auf die Knochengesundheit ausüben können. Das Cushing Syndrom beispielsweise, gekennzeichnet durch einen systemischen Hyperkortisolismus, führt zu einem ausgeprägten Knochenmasseverlustsyndrom mit erhöhtem Frakturrisiko der betroffenen Patienten. Ähnliche Beobachtungen können beim primären oder sekundären Hyperparathyreoidismus gemacht werden, wo dauerhaft erhöhte PTH Spiegel zu einer exzessiven Knochenresorption führen. Bislang unbekannt war die Tatsache, dass entzündliche Hautveränderungen ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Knochenbau ausüben. In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Patienten mit Psoriasis an einer erniedrigten Knochenmasse aufgrund reduzierter Osteoblastenaktivität leiden. Il17A ist eines der pro-inflammatorischen Schlüsselzytokine, die die Krankheitsaktivität der Psoriasis bestimmen, und dessen Neutralisierung durch spezifische Antikörper einen therapeutischen Durchbruch bedeutete (AbuHilal et al., 2016). Bisherige Studien führten den häufig zu beobachteten Knochenverlust während Entzündungsprozessen auf eine gesteigerte Knochenresorption zurück (Schett und Gravallese, 2012), wohingegen die Ergebnisse dieser Arbeit einen hemmenden Effekt von Il17A auf die Knochenformation nachweisen. Mechanistisch konnte demonstriert werden, dass Il17A sowohl in Osteoblasten als auch in Osteozyten einen inhibitorischen Effekt auf den WNT Signalweg ausübt, der die erniedrigte Knochenformation erklären kann. Die Frage, wieso hierbei kein Effekt auf die Knochenresorption festgestellt werden konnte, ist zu diesem Zeitpunkt schwierig zu erklären. Möglicherweise sezernieren entzündete Hautareale weitere bislang unbekannt Substanzen, die systemisch einen hemmenden

Effekt auf die Osteoklastenaktivität ausüben und somit eine exzessive Knochenresorption durch eine Stimulation durch IL17A neutralisieren. Obgleich weiterführende Studien notwendig sind, um hier die beobachteten Effekte im Detail zu verstehen, weist diese Arbeit neue Therapieoptionen auf, um der Abnahme der Knochenmasse bei entzündlichen Erkrankungen entgegenzuwirken.

3.5. Knochen als endokrines Organ

Die verschiedenen Studien dieser Arbeit konnten demonstrieren, dass der Knochenstoffwechsel im gesunden und erkrankten Organismus neben zellautonomen Regulationsmechanismen einer autokrinen, parakrinen und systemischen Kontrolle unterliegt. Gemäß dem Gesetz der negativen Rückkopplung liegt die Vermutung nahe, dass Knochen selbst die Aktivität und Funktion anderer Zellsysteme reguliert und somit als endokrines Organ fungiert könnte. Als geistiger Vater dieser Hypothese gilt der Endokrinologe und Osteologe Gerald Karsenty, der in den letzten Jahren durch aufwendige genetische Mausexperimente eine endokrine Funktion des von Osteoblasten sezernierten Hormons Osteocalcin belegen konnte (Karsenty, 2016). Neben der Beobachtung, dass Osteocalcin einen positiven Effekt auf den Glukosestoffwechsel ausübt, sorgte zudem die Behauptung für großes Interesse, dass Osteocalcin die Testosteronproduktion im Testikel von Mäusen stimuliert (Oury et al., 2011). Um diese tierexperimentelle Beobachtung zu überprüfen, wurde eine retrograde klinische Studie in 1338 gesunden und 110 an verschiedenen Osteopathologien leidenden Männern durchgeführt und der Zusammenhang zwischen Osteocalcin und Testosteron analysiert. Hierbei konnte in beiden Populationen eine hochsignifikante Assoziation zwischen beiden Serumparametern festgestellt werden. Diese Beobachtungen werden von vergleichbaren Studien anderer Autoren gestützt, die ebenfalls eine positive Assoziation zwischen Osteocalcin und Testosteron detektieren konnten (Kirmani et al., 2011; Valimaki et al., 2004). Interessanterweise konnte zudem eine positive Korrelation zwischen dem Knochenresorptionsmarker C-terminale Crosslinks (CTX) und Testosteron nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde zuvor im Tiermodell beschrieben, dass Osteoklasten für die Aktivierung von Osteocalcin aus der Knochenmatrix notwendig sind und somit dessen endokrinologischen Effekte modulieren (Ferron et al., 2010). Nachdem die aktuelle Studie jedoch durch ein Querschnittsdesign charakterisiert ist, lassen sich keine kausalen Zusammenhänge erschließen. Ein regulatorischer Effekt von Testosteron auf die Osteocalcinspiegel kann somit nicht ausgeschlossen werden, und weiterführende Studien sind notwendig, um das Verständnis der endokrinologischen Effekte des Knochens zu vertiefen.

4. Zusammenfassung

Der Knochenstoffwechsel repräsentiert einen komplexen und dynamischen Prozess, dessen detailliertes Verständnis aufgrund der demografischen Entwicklung mit hoher Prävalenz von Knochenerkrankungen eine zunehmende klinische Bedeutung erlangt. In dieser kumulativen Arbeit wurden spezifische Regulations- und Kommunikationsmechanismen im Knochenstoffwechsel untersucht und auf zellulärer, molekularer und klinischer Ebene analysiert. Durch die Charakterisierung der Rolle der CEACAMs im Knochenstoffwechsel konnte eine entscheidende Funktion des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 in der Regulation der Knochenresorption identifiziert werden, die nicht nur in der Pathogenese der Osteoporose, sondern auch bei tumorassoziierten Knochenerkrankungen von Bedeutung sein könnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der WNT Co-Rezeptor FZD8, ähnlich wie das terminale Signalprotein des WNT Signalweges β -Catenin, einen direkt hemmenden Effekt auf die Formation von Osteoklasten ausübt. Während FZD8 somit die Knochenresorption limitiert, übt der verwandte Oberflächenrezeptor FZD9 einen stimulierenden Effekt auf die Osteoblastenfunktion aus. Im Gegensatz dazu wird die Knochenformation durch das systemische Hormon CT gehemmt, indem die Freisetzung von S1P aus Osteoklasten inhibiert wird und somit der S1PR3-abhängige, stimulierende Effekt für Osteoblasten ausbleibt. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der bilateralen Kommunikation von Knochenzellen für einen gesunden Knochenstoffwechsel und zeigt am Beispiel von FTY720, wie ein derartiger Mechanismus pharmakologisch zur Therapie von Knochenerkrankungen genutzt werden kann. Neben zirkulierenden Hormonen wie CT können jedoch auch periphere Entzündungen durch systemische Effekte eine Störung des Knochenstoffwechsels verursachen. Dies wird am Beispiel der Psoriasis ersichtlich, in der erhöhte IL17A Spiegel einen bislang unbeschriebenen Einfluss auf den WNT Signalweg ausüben und somit knochenbildende Osteoblasten in ihrer Funktion hemmen. Der Knochen repräsentiert jedoch nicht nur ein wichtiges Zielorgan systemischer Einflüsse, sondern scheint auch selbst als endokrines Organ die Funktion von peripheren Zellsystemen zu steuern. Ähnlich wie in tierexperimentellen Studien ist das Osteoblasten-spezifische Hormon Osteocalcin mit den Testosteronspiegeln in gesunden Probanden und in Patienten mit Knochenerkrankungen assoziiert, was die physiologische Bedeutung des Knochenstoffwechsels für die Gesundheit des Menschen unterstreicht. Obgleich weiterführende experimentelle und klinische Studien notwendig sind, konnte mit dieser Arbeit das Verständnis wichtiger Regulations- und Kommunikationsmechanismen im Knochenstoffwechsel erweitert und Ansatzpunkte neuartiger Therapieformen für Patienten mit Skeletterkrankungen identifiziert werden.

5. Literaturangaben

AbuHilal M, Walsh S, Shear N. The Role of IL-17 in the Pathogenesis of Psoriasis and Update on IL-17 Inhibitors for the Treatment of Plaque Psoriasis. *J Cutan Med Surg*. 2016, 20(6):509-516.

Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Goldberg M, Guénet JL, Poirier C. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet*. 2005, 37(8):803-5.

Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016, 374(3):254-62.

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*. 2002, 346(20):1513-21

Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. 1999, 8(4):265-77.

Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012, 149(6):1192-205.

Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update. *Curr Rheumatol Rep*. 2008, 10(2):92-6.

Cong F, Schweizer L, Varmus H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development*. 2004, 131(20):5103-15.

Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 2002, 99(1):111-20.

Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, Cummings SR. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016, 2:16069.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 2010, 142(2):296-308.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005, 8(5):751-64.

Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008, 22(1):85-100.

Goltzman D. Osteolysis and Cancer. *J Clin Invest*. 2001, 107(10):1219-20.

Gong Y et al. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001, 107(4):513-23.

Han JI, Na KJ. Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Canine Skin Melanoma and a Possibility as a Cancer Model for Human Skin Melanoma. 2011, ISBN 978-953-307-571-6.

Hemmila E, Turbide C, Olson M, Jothy S, Holmes KV, Beauchemin N. Ceacam1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol*. 2004, 78(18):10156-65.

Hermann M, Bogunovic D. ISG15: In Sickness and in Health. *Trends Immunol*. 2016, S1471-4906(16)30181-8.

Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, Hirata M, Nishimura F. Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts. *Bone*. 2016, 93:1-11.

Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem*. 2005, 280(22):21162-8.

Huang S, Kaw M, Harris MT, Ebraheim N, McInerney MF, Najjar SM, Lecka-Czernik B. Decreased osteoclastogenesis and high bone mass in mice with impaired insulin clearance due to liver-specific inactivation to CEACAM1. *Bone*. 2010, 46(4):1138-45

Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J*. 1994, 302 (Pt 1):175-9

Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem*. 2001, 276(36):33697-704.

Jin L1, Li Y, Chen CJ, Sherman MA, Le K, Shively JE. Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008, 233(7):849-59.

Karasawa T, Yokokura H, Kitajewski J, Lombroso PJ. Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/beta -catenin signaling. *J Biol Chem.* 2002, 277(40):37479-86.

Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 2012, 481(7381):314-20.

Karsenty G, Olson EN. Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-organ Communication. *Cell.* 2016, 164(6):1248-56.

Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science.* 2009, 323(5913):524-7.

Keller J. Die Rolle von Calcitonin und seines Rezeptors im Knochenstoffwechsel - Untersuchungen an gentechnisch modifizierten Mausmodellen. Dissertation (Dr. med.), Staats- und Universitätsbibliothek Universität Hamburg Carl von Ossietzky, 2011.

Keller J. The Role of Canonical Wnt Signaling and Il-33 in the Regulation of Bone Resorption. Dissertation (Dr. rer. biol. hum.), Staats- und Universitätsbibliothek Universität Hamburg Carl von Ossietzky, 2014.

Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, Riggs BL, Amin S, Khosla S. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res.* 2011, 26(9):2212-6.

Kodama H, Yamasaki A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, Kumegawa M, Suda T. Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1991, 173(1):269-72.

Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2010, 30(12):3071-85.

Kuespert K, Pils S, Hauck CR (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2006, 18(5):565-71.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998, 93(2):165-76.

Leung N, Turbide C, Balachandra B, Marcus V, Beauchemin N. Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1^{-/-} mice. *Oncogene.* 2008, 27(36):4943-53.

Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002, 70(1):11-9.

Loeb, K.R., and A.L. Haas. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem.* 1992, 267(11):7806-13.

Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, Koskivirta I, Kleuser B, Vacher J, Vuorio E, Horne WC, Baron R. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest.* 2013, 123(2):666-81.

Ma C, Shuai B, Shen L, Yang YP, Xu XJ, Li CG. Serum carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 level in postmenopausal women: correlation with β -catenin and bone mineral density. *Osteoporos Int.* 2016, 27(4):1529-35.

Martin TJ, Sims NA. Calcitonin physiology, saved by a lysophospholipid. *J Bone Miner Res.* 2015, 30(2):212-5.

Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015, 16(2):131-9.

Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR, Yoneda T. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and $\alpha(4)\beta(1)$ -integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood.* 2000, 96(5):1953-60.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, 10(4):276-86.

Otero K, Shinohara M, Zhao H, Cella M, Gilfillan S, Colucci A, Faccio R, Ross FP, Teitelbaum SL, Takayanagi H, Colonna M. TREM2 and β -catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2012, 188(6):2612-21.

Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 2011, 144(5):796-809.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5(12):993-6.

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liao DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(20):11581-6.

Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, Pitson SM. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Curr Mol Med*. 2012, 12(10):1207-19.

Roodman GD. Osteoclast function in Paget's disease and multiple myeloma. *Bone*. 1995, 17(2 Suppl):57S-61S.

Ruiz P, Martin-Millan M, Gonzalez-Martin MC, Almeida M, González-Macias J, Ros MA. CathepsinKCre mediated deletion of β catenin results in dramatic loss of bone mass by targeting both osteoclasts and osteoblastic cells. *Sci Rep*. 2016, 6:36201.

Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J*. 2006, 25(24):5840-51.

Sato C, Iwasaki T, Kitano S, Tsunemi S, Sano H. Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 423(1):200-5.

Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012, 8(11):656-64.

Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2009, 66(7):1178-97.

Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007, 28(10):518-25.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 89(2):309-19.

Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014, 8;3:481.

Skaug B, Chen ZJ. 2010. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell*. 2010, 143(2):187-90.

Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S, Minami Y. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res.* 2000, 15(10):1912-23.

Tchoupa AK, Schuhmacher T, Hauck CR. Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal.* 2014, 15;12:27.

Uluçkan Ö, Wagner EF. Role of IL-17A signalling in psoriasis and associated bone loss. *Clin Exp Rheumatol.* 2016, 34(4 Suppl 98):17-20.

Välimäki VV, Alfthan H, Ivaska KK, Löyttyniemi E, Pettersson K, Stenman UH, Välimäki MJ. Serum estradiol, testosterone, and sex hormone-binding globulin as regulators of peak bone mass and bone turnover rate in young Finnish men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(8):3785-9.

Vogel P, Donoviel MS, Read R, Hansen GM, Hazlewood J, Anderson SJ, Sun W, Swaffield J, Oravec T. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS One.* 2009, 4(1):e4112.

Wagner EF, Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E, Psoriasis: What we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol.* 2010, 6(12):704-14.

Wang YK, Samos CH, Peoples R, Pérez-Jurado LA, Nusse R, Francke U. A novel human homologue of the *Drosophila* frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum Mol Genet.* 1997, 6(3):465-72.

Wang YK, Spörle R, Paperna T, Schughart K, Francke U. Characterization and expression pattern of the frizzled gene *Fzd9*, the mouse homolog of *FZD9* which is deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics.* 1999, 57(2):235-48.

Wei W, Zeve D, Suh JM, Wang X, Du Y, Zerwekh JE, Dechow PC, Graff JM, Wan Y. Biphasic and dosage-dependent regulation of osteoclastogenesis by β -catenin. *Mol Cell Biol.* 2011, 31(23):4706-19.

Wise A, Gearing K, Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today.* 2002, 7(4):235-46.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(7):3597-602.

Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med.* 2007, 13(7):791-801.

Zhao C, Avilés C, Abel RA, Almli CR, McQuillen P, Pleasure SJ. Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. *Development.* 2005, 132(12):2917-27.

6. Anhang

6.1. Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schütz, Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ich danke ihm herzlich für seine vielfältige Unterstützung, das in mich gesetzte Vertrauen und das Gewähren von zeitlichen Freiräumen zur Durchführung meiner weiterführenden Forschungsvorhaben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund und Mentor Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling, Direktor des Instituts für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, an dessen Institut ich meine bisherigen Forschungstätigkeiten durchführen konnte und der mich in jeglicher Hinsicht uneingeschränkt unterstützte. Gleichmaßen bedanke ich mich bei meinem Lehrer und ehemaligen Betreuer, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke, stellvertretender Direktor des Instituts für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, der mir das naturwissenschaftliche Denken beibrachte und mich ebenfalls uneingeschränkt unterstützte. Ohne Michael und Thorsten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. rer. nat. Anke Jeschke, die zu jeder Tages- und Nachtzeit für neue Projektideen zu begeistern war und die Zusammenarbeit so produktiv und angenehm gestaltete.

Außerdem möchte ich mich zutiefst bei Herrn PD Dr. med. Philipp Schwabe und PD Dr. med. Sven Märdian bedanken, deren zielstrebige, geradlinige und offene Art meine Arbeit im klinischen und operativen Bereich maßgeblich gefördert und geprägt hat. Danken möchte ich außerdem allen Kolleginnen und Kollegen des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie für die geleistete Unterstützung. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg N. Duda, Direktor des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, für die Unterstützung und die uneingeschränkte Möglichkeit, meine Forschungsarbeit in Berlin fortführen zu können.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie - meinen Eltern, meiner Schwester Christina, meiner Tante Gea, und meiner Verlobten Daniela Mau - für die nie endende Unterstützung und ihr Vertrauen.

6.2. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Dr. Dr. Johannes Keller