

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie  
Univ.-Prof. Dr. med. habil. Tobias Renkawitz  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Der Einfluss der sensiblen Neuropeptide Substanz P (SP) und alpha-Calcitonin  
gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) auf murine Osteozyten in vitro und in vivo**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Eder

2025



Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie  
Univ.-Prof. Dr. med. habil. Tobias Renkawitz  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Der Einfluss der sensiblen Neuropeptide Substanz P (SP) und alpha-Calcitonin  
gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) auf murine Osteozyten in vitro und in vivo**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Eder

2025

Dekan:	Prof. Dr. med. Dirk Hellwig
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. Susanne Grässel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Richard Bauer
Datum der mündlichen Prüfung:	01.08.2025

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1.	Anatomie des adulten Knochens .....	5
1.1.1.	Makroskopische Anatomie des adulten Knochens .....	5
1.1.2.	Mikroskopische Anatomie des adulten Knochens .....	9
1.1.2.1.	Extrazellulärmatrix des Knochens .....	9
1.1.2.2.	Knochenzellen .....	11
1.1.2.3.	Periost und Endost .....	12
1.2.	Osteozyten .....	14
1.2.1.	Morphologie und Differenzierung von Osteozyten .....	14
1.2.2.	Funktionen von Osteozyten .....	21
1.2.2.1.	Regulierung des Knochenumbaus .....	21
1.2.2.2.	Mechanorezeption .....	27
1.2.2.3.	Regulierung des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts .....	29
1.3.	Beeinflussung des Knochens durch das Nervensystem .....	35
1.3.1.	Neuronale Innervation des Knochens .....	35
1.3.2.	Einfluss von SP auf den Knochen .....	38
1.3.2.1.	Das sensible Neuropeptid SP und sein Rezeptor NK1R .....	38
1.3.2.2.	Einfluss von SP auf Osteoblasten und Osteoklasten .....	40
1.3.3.	Einfluss von $\alpha$ CGRP auf den Knochen .....	42
1.3.3.1.	Das sensible Neuropeptid $\alpha$ CGRP und sein Rezeptor CGRPR .....	42
1.3.3.2.	Einfluss von $\alpha$ CGRP auf Osteoblasten und Osteoklasten .....	44
<b>2.</b>	<b>Gegenstand der Arbeit .....</b>	<b>46</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>50</b>
3.1.	Material .....	50
3.2.	Methoden .....	55
3.2.1.	Zellkultur .....	55
3.2.1.1.	Die Zelllinie MLO-Y4 .....	55
3.2.1.2.	Kultivierung von MLO-Y4-Zellen .....	55
3.2.1.3.	Passagierung und Aussaat von MLO-Y4-Zellen .....	56

3.2.1.4. Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit sensiblen Neuropeptiden und Rezeptorinhibitoren .....	57
3.2.1.5. BrdU-Assay .....	58
3.2.1.6. Caspase-3/7-Assay .....	59
3.2.2. Molekularbiologische Methoden .....	60
3.2.2.1. RNA-Isolierung aus MLO-Y4-Zellen .....	60
3.2.2.2. RNA-Isolierung aus murinen Röhrenknochen .....	61
3.2.2.3. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA .....	62
3.2.2.4. cDNA-Synthese .....	63
3.2.2.5. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	64
3.2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	69
3.2.3.1. Proteinisolierung aus MLO-Y4-Zellen .....	69
3.2.3.2. BCA-Assay .....	69
3.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	70
3.2.3.4. Western Blot .....	71
3.2.4. Immunologische Methoden .....	74
3.2.4.1. Immunfluoreszenzfärbung .....	74
3.2.4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay für FGF23 (FGF23-ELISA) .....	75
3.2.5. Statistische Methoden .....	77
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
4.1. Nachweis der Rezeptoren NK1R, CRLR und Ramp1 in MLO-Y4-Zellen .....	78
4.1.1. Nachweis von NK1R in MLO-Y4-Zellen .....	78
4.1.2. Nachweis von CRLR in MLO-Y4-Zellen .....	80
4.1.3. Nachweis von Ramp1 in MLO-Y4-Zellen .....	82
4.2. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf MLO-Y4-Zellen .....	84
4.2.1. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proliferation und Apoptose von MLO-Y4-Zellen .....	84
4.2.1.1. Einfluss auf die Proliferation .....	84
4.2.1.2. Einfluss auf die Apoptose .....	85
4.2.2. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Genexpression in MLO-Y4-Zellen .....	89
4.2.2.1. Genexpression in unstimulierten MLO-Y4-Zellen .....	89
4.2.2.2. Einfluss auf die Genexpression von sensiblen Neuropeptiden in vitro .....	91
4.2.2.3. Einfluss auf die Genexpression von Neuropeptidrezeptoren in vitro .....	92

4.2.2.4.	Einfluss auf die Genexpression eines Markers der Osteozytenmorphologie in vitro .....	94
4.2.2.5.	Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoblastogenese in vitro .....	95
4.2.2.6.	Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoklastogenese in vitro .....	96
4.2.2.7.	Einfluss auf die Genexpression von Mediatoren der Mechanorezeption in vitro .....	98
4.2.2.8.	Einfluss auf die Genexpression von Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts in vitro .....	100
4.2.3.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proteinexpression von FGF23 in MLO-Y4-Zellen.....	102
4.3.	Einfluss der Abwesenheit von SP und $\alpha$ CGRP auf die Genexpression in murinen Röhrenknochen in vivo .....	104
4.3.1.	Genexpression in murinen Röhrenknochen aus Wildtyp-Mäusen .....	104
4.3.2.	Einfluss auf die Genexpression von sensiblen Neuropeptiden in vivo .....	107
4.3.3.	Einfluss auf die Genexpression von Neuropeptidrezeptoren in vivo.....	108
4.3.4.	Einfluss auf die Genexpression von Osteoblastenmarkern in vivo.....	109
4.3.5.	Einfluss auf die Genexpression eines Markers der Osteozytenmorphologie in vivo .....	110
4.3.6.	Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoblastogenese in vivo .....	111
4.3.7.	Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoklastogenese in vivo .....	112
4.3.8.	Einfluss auf die Genexpression von Mediatoren der Mechanorezeption in vivo .....	114
4.3.9.	Einfluss auf die Genexpression von Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts in vivo .....	115
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
5.1.	Nachweis der Expression der Rezeptoren für SP und $\alpha$ CGRP in Osteozyten .....	117
5.2.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proliferation und Apoptose von Osteozyten.....	120
5.3.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die endogene Expression sensibler Neuropeptide und deren Rezeptoren in Osteozyten.....	122
5.4.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Differenzierung und Morphologie von Osteozyten.....	126



5.5.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Modulation des Knochenumbaus.....	128
5.6.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Mechanorezeption in Osteozyten.....	137
5.7.	Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Modulation des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts.....	139
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung/ Summary .....</b>	<b>146</b>
	Abkürzungsverzeichnis.....	149
	Literaturverzeichnis .....	153
	Selbstständigkeitserklärung.....	168
	Danksagung .....	169

# 1. Einleitung

## 1.1. Anatomie des adulten Knochens

### 1.1.1. Makroskopische Anatomie des adulten Knochens

Die 206 menschlichen Skelettknochen unterscheiden sich untereinander stark in Größe und Form. Von den filigranen Gehörknöchelchen im Innenohr (Malleus, Incus und Stapes) bis hin zum massiven Oberschenkelknochen (Femur) folgt die Morphologie jedes Knochens weitgehend seinen funktionellen Anforderungen. Trotz der enormen Heterogenität der einzelnen Skelettknochen lassen sich makroskopisch einige anatomische Gemeinsamkeiten erkennen.

Auf der Oberfläche fast jeden Knochens befinden sich Strukturen, an denen Sehnen und Bänder entspringen oder ansetzen, um das Skelett mit dem aktiven Bewegungsapparat in Verbindung zu bringen. Je nach ihrer Gestalt und Lokalisation werden diese Strukturen als Tuberculum (Höcker), Trochanter (Rollhügel), Epicondylus (Knochenvorsprung in unmittelbarer Nähe eines Gelenkkopfes), Malleolus (Knöchel), Tuberositas (Aufrauhung), Eminentia (Erhebung), Crista (Kamm), Labium (Lippe) oder Linea (Linie) bezeichnet (1).

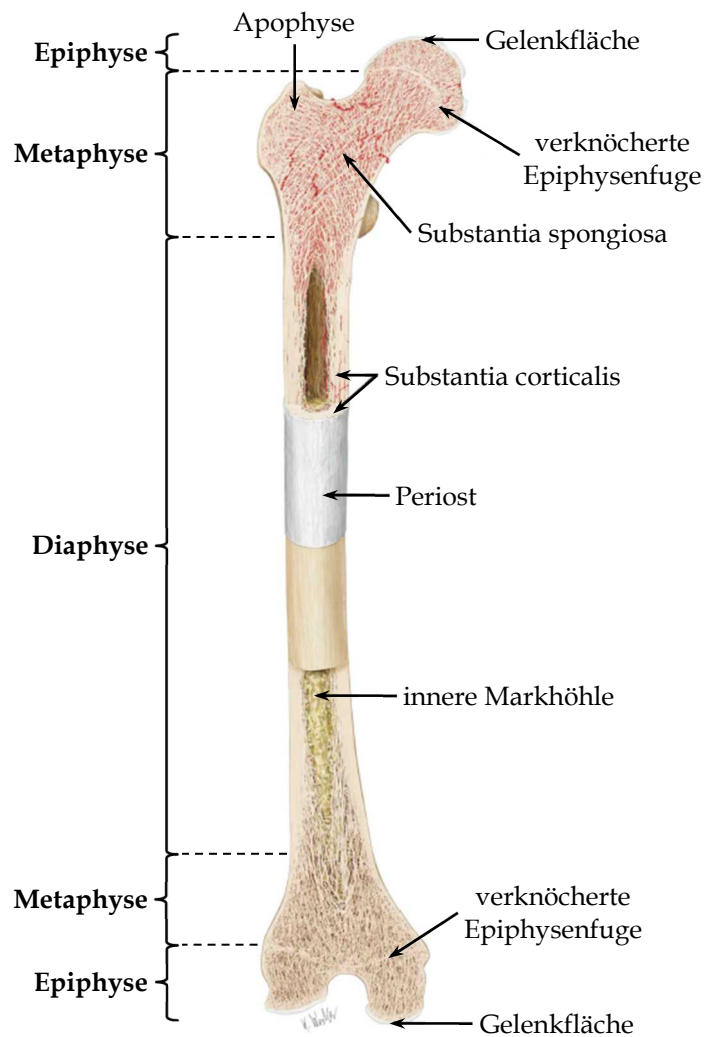
In nahezu jedem Knochen lassen sich makroskopisch zwei verschiedene Anteile voneinander abgrenzen – die Substantia corticalis (Substantia compacta) und die Substantia spongiosa (Abb. 1). Die Substantia corticalis bildet die äußere Schicht des Knochens und stellt eine kompakte und dichte Masse dar. Die Substantia spongiosa lagert sich der Substantia corticalis ohne scharfe Grenze von innen her an und besteht aus einem feinen System aus dünnen Knochenbälkchen, die Trabekel genannt werden. Zwischen den Trabekeln befindet sich Raum für das blutbildende Knochenmark oder Fettgewebe. Die Ausprägung von Substantia corticalis und Substantia spongiosa variiert und ist von der Art des Knochens abhängig. In langen Röhrenknochen beispielsweise ist die Substantia corticalis am proximalen und distalen Ende sehr dünn, während die Substantia spongiosa hingegen sehr ausgedehnt ist. Zur Mitte des Knochens hin wird die Substantia corticalis jedoch immer stärker ausgeprägt und die

Substantia spongiosa weicht mehr und mehr der inneren Markhöhle – einem Hohlraum im Inneren des Knochens, der entweder rotes Knochenmark oder Fettgewebe beinhaltet (Abb. 1). Von außen wird der Knochen vom bindegewebigen Periost (äußere Knochenhaut), das mit der Substantia corticalis verwachsen ist, umhüllt. Die Trabekel sowie die innere Markhöhle sind von Endost (innere Knochenhaut) überzogen (1), (2), (3), (4), (5).

Nach ihrer Gestalt können die Knochen des menschlichen Skeletts in fünf Kategorien eingeteilt werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

### **a) Ossa longa**

Zu den Ossa longa (lange Knochen, Röhrenknochen) gehören beispielsweise der Humerus, der Radius, die Ulna, der Femur, die Tibia und die Fibula. An einem Röhrenknochen werden verschiedene Abschnitte unterschieden (Abb. 1). Das proximale und distale Ende des Knochens wird als Epiphyse bezeichnet. Hier befinden sich die Gelenkflächen, mit denen der Knochen mit anderen Skelettelementen artikuliert. An die Epiphyse schließt sich die Metaphyse an – ein zumeist verbreiteter Knochenabschnitt, der die Epiphysenfuge enthält. Diese stellt beim juvenilen Knochen den Ort des Längenwachstums dar und verknöchert nach Abschluss des Wachstums. An der Metaphyse befinden sich häufig Knochenvorsprünge, an denen Sehnen und Bänder inserieren. Diese Knochenvorsprünge werden als Apophysen bezeichnet. Der Abschnitt des Röhrenknochens, der die proximale mit der distalen Metaphyse verbindet, heißt Diaphyse (Knochenschaft) (1), (2), (3), (4), (5).



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Röhrenknochens am Beispiel des menschlichen Femurs. Frontalschnitt durch den proximalen und distalen Teil des rechten Femurs bei als Ganzes erhaltenem mittleren Teil der Diaphyse. Ansicht von ventral (modifiziert nach (1)).**

### b) Ossa brevia

Die Ossa brevia (kurze Knochen) beinhalten die Handwurzelknochen sowie die Fußwurzelknochen.

### c) Ossa plana

Zu den Ossa plana (platte Knochen) zählen die Scapula, das Sternum, die Beckenknochen (Os ilium, Os ischii und Os pubis) sowie die Knochen des Schädeldachs (Os frontale, Os parietale und Os occipitale). Letztere bestehen außen und innen aus einer breiten Substantia corticalis, die als Lamina externa beziehungsweise Lamina interna bezeichnet wird. Die dazwischenliegende Substantia spongiosa heißt in der Schädelkalotte Diploe.

**d) Ossa pneumatica**

Ossa pneumatica (lufthaltige Knochen) sind Knochen des Viszerokraniums, die innen hohl und mit einer Schleimhaut ausgekleidet sind. Sie bilden die Nasennebenhöhlen sowie die Paukenhöhle und den Processus mastoideus.

**e) Ossa irregularia**

Die Knochen, deren Form sich in keine der vier genannten Kategorien einordnen lässt, werden als Ossa irregularia (unregelmäßige Knochen) zusammengefasst. Hierzu zählen beispielsweise die Wirbelknochen (1), (2), (3), (4), (5).

## 1.1.2. Mikroskopische Anatomie des adulten Knochens

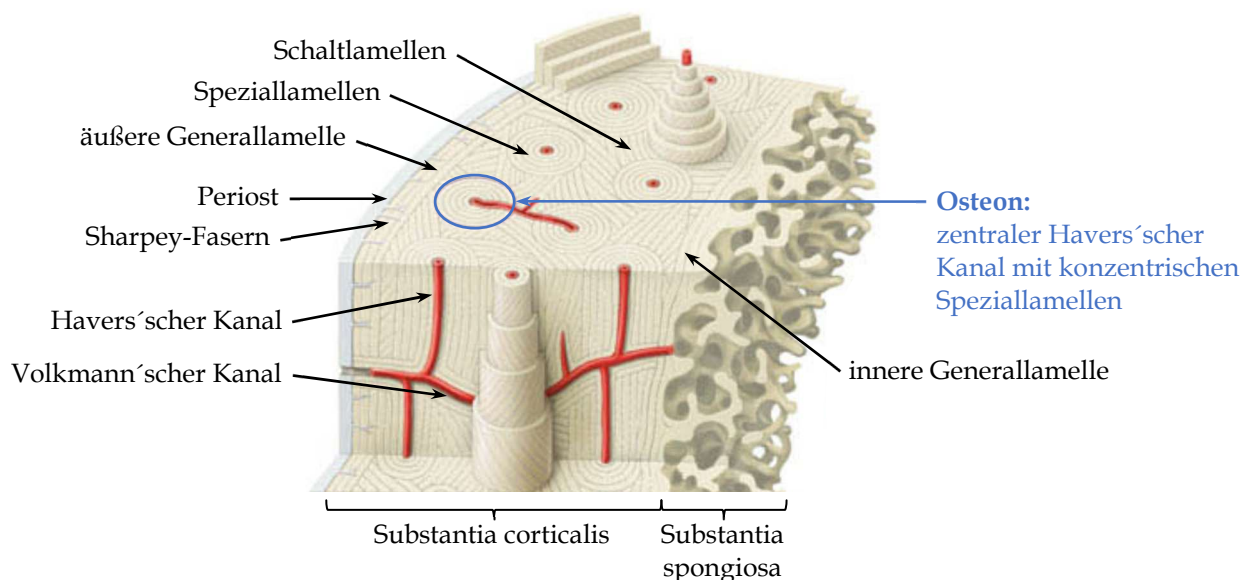
### 1.1.2.1. Extrazellulärmatrix des Knochens

Die für den Knochen charakteristische Härte und Stabilität beruht auf der Zusammensetzung seiner Extrazellulärmatrix. Diese besteht zu etwa einem Drittel aus organischen und zu etwa zwei Dritteln aus anorganischen Substanzen. Den mit Abstand größten Anteil des organischen Materials macht Kollagen Typ I aus. Daneben kommen Proteoglykane und Glykoproteine (Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN), Osteonektin, Bone Sialoprotein (BSP), Thrombospondin (TSP) und weitere) vor. Die anorganische Komponente der knöchernen Extrazellulärmatrix besteht vor allem aus Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ). Dabei handelt es sich um ein kristallines Salz, das im Rahmen der Knochenmineralisierung an die Kollagenfibrillen angelagert wird und dem Knochen seine Robustheit verleiht (2), (3).

Histologisch lassen sich nach der räumlichen Organisation der Extrazellulärmatrix der Geflechtknochen (Faserknochen, primärer Knochen) und der Lamellenknochen (sekundärer Knochen) voneinander unterscheiden. Während im Geflechtknochen die mineralisierten Kollagenfibrillen in Bündeln zusammengelagert und ungeordnet in der Extrazellulärmatrix verteilt sind, sind sie im Lamellenknochen in etwa 3 bis 5  $\mu\text{m}$  dicken Lamellen organisiert. Eine Lamelle besteht aus mehreren Kollagenfibrillen, die nahezu parallel zueinander angeordnet sind. Der Geflechtknochen ist die überwiegende Erscheinungsform der Knochen bei Säuglingen und wird nach und nach in den stabileren Lamellenknochen umgebaut. Bei Erwachsenen findet sich Geflechtknochen nur noch an sehr wenigen Stellen des Körpers oder nach einer Fraktur als Zwischenstufe bei der Frakturheilung. Daher soll im Folgenden näher auf die mikroskopische Morphologie des Lamellenknochens eingegangen werden (2), (3). Während die Lamellen in der Substantia spongiosa ungerichtet und zufällig in den Trabekeln verteilt sind, weisen sie in der Substantia corticalis eine geordnete Struktur auf (Abb. 2). Jeweils vier bis zwanzig so genannte Speziallamellen sind hier konzentrisch um einen zentralen Kanal, der als Havers'scher Kanal bezeichnet wird und meist in Längsrichtung des Knochens verläuft, angeordnet. Die mikroskopische

Baueinheit des Lamellenknochens – bestehend aus einem Havers'schen Kanal und den umgebenden Speziallamellen – wird Osteon (Havers'sches System) genannt. Ein Osteon besitzt einen Durchmesser von etwa 100 bis 400  $\mu\text{m}$  und ist bis zu einigen Zentimetern lang. Es ist von seiner Umgebung durch so genannte Zementlinien, die reich an Proteoglykanen sind, scharf abgegrenzt. Die Lamellen, die zwischen den einzelnen Osteonen liegen und keinen konzentrischen Verlauf aufweisen, heißen Schaltlamellen und stellen Reste von alten und bereits abgebauten Osteonen dar. Unmittelbar unterhalb des Periosts liegt die äußere Generallamelle, die die Oberfläche des Knochens bildet. Die innere Generallamelle grenzt die Substantia corticalis von der Substantia spongiosa ab (2), (3).

Die Havers'schen Kanäle haben einen Durchmesser von etwa 20 bis 30  $\mu\text{m}$  und beinhalten in der Regel ein bis drei Blutgefäße (Kapillaren, Venolen und Arteriolen), die in lockeres Bindegewebe eingebettet sind. Das Endost kleidet die Havers'schen Kanäle aus und bildet die Abgrenzung zu den umliegenden Speziallamellen. Ein in einem Havers'schen Kanal verlaufendes Blutgefäß kann sich aufzweigen und durch Querverbindungen – die so genannten Volkmann'schen Kanäle – in einen anderen Havers'schen Kanal gelangen (2), (3).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der mikroskopischen Struktur eines Lamellenknochens (modifiziert nach (1)).**

### 1.1.2.2. Knochenzellen

Im Knochen befinden sich hauptsächlich drei Zellarten – Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Osteoblasten sind für die Synthese der Knochenmatrix verantwortlich, Osteoklasten für deren Resorption. Osteozyten sind Osteoblasten, die ihre Matrixsynthese eingestellt haben und sich in die mineralisierte Extrazellulärmatrix eingemauert haben (2). Im Folgenden wird auf die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten eingegangen. Die Osteozytogenese wird ausführlich in Kapitel 1.2.1 beschrieben.

Osteoblasten entstehen über mehrere Differenzierungsstufen aus mesenchymalen Stammzellen (Mesenchymal Stem Cells, MSCs). Bei diesen handelt es sich um pluripotente Zellen, die unter anderem zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren können (6). Welcher Differenzierungsweg von den MSCs eingeschlagen wird, hängt von der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren ab, die die Expression von für die jeweilige Zellart spezifischen Genen regulieren (7). Für die Differenzierung zu Osteoblasten haben unter anderem die Transkriptionsfaktoren Runx-related transcription factor 2 (Runx2) und Osterix (OSX) eine zentrale Bedeutung (8).

Runx2 wird auch als Core-binding factor subunit alpha 1 (Cbfa1) bezeichnet und ist für die osteogene Differenzierung essenziell. In homozygoten Runx2-Knockout-Mäusen sind keine Osteoblasten und damit kein knöchernes Skelett nachweisbar. Heterozygote Mutationsträger weisen schwere Skelettanomalitäten auf (9). Runx2 fördert die Expression von verschiedenen Genen, die typisch oder sogar spezifisch für Osteoblasten sind. Dazu gehören die Gene für OCN, OPN, BSP und das für eine der beiden Proteinketten von Kollagen I kodierende Gen COL1A1 (10).

Eine ebenso bedeutende Rolle in der Osteoblastogenese spielt der Transkriptionsfaktor OSX. Auch in OSX-Knockout-Mäusen findet keine Knochenbildung statt. OSX-Knockout-Mäuse exprimieren jedoch Runx2, während in Runx2-Knockout-Mäusen keine Expression von OSX nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass OSX in einem späteren Stadium der Differenzierung exprimiert wird als Runx2 (11).



Obgleich Runx2 und OSX die Schlüsselrollen unter den für die Osteoblastogenese wichtigen Transkriptionsfaktoren einnehmen, existieren noch zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung der Osteoblastenlinie von Bedeutung sind. Beispiele hierfür sind SRY-box transcription factor 9 (SOX9) und Activating transcription factor 4 (ATF4). Die Osteoblastogenese wird von einer Vielzahl an unterschiedlichen Faktoren moduliert. Neben den genannten Transkriptionsfaktoren gehören hierzu Wachstumsfaktoren und Zytokine – wie beispielsweise Bone morphogenic proteins (BMPs) und Interleukin 11 (IL11) – sowie endokrine Einflüsse über das Parathormon (PTH) und Vitamin D und parakrine Stimuli – zum Beispiel über Glykoproteine der Wnt-Familie (12).

Osteoklasten stammen – anders als Osteoblasten und Osteozyten – von hämatopoetischen Stammzellen ab, die über die Monozyten-Makrophagen-Linie zu Präosteoklasten differenzieren. Dafür ist die Präsenz des Zytokins Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RankL) und des Wachstumsfaktors Macrophage colony-stimulating factor (MCSF) erforderlich. In Abwesenheit dieser beiden Moleküle kann keine Osteoklastogenese stattfinden. Die Bindung von RankL an den von Osteoklasten-Progenitorzellen exprimierten Receptor activator of NF $\kappa$ B (Rank) führt zu einer Vielzahl an intrazellulären Signalwegen, die in zellmorphologischen Veränderungen und in der Expression von Osteoklasten-spezifischen Genen resultieren. Zu diesen gehören unter anderem die für Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) und Kathepsin K – die beiden wichtigsten lytischen Enzyme für die Resorption von Knochenmatrix – kodierenden Gene. Die mononukleären Präosteoklasten fusionieren schließlich zu mehrkernigen Zellen, die so zu Osteoklasten heranreifen. Auch reife Osteoklasten exprimieren Rank. Dessen Aktivierung durch RankL führt zu einer Steigerung der Resorptionstätigkeit und einer verlängerten Überlebenszeit der Osteoklasten (13).

### 1.1.2.3. Periost und Endost

Das Periost umgibt den Knochen als bindegewebige äußere Knochenhaut. Sie besteht in der Regel aus drei Schichten. Die äußere Adventitia ist reich an Blutgefäßen, die der

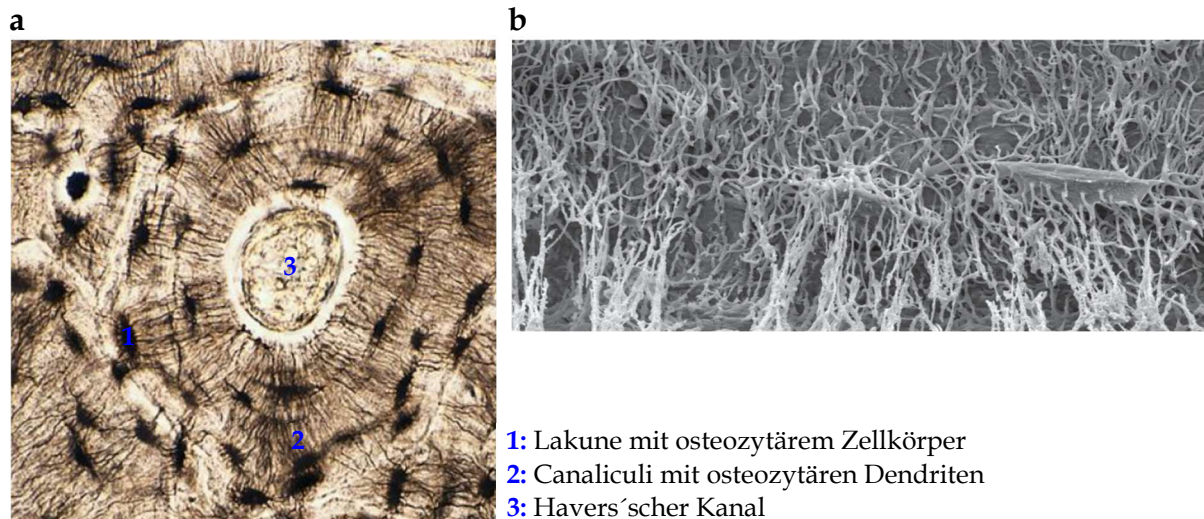
Ernährung des Knochens dienen. Die mittlere Schicht wird als Stratum fibrosum bezeichnet. Von ihr gehen Kollagenfasern – die so genannten Sharpey-Fasern – aus, die bis in die Substantia corticalis hineinragen und fest mit ihr verwachsen sind (Abb. 2). Die innere Schicht des Periosts ist das Stratum osteogenicum. Bei sich im Wachstum befindenden Knochen beinhaltet diese Schicht eine große Anzahl an mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten-Vorstufen, wie zum Beispiel Osteoprogenitorzellen. So wird das Dickenwachstum des Knochens gewährleistet. Bei adulten Knochen ist das Stratum osteogenicum zellarm oder gar nicht mehr abgrenzbar (2).

Das Endost überzieht die Trabekel der Substantia spongiosa und kleidet die innere Markhöhle sowie die Havers'schen Kanäle aus. Es besteht aus Bone Lining Cells (Knochendeckzellen), zu denen mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten-Vorstufen sowie inaktive Osteoblasten und inaktive Osteoklasten gehören. Im Fall einer Fraktur können diese Zellen aktiviert werden und entscheidend zur Frakturheilung beitragen (2).

## 1.2. Osteozyten

### 1.2.1. Morphologie und Differenzierung von Osteozyten

Osteozyten machen mit etwa 95% den mit Abstand größten Anteil der Zellen im adulten Knochen aus. Sie befinden sich – eingebettet in die mineralisierte Extrazellulärmatrix – in konzentrisch um den Havers'schen Kanal eines Osteons angeordneten Aussparungen zwischen den Lamellen. Diese Aussparungen werden als Lakunen bezeichnet und besitzen einen Durchmesser von etwa 15 bis 20  $\mu\text{m}$  (Abb. 3). Osteozyten exprimieren zahlreiche Dendriten, die den Knochen in von den Lakunen ausgehenden, etwa 250 bis 300 nm durchmessenden Kanälen (Canaliculi) durchziehen (Abb. 3). Über ihre Dendriten stehen die Osteozyten zum einen untereinander mittels „Gap Junctions“ in engem Kontakt und interagieren zum anderen mit Osteoblasten, mit dem Gefäßsystem sowie möglicherweise mit Zellen der inneren Markhöhle. Durch das lakunokanalikuläre System wird den Osteozyten also die Kommunikation mit anderen Zellen ermöglicht, obwohl sie von der Knochenmatrix regelrecht „ummauert“ sind. Die feste Integration in die Matrix bringt jedoch noch eine weitere Herausforderung mit sich – die Ernährung der Osteozyten. Die Diffusion von Nährstoffen durch die verkalkte Knochenmatrix ist nahezu unmöglich. Daher erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff größtenteils über die Flüssigkeit, die die Osteozyten im lakunokanalikulären System umgibt. Die Zusammensetzung dieser Knochenflüssigkeit ist bisher nicht hinreichend geklärt, jedoch wird ihr neben der Funktion des Nährstofftransports auch eine zentrale Rolle in der Mechanorezeption (Kapitel 1.2.2.2) zugeschrieben (2), (14).



**Abbildung 3:**

**a:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Osteons. Konzentrisch um den Havers'schen Kanal liegen in interlamellären Lakunen die Zellkörper der Osteozyten. Ihre Zellfortsätze durchziehen den Knochen in radiär zum Havers'schen Kanal ausgerichteten feinen Kanälen (modifiziert nach (2)).

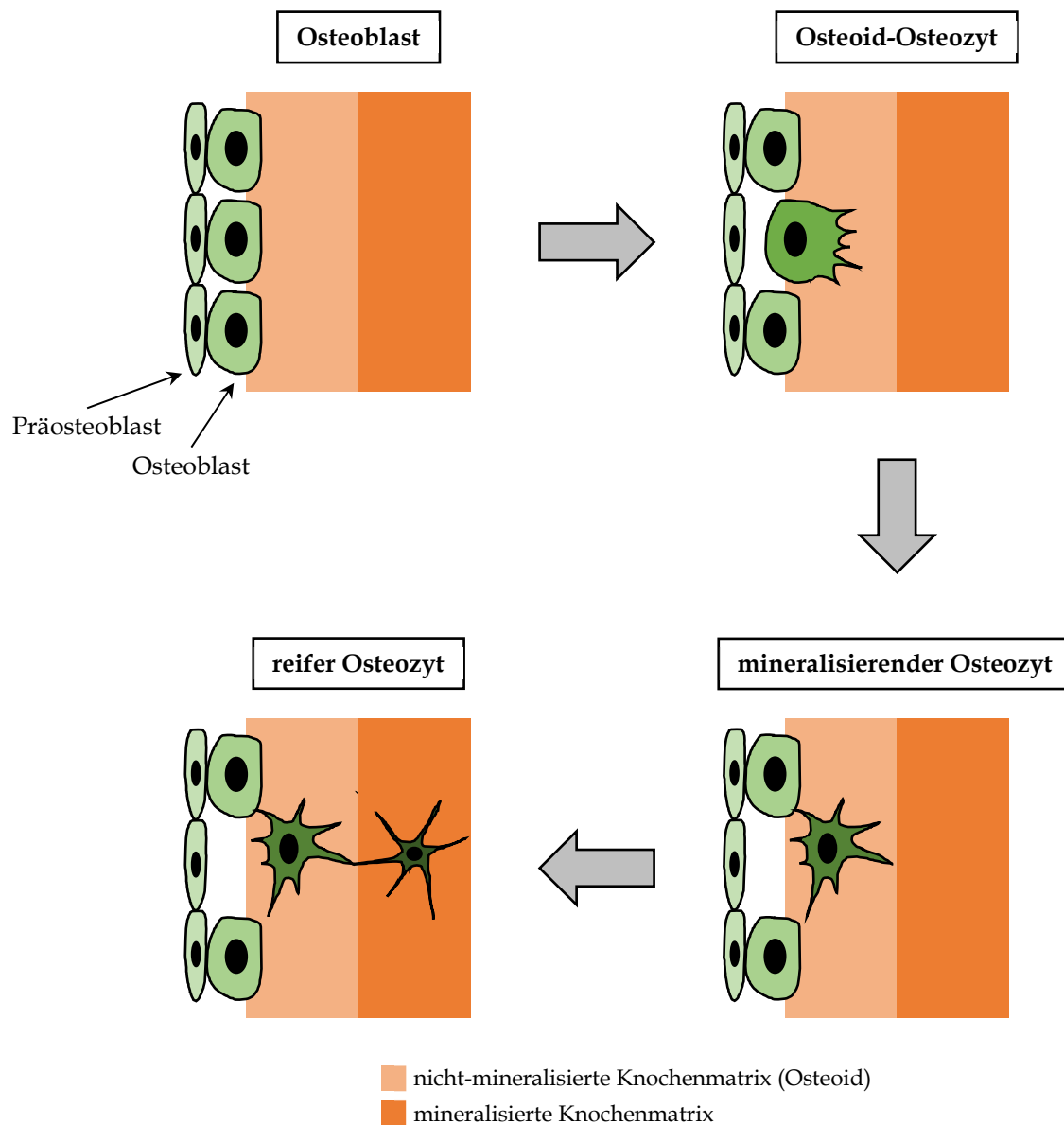
**b:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des lakunokanalikulären Systems (entnommen aus (15)).

Osteozyten entstehen durch Enddifferenzierung von Osteoblasten, die sich in die von ihnen produzierte Matrix einbetten. Osteoblasten, die nicht die Apoptose einleiten, können entweder zu inaktiven „Bone Lining Cells“ konvertieren oder zu Osteozyten differenzieren (16). Der Osteozyt ist die terminal differenzierte Zellart der Osteoblastenlinie (14), (17). Während der Osteozytogenese verändert sich die Zellmorphologie der differenzierenden Osteoblasten merklich. Ein wesentlicher Schritt vom Osteoblast zum Osteozyt ist die Ausbildung von Dendriten. Zudem geht die Differenzierung mit einer Reduktion des Zellvolumens sowie mit einer schwindenden Anzahl an Zellorganellen – insbesondere des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats – einher (18), (19).

In der Literatur existieren verschiedene Theorien, wie die Einbettung von Osteoblasten in die Knochenmatrix im Detail abläuft. Franz-Odenaal et al. gehen davon aus, dass ein Osteoblast seine Matrixproduktion langsam reduziert und daraufhin von benachbarten Osteoblasten, deren Matrixsynthese unverändert stattfindet, passiv eingemauert wird (20). Dieser Theorie widersprechen jedoch Befunde von Holmbeck et al. und Inoue et al., die eine große Bedeutung von Matrix-spaltenden Enzymen, die von Osteozyten exprimiert werden und durch Spaltung von Kollagen-Fasern der

bereits bestehenden Knochenmatrix eine Einbettung der Zelle in seine umgebende Matrix begünstigen könnten, festgestellt haben (21), (22). Diese Ergebnisse weisen weg vom Bild der Osteozytogenese als passiver Prozess und deuten darauf hin, dass Osteozyten aktiv an der Ausbildung des lakunokanalikulären Systems und damit an ihrer Einbettung in die Knochenmatrix beteiligt sind (14). Des Weiteren ist unklar, ob die Wahrscheinlichkeit der Differenzierung zum Osteozyten für jeden Osteoblasten gleich hoch ist oder ob bestimmte Untergruppen von Osteoblasten für die Osteozytogenese molekular prädisponiert sind (18).

In Anbetracht der zellmorphologischen Veränderungen während der Differenzierung wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Zwischenstadien in der Entwicklung vom Osteoblast zum Osteozyt definiert (20). Ihnen gemeinsam ist die Vorstellung, dass einer der ersten Schritte in der Osteozytogenese die Ausbildung von Dendriten in die Richtung, in die auch das Osteoid sezerniert wird, ist. Daraufhin kommt es zur Abtrennung der Zelle von der Osteoblastenfront. In diesem Stadium wird die Zelle als Osteoid-Osteozyt bezeichnet. Im Anschluss daran bildet die Zelle auch Dendriten in Richtung der Osteoblastenfront aus, um mit den Osteoblasten in Kontakt zu bleiben. Nun ist die Zelle komplett von Osteoid umgeben und wird mineralisierender Osteozyt genannt. Mit weiterer Progression der Osteozytogenese wird schließlich das Osteoid mineralisiert und der mineralisierende Osteozyt wird zum reifen Osteozyt (20), (15). Diese vereinfachte Modellvorstellung der phänotypischen Entwicklung während der Osteozytogenese ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der zellmorphologischen Veränderungen während der Osteozytogenese (inspiriert durch (20)).**

Die zellmorphologische Entwicklung geht mit Veränderungen der Genexpression einher. Während Osteoblasten-spezifische Gene – wie beispielsweise *OSX*, *COL1A1* oder das für die alkalische Phosphatase kodierende *ALP* – weniger oder gar nicht mehr exprimiert werden, werden in Osteozyten andere Gene induziert. Je nach Differenzierungsstadium ändert sich das Spektrum der exprimierten Markergene (14). Das während der Differenzierung am frühesten exprimierte Osteozyten-spezifische Gen kodiert für E11 (gp38, Podoplanin, OTS-8, PA2.25). E11 ist ein Transmembranprotein, dem eine entscheidende Bedeutung bei der Formation der Dendriten zugeschrieben wird. Die konditionelle Deletion von Knochen-spezifischem

E11 in Mäusen führt zu reduzierten Volumina und Längen der osteozytären Dendriten sowie zu Beeinträchtigungen der Mikroarchitektur des Knochengewebes (23). Die Osteozyten-ähnliche Zelllinie MLO-Y4 reagiert auf die Applikation von „Fluid Flow Shear Stress“ (Kapitel 1.2.2.2), indem sie sowohl mehr als auch längere Dendriten ausbilden. Dieser Effekt wird durch Blockierung von E11 mittels siRNA aufgehoben (24). Da E11 nur in frühen Stadien der Osteozytogenese, aber nicht in reifen Osteozyten exprimiert wird, geht man davon aus, dass es zwar eine bedeutende Rolle für die Ausbildung der Dendriten spielt, jedoch keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Dendriten-Struktur im reifen Osteozyten hat (18).

Genanalysen und proteomische Untersuchungen lieferten weitere Markergene sowie Markerproteine von jungen Osteozyten. Hierzu zählen die Gene für Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (PHEX), Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), Dentin matrix protein 1 (DMP1), Macrophage-capping protein (CapG) und Destrin (DSTN) (14). PHEX, MEPE und DMP1 spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Phosphat-Haushalts sowie in der Regulation der Biomineralisierung des Knochens. Ihre genaue Funktion wird in Kapitel 1.2.2.3 erläutert. Lu et. al. gehen davon aus, dass DMP1 die Differenzierung von Osteozyten reguliert, da die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen in Osteozyten von DMP1-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass DMP1 die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen in jungen Osteozyten unterdrücken könnte (25). CapG und DSTN regulieren die Organisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts. CapG kodiert das Macrophage-capping protein – ein Mitglied der Gelsolin/Villin-Familie. Es deckt die spitzen Enden von Aktinfilamenten ab und reguliert dadurch deren Länge und Motilität (26), (27). DSTN gehört zur Familie der Aktin-bindenden Proteine und steigert die Umsatzrate von Aktinfilamenten (28). Die hohe Expression von CapG und DSTN in unreifen Osteozyten spricht für eine aktive Umorganisation des Zytoskeletts während der Einbettung in die Knochenmatrix und der Dendritenbildung (29).

Reife, fest in die mineralisierte Matrix eingemauerte Osteozyten exprimieren zudem Sklerostin (SOST), Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) und Hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1, ORP150) (14). SOST hat eine immense Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase (Kapitel 1.2.2.1). Zudem inhibiert SOST

die Biomineralisierung sowie die Entwicklung von Osteoid-Osteozyten zu fortgeschrittenen Differenzierungsstufen, indem es die Expression von MEPE sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene erhöht, während PHEX vermindert exprimiert wird (30), (31). Das Genprodukt von FGF23 wird von ausgereiften Osteozyten sezerniert und besitzt außerhalb des Knochens zahlreiche systemische Funktionen (Kapitel 1.2.2.3). HYOU1 kodiert ein Chaperon, das möglicherweise protektiv auf die in ihrer hypoxischen Umgebung residierenden Osteozyten wirkt (29).

Eine Übersicht über die Entwicklung der Expression der eben genannten Markergene während der verschiedenen Stadien der gesamten Osteoblastenlinie – von der Osteoprogenitorzelle über den Osteoblast bis hin zum reifen Osteozyt – ist in Tab. 1 zusammengestellt.





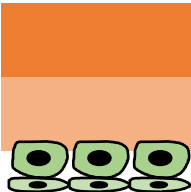
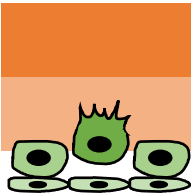
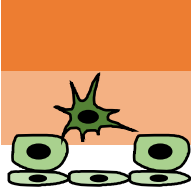
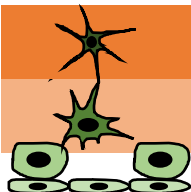
	Osteoprogenitor	Präosteoblast	reifer Osteoblast	Osteoid-Osteozyt	mineralisierender Osteozyt	reifer Osteozyt
						
Runx2	+	+	+	-/+	-/+	-/+
OSX	-	+	+	-/+	-/+	-/+
ALP	+	+	+	-	-	-
COL1A1	+	+	+	-/+	-/+	-
OCN	-	-	+	+	+	-
E11	-	-	-	++	+	-
PHEX	-	-	-/+	++	+	+
MEPE	-	-	-	++	+	+
DMP1	-	-	-	+	++	+
CapG	-	-	-	+	++	+
FGF23	-	-	-	-	-	+
SOST	-	-	-	-	-	+
HYOU1	-	-	-	-	-	+

Tabelle 1: Expression ausgewählter Markergene in verschiedenen Stadien der Differenzierung der gesamten Osteoblastenlinie – von der Osteoprogenitorzelle bis zum reifen Osteozyt (–: wird nicht exprimiert, +: wird exprimiert, ++: wird stark exprimiert (im Vergleich zur Expression desselben Gens in den anderen Stadien), –/+: keine oder widersprüchliche Literaturangaben) (14), (15), (29), (32), (33).

## 1.2.2. Funktionen von Osteozyten

Lange wurden Osteozyten, die als enddifferenzierte Zellen in die Knochenmatrix eingebettet sind, als inaktive Zellpopulation ohne wesentliche Funktionen für den Knochen angesehen. Jedoch hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten diese Sichtweise mit der Entdeckung zahlreicher bedeutender Funktionen von Osteozyten für den Knochen und darüber hinaus drastisch geändert. Osteozyten regulieren – als Hauptmechanosensoren des Knochens – aktiv den Knochenumbau im adulten Knochen, indem sie die Differenzierung und Aktivität sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten beeinflussen und an endogene und exogene Einflüsse anpassen. Weiterhin wird aufgrund der Synthese und Sekretion FGF23, das in den Vitamin-D-Phosphat-Haushalt eingreift, eine endokrine Funktion der Osteozyten diskutiert (14).

### 1.2.2.1. Regulierung des Knochenumbaus

Auch nach Abschluss des Wachstums bleibt der Knochen ein physiologisch aktives, dynamisches Organ, das einem ständigen Umbauprozess (Bone Remodeling) unterliegt. Durch ein Zusammenspiel von Knochen-resorbierenden Osteoklasten und Knochen-bildenden Osteoblasten wird die Knochenmatrix permanent erneuert. Der Knochenumbau ist ein akkurat koordinierter Prozess, der auf hormonelle und parakrine Stimuli sowie auf mechanische Belastung reagieren kann. Dies ist wichtig, um Mikroschäden im Knochen zu reparieren, die Knochenarchitektur an mechanische Ansprüche anzupassen und eine Balance im Mineralhaushalt aufrechtzuerhalten. Ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten führt zu vermehrter oder verminderter Knochenmasse und damit zu Krankheitsbildern wie der Osteopetrose, Osteopenie oder Osteoporose. Osteozyten gelten als hauptverantwortliche Regulatoren des Knochenumbaus und beeinflussen die Differenzierung und Aktivität von beiden am Knochenumbau beteiligten Akteuren – Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 6) (14), (34), (35).

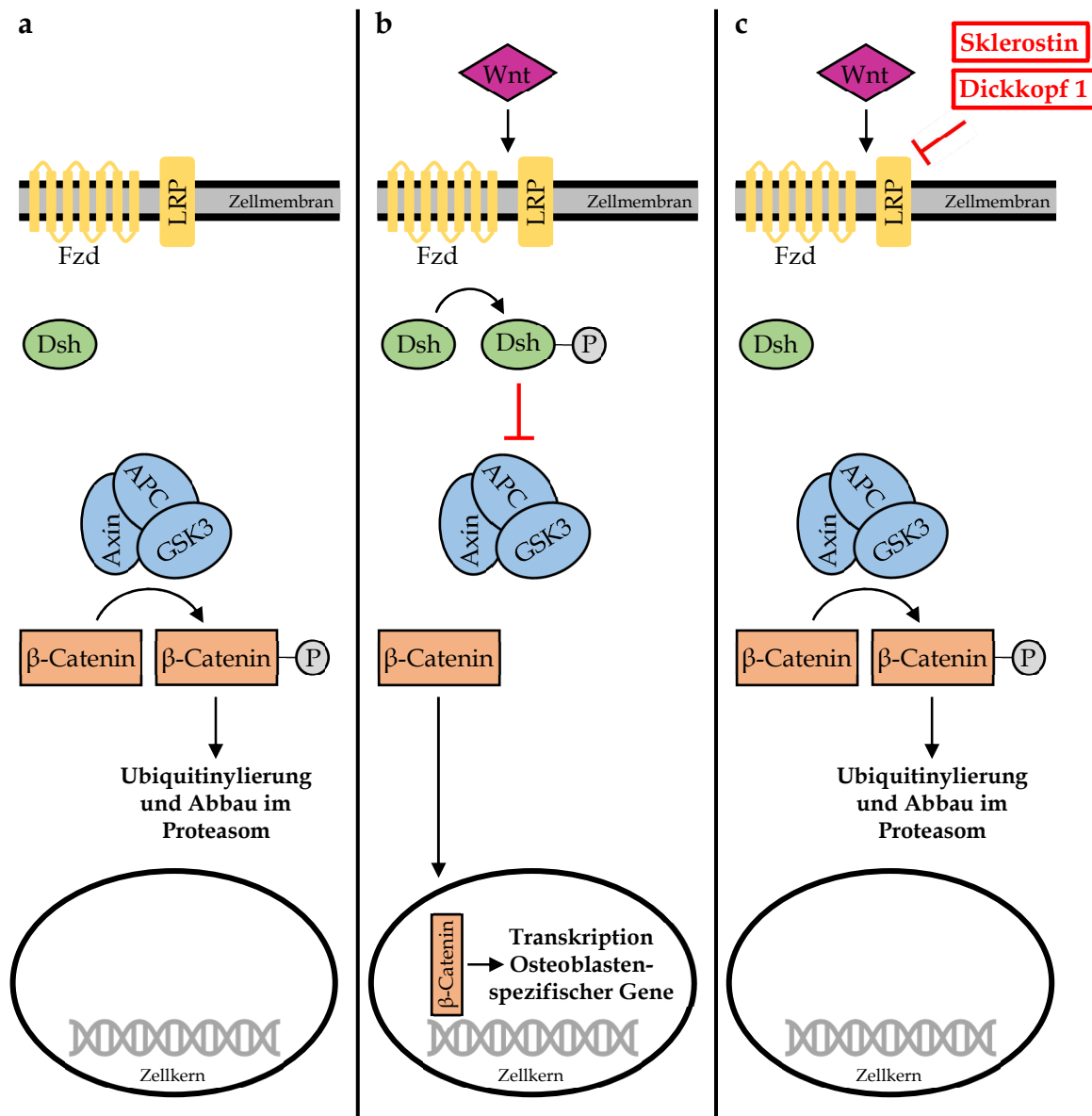
**a) Osteozytäre Regulierung der Osteoblastogenese**

Osteozyten regulieren die Osteoblastogenese über den Wnt-Signalweg. Der Wnt-Signalweg hat für die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten und für die Knochenbildung eine große Bedeutung. Im Mausmodell führt eine Gain-of-function-Mutation im Gen für Wnt10b zu einer vierfach erhöhten Knochenmasse, während in Mäusen, die keinen Wnt-Korezeptor LRP5 exprimieren, die Knochenmasse vermindert ist und die Proliferation von Osteoblasten gehemmt wird. Die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade fördert die Expression von Runx2 und OSX und unterdrückt die Expression von Transkriptionsfaktoren, die für die Adipozytogenese relevant sind. Damit induziert der Wnt-Signalweg die osteogene Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen (36), (37), (38).

Die Bindung eines Wnt-Proteins an seinen Rezeptor löst eine Vielzahl an unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden aus. Vereinfachend unterscheidet man zwischen dem  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen Signalweg und den  $\beta$ -Catenin-unabhängigen nicht-kanonischen Signalwegen (39). Es wurde bereits nachgewiesen, dass der kanonische Signalweg für die Modulation der Osteoblastogenese eine große Bedeutung besitzt, während die Rolle der nicht-kanonischen Signalwege für die osteogene Differenzierung noch nicht abschließend geklärt ist (40). Eine vereinfachte schematische Darstellung der kanonischen Signalkaskade ist in Abb. 5a und 5b dargestellt. Der Wnt-Rezeptor besteht aus einem Transmembranrezeptor der Frizzled-Familie (Fzd) sowie einem Korezeptor aus der Familie der Low-density-lipoprotein-related proteins (LRPs) – vorrangig LRP5 oder LRP6 (39), (41). Im Zentrum des kanonischen Signalwegs steht  $\beta$ -Catenin. In Abwesenheit von Wnt wird im Zytosol  $\beta$ -Catenin vom  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex – bestehend aus Axin, Adenomatosis polyposis coli (APC) und Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) – phosphoryliert und anschließend ubiquitinyliert, was den Abbau im Proteasom nach sich zieht (39), (42). Bindet jedoch Wnt an seinen Rezeptor, wird durch Phosphorylierung das Protein Dishevelled (Dsh) aktiviert, das wiederum den  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex inaktiviert. Dadurch bleibt die Phosphorylierung und damit der Abbau von  $\beta$ -Catenin aus. Dieses akkumuliert im Zytosol und transloziert schließlich in den Zellkern, wo es als

Transkriptionsfaktor die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen induziert (39), (38).

Der Wnt-Signalweg kann durch LRP-Antagonisten – wie Sklerostin (SOST) oder Dickkopf 1 (DKK1) – inhibiert werden (Abb. 5c). Die Bindung des Antagonisten an extrazelluläre Domänen von LRP5 beziehungsweise LRP6 führt zur Beeinträchtigung der Komplexbildung von LRP mit Fzd und Wnt und verhindert somit die intrazelluläre Signalweiterleitung (43), (44).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der kanonischen Wnt-Signalkaskade in Osteoblasten (inspiriert durch (45)). a: Signalkaskade in Abwesenheit von Wnt; b: Signalkaskade in Anwesenheit von Wnt; c: Inhibition der kanonischen Wnt-Signalkaskade durch LRP-Antagonisten (Fzd: Frizzled, LRP: Low-density-lipoprotein-related proteins, Dsh: Dishevelled, APC: Adenomatosis polyposis coli, GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3, P: Phosphat).

Osteozyten sind die Hauptproduzenten von SOST im Organismus. SOST wird jedoch nur in reifen Osteozyten exprimiert, nicht aber in jungen Osteozyten, deren umgebende Matrix noch nicht mineralisiert ist (31), (46). SOST ist ein potenter Inhibitor der Osteoblastogenese. In vitro führt die SOST-vermittelte Unterdrückung der Wnt-Signalkaskade in präosteoblastischen Zellen zu einer verminderten osteogenen Differenzierung und einer reduzierten Mineralisierung (31), (47). In vivo weisen transgene Mäuse, die SOST überexprimieren, eine Reduktion der Osteoblasten-Aktivität, Knochenbildung, Knochenmasse und Knochenstabilität auf (48), während alle diese Parameter in SOST-Knockout-Mäusen sowohl in der Substantia corticalis als auch in der Substantia spongiosa erhöht sind (49). Patienten mit Sklerosteose – eine autosomal-rezessive Erbkrankheit, der eine Loss-of-function-Mutation im SOST-Gen zugrunde liegt – leiden an übermäßiger Knochenbildung und Sklerosierung (50).

Die Expression von DKK1 ist hauptsächlich auf den Knochen beschränkt, wobei es in Osteozyten am stärksten exprimiert wird (51), (52). Ähnlich wie SOST hemmt auch DKK1 die Differenzierung von präosteoblastischen MC3T3-E1-Zellen und induziert stattdessen die Adipozytogenese in primären Kalvarienzellen aus Ratten. Zudem führt die heterozygote Deletion von DKK1 in Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Knochenbildung, Knochenmasse, Mineralisierung und Osteoblasten-Anzahl (53). Die Überexpression von DKK1 hat hingegen eine starke Osteopenie zur Folge (51).

Neben den beiden am besten erforschten Osteoblastogenese-Inhibitoren SOST und DKK1 synthetisieren Osteozyten noch weitere Faktoren, die Osteoblasten beeinflussen können. Zu diesen gehören die ebenfalls inhibitorisch wirkenden Proteine Neuropeptid Y und Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) (14), (54). Osteozyten können Osteoblasten durch Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Stickstoffmonoxid (NO), Wnt-Proteinen und Adenosintriphosphat (ATP) jedoch auch stimulieren. Die Relevanz der genannten Moleküle für den Knochenmetabolismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt (14), (33).

**b) Osteozytäre Regulation der Osteoklastogenese**

Neben der Modulation der Knochenbildung nehmen Osteozyten auch Einfluss auf die Knochenresorption, indem sie maßgeblich an der Regulation der Osteoklastogenese beteiligt sind. Den potenziellen Einfluss von Osteozyten auf die Osteoklastogenese zeigten Studien von Tanaka et al. und Zhao et al., die Kokulturen von primären Osteozyten sowie von Zellen der Osteozytenlinie MLO-Y4 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen anlegten. In beiden Kokulturen differenzierten die Osteoklasten-Progenitorzellen – ohne die Zugabe von RankL und MCSF – zu reifen Osteoklasten. Dies legt nahe, dass Osteozyten in der Lage sind, diese Faktoren in relevanten Mengen zu produzieren und dadurch die Osteoklastogenese zu induzieren (55), (56).

Die Expression von RankL wurde unter anderem in Osteozyten, Osteoblasten, Chondrozyten und Bone Lining Cells nachgewiesen (57). RankL-Knockout-Mäuse weisen eine Osteopetrose und einen vollständigen Mangel an Osteoklasten aufgrund der nicht stattfindenden Osteoklastogenese auf. Nakashima et al. entwickelten eine Methode der spezifischen Deletion von RankL in Osteozyten, während die Expression in Osteoblasten und anderen Zellen erhalten bleibt. Diese Mäuse entwickeln ebenfalls einen stark osteopetrotischen Phänotyp, was auf eine Schlüsselrolle der Osteozyten in der RankL-vermittelten Induktion der Osteoklastogenese hindeutet. Auch in vitro ist die Expression von RankL in Osteozyten höher als in Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläuferzellen. Osteozyten gelten daher mittlerweile als Hauptquelle von RankL (58), (59), (60).

Die RankL-exprimierenden Zellen synthetisieren des Weiteren Osteoprotegerin (OPG) (57). OPG ist ein unmittelbarer Gegenspieler von RankL. Es fungiert als Decoy-Rezeptor und konkurriert mit Rank um die Bindung an RankL. An OPG gebundenes RankL steht nicht mehr für die Bindung an Rank zur Verfügung, was dazu führt, dass die Induktion der Osteoklastogenese ausbleibt. Im Mausmodell führt ein Knockout von OPG zu einer starken Osteoporose, während die Überexpression von OPG – bedingt durch Hemmung der Osteoklastogenese – eine Osteopetrose zur Folge hat. Auch in vitro wird die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen durch OPG inhibiert. Das Verhältnis der im Mikromilieu vorhandenen Mengen an RankL und OPG bestimmt maßgeblich den Grad der Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten. Ist mehr RankL als OPG vorhanden ( $\text{RankL/OPG-Verhältnis} > 1$ ), wird

die Osteoklastogenese stimuliert; überwiegt hingegen die Dosis von OPG die Menge an RankL (RankL/OPG-Verhältnis  $< 1$ ), wird die Osteoklastogenese inhibiert. Die RankL-OPG-Achse gilt als wichtigstes regulatorisches Element der Osteoklastogenese (61), (62), (63), (64), (65), (66). In Osteozyten wird die Sekretion von OPG durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. Kramer et al. führten im Mausmodell eine spezifische Deletion von  $\beta$ -Catenin in Osteozyten – nicht aber in Osteoblasten und anderen Zellen – durch. Dies führte zu einer verminderten Expression von OPG in Osteozyten und dadurch zu einer erhöhten Osteoklasten-Anzahl und einer gesteigerten Knochenresorption mit der Konsequenz eines osteoporotischen Phänotyps. Daraus lässt sich schließen, dass das von Osteozyten produzierte OPG entscheidend zur Aufrechterhaltung des RankL/OPG-Verhältnisses beiträgt und ein Verlust des osteozytären OPG zu einer physiologisch relevanten Verschiebung der Knochenhomöostase führt (67).

Das in Osteozyten produzierte RankL wird den Osteoklasten-Vorläufern Membrangebunden über die osteozytären Dendriten präsentiert. Der Einfluss der sezernierten RankL-Moleküle auf die Osteoklastogenese ist hingegen vernachlässigbar gering. Somit ist nicht nur die Expression von RankL, sondern auch dessen subzellulärer Transport zur Zellmembran ein möglicher Ansatz für regulatorische Prozesse. Synthetisierte RankL-Moleküle gehen einen Komplex mit OPG ein und werden daraufhin zu den Lysosomen transportiert. Die Komplexbildung ist für den subzellulären Transport unerlässlich. OPG reguliert also neben seiner extrazellulären Funktion als Decoy-Rezeptor intrazellulär den Transport von RankL. Der Verlust der Transportfunktion von OPG bei erhaltener Funktion als Decoy-Rezeptor resultiert in einer gesteigerten Osteoklastogenese. Die Regulation des subzellulären Transports von RankL in Osteozyten durch OPG hat somit einen direkten physiologisch bedeutsamen Einfluss auf die Osteoklastogenese (68), (69).

Neben der RankL-OPG-Achse exprimieren Osteozyten noch diverse andere Moleküle, die die Osteoklastogenese beeinflussen. Zu diesen gehören unter anderem MCSF, Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) (33). MCSF ist für eine normale Osteoklastogenese unverzichtbar. Es wird in Osteoblasten, Osteozyten und in einigen nicht-skelettalen Geweben exprimiert. Die Bindung von MCSF an den MCSF-Rezeptor (MCSFR) stimuliert die Proliferation und durch Hochregulierung der

Expression von Rank die Differenzierung von Präosteoklasten. MCSF-Knockout-Mäuse weisen einen osteopetrotischen Phänotyp sowie eine gestörte Osteozyten-Reifung – assoziiert mit einer reduzierten Expression von DMP1 in Osteozyten – auf (70), (71), (72). Auch der Osteoblastogenese-Inhibitor SOST könnte in die Osteoklastogenese eingreifen. Die Stimulation von primären humanen Präosteozyten und MLO-Y4-Zellen mit SOST führt zu einer vermehrten Expression von RankL und einer verminderten Expression von OPG. Dies resultiert in einer Erhöhung des RankL/OPG-Verhältnisses, die mit einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität einhergeht (73). SOST könnte also neben der parakrinen Inhibition der Osteoblastogenese möglicherweise auch autokrin die Osteozyten-vermittelte Osteoklastogenese stimulieren.

#### 1.2.2.2. Mechanorezeption

Osteozyten gelten als die wichtigsten Mechanosensoren des Knochens. Sie nehmen mechanische Stimuli wahr, generieren daraufhin intrazelluläre biochemische Signale, leiten diese Signale interzellulär über „Gap Junctions“ weiter und modifizieren schließlich die osteoblastische Knochenbildung und die osteoklastische Knochenresorption, um die Struktur des Knochens an die mechanischen Ansprüche anzupassen (14). Tatsumi et al. zerstörten gezielt einen Großteil der Osteozyten im Mausmodell und stellten daraufhin neben einem osteoporotischen Phänotyp auch eine gestörte Mechanorezeption in diesen Mäusen fest. Dieser Befund unterstreicht die hohe Relevanz von Osteozyten für die Mechanorezeption im Knochen (74). Osteozyten nehmen mechanische Belastung unter anderem durch die in Folge von mechanischen Belastungen veränderte Dynamik der sie umgebenden Flüssigkeit im lakunokanalikulären System mit damit einhergehenden Scherkräften (Fluid Flow Shear Stress) wahr. Jedoch sind bislang viele Details der physiologischen Prozesse noch ungeklärt (14), (75).

Beispielsweise ist nicht abschließend geklärt, welches subzelluläre Kompartiment den größten Beitrag zur osteozytären Mechanosensation leistet (14). Es gibt Hinweise, dass die dendritischen Fortsätze der Osteozyten sensitiver für die Rezeption von



mechanischen Reizen sind als die Zellkörper (76). Zudem wird den Zilien möglicherweise eine Bedeutung in der Mechanorezeption zugeschrieben. Zilien sind mit Antennen vergleichbare Zellfortsätze, die in die Extrazellulärmatrix ragen (77). Die mechanosensorischen Komplexe in Zilien von Epithelzellen der Niere enthalten das Transmembranprotein Polycystin 1 (PC1). Knochenzellen besitzen ebenfalls Zilien-ähnliche Strukturen und Polycystin 1 – das Genprodukt von Polycystic kidney disease 1 (PKD1) – wird auch in Osteoblasten und Osteozyten exprimiert (78). Xiao et al. postulieren, dass das Genprodukt von PKD1 essenziell für eine physiologische Antwort von Osteoblasten und Osteozyten auf mechanische Belastung ist (79).

Zudem könnten Adhäsionsmoleküle bei der Registrierung von Fluid Flow Shear Stress eine entscheidende Rolle spielen. Adhäsionsmoleküle befestigen zum einen die osteozytären Zellkörper und Dendriten an den Wänden des lakunokanalikulären Systems und können zum anderen potenziell mit dem Zytoskelett der Osteozyten interagieren (Abb. 6). Die Lokalisation der Adhäsionsmoleküle prädestiniert sie als mögliche Sensoren des Fluid Flow Shear Stress und ihr Kontakt zu Filamenten des Zytoskeletts könnte als histologisches Korrelat der intrazellulären Mechanotransduktion aufgefasst werden. Osteozyten exprimieren die Adhäsionsmoleküle CD44, Fimbrin sowie verschiedene Integrine (14). Das Transmembranprotein CD44 wird ubiquitär im Organismus exprimiert. Im Knochen hat CD44 eine hohe Expressionsrate in Osteozyten und eine mäßige Expressionsrate in Osteoklasten und Zellen des Periosts, während es in Osteoblasten und Bone Lining Cells nicht oder nur gering exprimiert wird (80). Immobilität erhöht die Expression von CD44 in Osteoklasten in vivo (81).

Nach Registrierung eines mechanischen Reizes finden diverse intrazelluläre Prozesse statt, die bisher nur unzureichend bekannt sind. Fluid Flow Shear Stress induziert in Osteozyten die Öffnung von Hemikanälen und Gap Junctions, durch die die Osteozyten untereinander in Verbindung stehen und interzellulär Signale übertragen können (14), (82). Gap Junctions bestehen aus hexameren Connexonen, die wiederum aus jeweils sechs Connexinen aufgebaut sind (83). Der Hauptbestandteil von Gap Junctions in Osteozyten ist Connexin 43 (Gap junction alpha-1 protein, GJA1). Auch in Osteozyten der Zelllinie MLO-Y4 ist GJA1 hoch exprimiert. Fluid Flow Shear Stress erhöht in Osteozyten in vitro die Expression von GJA1 auf mRNA- und Proteinebene

und induziert die Translokation von GJA1 an die Zelloberfläche (84), (85), (86), (87). In vivo konnte ebenfalls eine Beteiligung von GJA1 in der Mechanorezeption von Knochenzellen nachgewiesen werden (14), (88), (89).

Um die Knochenarchitektur an mechanische Ansprüche anpassen zu können, führt die Applikation von mechanischer Belastung auf Osteozyten zu Veränderungen in der Expression von zahlreichen osteozytären Genen, die zum Teil maßgeblich in die Knochenhomöostase eingreifen. Beispielsweise ist die Expression von E11 in Osteozyten nach mechanischer Belastung sowohl in vitro als auch in vivo erhöht. Zhao et al. schlussfolgern daraus, dass Osteozyten auf mechanische Belastung mit der Verlängerung ihrer Dendriten reagieren. Die maximale Expression von E11 wird jedoch nicht an den Orten der maximalen mechanischen Belastung beobachtet, sondern in Regionen, wo potenziell Knochenumbau stattfinden kann (24). Mechanische Belastung hat in Osteozyten eine Reduktion der Expression von SOST und DKK1 sowie ein erniedrigtes RankL/OPG-Verhältnis zur Folge – mit resultierender Steigerung der Osteoblastogenese bei gleichzeitiger Inhibition der Osteoklastogenese (90), (91). Darüber hinaus stimuliert mechanische Belastung die Expression von DMP1 und MEPE in Osteozyten (92), (93), (94). Immobilität führt hingegen zu einer Hochregulierung von SOST und RankL (60), (95).

### 1.2.2.3. Regulierung des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts

Osteozyten regulieren nicht nur die in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft lokalisierten Osteoblasten und Osteoklasten, sondern beeinflussen – auf endokrine Weise – auch weit entfernte Zellen in anderen Organen und greifen dadurch in den Vitamin-D-Stoffwechsel und Phosphat-Haushalt ein. Aufgrund der Einbettung der Osteozyten in der rigiden Knochenmatrix erscheint die Sekretion von Hormon-ähnlichen Substanzen aus Osteozyten in den Blutkreislauf zunächst unwahrscheinlich. Jedoch sind Osteozyten von der lakunokanalikulären Flüssigkeit umgeben, die von Osteozyten sezernierte Substanzen aufnehmen und diese wiederum in den Blutkreislauf überführen kann. Intravenös injizierte Substanzen bis zu einer Größe von 40 kDa erreichen innerhalb weniger Minuten das lakunokanalikuläre System im

Mausmodell – getrieben allein durch den Blutdruck. Die Verbindung zwischen dem Blutkreislauf und dem lakunokanalikulären System ermöglicht den Osteozyten die Kommunikation mit weit entfernten Zellen und qualifiziert sie damit als endokrine Zellen (14), (96).

Osteozyten sind die Hauptquelle des im Blutstrom zirkulierenden Fibroblast growth factor 23 (FGF23) (97). FGF23 vermittelt seine Wirkung durch Bindung an einen FGF-Rezeptor in Verbindung mit dem Korezeptor Klotho (98) und erreicht Zielzellen in diversen Organen:

- Niere:

Die Niere ist das wichtigste Zielorgan von FGF23. Zum einen senkt FGF23 die tubuläre Rückresorption des glomerulär filtrierten Phosphats und führt daher zu einer gesteigerten renalen Phosphat-Ausscheidung mit dem Resultat einer verminderten Phosphat-Konzentration im Serum (99), (100), (101), (102). Zum anderen hemmt FGF23 das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase, das in der Niere den letzten Schritt der Vitamin-D-Synthese – die Umwandlung der inaktiven Vorstufe Calcidiol (25-Hydroxycholecalciferol) in den aktiven Metaboliten Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) – katalysiert. Die Enzymhemmung resultiert in einer Reduktion der Calcitriol-Konzentration im Serum (100), (103), (104). Die FGF23-Calcitriol-Achse ist bidirektional, da Calcitriol im Sinne eines Feedback-Mechanismus wiederum die Expression von FGF23 im Knochen induziert (105). Eine erniedrigte Serumkonzentration von Calcitriol hat zahlreiche Auswirkungen auf den gesamten Organismus und führt unter anderem zu einer verminderten enteralen Phosphat-Resorption (106).

- Nebenschilddrüsen:

Ein weiteres Zielorgan von FGF23 sind die Nebenschilddrüsen. FGF23 inhibiert in Nebenschilddrüsenzellen die Expression und Sekretion von Parathormon (PTH), das wiederum im Sinne eines Feedback-Mechanismus die FGF23-Expression in Osteozyten erhöht (107), (108), (109), (110), (111).

- Knochen:

Obwohl Knochenzellen kein primäres Ziel von FGF23 sind, hat FGF23 indirekt durch Modifikation des Vitamin-D-Haushalts und der PTH-Sekretion und den damit einhergehenden Veränderungen im Calcium-Phosphat-Haushalt

gravierende Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus. FGF23-Knockout-Mäuse weisen einen abnormen ossären Phänotyp auf (100). Darüber hinaus sind zahlreiche Erkrankungen des Knochenstoffwechsels – wie beispielsweise die tumorinduzierte Osteomalazie, die fibröse Dysplasie sowie hereditäre hypophosphatämische Rachitiden – mit Veränderungen in der Expression von FGF23 assoziiert (112).

- **Kardiovaskuläres System:**

Auch ein FGF23-vermittelter Effekt auf das Herz-Kreislauf-System wird diskutiert. Erhöhte FGF23-Konzentrationen im Serum könnten die arterielle Gefäßsteifigkeit erhöhen sowie zur Pathogenese der linksventrikulären Hypertrophie beitragen und somit das kardiovaskuläre Risiko steigern (113), (114).

Die Expression von FGF23 in Osteozyten wird durch die Faktoren DMP1, PHEX und MEPE reguliert (Abb. 6). DMP1 ist ein Mitglied der Familie der Small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins (SIBLING) (115). Es wird hauptsächlich in Osteozyten exprimiert (116) und fungiert als Inhibitor der osteozytären Expression von FGF23 (117). In DMP1-Knockout-Mäusen ist die Expression von FGF23 in Osteozyten sowie die FGF23-Konzentration im Serum erhöht – mit der Folge einer erniedrigten Serumkonzentration von Phosphat. Damit einhergehend sind die Knochen in DMP1-Knockout-Mäusen hypomineralisiert, während die Überexpression von DMP1 im Mausmodell einen erhöhten Mineralgehalt des Knochens zur Folge hat (118), (119), (120), (121). Menschen mit einer Loss-of-function-Mutation im DMP1-Gen leiden an autosomal-rezessiver hypophosphatämischer Rachitis (118), (122). Möglicherweise trägt DMP1 auch direkt zur Mineralisierung der Knochenmatrix bei (123), (124). Zudem spielt DMP1 eine Rolle in der Differenzierung von Osteozyten (25) und scheint eine protektive Funktion für ausgereifte Osteozyten zu haben, da es die Apoptoserate von Osteozyten reduziert (125), (126).

Ein weiterer Regulator der osteozytären FGF23-Expression ist PHEX. PHEX wird hauptsächlich im Knochen exprimiert, wobei die Expression in Osteozyten höher als in Osteoblasten ist (127), (128), (129). PHEX ist eine Endopeptidase und hemmt die Expression von FGF23 in Osteozyten vermutlich durch den selben Signalweg wie DMP1 (117), (130), (131). PHEX-defiziente Mäuse ähneln bezüglich ihres Phänotyps und ihrer reduzierten Serumkonzentration von Phosphat und Calcitriol den DMP1-

Knockout-Mäusen (132). Bei Menschen führt eine Loss-of-function-Mutation im PHEX-Gen zu einer X-chromosomal-dominant vererbten Form der Rachitis, bei der erhöhte Serumkonzentrationen von FGF23 auftreten (130), (133).

PHEX wird durch das ebenfalls in Osteozyten exprimierte SIBLING-Protein MEPE beeinflusst, das dadurch indirekt zur FGF23-Regulation beiträgt (33), (115), (134). Kathepsin B spaltet von MEPE das Peptid Acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif (ASARM) ab. Dieses Peptid bindet direkt an PHEX und hemmt seine enzymatische Aktivität mit dem Resultat einer erhöhten Expression von FGF23, die zu einer reduzierten renalen Rückresorption von Phosphat und damit zu einer verminderten Knochenmineralisierung führt (135), (136), (137), (138), (139). Die MEPE-PHEX-Achse verfügt über eine Rückkopplung, indem PHEX wiederum die proteolytische Freisetzung des ASARM-Peptids aus MEPE verhindert und ASARM auch direkt spaltet und dadurch inaktiviert (140), (141). Zudem zirkuliert MEPE in relevanten Mengen im Blut, was auf PHEX-unabhängige endokrine Funktionen von MEPE hindeutet (142).

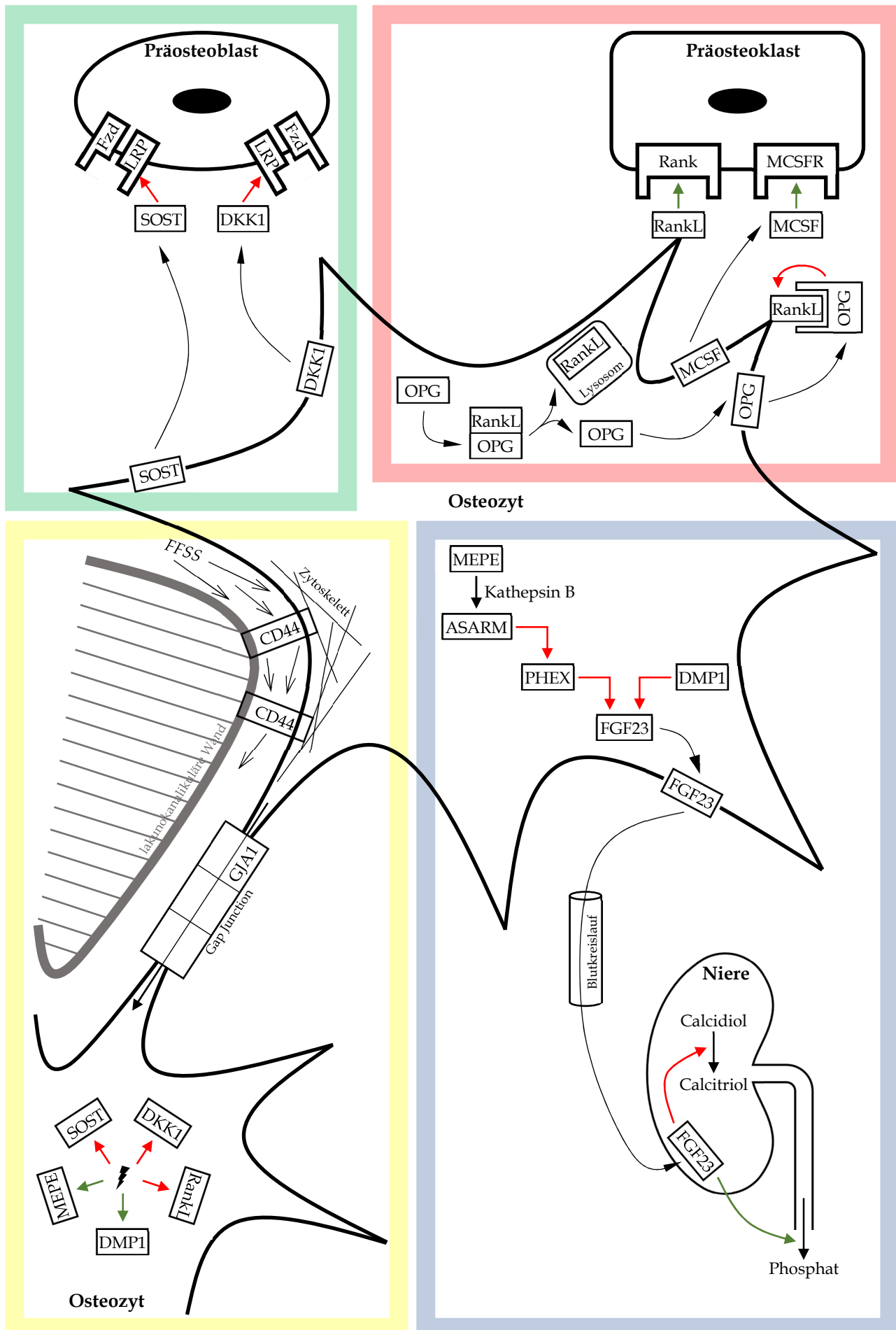


Abbildung 6: vereinfachte schematische Übersicht über die Funktionen von Osteozyten:

- Regulierung der Osteoblastogenese (grüne Umrandung): Osteozyten hemmen durch Freisetzung der LRP-Inhibitoren SOST und DKK1 die Osteoblastogenese.
- Regulierung der Osteoklastogenese (rote Umrandung): Osteozyten induzieren durch Expression von RankL und MCSF die Osteoklastogenese. Das ebenfalls von Osteozyten exprimierte OPG reguliert zum einen den intrazellulären Transport von RankL zu den Lysosomen und inhibiert zum anderen die Osteoklastogenese durch extrazelluläre Blockierung von RankL als Decoy-Rezeptor.
- Mechanorezeption (gelbe Umrandung): Osteozyten exprimieren das Oberflächenprotein CD44, das sowohl mit dem osteozytären Zytoskelett als auch mit der lakunokanalikulären Wand in Verbindung steht und möglicherweise für die Detektion von Fluid Flow Shear Stress von Bedeutung ist. Nach mechanischer Belastung öffnen sich interosteozytäre Gap Junctions, deren Hauptbestandteil GJA1 ist. Mechanische Belastung führt in Osteozyten zu Veränderungen der Genexpression: DMP1 und MEPE werden hochreguliert, während SOST, DKK1 und RankL vermindert exprimiert werden.
- Regulierung des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts (blaue Umrandung): Das von Osteozyten sezernierte FGF23 gelangt in den Blutkreislauf und beeinflusst endokrin zahlreiche Organe. Das wichtigste Zielorgan ist die Niere, wo FGF23 einerseits die Vitamin-D-Synthese hemmt und andererseits die renale Phosphat-Ausscheidung erhöht. Die osteozytäre FGF23-Expression wird durch MEPE, PHEX und DMP1 reguliert. MEPE wird von Kathepsin B zu ASARM gespalten, das inhibitorisch auf PHEX wirkt. PHEX inhibiert wiederum – ebenso wie DMP1 – die Expression von FGF23.

Grüne Pfeile symbolisieren Stimulierung bzw. Aktivierung, rote Pfeile stellen Inhibierung bzw. Inaktivierung dar und das Blitz-Symbol steht für mechanische Belastung (ASARM: Acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif, DKK1: Dickkopf 1, DMP1: Dentin matrix protein 1, FFSS: Fluid Flow Shear Stress, FGF23: Fibroblast Growth Factor 23, Fzd: Frizzled, GJA1: Gap junction alpha-1 protein (Connexin 43), LRP: Low-density-lipoprotein-related proteins, MCSF: Macrophage colony-stimulating factor, MCSFR: Macrophage colony-stimulating factor receptor, MEPE: Matrix extracellular phosphoglycoprotein, OPG: Osteoprotegerin, PHEX: Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome, Rank: Receptor activator of NFκB, RankL: Receptor activator of NFκB ligand, SOST: Sklerostin).

## 1.3. Beeinflussung des Knochens durch das Nervensystem

### 1.3.1. Neuronale Innervation des Knochens

Der Knochen als stoffwechselaktives Organ wird nicht nur von einem Geflecht aus Blutgefäßen durchzogen, sondern auch von zahlreichen Nervenfasern innerviert. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass Nervenfasern das Periost, den mineralisierten Knochen, die Epiphysenfuge, das Knochenmark, die Synovialmembran, die vaskularisierten Anteile der Menisken sowie das hintere Kreuzband innervieren, wobei die Innervationsdichte im Periost und im epiphysären beziehungsweise metaphysären Knochen in der Umgebung der Epiphysenfuge am höchsten ist. Zur genaueren Charakterisierung der Nervenfasern wurden in Knochenpräparaten Neuropeptide des sensiblen und sympathischen Nervensystems immunhistochemisch angefärbt. Es zeigte sich unter anderem ein hoher Gehalt an den sensiblen Neuropeptiden Substanz P (SP) und alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP).  $\alpha$ CGRP-positive Nervenfasern sind insgesamt häufiger als SP-positive Nervenfasern, jedoch gibt es keine wesentlichen Unterschiede in der lokalen Verteilung. Daneben wurden auch sympathische Nervenfasern, die unter anderem die Neuropeptide Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) sowie Katecholamine wie Noradrenalin enthalten, im Knochen identifiziert. Ein Großteil der Nervenfasern ist perivaskulär lokalisiert und zieht zusammen mit den Blutgefäßen durch die Havers'schen und Volkmann'schen Kanäle (143), (144), (145), (146), (147), (148), (149), (150).

Die anatomische Nähe von Nervenfasern zum Knochen legt nahe, dass das sensible und sympathische Nervensystem Einfluss auf den Knochen und angrenzende Strukturen ausübt. Die aus den Nervenfasern freigesetzten Neuropeptide können in parakriner Weise auf die umliegenden Knochenzellen einwirken, da viele Knochenzellen die entsprechenden Rezeptoren für die ausgeschütteten Neuropeptide exprimieren (Kapitel 1.3.2.2 und 1.3.3.2). Zahlreiche experimentelle und klinische Beobachtungen unterstützen die These einer neuro-osteogenen Interaktion:



- a) Offley et al. behandelten Ratten mit Capsaicin zur selektiven Ausschaltung von unmyelinisierten sensiblen Nerven. Die chemische Denervierung hatte eine signifikante Reduktion der Knochenmasse und Knochenfestigkeit zur Folge. Die Autoren führten diese Effekte auf eine verminderte Ausschüttung von SP und  $\alpha$ CGRP aus sensiblen Nerven zurück und postulierten eine essenzielle Funktion des sensiblen Nervensystems für die Erhaltung der Knochenintegrität (151).
- b) Patienten mit Schlaganfall oder Rückenmarkstrauma entwickeln im Verlauf häufig eine Osteopenie oder Osteoporose und haben ein erhöhtes Frakturrisiko (152), (153). Dies ist nicht allein auf die Immobilität der Patienten zurückzuführen (153), (154). Stattdessen wird die Knochenresorption zeitnah nach einer Rückenmarksverletzung erhöht, während die Knochenneubildung unverändert bleibt. Die Steigerung der Knochenresorption hält für mehrere Jahre an und erklärt den nachhaltigen Verlust von Knochenmasse (155). Somit können zentralnervöse Störungen die Knochenhomöostase in ein Ungleichgewicht bringen, was auf eine neuronale Modulation des Knochenmetabolismus schließen lässt.
- c) Der während der Heilung von Frakturen entstehende Frakturkallus ist ebenfalls neural innerviert. Madsen et al. wiesen eine insuffiziente Frakturheilung in chirurgisch denervierten Ratten mit einem vergrößerten, aber instabileren Frakturkallus im Vergleich zu Ratten mit intaktem Nervensystem nach (156). In SP-defizienten Knockout-Mäusen ist nach einer Fraktur die Knochenbildung sowie die mechanische Stabilität des Knochens niedriger als in Wildtyp-Mäusen (157). Patienten mit Kopfverletzungen weisen eine gesteigerte osteogene Aktivität im Rahmen der Frakturheilung auf (158). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine intakte neuronale Innervation des Knochens essenziell für eine normale Frakturheilung ist.
- d) Auch in der Pathogenese der Arthrose und in der Schmerzwahrnehmung in arthrotischen Gelenken nehmen Nervenfasern und Neuropeptide eine tragende Rolle ein (159). Im Mausmodell beschleunigt die altersabhängige Reduktion der Gelenk-innervierenden Nervenfasern die Entwicklung von degenerativer

Gonarthrose (160). Gesunder Knorpel ist nicht nerval innerviert. Suri et al. fanden jedoch perivaskulär sensible und sympathische Nervenfasern im arthrotischen Knorpel. Dies führt zu der Hypothese, dass im Rahmen der Arthrose-Entstehung Nervenfasern – getrieben durch den Motor der Vaskularisierung und Angiogenese – zusammen mit Blutgefäßen vom subchondralen Knochen in den degradierten Knorpel einwandern (159), (161). Einige Studien zeigten auch im subchondralen Knochen von arthrotischen Gelenken und in Osteophyten Veränderungen im Verteilungsmuster und in der Innervationsdichte von sensiblen und sympathischen Nerven (159). Zudem ist die Konzentration der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Hüftdysplasie-assoziiierter Coxarthrose erhöht (162).

### 1.3.2. Einfluss von SP auf den Knochen

#### 1.3.2.1. Das sensible Neuropeptid SP und sein Rezeptor NK1R

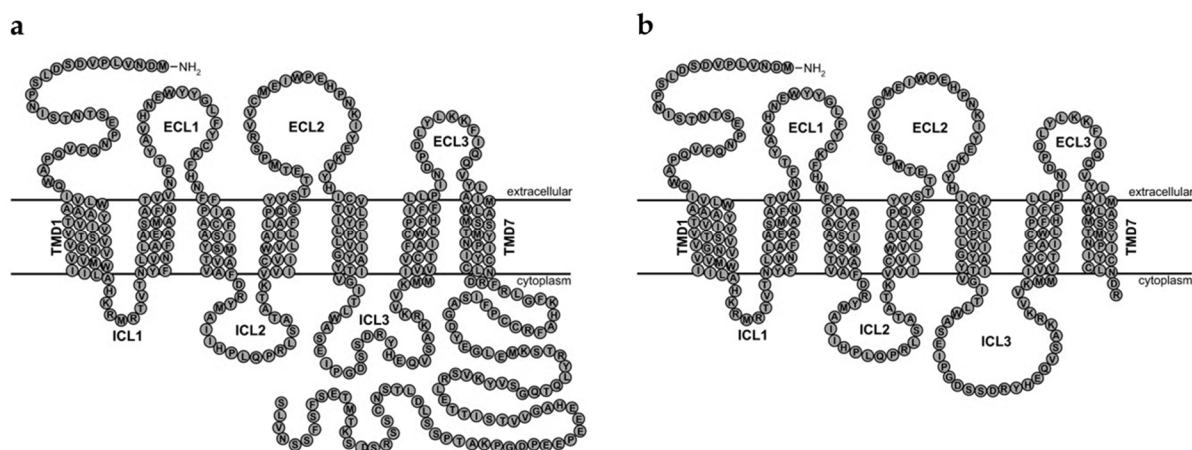
SP ist ein Neuropeptid des sensiblen Nervensystems und besteht aus elf Aminosäuren: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (163), (164). SP ist ein wichtiger Vertreter der Familie der Tachykinine (Tab. 2) und wird vom Tachykinin(Tac)-1-Gen (Prä-Protachykinin A, PPT-A) kodiert. Insgesamt sind bisher drei Gene bekannt, die für Tachykinine kodieren: Tac1 kodiert neben SP auch für Neurokinin A und seine alternativen Spleißprodukte Neuropeptid K und Neuropeptid  $\gamma$ , Tac3 (Prä-Protachykinin B, PPT-B) kodiert für Neurokinin B und Tac4 (Prä-Protachykinin C, PPT-C) kodiert für Hemokinin 1 und die Endokine A, B, C und D (164), (165), (166), (167), (168), (169), (170).

Tachykinine entfalten ihre Wirkung durch Bindung an Neurokinin-Rezeptoren (NKRs). Man unterscheidet die drei Subtypen NK1R, NK2R und NK3R, wobei die einzelnen Tachykinine jeweils unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den drei Subtypen aufweisen. SP sowie Hemokinin 1 und Endokine binden bevorzugt an NK1R, Neurokinin A, Neuropeptid K und Neuropeptid  $\gamma$  haben die höchste Bindungsaffinität zu NK2R und Neurokinin B hat die stärkste Präferenz für NK3R (Tab. 2) (164), (170), (171). Für die Untersuchung der biologischen Wirkung von SP ist daher die Betrachtung des NK1R vorrangig.

Gen	Tachykinin	Rezeptor
Tac1	Substanz P	NK1R
	Neurokinin A	NK2R
	Neuropeptid K	NK2R
	Neuropeptid $\gamma$	NK2R
Tac3	Neurokinin B	NK3R
Tac4	Hemokinin 1	NK1R
	Endokinin A	NK1R
	Endokinin B	NK1R
	Endokinin C	NK1R
	Endokinin D	NK1R

**Tabelle 2: Mitglieder der Tachykinin-Familie, aufgeteilt nach ihren kodierenden Genen, mit dem jeweiligen Rezeptor mit der höchsten Bindungsaffinität (164), (165), (166), (167), (168), (169), (170), (171).**

NK1R gehört zu den „7TM-Rezeptoren“, die über sieben Transmembrandomänen (TM) sowie über jeweils vier intra- und extrazelluläre Anteile verfügen. NK1R kann nach Aktivierung durch SP mit verschiedenen G-Proteinen interagieren, was zu einer Akkumulation von verschiedenen „second messengers“ und damit zu einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden führen kann. Zu diesen Mechanismen zählen beispielsweise die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Stimulation der Phosphoinositol-Umsetzung über die Phospholipase C, die Mobilisierung von Arachidonsäure über die Phospholipase A2 sowie die Akkumulation von cAMP über die Adenylatzyklase mit konsekutiver Aktivierung der Proteinkinase A (172). Durch alternatives Splicing existieren zwei Isoformen des NK1R – eine lange Variante (full-length NK1R) sowie eine kurze Variante (truncated NK1R), die am C-Terminus 96 Aminosäuren weniger besitzt (Abb. 7). Die beiden Isoformen können je nach Zellart unterschiedlich verteilt sein und scheinen bei Aktivierung durch SP unterschiedliche Wirkungen zu zeigen (173).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der beiden Isoformen full-length (a) und truncated (b) des NK1-Rezeptors (TMD: transmembrane domain, ECL: extracellular loop, ICL: intracellular loop) (modifiziert nach (170)).**

SP und NK1R werden in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und Organe sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert (174). Somit ist SP an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen beteiligt. Zu diesen gehören inflammatorische Prozesse, Vasodilatation, Extravasation, Angiogenese, Nozizeption, Kontraktion glatter Muskulatur, Regulation von Übelkeit und Erbrechen, psychische Vorgänge wie Stress- und Angstreaktionen sowie die Modulation des Knochenumbaus (175), (176), (177), (178), (179), (180).

### 1.3.2.2. Einfluss von SP auf Osteoblasten und Osteoklasten

Sowohl Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten als auch Osteoblasten- und Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren den NK1R und sind daher potenziell in der Lage, auf Exposition zu SP zu reagieren (181), (182), (183), (184), (185). Man geht davon aus, dass SP durch Modulation der Akteure des Knochenumbaus entscheidend zur Regulation des Knochenmetabolismus beiträgt, wobei die genaue Rolle von SP für den Knochenstoffwechsel noch nicht hinreichend geklärt ist.

Zahlreiche Studien weisen auf eine Stimulation von Osteoblasten durch SP hin und ordnen SP damit eine anabole Funktion im Knochenmetabolismus zu. Goto et al. zeigten, dass aus Schädelkalotten von Ratten isolierte Osteoblasten nach Behandlung mit SP signifikant mehr extrazelluläre Knochenmatrix synthetisieren. Zudem erhöht SP die Genexpression von OCN, Runx2 und Kollagen Typ I (183). Kingery et al. behandelten Ratten mit einem NK1R-Antagonisten und wiesen daraufhin eine signifikante Verminderung der Substantia spongiosa nach (186). In vitro induziert SP dosisbezogen die Osteogenese (187) und fördert die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen (Bone Marrow Stem Cells, BMSCs) über den Wnt-Signalweg (188), (189) sowie die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch Hochregulation von OSX (190). Ebenso konnte eine erhöhte ALP-Aktivität und eine gesteigerte Knochenmineralisierung nach Stimulation von Osteoblasten-Vorläufern mit SP festgestellt werden (185). Zudem erhöht SP die Aktivität von Osteoblasten, indem die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions verbessert wird (191).

Jedoch widersprechen Erkenntnisse von Azuma et al. und Adamus et al. der Theorie einer Osteoblasten-stimulierenden Wirkung von SP. Sie fanden heraus, dass SP in vitro die Knochenbildung inhibiert, die Aktivität von ALP reduziert und die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen unterdrückt (192), (193). Außerdem hemmt SP die Differenzierung von Osteoblasten nach Rückenmarkstraumata und fördert über eine Verschiebung der RankL/OPG-Achse in Osteoblasten die Knochenresorption (184). Somit ist angesichts der inkonsistenten Studienlage mit teils widersprüchlichen Ergebnissen bislang nicht abschließend geklärt, ob SP einen stimulierenden oder inhibitorischen Effekt auf Osteoblasten ausübt.

Ein klareres Bild ergibt sich hingegen bei der Untersuchung der Wirkung von SP auf Osteoklasten. SP aktiviert die Knochenresorption und induziert die Osteoklastogenese in Osteoklasten-Vorläuferzellen (Bone Marrow Macrophages, BMMs) durch Aktivierung von NF $\kappa$ B – einem für die Differenzierung von Osteoklasten essenziellen Transkriptionsfaktor (185), (194), (195), (196). Mori et al. stellten fest, dass SP in vitro die intrazelluläre Calcium-Konzentration in Osteoklasten erhöht. Diesen Effekt ruft auch RankL nach Bindung an seinen Rezeptor hervor, was zu einer Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern und somit zu einer Stimulierung der Osteoklastogenese führt (176), (197), (198). Zudem fördert SP die Expression von RankL und hemmt die Expression von OPG in Synovialfibroblasten, die dadurch die Osteoklastogenese anregen (199). Zusammenfassend kann also eine Osteoklasten-stimulierende Wirkung von SP angenommen werden.

Aufgrund der Inkonsistenz der bisher vorliegenden Befunde kann dem sensiblen Neuropeptid SP nicht eindeutig eine anabole oder katabole Funktion im Knochenstoffwechsel zugeschrieben werden. Dennoch ist eine Involvierung von SP im Knochenmetabolismus offensichtlich und es bleibt Aufgabe zukünftiger Studien, die genaue Funktion von SP offenzulegen. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Wirkungen von SP auf die Zielzellen auf unterschiedliche SP-Konzentrationen zurückzuführen. SP könnte in Abhängigkeit seiner Konzentration die Knochenhomöostase in die katabole oder in die anabole Richtung verschieben (176). Diese Arbeit untersucht die Beteiligung von Osteozyten in der SP-vermittelten Regulierung des Knochenumbaus. Obwohl den Osteozyten eine bedeutende Rolle in der Modulation von Osteoblastogenese und Osteoklastogenese zugeschrieben wird und bereits nachgewiesen wurde, dass sie über den SP-Rezeptor NK1R verfügen, wurden bislang keine Studien publiziert, die den Einfluss von SP auf Osteozyten analysieren.

### 1.3.3. Einfluss von $\alpha$ CGRP auf den Knochen

#### 1.3.3.1. Das sensible Neuropeptid $\alpha$ CGRP und sein Rezeptor CGRPR

Das sensible Neuropeptid  $\alpha$ CGRP besteht aus 37 Aminosäuren und wird vom Gen CALCA kodiert. Durch gewebsspezifisches alternatives Spleißen entsteht aus der vom CALCA-Gen transkribierten hnRNA in den C-Zellen der Schilddrüse das Hormon Calcitonin und in Nervenzellen das Neuropeptid  $\alpha$ CGRP (200), (201), (202). Calcitonin und  $\alpha$ CGRP bilden aufgrund struktureller Ähnlichkeit eine Familie mit den Peptiden Adrenomedullin (AM), Amylin (AMY), Adrenomedullin 2 / Intermedin (AM2/IMD), Calcitonin receptor-stimulating peptide (CRSP) und  $\beta$ CGRP – einem Peptid, das sich von  $\alpha$ CGRP in drei Aminosäuren unterscheidet, aber von einem separaten Gen (CALCB) kodiert wird (203), (204), (205).

$\alpha$ CGRP bindet an ein Rezeptordimer, das aus dem Calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) und dem Receptor-activity-modifying protein 1 (Ramp1) besteht. CRLR ist ein 7TM-Rezeptor und ist auf die Interaktion mit Proteinen der Ramp-Familie (Ramp1, Ramp2 und Ramp3) angewiesen, um eine Bindung mit seinen Liganden eingehen zu können. Die Ramps bestehen aus einer einzelnen Transmembrandomäne und transportieren CRLR aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche. Zudem regulieren sie die Glykosylierung von CRLR und stellen damit die Liganden-Spezifität des Rezeptordimers her:  $\alpha$ CGRP hat eine hohe Affinität zu CRLR in Kombination mit Ramp1, während es an CRLR/Ramp2 sowie CRLR/Ramp3 fast gar nicht binden kann. Ramp2 und Ramp3 hingegen befähigen CRLR zur Interaktion mit Adrenomedullin (206), (207), (208). Der Calcitonin-Rezeptor (CTR) weist einige strukturelle Homologien zu CRLR auf, wobei die Bindung von Calcitonin an CTR keine Beteiligung von Ramps erfordert. Dennoch kann auch CTR mit den Ramps interagieren und so Rezeptoren bilden, die eine hohe Affinität zu Amylin sowie variable Affinitäten zu  $\alpha$ CGRP haben.  $\alpha$ CGRP bindet nur geringfügig an CTR/Ramp2 und CTR/Ramp3, hat jedoch eine mit Amylin vergleichbare Affinität zu CTR/Ramp1. Insgesamt scheint aber die Bedeutung von CRLR/Ramp1 als CGRP-Rezeptor größer zu sein als die von CTR/Ramp1 (209), (210). Eine Übersicht über die Rezeptoren, die

durch Kombination von CRLR beziehungsweise CTR mit den verschiedenen Ramps entstehen, sowie deren bevorzugten Liganden ist in Abb. 8 dargestellt.

Die Bindung von  $\alpha$ CGRP an seinen Rezeptor setzt verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Hauptsächlich vermittelt  $\alpha$ CGRP seine Wirkung durch Interaktion des CRLR-Ramp1-Komplexes mit  $G_s$ -Proteinen, was in einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration resultiert. Wie die meisten G-Proteingekoppelten Rezeptoren kann auch CRLR/Ramp1 darüber hinaus noch weitere Proteine – beispielsweise  $G_q$ -Proteine und Mitogen-activated protein kinase (MAPK) – aktivieren und so multiple Signalwege auslösen (211).

$\alpha$ CGRP kommt – häufig in Koexistenz mit SP – hauptsächlich im ZNS und in sensiblen C- und A $\delta$ -Fasern, die perivaskulär bis in die Körperperipherie ziehen, vor. Daneben wurde die Expression von  $\alpha$ CGRP auch in verschiedenen nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen (213), (214).  $\alpha$ CGRP-Rezeptoren sind ubiquitär verbreitet (215) und die Funktionen von  $\alpha$ CGRP sind dementsprechend vielfältig.  $\alpha$ CGRP ist einer der potentesten bisher bekannten Vasodilatoren (216). Darüber hinaus hat  $\alpha$ CGRP Einfluss auf das kardiovaskuläre System und ist an der Nozizeption, der Wundheilung, der Entstehung von Übergewicht sowie am Knochenstoffwechsel beteiligt.  $\alpha$ CGRP spielt zudem eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Migräne (213), (217).



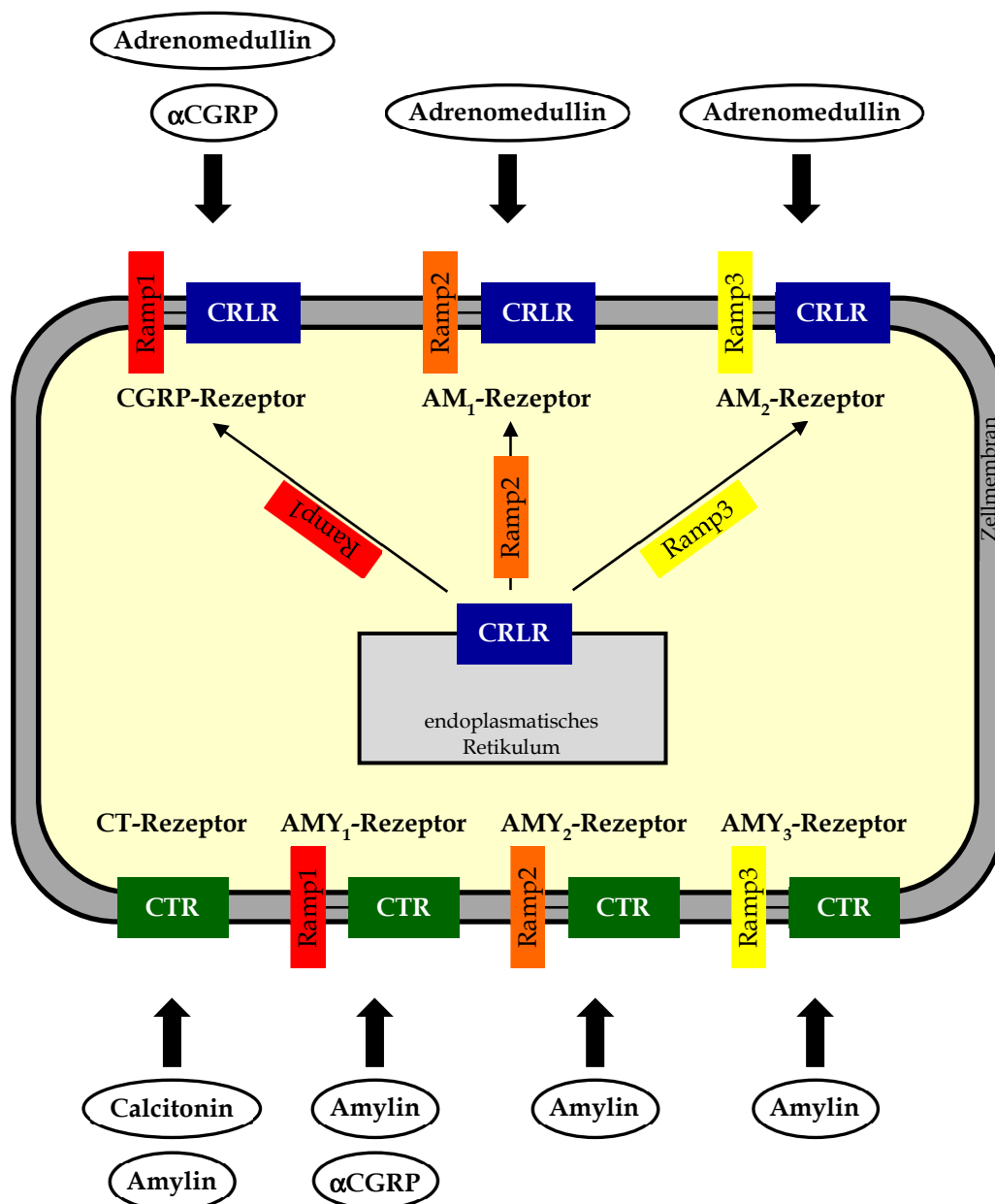


Abbildung 8: Mögliche Kombinationen von CRLR bzw. CTR und den Mitgliedern der Ramp-Familie zur Ausbildung von unterschiedlichen Rezeptoren mit den jeweils zugehörigen Liganden mit der höchsten Bindungsaffinität (203), (208), (212).

### 1.3.3.2. Einfluss von $\alpha$ CGRP auf Osteoblasten und Osteoklasten

Die Expression der beiden für die vollständige Funktionsweise des  $\alpha$ CGRP-Rezeptors essenziellen Rezeptorkomponenten CRLR und Ramp1 wurde in Osteoblasten und Osteoklasten sowie in Osteoblasten- und Osteoklasten-Vorläuferzellen nachgewiesen (218), (219), (220). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass  $\alpha$ CGRP eine anabole Wirkung auf den Knochenumsatz hat.  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse weisen eine

Osteopenie auf, die durch verminderte Knochenbildung hervorgerufen wird (221). Ratten entwickeln nach Ovariectomie eine Osteoporose, jedoch mildert eine Behandlung von ovariectomierten Ratten mit  $\alpha$ CGRP den osteoporotischen Phänotyp ab (222). Transgene Mäuse, die in Osteoblasten  $\alpha$ CGRP unter dem Promotor Osteocalcin exprimieren, weisen eine gesteigerte Knochenbildung und eine erhöhte Knochenmasse auf (223).

In vitro zeigte sich ein direkter Einfluss von  $\alpha$ CGRP sowohl auf Osteoblasten als auch auf Osteoklasten.  $\alpha$ CGRP fördert die Proliferation und inhibiert die Apoptose von Osteoblasten-Vorläuferzellen, stimuliert die osteogene Differenzierung von präosteoblastischen Zellen, induziert die Genexpression von ALP, Kollagen Typ I, Bmp2, Osteonectin und Runx2 in mesenchymalen Stammzellen, erhöht die ALP-Aktivität in BMSCs und steigert die Knochenmineralisierung (220), (224), (225). Zudem führt die Stimulation von Osteoblasten-Vorläuferzellen mit  $\alpha$ CGRP zu einer verminderten Expression von RankL, während die Expression von OPG erhöht wird. Somit inhibiert  $\alpha$ CGRP – vermittelt durch Osteoblasten – die Osteoklastogenese (226), (227).  $\alpha$ CGRP inhibiert darüber hinaus die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen, reduziert die Genexpression von TRAP und Kathepsin K in BMMs, hemmt die durch RankL vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in BMMs und vermindert die osteoklastische Knochenresorption (220), (228), (229).

Zusammenfassend spricht die Studienlage für eine Osteoblasten-fördernde und eine Osteoklasten-hemmende Wirkung von  $\alpha$ CGRP und somit insgesamt für einen anabolen, protektiven Effekt im Knochenstoffwechsel. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob auch Osteozyten den  $\alpha$ CGRP-Rezeptor exprimieren. Falls die Rezeptorexpression nachgewiesen werden kann, wird weiterhin analysiert, inwiefern die osteozytäre Regulation des Knochenmetabolismus durch  $\alpha$ CGRP moduliert wird.

## 2. Gegenstand der Arbeit

Das vorliegende Projekt wurde im Rahmen der Forschungsgruppe „Exploring Articular Cartilage and Subchondral Bone Degeneration and Regeneration in Osteoarthritis (ExCarBon)“, die von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) gefördert wird (FOR2407), durchgeführt. ExCarBon ist ein Konsortium aus sieben deutschen Forschungsprojekten, das sich mit der Exploration von pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung sowie der Regeneration von Knorpel- und Knochenschäden in arthrotischen Gelenken mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapieansätze für die Arthrose beschäftigen. Prof. Dr. Susanne Grässel ist die Sprecherin der Forschungsgruppe ExCarBon und die Abteilung für experimentelle Orthopädie der Universität Regensburg bildet mit dem Subprojekt 4 (SP4) eine tragende Säule des Konsortiums. SP4 untersucht den Einfluss von sensiblen Neuropeptiden auf strukturelle Veränderungen in Knorpel und Knochen während der Osteoarthroseprogression.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll der Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf murine Osteozyten in Hinblick auf die Genregulation des Knochenumbaus (Bone Remodeling) und die Genexpression von Mediatoren der Mechanorezeption und der Modulierung des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts sowohl in vitro – mittels der murinen Osteozyten-ähnlichen Zelllinie MLO-Y4 – als auch in vivo – mittels SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen – untersucht werden. Dabei werden die folgenden Fragen bearbeitet:

### 1. Sind Osteozyten mit Rezeptoren für SP und $\alpha$ CGRP ausgestattet?

Der Nachweis der Präsenz der Rezeptoren NK1R, CRLR und Ramp1 in Osteozyten ist die Voraussetzung dafür, dass die Zellen auf entsprechende Stimuli reagieren können, und stellt daher die Basis des vorliegenden Projekts dar. Der SP-Rezeptor NK1R wurde bereits in Osteozyten identifiziert (181), (182), während für die  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponenten CRLR und Ramp1 bisher keine entsprechenden Befunde veröffentlicht wurden.

Zunächst wird RNA aus Zellen der Osteozyten-ähnlichen Zelllinie MLO-Y4 isoliert und dann mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) hinsichtlich der Genexpression für NK1R, CRLR und Ramp1 untersucht. Für den Nachweis der Rezeptoren auf Proteinebene werden Western Blots mit Zelllysaten aus MLO-Y4-Osteozyten sowie Immunfluoreszenzfärbungen von MLO-Y4-Osteozyten mit spezifischen Antikörpern für die zu untersuchenden Rezeptoren durchgeführt.

## **2. Haben SP und $\alpha$ CGRP in vitro Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoserate von Osteozyten? Haben SP und $\alpha$ CGRP in vitro Einfluss auf die Genexpression von Markern für die Osteozytenmorphologie, das Knochenremodeling, den Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsel sowie die Mechanorezeption von Osteozyten?**

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob und inwiefern die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP die Genexpression entsprechender Markergene beeinflussen. Zudem sollen Auswirkungen von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Proliferations- und Apoptoserate von Osteozyten-ähnlichen MLO-Y4-Zellen in vitro analysiert werden.

Hierfür werden MLO-Y4-Osteozyten mit SP,  $\alpha$ CGRP, GR73632 (spezifischer NK1R-Agonist), CGRP<sub>8-37</sub> (CGRP-Antagonist) sowie L733,060 (NK1R-Antagonist) stimuliert. Für die Analyse der Auswirkungen der Stimulationen auf die Proliferations- beziehungsweise Apoptoserate der Zellen werden BrdU-Assays beziehungsweise Caspase-3/7-Assays durchgeführt. Darüber hinaus wird mittels qPCR untersucht, ob MLO-Y4-Zellen SP und  $\alpha$ CGRP auf mRNA-Ebene exprimieren und ob sich die Expression der Neuropeptide sowie der Neuropeptidrezeptoren nach Stimulation verändert. Schließlich wird die Genexpression von Mediatoren, die an der Regulation der Osteozytenmorphologie (Dendritenausbildung), Osteoblastogenese und Osteoklastogenese sowie am Vitamin-D- und Phosphat-Stoffwechsel und an der Mechanorezeption beteiligt sind (Tab. 3), analysiert und Unterschiede nach Neuropeptid-Stimulation herausgestellt. Gene, die nach Stimulation deutlich reguliert werden, werden anschließend auf Proteinebene mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht.

### 3. Führt die Abwesenheit von SP und $\alpha$ CGRP in vivo zu Veränderungen der Genexpression in murinen Röhrenknochen?

Um den Einfluss der Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf Osteozyten auch in vivo untersuchen zu können, sollen Knockout-Mäuse, denen entweder SP (Tac1-/-) oder  $\alpha$ CGRP ( $\alpha$ CGRP-/-) fehlt, mit Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Knockout-Mäuse mit zunehmendem Alter eine starke Sklerosierung des subchondralen Knochens, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, aufweisen (230). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, die aus Knockout-Mäusen isoliert wurden, verändert ist (231). Die Veränderungen in der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten sind jedoch nicht ausreichend groß, um die Knochenbefunde hinreichend zu erklären. So ist es naheliegend, dass auch Osteozyten zum sklerotischen Knochenphänotyp in Knockout-Mäusen beitragen könnten.

Im Rahmen dieses Projekts soll zunächst ein Protokoll für die Isolierung von RNA aus murinen Röhrenknochen etabliert werden, um anschließend die Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen und Tac1- beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen mittels qPCR vergleichen zu können. Dabei wird die Expression von osteozytären Mediatoren, die für die Osteozytenmorphologie (Dendritenausbildung), Regulation der Osteoblastogenese und Osteoklastogenese, Modulation des Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsels und Mechanorezeption relevant sind (Tab. 3), sowie der Rezeptoren NK1R, CRLR und Ramp1 analysiert.

<b>Regulation der Osteozytenmorphologie</b>	Podoplanin (E11)
<b>Regulation der Osteoblastogenese</b>	Sklerostin (SOST)
	Dickkopf 1 (DKK1)
<b>Regulation der Osteoklastogenese</b>	Receptor activator of NFκB ligand (RankL)
	Osteoprotegerin (OPG)
	Macrophage colony-stimulating factor (MCSF)
<b>Mechanorezeption</b>	CD44
	Connexin 43 (GJA1)
	Polycystic kidney disease 1 (PKD1)
<b>Regulation des Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsels</b>	Dentin matrix protein 1 (DMP1)
	Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (PHEX)
	Fibroblast growth factor 23 (FGF23)

**Tabelle 3: Faktoren zur Regulation von Osteozytenmorphologie, Knochenstoffwechsel, Mechanorezeption und Vitamin-D-Phosphat-Haushalt. Im Rahmen dieses Projekts soll die Expression dieser Mediatoren hinsichtlich Beeinflussbarkeit durch die sensiblen Neuropeptide SP und αCGRP untersucht werden.**

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Materialien für Zellkultur (Zelllinie, Zellkulturmedien, Zusätze und Stimulanzen)	
rekombinantes alpha Calcitonin gene-related Peptide (mouse, rat) ( $\alpha$ CGRP) (#H-2265)	Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz
alpha Minimum Essential Medium Eagle (#M8042)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovine Calf Serum (BCS) (#12133C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CGRP <sub>8-37</sub> (#1169)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Collagen I, rat tail (#A1048301)	gibco®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) (#12103C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GlutaMAX™ (#35050061)	gibco®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
GR73632 (#1669)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
L733,060 (#1145)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Murine Osteocyte-like Cell Line MLO-Y4 (#EKC002)	Kerafast Inc., Boston, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S) (#P4333)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
rekombinantes Substanz P (SP) (#S6883)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (#T4049)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puffer und Puffer-Zusätze	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (#D8537)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Buffer	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sonstige Chemikalien	
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (#D1306)	Invitrogen®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Bovine Serum Albumine (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, CA, USA
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (Desinfektion)	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Methanol	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
RNAlater™ Stabilisierungslösung	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol™ Reagenz	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Kits</b>	
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (#600559)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Apo-ONE® Homogenous Caspase-3/7 Assay (#G7792)	Promega, WI, USA
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (#600882)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) (#11647229001)	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2 (#DY008)	Research and Diagnostic Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Mouse FGF-23 DuoSet® ELISA (#DY2629-05)	Research and Diagnostic Systems, Minneapolis, Minnesota, USA



Pierce® BCA Protein Assay Kit (#23225)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce® ECL Western Blotting Substrate (#32134)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce® SuperSignal West Femto (#34095)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNA 6000 Nano Kit (#5067-1511)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
RNase-Free DNase Set (#79254)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit (#74106)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Antikörper</b>	
Anti-beta Actin antibody (#ab8227)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Neurokinin 1 Receptor antibody (#ab183713)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-RAMP1 antibody (#ab156575)	Abcam, Cambridge, UK
CRLR/CGRPR1 Polyclonal Antibody (#bs-1860R)	Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, USA
F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-Rabbit IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (#A-11070)	Invitrogen®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (#711-036-152)	Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK
Rabbit IgG Isotype control polyclonal (#NBP1-97041)	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
Rabbit monoclonal Isotype control (#ab172730)	Abcam, Cambridge, UK
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Costar® 6 Well Cell Culture Cluster	Corning, Corning, NY, USA
Costar® 12 Well Cell Culture Cluster	Corning, Corning, NY, USA
Costar® 96 Well Cell Culture Cluster	Corning, Corning, NY, USA
Culture Slides 8 Chamber	Corning, Corning, NY, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon® 96 Well Black/Clear Cell Culture Plate	Corning, Corning, NY, USA
Filtropur S plus 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

FrameStar® 96 Well Non-Skirted PCR Plate	4titude, Wotton, UK
Ibidi Smart Slide	Ibidi, Gräfelfing, Deutschland
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
TC-Flasche T75 (75cm <sup>2</sup> -Zellkulturflasche)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Geräte</b>	
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
AriaMx Real-Time PCR System G8830A	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Cedex Cell Counter	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Chemilumineszenzgerät	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Eclipse TE2000-U (Fluoreszenzmikroskop)	Nikon, Tokio, Japan
Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Eppendorf mini Spin (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf ThermoMixer C (Heizblock)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberbach, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
GelDoc Imager	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Heraeus HeraCell (Brutschrank)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heraeus HeraSafe HS 15 (Sterilbank)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hettich Universal 320 (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Microplate Reader GENios F129004	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Sonopuls HD 2070 Ultraschallhomogenisator	Bandelin, Berlin, Deutschland
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
VWR Mini Vortexer	VWR International, Darmstadt, Deutschland
<b>Software</b>	
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San José, CA, USA
AriaMx HRM qPCR Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Bioanalyzer 2100 Expert Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Cedex XS	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz

GraphPad Prism 7	GraphPad, San Diego, CA, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>Tiermodell</b>	
Wildtyp-Mäuse (C57Bl/6J)	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
Tac1-Knockout-Mäuse	A. Zimmer, Universität Bonn, Deutschland (232)
$\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse	T. Schinke und M. Amling, Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, Deutschland (ursprünglich generiert von R. B. Emeson) (233)

Tabelle 4: verwendete Materialien mit Herstellerangaben

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

#### 3.2.1.1. Die Zelllinie MLO-Y4

Die durchgeführten in-vitro-Experimente basieren auf der Zelllinie MLO-Y4 (Murine Long Bone Osteocyte Y4), die im Labor von Prof. Linda Bonewald etabliert wurde. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Osteozyten-ähnliche Zellen, die aus Röhrenknochen von genetisch modifizierten Mäusen isoliert wurden. Den Mäusen wurde zuvor das aus dem Polyomavirus Simian Virus 40 (SV40) stammende Onkogen SV40 Large T-Antigen transfiziert, dessen Expressierung durch den Promotor Osteocalcin reguliert wird. Osteocalcin eignet sich für die Rolle des Promotors, da es fast ausschließlich im Knochen exprimiert wird und seine Expressionsrate in Osteozyten höher als in Osteoblasten ist (234).

Zur Kontaminationsprophylaxe wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Utensilien waren entweder sterilisiert oder wurden vor der Anwendung ebenso wie die Arbeitsflächen mit Isopropanol (70%) gereinigt.

#### 3.2.1.2. Kultivierung von MLO-Y4-Zellen

Die Kultivierung der MLO-Y4-Zellen erfolgte in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen, die zur Schaffung von optimalen Wachstumsbedingungen für die Osteozyten-ähnlichen Zellen zuvor mit Kollagen I beschichtet wurden. Hierfür wurden 8 ml Kollagen I (150 mM), das zuvor in Essigsäure (20 mM) verdünnt und anschließend durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert wurde, in eine 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur (rt) folgten zwei Waschschrte mit PBS-Puffer und anschließend wurde die Flasche unter der Sterilbank luftgetrocknet.

Als Nährmedium wurde das alpha Minimum Essential Medium Eagle ( $\alpha$ MEM) verwendet, dem Bovine Calf Serum (BCS), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin (P/S) sowie Glutamax zugesetzt wurde (Tab. 5). Nach dem Auftauen der Zellen wurden sie für einen Tag in Osteozytenmedium A kultiviert. Danach wurde auf Osteozytenmedium B gewechselt, wobei zwei Mal pro Woche ein Medienwechsel durchgeführt wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

Osteozytenmedium A:		Osteozytenmedium B:	
$\alpha$ MEM	+ 5% BCS	$\alpha$ MEM	+ 2,5% BCS
	+ 5% FBS		+ 2,5% FBS
	+ 1% P/S		+ 1% P/S
	+ 1% Glutamax		+ 1% Glutamax

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Nährmediums für die Kultivierung von MLO-Y4-Osteozyten**

### 3.2.1.3. Passagierung und Aussaat von MLO-Y4-Zellen

Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die kultivierten MLO-Y4-Zellen passagiert, um das weitere Wachstum zu gewährleisten. Hierfür wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen durch 5 ml Trypsin enzymatisch vom Boden abgelöst. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Wirkung des Trypsins durch Hinzugeben von 5 ml Osteozytenmedium B (Tab. 5) terminiert. Nun wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 50ml-Gefäß überführt, das anschließend 5 Minuten bei 220 x g zentrifugiert wurde. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 5 ml Osteozytenmedium B (Tab. 5) resuspendiert. Im Anschluss daran wurde mit dem Cedex Cell Counter die Zellzahl bestimmt. Das die gewünschte Anzahl an Zellen enthaltende Volumen der Zellsuspension wurde in eine neue kollagenbeschichtete 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert und mit 12 ml Osteozytenmedium B (Tab. 5) aufgefüllt oder für die Versuche in Platten oder Chamber Slides ausgesät. Diese wurden analog zu der in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Vorgehensweise zuvor mit Kollagen I beschichtet. Für die Beschichtung von 6-Well-Platten wurden pro Well 2 ml

der Kollagen-Lösung, für 12-Well-Platten 1 ml, für 96-Well-Platten 50 µl und für 8-Well-Chamber-Slides 200 µl verwendet.

#### 3.2.1.4. Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit sensiblen Neuropeptiden und Rezeptorinhibitoren

Um den Einfluss von sensiblen Neuropeptiden auf Osteozyten zu untersuchen, wurden MLO-Y4-Zellen mit den in Tabelle 6 aufgelisteten Substanzen stimuliert. Die Inhibitoren wurden jeweils allein sowie in Kombination mit den jeweiligen Neuropeptiden auf die Zellen gegeben. Inhibitoren wurden 30 Minuten vor Neuropeptidzugabe präinkubiert. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden.

Substanz	Funktion	Endkonzentration	Abkürzung
SP	Neuropeptid	10 <sup>-8</sup> M (10 <sup>-10</sup> M)	SP
GR73632	NK1R-Agonist	10 <sup>-8</sup> M	GR
L733,060	NK1R-Antagonist	10 <sup>-7</sup> M	L
αCGRP	Neuropeptid	10 <sup>-8</sup> M (10 <sup>-10</sup> M)	αCGRP
CGRP <sub>8-37</sub>	αCGRP-Rezeptorantagonist	10 <sup>-7</sup> M	C*

**Tabelle 6: Sensible Neuropeptide und spezifische Rezeptor-Antagonisten bzw. -Agonist**

Es wurden die Auswirkungen der Stimulationen auf die Proliferation, die Apoptose, die Genexpression sowie die Proteinsynthese untersucht. Für die Analyse der Proliferations- beziehungsweise Apoptoserate wurden BrdU-Assays (Kapitel 3.2.1.5) beziehungsweise Caspase-3/7-Assays (Kapitel 3.2.1.6) durchgeführt.

Für die Untersuchung von Stimulationseinflüssen auf die Genexpression wurden 3x10<sup>5</sup> MLO-Y4-Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium abgesaugt und die Stimulanzen, die in den jeweiligen Konzentrationen (Tab. 6) in 1 ml Osteozytenmedium B (Tab. 5) verdünnt wurden, auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun 24 Stunden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und die mRNA isoliert. Diese wurde in cDNA transkribiert und mittels qPCR amplifiziert, um die Expression der in Tabelle 3 aufgelisteten Gene zu analysieren (Kapitel 3.2.2).

Für die Analyse der Auswirkungen der Stimulationen auf Proteinebene wurden 1x10<sup>5</sup> MLO-Y4-Zellen pro Well in eine 12-Well-Platte ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat

wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 1 ml Osteozytenmedium B (Tab. 5), das mit den Stimulanzen in den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen versetzt wurde, ersetzt. Nach 24 Stunden wurde für weitere 24 Stunden auf 500 µl BCS- und FBS-freies Osteozytenmedium gewechselt, sodass die Stimulationsdauer insgesamt 48 Stunden betrug. Danach wurde der Überstand abgenommen und bis zur Durchführung des FGF23-ELISA bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.1.5. BrdU-Assay

Für die Untersuchung der Proliferationsrate wurden je  $1 \times 10^4$  MLO-Y4-Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde zur Synchronisation der Zellen das Nährmedium durch BCS- sowie FBS-freies Osteozytenmedium ersetzt und die Zellen erneut für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben stimuliert. Daraufhin wurde der *Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)* nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip des Assays beruht auf dem Einbau des Thymidinanalogons 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in die neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen. Durch einen mit einer Peroxidase gekoppelten Antikörper kann das inkorporierte BrdU und damit die Proliferationsrate quantifiziert werden. Es kommt durch Hinzugabe des entsprechenden Substrats der Peroxidase zu einem Farbumschlag, der mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader GENios F129004) bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert wird. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Menge des in die neu synthetisierte DNA eingebauten BrdU und damit zur Anzahl der proliferierenden Zellen. Durch Vergleich der optischen Dichten von stimulierten Zellen mit denen von unstimulierten Kontrollen lassen sich die Auswirkungen der Stimulationen auf die Proliferationsrate relativ darstellen.

### 3.2.1.6. Caspase-3/7-Assay

Um den Einfluss sensibler Neuropeptide und deren spezifischen Rezeptorinhibitoren auf die Apoptoserate von MLO-Y4-Osteozyten zu untersuchen, wurde der *Apo-ONE® Homogenous Caspase-3/7 Assay* nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden je  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in Dreifachbestimmung in eine schwarze 96-Well-Platte mit lichtdurchlässigem Boden ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat wurden sie wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben stimuliert, wobei die Stimulanzen in dem im Kit enthaltenen Caspase-Reagenz verdünnt wurden. Im Caspase-Reagenz ist der nicht-fluoreszierende Stoff bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic-acid amide) enthalten. Von diesem wird durch die proteolytische Aktivität der Caspasen 3 und 7, die Proteine spezifisch nach Aspartat-Resten schneiden, das fluoreszierende Rhodamin 110 abgespalten. Die Menge des entstehenden Rhodamin 110 ist direkt proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7, die als Exekutor-Caspasen eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade zur Einleitung der Apoptose spielen, und ist damit ein Indikator für die apoptotische Aktivität der Zelle. Die Fluoreszenz wurde 1, 4 und 24 Stunden nach Beginn der Stimulation mit einem Photometer (Microplate Reader GENios F129004) bei einer Wellenlänge von 485 nm gemessen und dann auf die Fluoreszenz von unstimulierten Kontrollen bezogen, um die Auswirkungen der Stimulationen auf die Apoptoserate zu ermitteln.



### 3.2.2. Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1. RNA-Isolierung aus MLO-Y4-Zellen

Für die Isolierung von RNA aus MLO-Y4-Zellen wurde der *RNeasy® Mini Kit* sowie das *RNase-Free DNase Set* verwendet. Sämtliche im Folgenden erwähnten Puffer und Enzyme sowie die verwendeten Säulen sind in den beiden Kits enthalten.

Zunächst wurde das Nährmedium der in 6-Well-Platten ausgesäten Zellen abgesaugt und der Zellboden mit PBS-Puffer gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden 350 µl RLT-Puffer in jedes Well pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch vom Boden abgelöst. Das Lysat wurde anschließend in ein 1,5ml-Röhrchen überführt und durch einminütiges Vortexen homogenisiert. Nach Hinzugeben von 350 µl Ethanol (70%) wurde das Lysat in eine Säule überführt, die in ein 2ml-Sammelröhrchen gestellt wurde, und anschließend 30 Sekunden bei 12 000 x g zentrifugiert.

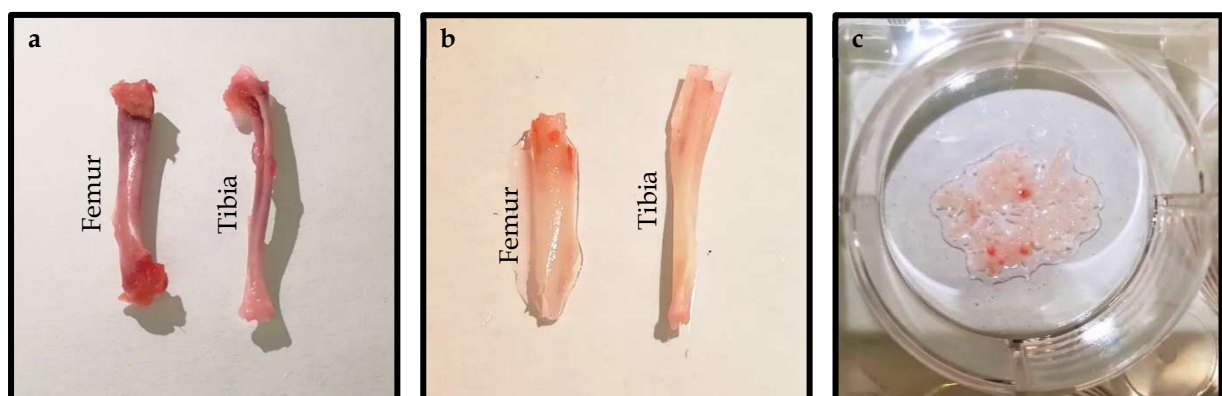
Um Kontaminationen mit DNA möglichst gering zu halten, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde nach Hinzugeben von 350 µl RW1-Puffer 30 Sekunden bei 12 000 x g zentrifugiert und anschließend 10 µl DNase I, die in 70 µl RDD-Puffer verdünnt wurden, hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden erneut 350 µl RW1-Puffer hinzugegeben und wieder 30 Sekunden bei 12 000 x g zentrifugiert.

Nun wurde die Säule mit 500 µl RPE-Puffer, der zuvor mit der vierfachen Menge Ethanol (100%) versetzt worden war, gewaschen und 30 Sekunden bei 12 000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei die Zentrifugationsdauer beim zweiten Mal 2 Minuten betrug. Im Anschluss daran wurde 1 Minute bei 12 000 x g leer zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein neues 1,5ml-Sammelröhrchen gestellt und zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach einminütiger Inkubation wurde 1 Minute bei 12 000 x g zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das erste Eluat erneut auf die Membran pipettiert und nach erneuter Inkubation für 1 Minute wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Die isolierte RNA ist nun in Wasser gelöst und wurde bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2.2. RNA-Isolierung aus murinen Röhrenknochen

Um zu analysieren, welche Auswirkungen die Abwesenheit der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP in vivo auf die Genexpression im Knochen hat, wurde zunächst RNA aus murinen Röhrenknochen isoliert und anschließend die Genexpression von osteozytären Mediatoren (Tab. 3) in den Knochen aus Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen mittels qPCR verglichen. Pro Genotyp wurden fünf Mäuse verwendet (n=5).

Die Mäuse wurden in den zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Universitätsklinik Regensburg mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bis zu einem Alter von sechs bis acht Monaten gehalten. Nach Tötung der Maus mit CO<sub>2</sub> wurde diese auf Eis gelegt und mit Isopropanol (70%) desinfiziert. Daraufhin wurden die kompletten hinteren Extremitäten entfernt, grob von Haut und Muskeln befreit und dann in RNAlater zwischengelagert. Die folgenden Präparationsschritte erfolgten ebenfalls auf Eis und unter einer Sterilbank. Femur und Tibia wurden mit einem Skalpell gründlich von Muskeln, Sehnen und Periost befreit. Die so isolierten Femora und Tibiae (Abb. 9a) einer Maus wurden in einer 12-Well-Platte mit RNAlater gesammelt. Anschließend wurden die Epiphysen abgetrennt und das Knochenmark mit RNAlater herausgespült. Die hohlen Knochen (Abb. 9b) wurden daraufhin mit einem Skalpell zu etwa 1 bis 2 mm langen Knochenstücken zerkleinert (Abb. 9c) und in einem 5ml-Röhrchen bei -20 °C gelagert.



**Abbildung 9: Isolierung von RNA aus murinen Röhrenknochen. a: Femur und Tibia nach der Präparation. b: Femur und Tibia nach Entfernen der Epiphysen und Herausspülen des Knochenmarks. c: zerkleinerte Knochenstücke**

Nach dem Auftauen auf Eis wurde die RNAlater-Suspension abgenommen und durch 500 µl Trizol ersetzt. Trizol lysiert die Zellen und das in Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat ist zudem ein starker Inhibitor von Ribonukleasen (235). Die Proben wurden mit einem Polytron zwei Mal für etwa 15 Sekunden mechanisch zerkleinert. Danach waren makroskopisch keine Knochenstücke mehr sichtbar. Das Lysat wurde 1 Minute gevortext und anschließend 5 Minuten bei rt inkubiert. Danach wurde die Probe mit 100 µl Chloroform versetzt und 3 Minuten bei rt inkubiert. Darauf folgte durch Zentrifugation mit 12 000 x g für 15 Minuten bei 4 °C eine Phasentrennung innerhalb der Probe. Die obere Phase ist wässrig und enthält RNA, während sich DNA und Proteine in der Interphase sowie in der unteren organischen Phase befinden (235), (236). Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in einem neuen Röhrchen mit Ethanol (70%, in RNase-freiem Wasser) resuspendiert. Im Anschluss wurde bei -20 °C über Nacht die RNA ausgefällt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem *RNeasy® Mini Kit* sowie dem *RNase-Free DNase Set*. Es wurden 700 µl des Lysats in eine Säule gegeben und dann die RNA analog zu der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise eluiert.

### 3.2.2.3. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer bestimmt. Dieses misst die Extinktion von UV-Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge durch die Probe. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Gerät misst die Extinktion bei 260 nm und berechnet daraus die Massenkonzentration der in der Probe enthaltenen RNA. Zudem wird auch die Extinktion bei anderen Wellenlängen gemessen, beispielsweise bei 280 nm, wo das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm lässt daher eine Aussage über die Verunreinigung der Probe durch Proteine zu. Eine isolierte RNA gilt als rein, wenn dieses Verhältnis zwischen 1,9 und 2,1 liegt. Der Großteil der isolierten RNA wies ein 260/280-Verhältnis in diesem Bereich auf und war somit relativ rein.

Um eine differenziertere Einschätzung über die Qualität beziehungsweise Integrität der isolierten RNA zu erhalten, wurde zudem eine Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Hierfür wurde der *RNA 6000 Nano Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Aliquots der RNA-Proben wurden auf einen Chip aufgetragen und die RNA-Fragmente mittels Mikrokapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Software erschließt aus dieser Auftrennung Rückschlüsse auf den Grad der Denaturierung der RNA und errechnet die „RNA integrity number“ (RIN). Eine RIN von 1 steht dabei für komplett degradierte RNA, während ein Wert von 10 für eine intakte RNA spricht. Für unsere Stimulationsversuche wurde die Integrität der aus den MLO-Y4-Zellen isolierten RNA stichprobenartig überprüft. Alle Stichproben wiesen eine RIN von über 7 auf. Alle aus murinen Röhrenknochen isolierten RNA-Proben wurden einer Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer unterzogen, wobei die RIN stets über einem Wert von 7 lag.

#### 3.2.2.4. cDNA-Synthese

Sowohl die aus MLO-Y4-Zellen als auch die aus murinen Röhrenknochen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, um im nächsten Schritt eine qPCR durchführen zu können. Für die cDNA-Synthese wurde der *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 1 µg RNA in cDNA transkribiert.

cDNA Synthesis Master Mix (2x)	10 µl
Oligo(dT) Primer	1,5 µl
Random Primer	1,5 µl
Affinity Script RT Mixture	1 µl
RNA	1 µg/ <sub>C</sub>
RNase-freies Wasser	ad 20 µl
	20 µl

**Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Transkription von 1 µg RNA in cDNA. Die Variable C bezeichnet die Massenkonzentration der in RNase-freiem Wasser verdünnten RNA.**

Die cDNA-Synthese fand im Thermocycler TGradient statt und gliedert sich in drei Phasen:

Phase 1: Annealing (5 Minuten bei 25 °C),

Phase 2: Elongation (15 Minuten bei 42 °C),

Phase 3: Inaktivierung (5 Minuten bei 95 °C).

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2.5. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Mittels qPCR kann die Expressionsrate bestimmter Gene einer Probe unter Verwendung spezifischer Primer relativ zur Expression einer Kontrollgruppe untersucht werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz gemäß Tabelle 8 in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-PCR-Platte aufgetragen.

cDNA (50 ng/μl)	1 μl
Primer vorwärts (10 μM)	0,4 μl
Primer rückwärts (10 μM)	0,4 μl
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (2x)	10 μl
RNase-freies Wasser	8,2 μl
	20 μl

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für die qPCR**

Die Amplifikation der cDNA erfolgt im AriaMx Real-Time PCR System G8830A und gliedert sich in verschiedene Schritte. Zunächst wird der Reaktionsansatz für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die cDNA zu denaturieren. Darauf folgen 40 Amplifizierungszyklen, die jeweils aus zwei Phasen bestehen. Während der Denaturierungs-Phase wird der Reaktionsansatz für 10 Sekunden auf 95 °C erhitzt und die Elongations-Phase erfolgt bei 60 °C für 30 Sekunden.

In der Theorie führt jeder Zyklus zu einer Verdopplung des entsprechenden cDNA-Abschnitts. Die Produkte des einen Zyklus fungieren dann wiederum als Templates für den darauffolgenden Zyklus, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Templates führen sollte. In der Realität trifft jedoch aufgrund der anfänglich geringen

Konzentration des Templates nicht jedes Template mit den Primern und der DNA-Polymerase zusammen und wird daher nicht zwingend kopiert, sodass die Verdopplung des Templates in den anfänglichen Zyklen nicht unbedingt gegeben ist und die exponentielle Phase der Amplifikation erst nach einigen Zyklen einsetzt. Je größer die ursprüngliche Menge der gewünschten cDNA ist, desto früher wird die exponentielle Phase erreicht. Die Menge der in der Probe vorhandenen cDNA wird nach jedem Zyklus durch Messung des Fluoreszenzsignals des interkalierenden Farbstoffs Brilliant III SYBR® Green, der fast ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet, detektiert. Sobald die exponentielle Phase eingesetzt hat, hebt sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundrauschen ab. Die Anzahl der Zyklen, nach denen das gemessene Fluoreszenzsignal erstmalig das Hintergrundrauschen übertrifft, wird als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet.

Die Auswertung der qPCR erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wurde die Relative Expression RQ (Relative Quantification) des spezifischen Gens (gene of interest, GOI) nach der folgenden Formel berechnet:

$$\begin{aligned}
 RQ &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \\
 &= 2^{-(\Delta C_{t\text{Probe}} - \Delta C_{t\text{Kontrolle}})} \\
 &= 2^{-[(C_{t\text{GOI}} - C_{t\text{Referenz}})_{\text{Probe}} - (C_{t\text{GOI}} - C_{t\text{Referenz}})_{\text{Kontrolle}}]} \\
 &= \frac{2^{(C_{t\text{Kontrolle}} - C_{t\text{Probe}})_{\text{GOI}}}}{2^{(C_{t\text{Kontrolle}} - C_{t\text{Probe}})_{\text{Referenz}}}}.
 \end{aligned}$$

Der Quotient RQ gibt die Expression des GOI in der Probe als Vielfaches der Expression desselben Gens in der Kontrolle an. Für die Auswertung der Stimulationsversuche mit MLO-Y4-Zellen werden als Proben die mit Neuropeptiden oder Neuropeptidrezeptor-Inhibitoren stimulierten Zellen bezeichnet. Als Kontrolle (Kalibrator) dienen unstimulierte MLO-Y4-Osteozyten. Beim Vergleich der Genexpression in murinen Röhrenknochen unterschiedlicher Genotypen werden die aus Tac1- beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen isolierten Proben auf die aus Wildtyp-Mäusen isolierten Kontrollen (Kalibratoren) bezogen. Dabei werden die Werte der RNA aus einer Knockout-Maus auf die Werte der RNA aus jeder Wildtyp-Maus bezogen und die Werte dann gemittelt. Um Probe und Kontrolle sinnvoll miteinander vergleichen zu können, werden beide auf ein Referenzgen (Normalizer) bezogen, dessen Expression unter allen verwendeten Bedingungen als konstant

angesehen wird. Für alle unsere Experimente wird als Referenz die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt.

Für den Rezeptornachweis in unstimulierten MLO-Y4-Zellen wird die Darstellung des  $\Delta C_t$  gewählt:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{Rezeptor}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}.$$

Als Primer wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Sie wurden von Microsynth (Balgach, Schweiz) bestellt und anschließend etabliert, indem eine qPCR mit mindestens vier verschiedenen cDNA-Konzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve durchgeführt wurde. Die Steigung der Standardkurve entspricht der Effizienz der Bindung des Primers an die cDNA. Um die Genexpression unterschiedlicher Proben sinnvoll miteinander vergleichen zu können, wurden nur Primer verwendet, deren Effizienz annähernd gleich ist und idealerweise zwischen 90% und 110% liegt. Zusätzlich wurden die Schmelzkurven begutachtet, um die Existenz relevanter Nebenprodukte auszuschließen.

	Basensequenz (5'→3')	T <sub>M</sub> [°C]	Amplikon- länge [bp]	NCBI- Referenznummer
Alkalische Phosphatase (ALP)				
for	CGCCATGACATCCCAGAAAG	57,5	239	X13409
rev	GCCTGGTAGTTGTTGTGAGC	57,5		
alpha-Calcitonin gene-related peptide (αCGRP)				
for	TGCAGGACTATATGCAGATGAAA	57,7	91	NM_007587
rev	GGATCTCTTCTGAGCAGTGACA	59,5		
Calcitonin-receptor-like receptor (CRLR)				
for	GCCAATAACCAGGCCTTAGTG	59,0	77	NM_018782
rev	GCCCATCAGGTAGAGATGGAT	58,7		
CD44				
for	AAAATTGGACCCCGGAAC	59,0	113	MMU_57612
rev	AGCTGCTGCTTCTGCTGTACTA	59,0		
Connexin 43 (GJA1)				
for	GTGCCGGCTTCACCTTCA	60,0	97	NM_010288
rev	GGAGTAGGCTTGACCTTGTC	60,0		
Dentin matrix protein 1 (DMP1)				
for	GAGGACGGGTGATTGGCTG	61,0	118	NM_016779
rev	AGATTCACCTGCTGTCCGTGT	59,3		
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)				
for	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	60,0	223	NM_017008
rev	ACACATTGGGGGTAGGAACA	60,0		
Dickkopf 1 (DKK1)				
for	GTAATGACCACAACGCCGC	59,9	94	NM_010051
rev	ACGGAGCCTTCTTGTCCTTTG	60,5		
Podoplanin (E11)				
for	GCCAGTGTTGTTCTGGGTTT	60,0	105	NM_001290822
rev	TCTCCTGTACCTGGGGTCAC	59,0		
Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23)				
for	CTTGGCTCCAACCTGGGGAAG	60,6	125	NM_022657
rev	AGGGCACTGTAGATGGTCTGA	60,3		
Macrophage colony-stimulating factor (MCSF)				
for	CGAGACCCTCAGACATTGGA	58,8	117	NM_007778
rev	TGTGTGCCCAGCATAGAATC	58,0		
Neurokinin-1-Rezeptor (NK1R)				
for	ATTGAGTGGCCAGAACATCC	57,9	135	NM_009313
rev	ACTGGCCCACAGTGTAATCC	59,7		



Osteoprotegerin (OPG)				
for	CGAGTGTGTGAGTGTGAGGAA	57,0	111	MMU_94331
rev	TGTTTCGCTCTGGGGTTC	55,0		
Osterix (OSX)				
for	CCACTTGAGCAAACATCAGC	57,0	103	DQ_229136
rev	GCTGATTGGCTTCTTCTTCC	57,0		
Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (PHEX)				
for	CAACGTTCCGCGGTCAATAC	59,9	105	NM_011077
rev	GTGTTGCTTGGTCCAGCTTC	59,7		
Polycystic kidney disease 1 (PKD1)				
for	AAGCACAGGAGCAATGTCCG	60,0	100	NM_013630
rev	AGGCTCCTGGTAACCTTGG	59,0		
Receptor-activity-modifying protein 1 (Ramp1)				
for	CCTGACTATGGGACTCTCATCC	59,1	139	NM_016894
rev	CGTGCTTGGTGCAGTAAGTG	59,8		
Receptor Activator of NFκB Ligand (RankL)				
for	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT	60,0	110	AF_019048
rev	AGCAAATGTTGGCGTACAGG	60,0		
Sklerostin (SOST)				
for	GAATGATGCCACAGAGGTCA	58,4	107	NM_024449
rev	CGGTTCATGGTCTGGTTGTT	58,4		
Substanz P (SP)				
for	GATGAAGGAGCTGTCCAAGC	58,6	102	NM_009311
rev	GCACAGGAGTCTCTGCTTCC	60,4		

**Tabelle 9: Primersequenzen für die qPCR (°C: Grad Celsius, A: Adenosin, bp: Basenpaare, C: Cytidin, for: forward (vorwärts), G: Guanodin, rev: reverse (rückwärts), NCBI: National Center for Biotechnology Information, T<sub>M</sub>: Melting temperature (Schmelztemperatur), T: Thymin)**

### 3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.3.1. Proteinisolierung aus MLO-Y4-Zellen

Für den Rezeptornachweis mittels Western Blotting wurden zunächst MLO-Y4-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 1 bis 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit auf 100 °C erhitztem Heat-Hot-Lysepuffer (Tris-HCl (10 mM) pH 8,0 + 1% SDS) lysiert. Nach Ablösen mit einem Zellschaber wurden die Proben in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß für weitere 15 Minuten im Heizblock bei 100 °C inkubiert, wobei alle 5 Minuten gründlich gevortext wurde. Es folgte eine Ultraschallbehandlung mit dem Sonopuls HD 2070 Ultraschallhomogenisator für zwei Mal je 20 Sekunden mit einer Amplitude von etwa 40%. Daraufhin wurden die Proben 20 Minuten bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert. Er enthielt die aus den Zellen isolierten löslichen Proteine.

#### 3.2.3.2. BCA-Assay

Die Konzentrationsbestimmung des isolierten Gesamtproteins erfolgte mit dem *Pierce® BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben. Die bei der Heat-Hot-Lyse (Kapitel 3.2.3.1) gewonnenen Proteinüberstände wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt und jeweils 25 µl pro Well auf eine 96-Well-Platte in Dreifachbestimmung aufgetragen. Daneben wurden ebenfalls in Dreifachbestimmung jeweils 25 µl Bovine Serum Albumine (BSA) in verschiedenen Konzentrationen (von 0 µg/ml bis 2000 µg/ml) zur Erzeugung einer Standardkurve aufgetragen. Die beiden dem Kit beiliegenden Reagenzien wurden gemäß den Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:50 gemischt. Jeweils 200 µl dieser Lösung wurden zu den zuvor mit den Proben beziehungsweise mit BSA befüllten Wells hinzugefügt. Während der darauffolgenden Inkubation von 30 Minuten auf einer Schüttelplatte bei 37 °C fand die dem Assay zugrundeliegende Biuret-Reaktion statt. Dabei reduzieren die Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen, die

daraufhin einen Komplex mit Bicinchoninsäure (BCA) bilden. Dadurch kommt es zu einem violetten Farbumschlag, der mit einem Photometer (Microplate Reader GENios F129004) bei 595 nm detektiert wurde. Die gemessene Absorption korreliert linear mit der Menge an reduziertem  $\text{Cu}^{2+}$ , die wiederum direkt proportional zur Menge der in der Probe enthaltenen Proteine ist. Durch Auftragen der gemessenen Absorptionen der BSA-Standards gegen die bekannten BSA-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden konnten.

### 3.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die aus den MLO-Y4-Zellen isolierten Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mittels Western Blotting auf eine Membran übertragen, um daraufhin mittels spezifischer Antikörper die Expression der Proteine NK1R, CRLR und Ramp1 nachweisen zu können.

Zunächst wurden 30  $\mu\text{g}$  (für die Detektion von NK1R und Ramp1) beziehungsweise 50  $\mu\text{g}$  (für die Detektion von CRLR) des Gesamtproteins mit Ladepuffer (5x) (Tab. 12) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Das im Ladepuffer enthaltene SDS dient der Abschirmung von Eigenladungen durch stabile Bindung an die Aminosäuren der Proteine, wodurch die Auftrennung im elektrischen Feld nur gemäß der Molekülgröße und nicht gemäß der Molekülladung erfolgen wird. Das ebenfalls im Ladepuffer enthaltene DTT unterstützt die Denaturierung, indem es die für die Tertiärstruktur bedeutsamen Disulfidbrücken reduziert. Anschließend wurden die Proben in einem 1,0 mm dicken Polyacrylamid-Gel (15%) aufgetragen (Tab. 10). Als Referenzmarker wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standards aufgetragen.

Trenngel (15%)		Sammelgel	
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid-Mix)	5,0 ml	Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid-Mix)	0,415 ml
Tris pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml	Tris pH 6,8 (0,5 M)	0,625 ml
SDS (10%)	0,1 ml	SDS (10%)	0,025 ml
APS (10%)	0,1 ml	APS (10%)	0,025 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,0025 ml
destilliertes Wasser	2,3 ml	destilliertes Wasser	1,39 ml
	10 ml		2,5 ml

**Tabelle 10: Zusammensetzung eines für die SDS-PAGE verwendeten Gels. Das Sammelgel ist der Abschnitt des Gels, in dem sich die Beladetaschen für die Proben befinden, während die Auftrennung der Proben im Trenngel erfolgt.**

Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (1x) (Tab. 12) aufgefüllt und eine Spannung von etwa 140 V angelegt. Diese veranlasst die auf das Gel aufgetragenen negativ geladenen Moleküle, zur Anode zu wandern. Die netzartige Struktur des Polyacrylamids bedingt, dass die Laufgeschwindigkeit eines Moleküls umso größer ist, je kleiner das Molekül ist, und führt somit zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die Laufstrecke ist indirekt proportional zum Logarithmus der Molekülmasse.

#### 3.2.3.4. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 30 Minuten in Methanol-haltigem Transferpuffer (1x) (Tab. 12) equilibriert, um Salzreste des Laufpuffers zu entfernen. Daraufhin wurden die Proteine per Tank Blot mit 120 mA für 90 Minuten unter ständiger Kühlung auf Eis auf eine 0,2µm-PVDF-Membran, die zuvor zur Aktivierung für 3 Sekunden in Methanol gelegt wurde und anschließend 3 Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt wurde, übertragen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotting für 1 Stunde in Trockenmilch (5%), die in Tris-buffered-saline mit Tween (T-TBS-Puffer, Tab. 12) gelöst war, bei rt auf einem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper (Tab. 11), der in Trockenmilch-T-TBS (5%) verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert.

Antigen	Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration
<b>primäre Antikörper</b>				
NK1R	Anti-Neurokinin 1 Receptor antibody (#ab183713)	Kaninchen	monoklonal	1 : 20000
CRLR	CRLR/CGRPR1 Polyclonal Antibody (#bs-1860R)	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000
Ramp1	Anti-RAMP1 antibody (#ab156575)	Kaninchen	monoklonal	1 : 5000
β-Aktin	Anti-beta Actin antibody (#ab8227)	Kaninchen	monoklonal	1 : 5000
<b>sekundärer Antikörper</b>				
	Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (#711-036-152)	Affe	polyklonal	1 : 10000

Tabelle 11: Antikörper für Western Blot

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit T-TBS-Puffer (1x) (Tab. 12) gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem in Trockenmilch-T-TBS (5%) verdünnten sekundären Antikörper für 1 Stunde auf einer Schüttelplatte bei rt. Nach erneutem Waschen mit T-TBS-Puffer (1x) (Tab. 12) wurde die Membran mit Hilfe des *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* entwickelt. Die Detektion der Banden erfolgte im GelDoc Imager mit Belichtungszeiten von 1, 3, 5, 10, 15 und 45 Minuten. Für eine sensitivere Detektion der Proteine wurde die Membran im Anschluss daran mit dem *Pierce® SuperSignal West Femto* erneut entwickelt. Die Entwicklung erfolgte im GelDoc Imager mit Belichtungszeiten von 10 und 30 Sekunden sowie 1, 3, 5, 10 und 15 Minuten.

Ladepuffer (5x)	
Tris-HCl pH 6,8	1 M
SDS	10%
DTT	0,5 M
Glycerin	50%
Bromphenol-Blau	0,01%
destilliertes Wasser	ad 100 ml
	100 ml

Laufpuffer (1x)		
Laufpuffer (10x)		100 ml
Glycin (192 mM)	144 g	
Tris (25 mM)	30,3 g	
SDS (0,1%)	10 g	
destilliertes Wasser	ad 1 l	
destilliertes Wasser		900 ml
		1 l

Transferpuffer (1x)		
Transferpuffer (10x)		100 ml
Glycin (192 mM)	144 g	
Tris (25 mM)	30,3 g	
destilliertes Wasser	ad 1 l	
Methanol		100 ml
destilliertes Wasser		800 ml
		1 l

T-TBS-Puffer (1x)		
T-TBS-Puffer (20x)		50 ml
Tris (20 mM)	48,4 g	
NaCl (140 mM)	160 g	
Tween 20 (0,1%)	20 ml	
destilliertes Wasser	ad 1 l	
destilliertes Wasser		950 ml
		1 l

Tabelle 12: Zusammensetzung der für SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Puffer

### 3.2.4. Immunologische Methoden

#### 3.2.4.1. Immunfluoreszenzfärbung

Um die Expression der Rezeptoren NK1R, CRLR und Ramp1 in MLO-Y4-Zellen auf Proteinebene nachzuweisen, wurden neben dem in Kapitel 3.2.3.4 beschriebenen Western Blotting auch Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, damit neben dem Nachweis der Proteine auch Aussagen über die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren getroffen werden können.

Es wurden  $2 \times 10^4$  MLO-Y4-Zellen pro Well in ein 8-Well-Chamber-Slide ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden, wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend fixiert. Für den Nachweis des NK1R wurden zur Fixierung 200 µl Paraformaldehyd (4%) bei rt verwendet, für CRLR 200 µl Methanol und für Ramp1 200 µl Aceton bei 4 °C. Die Inkubationszeit betrug für alle Fixierungslösungen 15 Minuten. Nach einem Waschschrift mit TBS + 0,1% Triton erfolgte für 30 Minuten die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels BSA (5%), das in TBS + 0,1% Triton gelöst war. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 13) über Nacht bei 4 °C. Alle Antikörper wurden in 1% BSA in TBS + 0,1% Triton verdünnt.

Antigen	Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration
<b>primäre Antikörper</b>				
NK1R	Anti-Neurokinin 1 Receptor antibody (#ab183713)	Kaninchen	monoklonal	2,5 µg/ml
CRLR	CRLR/CGRPR1 Polyclonal Antibody (#bs-1860R)	Kaninchen	polyklonal	3 µg/ml
Ramp1	Anti-RAMP1 antibody (#ab156575)	Kaninchen	monoklonal	2,5 µg/ml
<b>Isotypen</b>				
	Rabbit monoclonal Isotype control (#ab172730)	Kaninchen	monoklonal	2,5 µg/ml
	Rabbit IgG Isotype control polyclonal (#NBP1-97041)	Kaninchen	polyklonal	3 µg/ml
<b>sekundärer Antikörper</b>				
	F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-Rabbit IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (#A-11070)	Ziege	polyklonal	1 : 500
<b>Kernfärbung</b>				
	DAPI (#D1306)			1 : 5000

Tabelle 13: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal mit TBS + 0,1% Triton gewaschen. Dann erfolgte für 1 Stunde bei rt in einem abgedunkelten Raum die Inkubation mit dem sekundären Antikörper sowie mit DAPI, ebenfalls verdünnt in 1% BSA in TBS + 0,1% Triton, zur Anfärbung der Zellkerne. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit Fluorescence Mounting Medium überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Färbung wurde dann mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-U dokumentiert.

#### 3.2.4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay für FGF23 (FGF23-ELISA)

Um Einflüsse der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die endokrine FGF23-Sekretion von Osteozyten auf Proteinebene zu untersuchen, wurde FGF23 mittels *Mouse FGF-23 DuoSet® ELISA* und *DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2* im Nährmedium von stimulierten beziehungsweise unstimulierten MLO-Y4-Zellen (Kapitel 3.2.1.4) entsprechend den Herstellerangaben detektiert.



Nach Beschichtung einer 96-Well-Platte mit dem primären FGF23-Antikörper wurden die Proben unverdünnt aufgetragen. In den Proben vorhandene FGF23-Moleküle verursachen über den sekundären Antikörper durch Umsetzung eines hinzugegebenen Substrats einen Farbumschlag, der mit einem Photometer (Microplate Reader GENios F129004) bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert wird und anhand der Standardkurve quantifiziert wird. Anschließend werden die gemessenen optischen Dichten der Proben auf die Kontrollen (unstimulierte MLO-Y4-Zellen) bezogen und relative Unterschiede dargestellt.

### 3.2.5. Statistische Methoden

Die graphische Darstellung der Messergebnisse sowie die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 7. Die Ergebnisse wurden als Boxplots, die vom unteren bis zum oberen Quartile reichen, dargestellt. Eine horizontale Linie innerhalb des Boxplots markiert den Median. Whiskers unter- und oberhalb des Boxplots zeigen die minimalen und maximalen Messwerte an. Die einzelnen Messwerte selbst werden als Punkte dargestellt.

Für die Auswertung der Stimulationsversuche mit MLO-Y4-Zellen wurden die Ergebnisse der stimulierten Zellen jeweils auf die unstimulierten Zellen bezogen (Kontrolle = 1 bzw. Kontrolle = 100%). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimulierten Zellen und unstimulierten Kontrollzellen wurden mit dem Wilcoxon Signed-Rank Test auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ermittelt. Dabei wurden die Werte einer Gruppe mit dem theoretischen Wert 1 beziehungsweise 100, entsprechend der Kontrolle, verglichen.

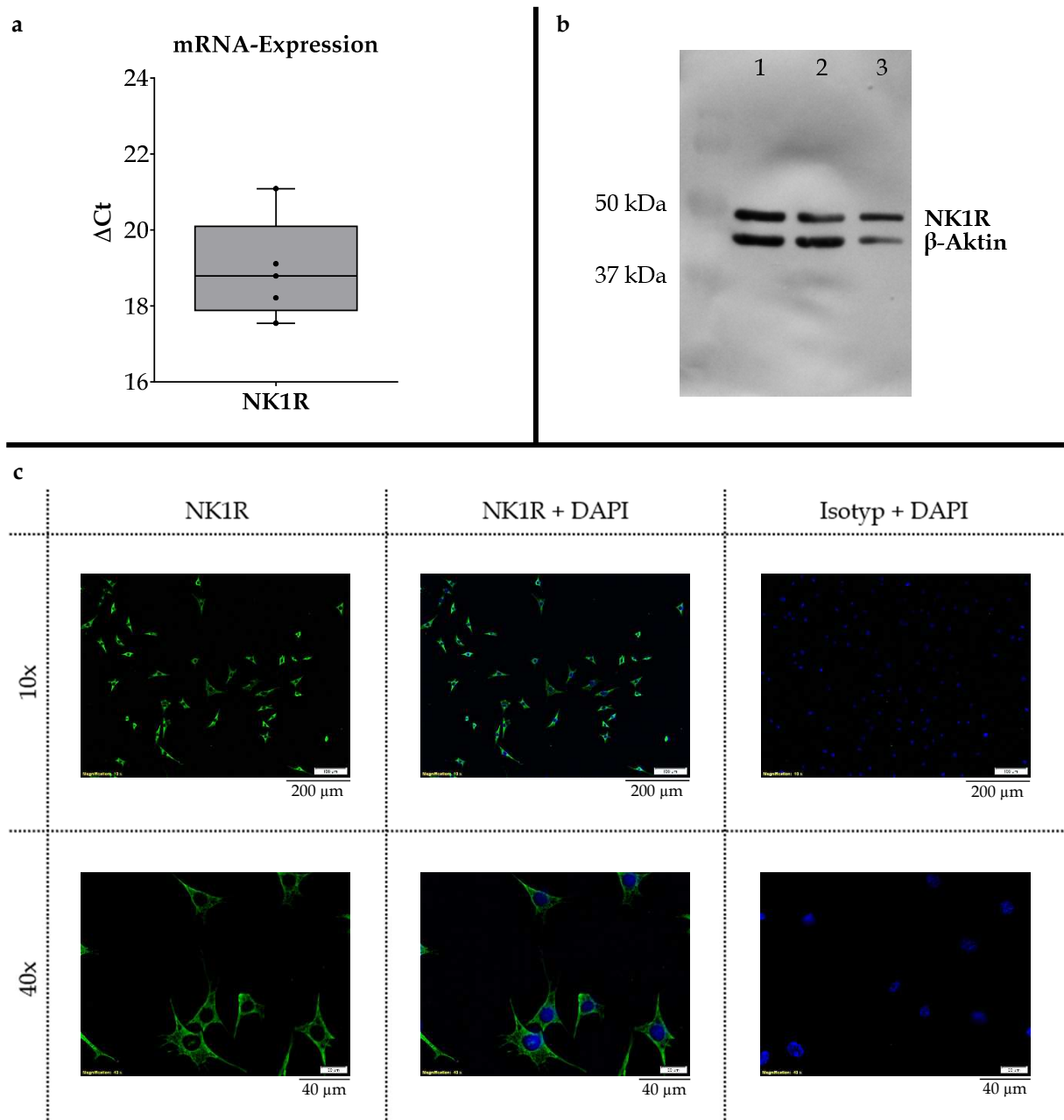
Für die Auswertung der in-vivo-Experimente wurden die Ergebnisse der Tac1-beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse auf Wildtyp-Mäuse bezogen (Kontrolle = 1). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mit dem One sample t test auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ermittelt. Dabei wurden die Werte einer Gruppe mit dem theoretischen Wert 1 verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Nachweis der Rezeptoren NK1R, CRLR und Ramp1 in MLO-Y4-Zellen

#### 4.1.1. Nachweis von NK1R in MLO-Y4-Zellen

Initial wurde die Expression des SP-Rezeptors NK1R in MLO-Y4-Zellen auf mRNA-Ebene mittels qPCR nachgewiesen. Für den Rezeptornachweis auf Proteinebene wurden zum einen Zelllysate von MLO-Y4-Zellen mittels Western Blotting analysiert und zum anderen Immunfluoreszenzfärbungen von MLO-Y4-Zellen durchgeführt.



**Abbildung 10: Expression des Rezeptors NK1R in MLO-Y4-Zellen auf mRNA- und Proteinebene.**

**a: Nachweis der Genexpression von NK1R in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36, 37, 38, 40 und 42 mittels qPCR. Der Graph stellt die Ct-Werte von NK1R abzüglich der Ct-Werte von GAPDH (endogene Kontrolle) dar ( $\Delta Ct$ ). n = 5.**

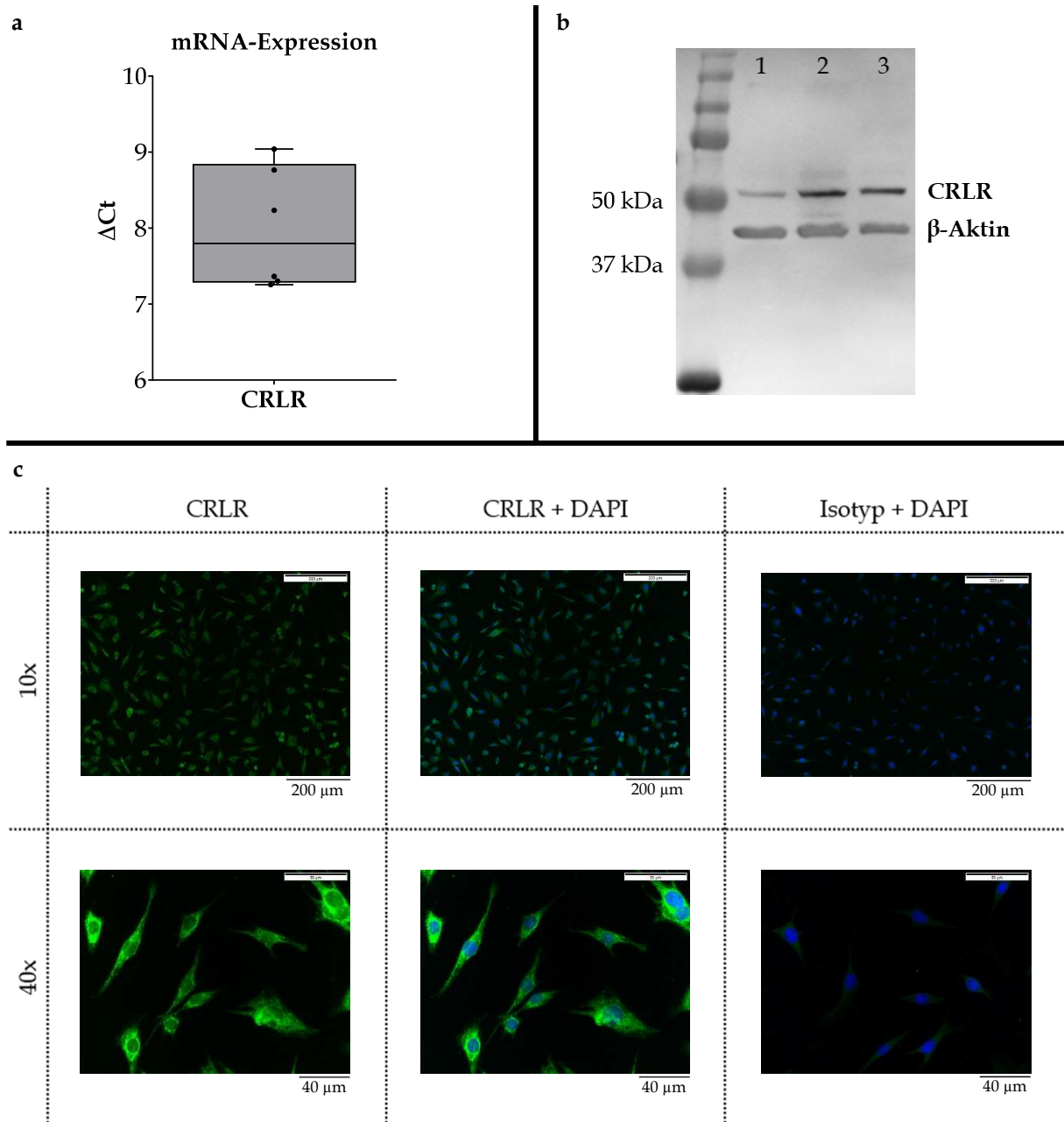
**b: Nachweis der Proteinexpression von NK1R (ca. 46 kDa) in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 38 (Linie 1), 42 (Linie 2) und 37 (Linie 3) mittels Western Blot. Als endogene Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (ca. 42 kDa) verwendet.**

**c: Nachweis der Proteinexpression von NK1R mittels Immunfluoreszenzfärbung von unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36 und 43 in 10-facher (10x) und 40-facher (40x) Vergrößerung. NK1R wurde durch einen spezifischen Antikörper angefärbt, die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.**

Der SP-Rezeptor NK1R wird in MLO-Y4-Zellen auf mRNA-Ebene exprimiert, wobei der hohe  $\Delta Ct$ -Wert (Median: 18,79) mit einer relativ geringen Expression des NK1R-Gens einhergeht (Abb. 10a). Jedoch sprechen die eindeutigen Banden im Western Blot für eine stabile Expression von NK1R auf Proteinebene (Abb. 10b). Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt die Proteinexpression durch spezifische Anfärbung von NK1R sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma von MLO-Y4-Zellen (Abb. 10c).

### 4.1.2. Nachweis von CRLR in MLO-Y4-Zellen

Analog zum SP-Rezeptor NK1R (Kapitel 4.1.1) wurde die Expression der  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponente CRLR in MLO-Y4-Osteozyten nachgewiesen.



**Abbildung 11: Expression des Rezeptors CRLR in MLO-Y4-Zellen auf mRNA- und Proteinebene.**

**a: Nachweis der Genexpression von CRLR in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36, 37, 38, 40 und 42 mittels qPCR. Der Graph stellt die Ct-Werte von CRLR abzüglich der Ct-Werte von GAPDH (endogene Kontrolle) dar ( $\Delta Ct$ ).  $n = 6$ .**

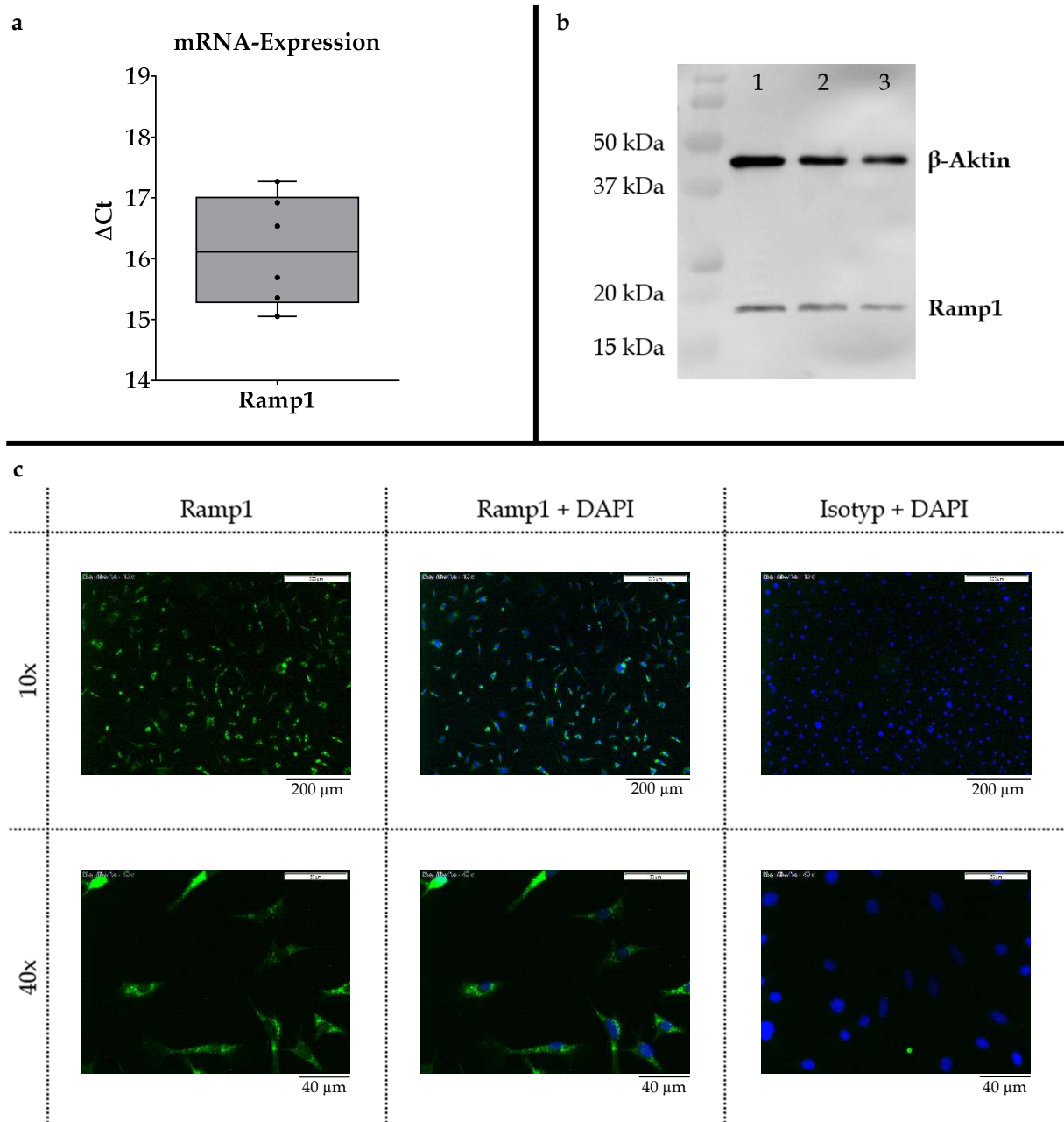
**b: Nachweis der Proteinexpression von CRLR (ca. 53 kDa) in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 38 (Linie 1), 42 (Linie 2) und 37 (Linie 3) mittels Western Blot. Als endogene Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (ca. 42 kDa) verwendet.**

**c: Nachweis der Proteinexpression von CRLR mittels Immunfluoreszenzfärbung von unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36 und 43 in 10-facher (10x) und 40-facher (40x) Vergrößerung. CRLR wurde durch einen spezifischen Antikörper angefärbt, die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.**

Die Genexpression von CRLR in MLO-Y4-Zellen liegt mit einem niedrigen  $\Delta Ct$ -Wert (Median: 7,800) auf relativ hohem Niveau (Abb. 11a). Auch auf Proteinebene wird CRLR mittels Western Blot (Abb. 11b) und durch Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 11c) detektiert. Hier ist das Fluoreszenzsignal im Zytoplasma höher als in der Zellmembran, wobei die stärkste Intensität um den Zellkern herum beobachtet wird.

### 4.1.3. Nachweis von Ramp1 in MLO-Y4-Zellen

Der Nachweis der zweiten Komponente des  $\alpha$ CGRP-Rezeptordimers Ramp1 in MLO-Y4-Osteozyten erfolgte analog zu NK1R (Kapitel 4.1.1) und CRLR (Kapitel 4.1.2).



**Abbildung 12: Expression des Rezeptors Ramp1 in MLO-Y4-Zellen auf mRNA- und Proteinebene.**  
**a:** Nachweis der Genexpression von Ramp1 in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36, 37, 38, 40 und 42 mittels qPCR. Der Graph stellt die Ct-Werte von Ramp1 abzüglich der Ct-Werte von GAPDH (endogene Kontrolle) dar ( $\Delta Ct$ ).  $n = 6$ .  
**b:** Nachweis der Proteinexpression von Ramp1 (ca. 17 kDa) in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 38 (Linie 1), 42 (Linie 2) und 37 (Linie 3) mittels Western Blot. Als endogene Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (ca. 42 kDa) verwendet.  
**c:** Nachweis der Proteinexpression von Ramp1 mittels Immunfluoreszenzfärbung von unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten der Passagen 36 und 43 in 10-facher (10x) und 40-facher (40x) Vergrößerung. Ramp1 wurde durch einen spezifischen Antikörper angefärbt, die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

MLO-Y4-Zellen exprimieren Ramp1 auf mRNA-Ebene, wobei der hohe  $\Delta Ct$ -Wert (Median: 16,11) auf eine eher geringe Genexpression hindeutet (Abb. 12a). Im Western Blot von Zelllysaten aus MLO-Y4-Zellen sind jedoch eindeutige Banden für Ramp1 zu erkennen (Abb. 12b). Auch durch Immunfluoreszenzfärbung lässt sich Ramp1 in MLO-Y4-Zellen spezifisch anfärben. In 40-facher Vergrößerung zeigen sich punktuelle Intensitätsmaxima des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma mit Betonung um den Zellkern herum bei insgesamt stärkerem Signal im Zytoplasma als in der Zellmembran (Abb. 12c).



## 4.2. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf MLO-Y4-Zellen

### 4.2.1. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proliferation und Apoptose von MLO-Y4-Zellen

#### 4.2.1.1. Einfluss auf die Proliferation

Der Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die Proliferation von MLO-Y4-Zellen wurde mittels BrdU-Assay nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden bestimmt.

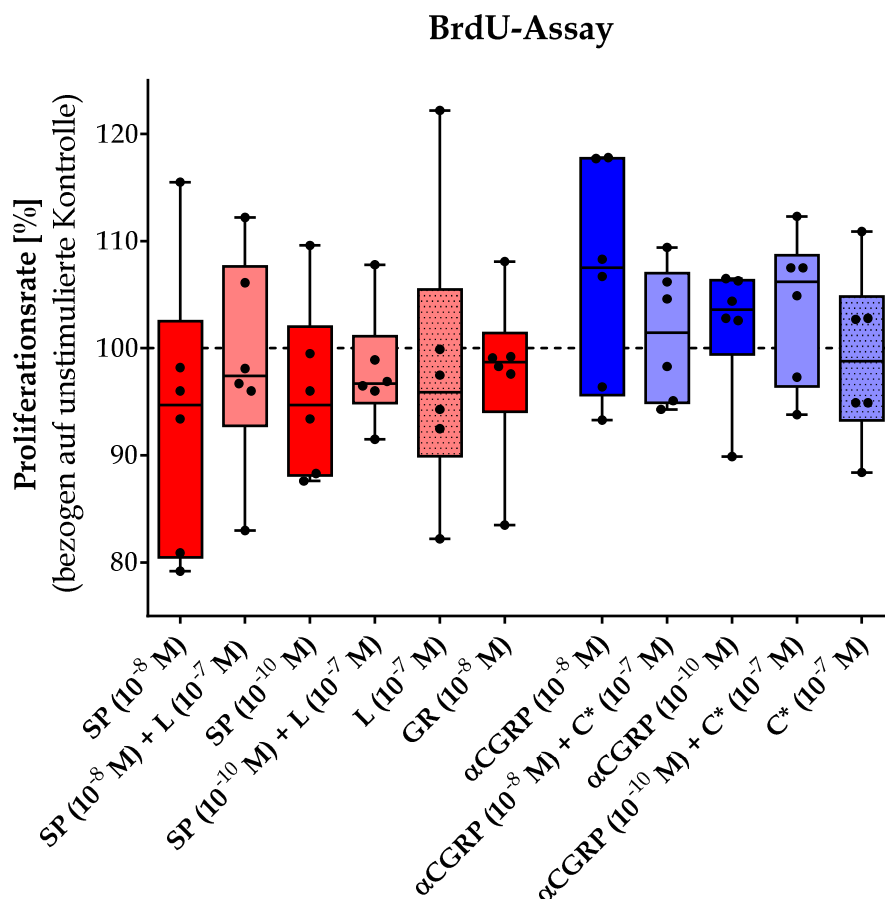
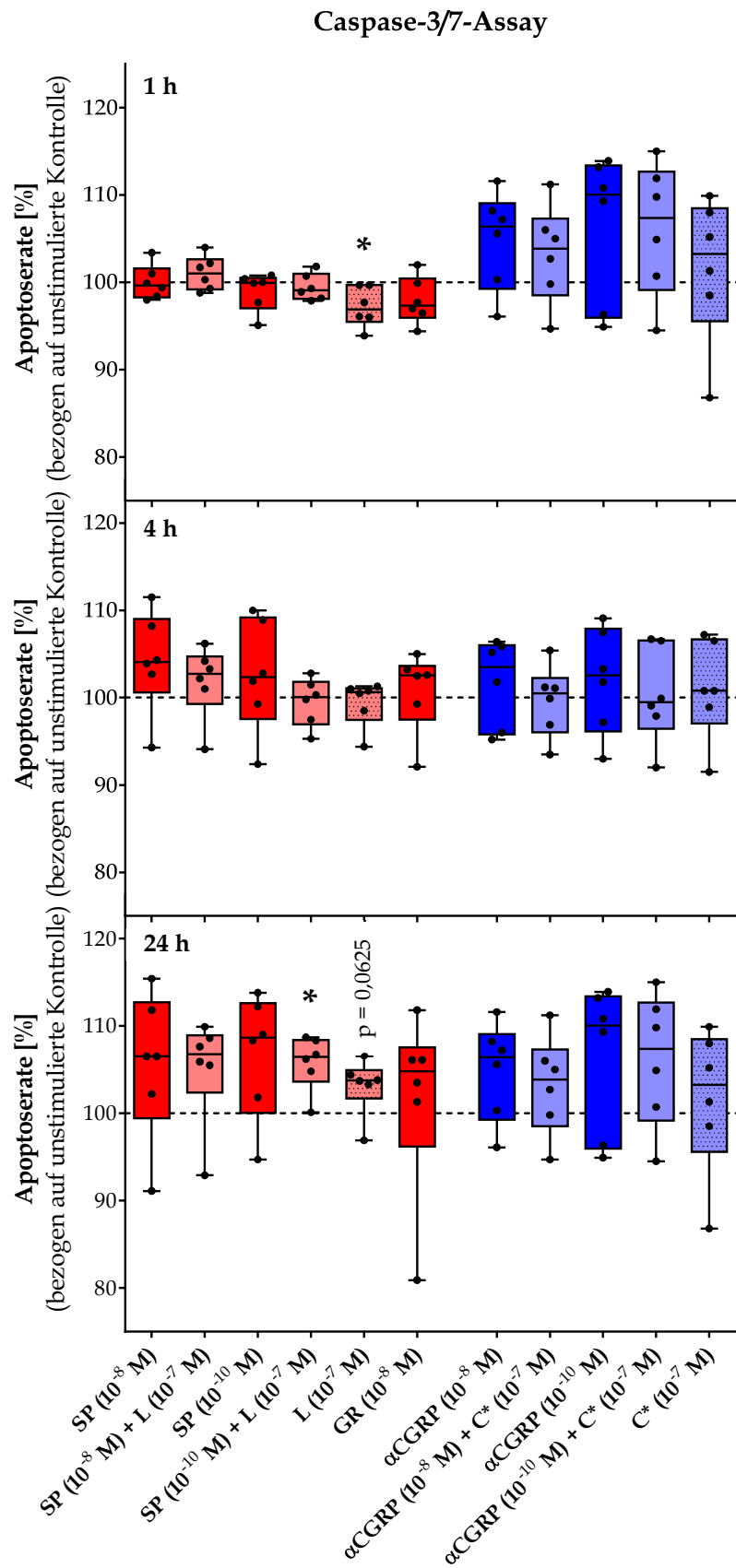


Abbildung 13: Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) ohne und in Gegenwart von SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Proliferation von MLO-Y4-Osteozyten nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden. Die Proliferationsrate der stimulierten Proben ist als prozentualer Anteil der Proliferationsrate von unstimulierten MLO-Y4-Zellen (100%, gestrichelte Linie) dargestellt. n = 6.

Die Stimulation mit SP führt in beiden Konzentrationen ( $10^{-8}$  M und  $10^{-10}$  M) zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der Proliferation in MLO-Y4-Osteozyten ( $10^{-8}$  M: Median: 94,70%;  $p = 0,2188$  /  $10^{-10}$  M: Median: 94,70%;  $p = 0,2188$ ), die auch durch Kombination mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 nicht beeinflusst wird. Der NK1R-Agonist GR73632 hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation von MLO-Y4-Zellen. Die Stimulation mit  $\alpha$ CGRP in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M und  $10^{-10}$  M führt ebenfalls zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Proliferationsrate, die durch Ko-Stimulation mit dem Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> nicht beeinflusst wird. Die MLO-Y4-Osteozyten wurden mit den Rezeptorinhibitoren allein stimuliert, um eine partielle agonistische Aktivität der Inhibitoren zu untersuchen. Auch nach alleiniger Stimulation mit den Rezeptorinhibitoren zeigte sich die Proliferationsrate der Osteozyten-ähnlichen MLO-Y4-Zellen im Wesentlichen unverändert ( $p > 0,1$ ).

#### 4.2.1.2. Einfluss auf die Apoptose

Der Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die Apoptoserate von MLO-Y4-Zellen wurde mittels Caspase-3/7-Assay nach einer Stimulationsdauer von 1, 4 und 24 Stunden bestimmt.



**Abbildung 14:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und in Kombination mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Apoptose von MLO-Y4-Osteozyten nach einer Stimulationsdauer von 1, 4 und 24 Stunden. Die Apoptoserate der stimulierten Proben ist als prozentualer Anteil der Apoptoserate von unstimulierten MLO-Y4-Zellen (100%, gestrichelte Linie) dargestellt. n = 6. \*p<0,05 (Wilcoxon Signed-Rank Test).

Eine Stimulation von Osteozyten-ähnlichen MLO-Y4-Zellen mit SP führt ebenso wie die kombinierte Stimulation mit SP und dem spezifischen NK1R-Antagonisten nach einer Stimulationsdauer von 1 Stunde zu keiner wesentlichen Änderung der Apoptoserate der Zellen. Eine alleinige Stimulation mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 hat bei gleicher Stimulationsdauer hingegen eine signifikant verminderte Apoptoserate (Median: 96,90%; p = 0,0313) in Relation zu unstimulierten Kontrollzellen zur Folge. Ein ähnlicher, wenn auch nicht signifikanter Effekt lässt sich jedoch auch nach einstündiger Stimulation mit dem NK1R-Agonisten GR73632 beobachten (Median: 97,35%; p = 0,0938). Bei einer Stimulationsdauer von 4 Stunden führen Stimulationen mit SP oder mit den entsprechenden Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten weder allein noch in Kombination zu wesentlichen Änderungen der Apoptoserate. Nach 24 Stunden vergrößert eine Stimulation mit SP in einer Dosis von  $10^{-10}$  M die Apoptoserate der MLO-Y4-Zellen tendenziell (Median: 108,7%; p = 0,0938), während die kombinierte Stimulation mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 diesen Effekt jedoch nicht aufhebt, sondern stattdessen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate führt (Median: 106,5%; p = 0,0313). Eine alleinige Stimulation mit L733,060 über 24 Stunden hat eine tendenziell erhöhte Apoptose zur Folge (Median: 103,8%; p = 0,0625).

Die Apoptoserate der MLO-Y4-Zellen ist nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M nach 1 Stunde und nach 24 Stunden tendenziell erhöht im Vergleich zu unstimulierten Zellen (1 Stunde: Median: 106,4%; p = 0,0938 / 4 Stunden: Median: 103,5%; p = 0,3125 / 24 Stunden: Median: 106,4%; p = 0,0938). Durch spezifische Blockade der Neuropeptidrezeptoren mit dem entsprechenden Antagonisten konnten die beobachteten Effekte jedoch nur tendentiell inhibiert werden (1 Stunde: Median: 103,9%; p = 0,3125 / 4 Stunden: Median: 100,5; p > 0,9999 / 24 Stunden: Median: 103,9%; p = 0,3125). Stimulationen mit  $\alpha$ CGRP in der niedrigeren Konzentration ( $10^{-10}$  M) und alleinige Stimulationen mit dem  $\alpha$ CGRP-

Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> führten an keinem der Messzeitpunkte zu relevanten Veränderungen der Apoptoserate ( $p > 0,1$ ).

Insgesamt sind die beobachteten Veränderungen der Apoptoserate sehr gering. Die einzelnen Messwerte einer Gruppe zeigen zudem eine hohe Variabilität.

## 4.2.2. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Genexpression in MLO-Y4-Zellen

### 4.2.2.1. Genexpression in unstimulierten MLO-Y4-Zellen

Im Rahmen dieses Projekts wird der Einfluss der Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP und  $\alpha$ CGRP auf die Genexpression der Neuropeptide, deren Rezeptoren sowie der in Tabelle 3 aufgelisteten Osteozytenmarker analysiert. Initial wurde mittels qPCR die Expression dieser Gene in unstimulierten MLO-Y4-Zellen untersucht. Ein hoher Ct-Wert steht für eine geringe Expression, während ein niedriger Ct-Wert eine starke Expression ausdrückt.

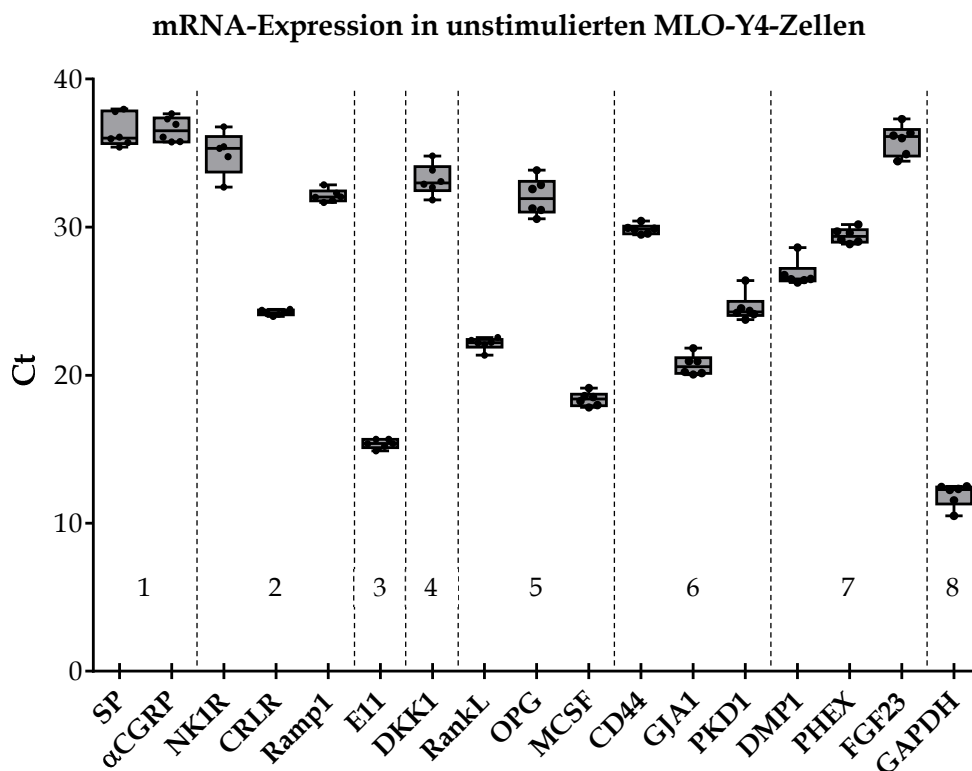
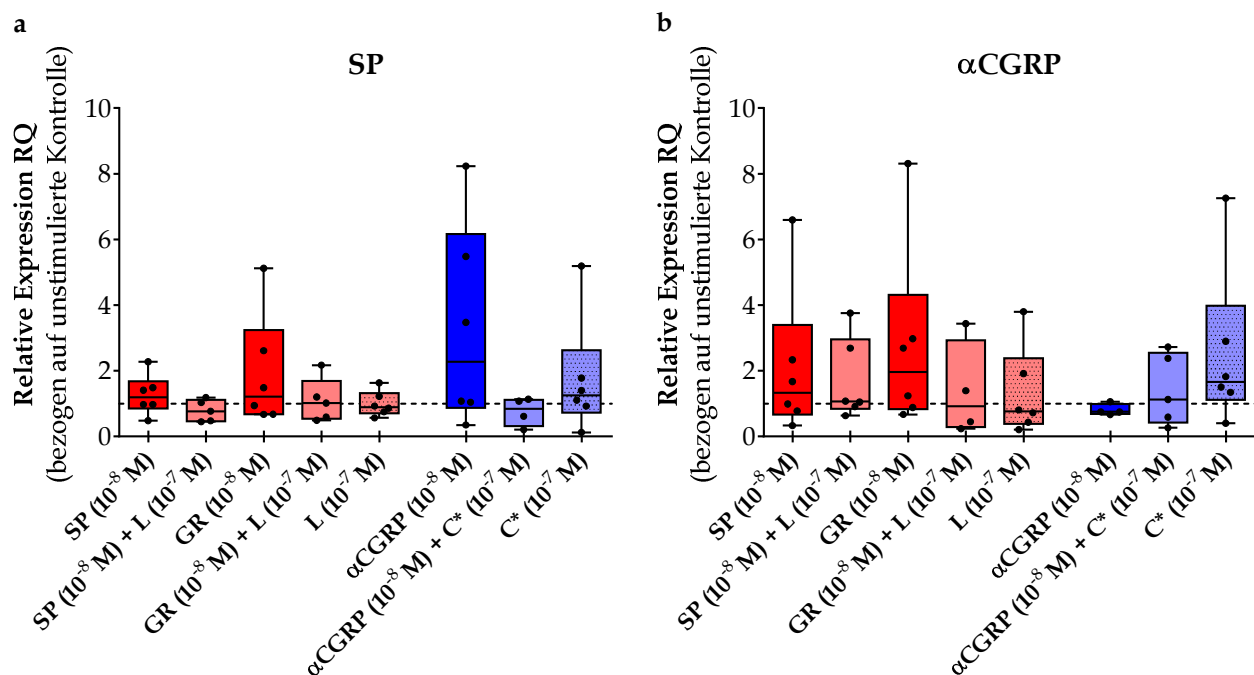


Abbildung 15: Expression der im Rahmen dieses Projekts untersuchten Gene in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten. Der Graph stellt die absoluten Ct-Werte der Expression von sensiblen Neuropeptiden (1), Rezeptoren für sensible Neuropeptide (2), einem Regulator der Osteozytenmorphologie (3), einem Regulator der Osteoblastogenese (4), Regulatoren der Osteoklastogenese (5), Mediatoren der Mechanorezeption (6), Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsels (7) und der endogenen Kontrolle (Referenzgen, 8) in unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten dar. n = 5 – 6.

MLO-Y4-Osteozyten exprimieren mRNA für die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf niedrigem Niveau (medianer Ct-Wert von SP: 36,03 / medianer Ct-Wert von  $\alpha$ CGRP: 36,52). Die Genexpression der Neuropeptidrezeptoren wurde bereits in Kapitel 4.1 beschrieben (medianer Ct-Wert von NK1R: 35,32 / medianer Ct-Wert von CRLR: 24,21 / medianer Ct-Wert von Ramp1: 32,04). Der Osteozytenmarker E11 wird in MLO-Y4-Zellen stärker exprimiert (medianer Ct-Wert von E11: 15,11). MLO-Y4-Osteozyten exprimieren ebenfalls verschiedene Regulatoren des Knochenumbaus. Während die Genexpression des Osteoblastogenese-Inhibitors DKK1 (medianer Ct-Wert von DKK1: 33,00) und des löslichen RankL-Rezeptors OPG (medianer Ct-Wert von OPG: 31,92) eher gering ist, weisen MLO-Y4-Zellen eine starke mRNA-Expression von RankL und MCSF auf (medianer Ct-Wert von RankL: 22,20 / medianer Ct-Wert von MCSF: 18,39). Der Osteoblastogenese-Inhibitor SOST wird in MLO-Y4-Zellen nicht oder nur geringfügig exprimiert (14), (237). In unseren Versuchen lagen die Ct-Werte von SOST stets über einem Wert von 38 oder die Expression war nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). In MLO-Y4-Osteozyten wird auf stabilem Niveau mRNA für die mechanorezeptorischen Proteine CD44, GJA1 und PKD1 transkribiert (medianer Ct-Wert von CD44: 29,88 / medianer Ct-Wert von GJA1: 20,58 / medianer Ct-Wert von PKD1: 24,29). Auch osteozytäre Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsels werden in MLO-Y4-Zellen exprimiert. Die Genexpression von DMP1 und PHEX ist mäßig, während FGF23 in MLO-Y4-Osteozyten nur geringfügig exprimiert wird (medianer Ct-Wert von DMP1: 26,51 / medianer Ct-Wert von PHEX: 29,39 / medianer Ct-Wert von FGF23: 36,11).

#### 4.2.2.2. Einfluss auf die Genexpression von sensiblen Neuropeptiden in vitro

MLO-Y4-Zellen exprimieren die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf mRNA-Ebene (Kapitel 4.2.2.1). Da für das Tachykinin-System ein autoregulatorischer Expressions-Loop in Knochenmarksmakrophagen nach Belastung beschrieben wurde (238), wurde der Einfluss der exogenen Stimulation mit SP und  $\alpha$ CGRP auf die endogene Genexpression der Neuropeptide in MLO-Y4-Osteozyten untersucht.



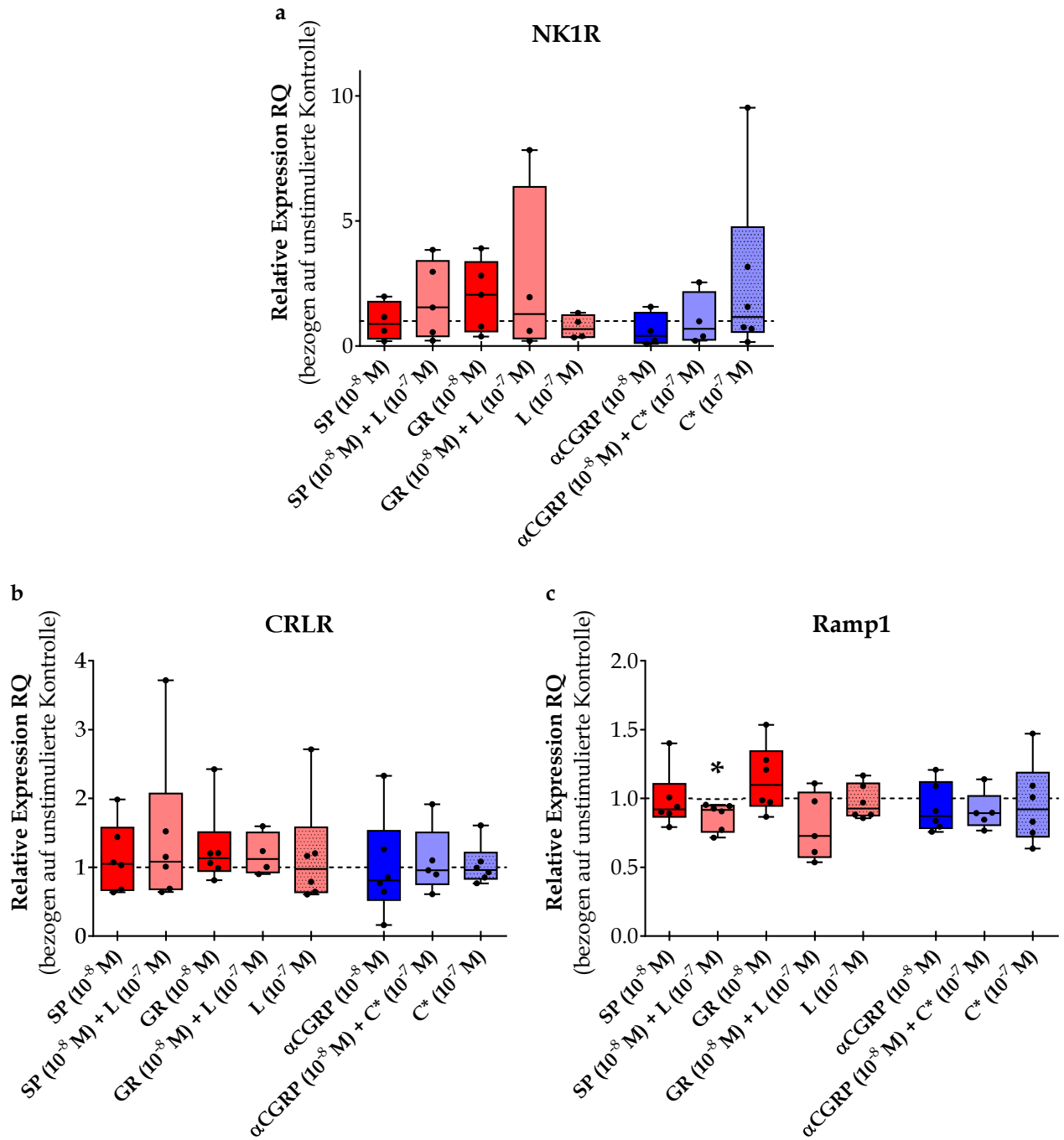
**Abbildung 16:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von SP (a) und  $\alpha$ CGRP (b) in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 4 – 6.

Die Genexpression von SP und  $\alpha$ CGRP wird durch Stimulation mit den Neuropeptiden wenig beeinflusst. Die Stimulation mit  $\alpha$ CGRP hat keine Änderung der Genexpression von SP zur Folge (Median: 2,273; p = 0,1563). Auch der SP-Rezeptor-Agonist GR73632 hat keinen Einfluss auf die Expression von mRNA für  $\alpha$ CGRP (Median: 1,964; p = 0,2500). Die Ko-Stimulation mit den jeweiligen Rezeptorinhibitoren führt ebenfalls zu keinen relevanten Veränderungen. Die endogene SP-Expression wird durch exogene Stimulation mit SP nicht beeinflusst. Die exogene Stimulation mit  $\alpha$ CGRP hat ebenfalls keinen Einfluss auf die endogene  $\alpha$ CGRP-Expression (p > 0,1).



#### 4.2.2.3. Einfluss auf die Genexpression von Neuropeptidrezeptoren in vitro

Nach dem Nachweis der Expression des SP-Rezeptors NK1R und des  $\alpha$ CGRP-Rezeptors – bestehend aus den Rezeptoruntereinheiten CRLR und Ramp1 – in MLO-Y4-Zellen (Kapitel 4.1) wurde untersucht, inwiefern die Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit SP und  $\alpha$ CGRP die Genexpression der Neuropeptidrezeptoren beeinflusst.



**Abbildung 17:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von NK1R (a), CRLR (b) und Ramp1 (c) in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 4 – 6. \* p < 0,05 (Wilcoxon Signed-Rank Test).

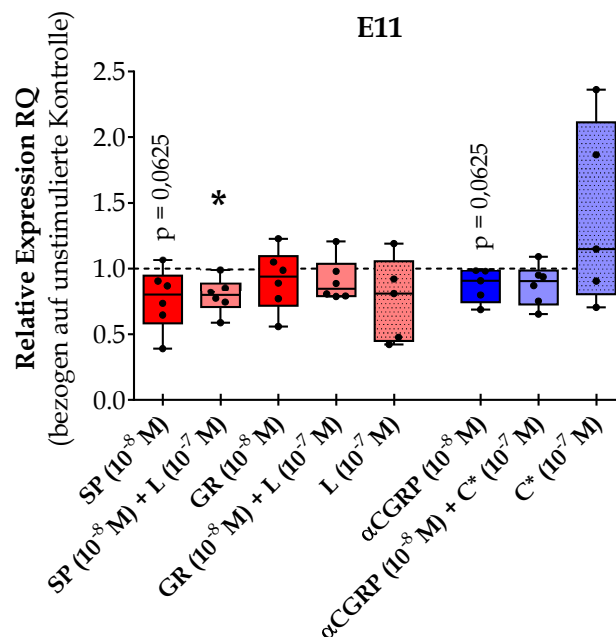
Die mRNA-Expression von NK1R wird weder durch Stimulation mit dem NK1R-Agonisten GR73632 (Median: 2,056; p = 0,3125) noch durch Stimulation mit SP und  $\alpha$ CGRP beeinflusst (SP: Median: 0,8890; p > 0,9999 /  $\alpha$ CGRP: Median: 0,4134; p = 0,3750) und durch Stimulation mit SP nicht beeinflusst.

Die Genexpression der  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponente CRLR ist nach allen durchgeführten Stimulationen unverändert im Vergleich zur Genexpression in unstimulierten MLO-Y4-Zellen (p > 0,1).

Während die alleinige Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit SP, dem NK1R-Agonisten GR73632 und dem NK1R-Antagonisten L733,060 die Genexpression der zweiten  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponente Ramp1 nicht wesentlich verändert (SP: Median: 0,9206; p = 0,5625 / GR73632: Median: 1,098; p = 0,4375 / L733,06: Median: 0,9264; p = 0,6875), führt die Ko-Stimulation mit SP und dem NK1R-Antagonist L733,060 zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression von Ramp1 in Relation zu unstimulierten Kontrollzellen (Median: 0,9163; p = 0,0313). Das Neuropeptid  $\alpha$ CGRP und der Rezeptorantagonist CGRP<sub>8-37</sub> beeinflussen weder bei alleiniger noch bei kombinierter Stimulation die Expression von Ramp1 in MLO-Y4-Zellen (p > 0,1).

#### 4.2.2.4. Einfluss auf die Genexpression eines Markers der Osteozytenmorphologie in vitro

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung vom Osteoblast zum Osteozyt ist die Ausbildung von Dendriten. Dem Protein E11 wird hierbei eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Kapitel 1.2.1). Wir untersuchten, ob SP und  $\alpha$ CGRP die Osteozytenmorphologie verändern können, indem wir die Auswirkungen der Stimulationen auf die Genexpression von E11 in MLO-Y4-Zellen analysierten.

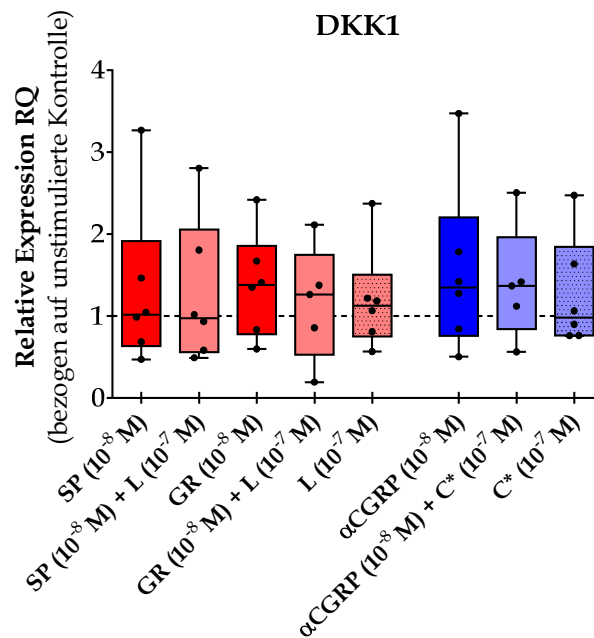


**Abbildung 18:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L), dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von E11 in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5 – 6.

Osteozyten-ähnliche Zellen der MLO-Y4-Zelllinie reagieren auf Stimulation mit SP und mit  $\alpha$ CGRP jeweils tendenziell mit einer Reduktion der Genexpression von E11 (SP: Median: 0,8011; p = 0,0625 /  $\alpha$ CGRP: Median: 0,9075; p = 0,0625). Die kombinierte Stimulation mit den jeweiligen Rezeptorantagonisten hebt die verminderte E11-Expression jedoch nicht oder nur teilweise auf (SP + L733,060: Median: 0,8001; p = 0,0313 /  $\alpha$ CGRP + CGRP<sub>8-37</sub>: Median: 0,9034; p = 0,1563). Die Stimulationen mit dem NK1R-Agonisten GR73632 führen ebenso wie die alleinigen Stimulationen mit den Rezeptorantagonisten zu keinen wesentlichen Veränderungen der Genexpression von E11 in MLO-Y4-Zellen (p > 0,1).

#### 4.2.2.5. Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoblastogenese in vitro

Über die Expression der inhibitorischen Moleküle SOST und DKK1 steuern Osteozyten die Osteoblastendifferenzierung und -aktivität und damit den Knochenumbau (Kapitel 1.2.2.1).

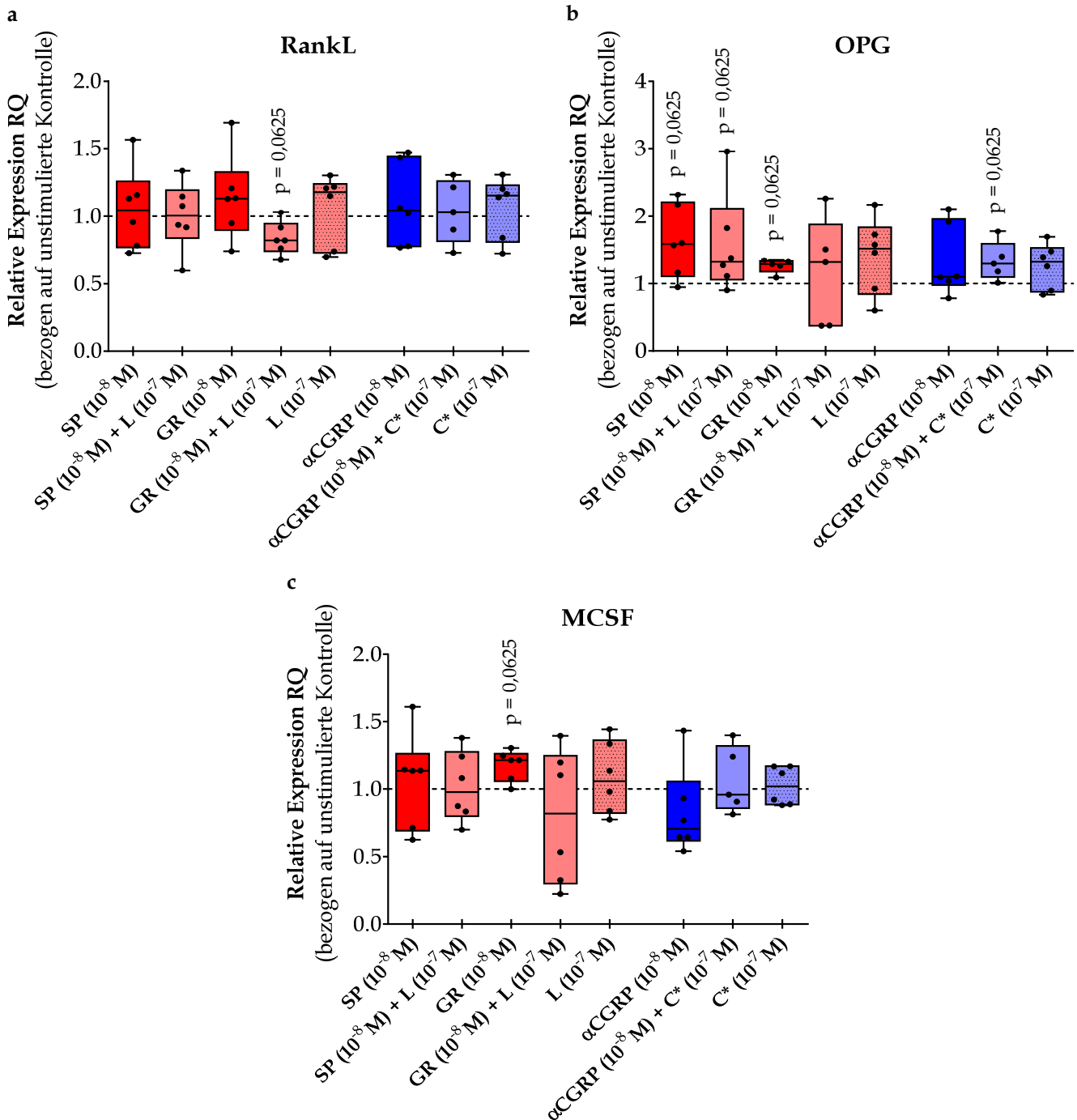


**Abbildung 19:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein oder zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von DKK1 in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5 – 6.

Die Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit SP,  $\alpha$ CGRP und GR73632 ergab keine wesentlichen Änderungen der Genexpression von DKK1 ( $p > 0,1$ ). Da SOST ausschließlich von reifen, fest in die Matrix eingebetteten Osteozyten exprimiert wird und die Zelllinie MLO-Y4 stattdessen junge, unreife Osteozyten repräsentiert (14), ist das Gen SOST in MLO-Y4-Zellen nur gering exprimiert (Kapitel 4.2.2.1). In unseren Versuchen lagen die Ct-Werte stets über einem Wert von 38, weshalb eine Analyse des Einflusses der sensiblen Neuropeptide auf die Genexpression von SOST nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2.6. Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoklastogenese in vitro

Osteozyten regulieren neben der Osteoblastogenese auch die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten über die Expression von RankL, OPG und MCSF (Kapitel 1.2.2.1).



**Abbildung 20:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein oder zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von RankL (a), OPG (b) und MCSF (c) in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5 – 6.

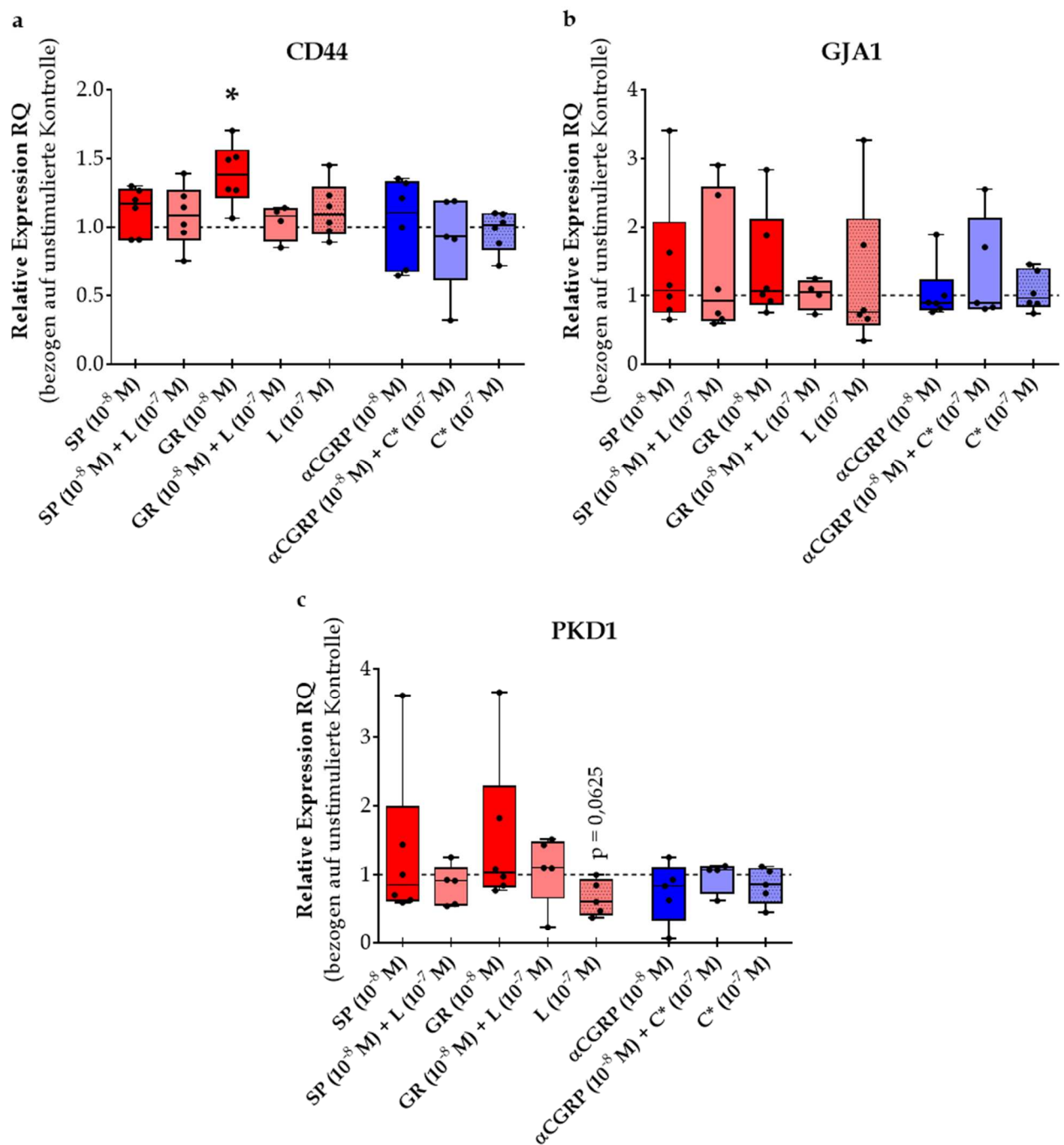
Weder die Stimulation mit SP und GR73632 noch mit  $\alpha$ CGRP führt zu Änderungen der Genexpression von RankL in MLO-Y4-Zellen ( $p > 0,1$ ). Die Stimulation der Zellen mit dem NK1R-Agonisten GR73632 zusammen mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 reduziert die Genexpression von RankL tendenziell (Median: 0,8207;  $p = 0,0625$ ).

Die Expression von OPG ist nach Stimulation mit SP allein und in Kombination mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 sowie nach Stimulation mit GR73632 tendenziell leicht erhöht (SP: Median: 1,586;  $p = 0,0625$  / SP + L733,060: Median: 1,325;  $p = 0,0625$  / GR73632: Median: 1,290;  $p = 0,0625$ ) und bleibt nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP unverändert ( $p > 0,1$ ). Jedoch führt die Stimulation mit  $\alpha$ CGRP in Kombination mit dem Antagonisten CGRP<sub>8-37</sub> tendenziell zu einer Erhöhung der Genexpression von OPG (Median: 1,299;  $p = 0,0625$ ).

MLO-Y4-Zellen exprimieren tendenziell mehr mRNA für MCSF nach Stimulation mit dem NK1R-Agonisten GR73632 (Median: 1,214;  $p = 0,0625$ ), während die Stimulation mit SP und  $\alpha$ CGRP sowie den Antagonisten keinen wesentlichen Effekt auf die Genexpression von MCSF hat ( $p > 0,1$ ).

#### 4.2.2.7. Einfluss auf die Genexpression von Mediatoren der Mechanorezeption in vitro

Osteozyten fungieren als Haupt-Mechanorezeptoren des Knochens (Kapitel 1.2.2.2). Das Tachykinin-System wurde bereits in Chondrozyten und Tenozyten als Mechanosensor beschrieben (239). Daher untersuchten wir den Einfluss der sensiblen Neuropeptide auf die Genexpression von drei Mediatoren, die für die osteozytäre Mechanorezeption relevant sind – CD44, GJA1 und PKD1.



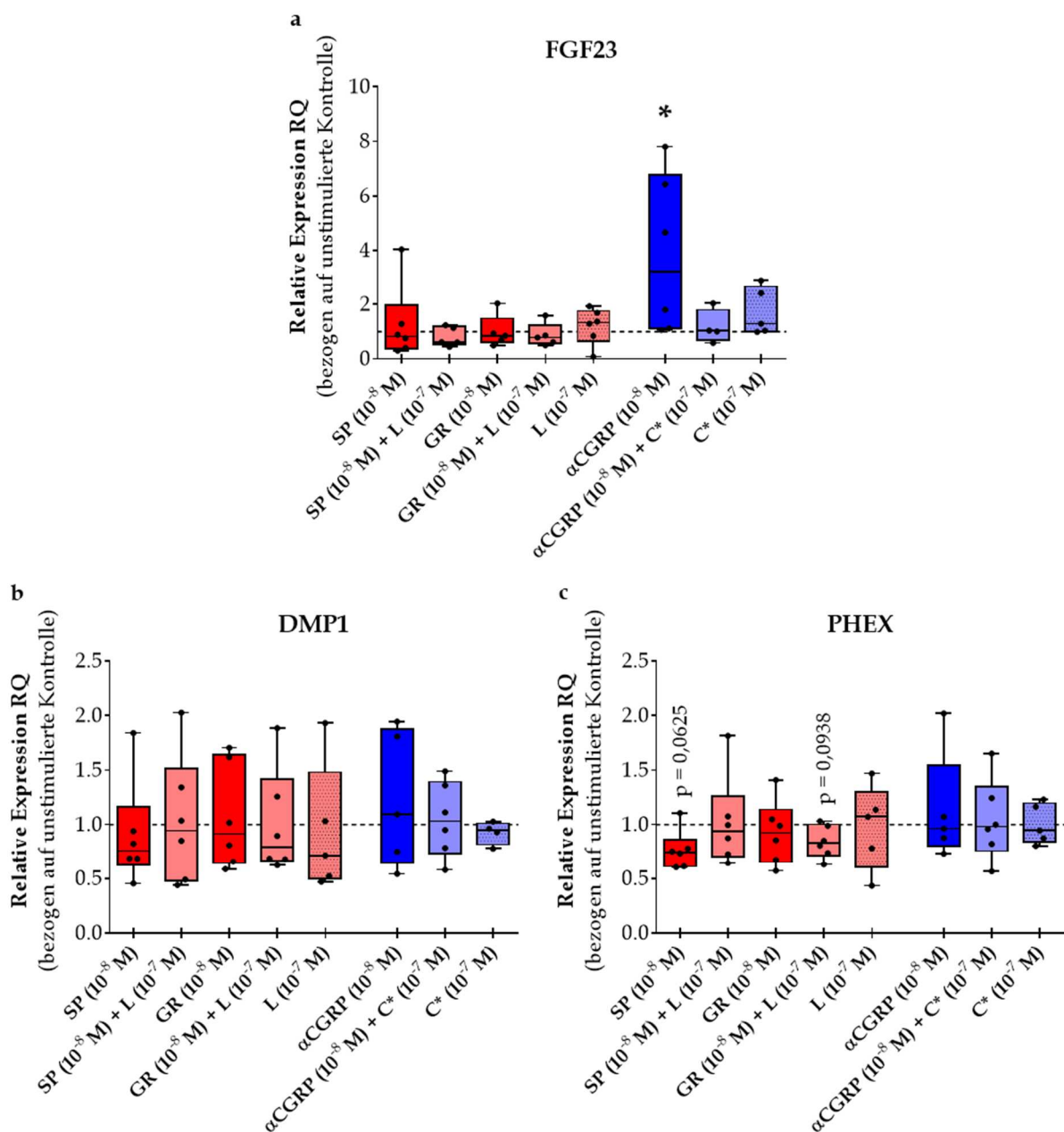
**Abbildung 21:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von CD44 (a), GJA1 (b) und PKD1 (c) in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5 – 6. \* p < 0,05 (Wilcoxon Signed-Rank Test).

Die Genexpression von CD44 wird durch Stimulation mit dem NK1R-Agonisten GR73632 signifikant erhöht (Median: 1,383; p = 0,0313). Die Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 führt zu einer tendenziell verminderten Genexpression von PKD1 (Median: 0,6029; p = 0,0625). Weitere Effekte auf die Expression von CD44, GJA1 und PKD1 wurden nach Stimulation mit SP, GR73632 und  $\alpha$ CGRP sowie den entsprechenden Rezeptorinhibitoren nicht beobachtet (p > 0,1).



#### 4.2.2.8. Einfluss auf die Genexpression von Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts in vitro

Osteozyten greifen durch endokrine Sekretion von FGF23 in den Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsel ein (Kapitel 1.2.2.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Genexpression von FGF23 sowie der regulatorischen Moleküle DMP1 und PHEX in MLO-Y4-Osteozyten untersucht.



**Abbildung 22:** Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und zusammen mit SP, dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, auf die Genexpression von FGF23 (a), DMP1 (b) und PHEX (c) in Relation zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 4 – 6. \* p < 0,05 (Wilcoxon Signed-Rank Test).

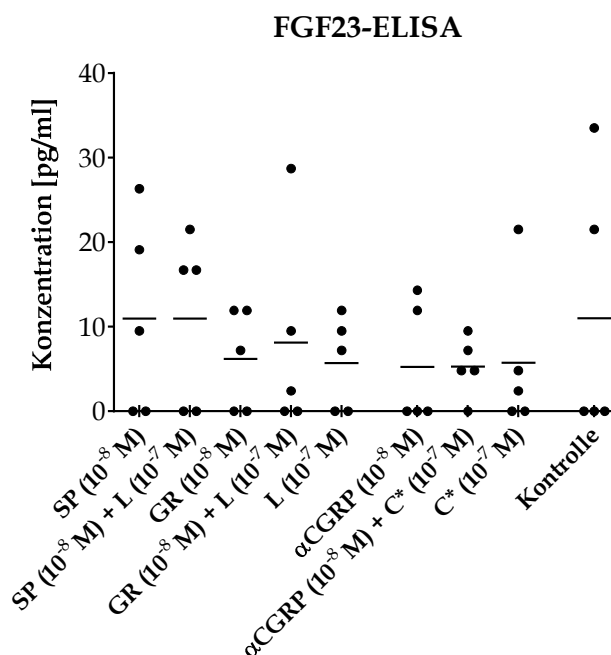
Nach Stimulation mit SP und GR73632 ist keine Veränderung der Genexpression von FGF23 erkennbar (p > 0,1). Die Stimulation mit  $\alpha$ CGRP induziert in MLO-Y4-Osteozyten einen signifikanten Anstieg der Genexpression von FGF23 um etwa das Dreifache (Median: 3,233; p = 0,0313). Die kombinierte Stimulation mit  $\alpha$ CGRP und dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorinhibitor CGRP<sub>8-37</sub> antagonisiert diesen Effekt (Median: 1,025; p = 0,6250), während die alleinige Stimulation mit CGRP<sub>8-37</sub> keine veränderte FGF23-Expression zur Folge hat (p > 0,1).

Die Genexpression des regulatorischen Moleküls DMP1 in MLO-Y4-Zellen wird durch die Neuropeptid-Stimulation nicht wesentlich beeinflusst (p > 0,1).

Die Stimulation mit SP hat eine tendenzielle Reduktion der Genexpression von PHEX zur Folge (Median: 0,7436; p = 0,0625), die durch Kombination mit dem NK1R-Antagonisten L733,060 inhibiert wird (Median: 0,9351; p = 0,6875). Die PHEX-Expression nach Stimulation mit GR73632 und  $\alpha$ CGRP ist hingegen im Wesentlichen unverändert zu den unstimulierten Kontrollen (p > 0,1).

### 4.2.3. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proteinexpression von FGF23 in MLO-Y4-Zellen

Da die Expression von FGF23 in MLO-Y4-Osteozyten nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP auf mRNA-Ebene signifikant hochreguliert wurde (Kapitel 4.2.2.8), wurde mittels FGF23-ELISA überprüft, ob dieser Effekt auf Proteinebene reproduzierbar ist. Hierfür wurde die FGF23-Konzentration im Nährmedium von unstimulierten MLO-Y4-Zellen und von mit Neuropeptiden und deren Rezeptorantagonisten stimulierten MLO-Y4-Zellen bestimmt.



**Abbildung 23:** Konzentration von FGF23 im Nährmedium von MLO-Y4-Osteozyten, die mit SP,  $\alpha$ CGRP, dem NK1R-Agonisten GR73632 (GR), dem NK1R-Antagonisten L733,060 (L) allein und zusammen mit SP und dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> (C\*) allein, sowie in Kombination, stimuliert wurden, und von unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten (Kontrolle). Die einzelnen Messwerte sind als Punkte dargestellt und eine horizontale Linie markiert den Median der Messwerte innerhalb einer Gruppe. n = 5.

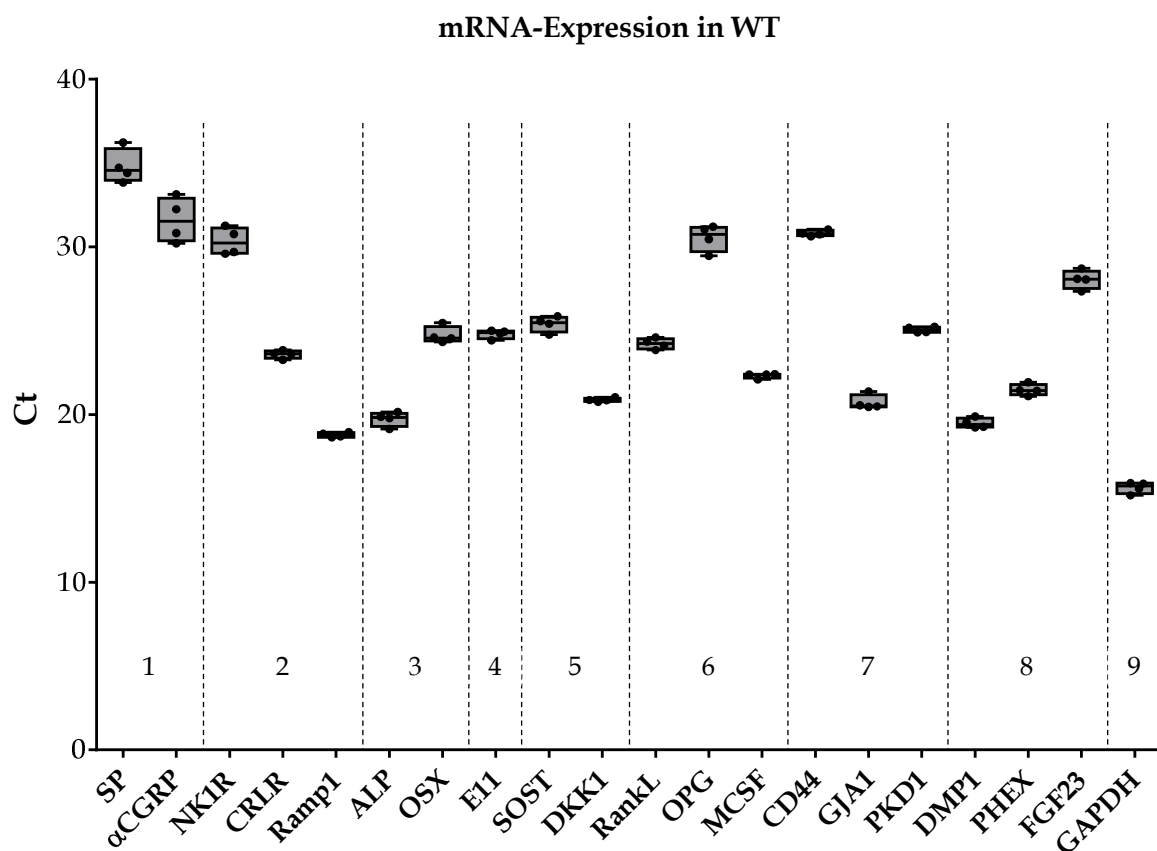
Jedoch waren die mittels FGF23-ELISA im Nährmedium der Zellen gemessenen Konzentrationen von FGF23 sehr niedrig und häufig konnte gar kein FGF23 detektiert werden. Aufgrund der nur minimalen Sekretion von FGF23 durch MLO-Y4-Osteozyten kann keine belastbare Aussage über den Einfluss der sensiblen Neuropeptide auf die FGF23-Expression von MLO-Y4-Zellen auf Proteinebene getroffen werden.

Da FGF23 nach extrazellulär sezerniert werden muss, um potenzielle Zielzellen im Organismus zu erreichen und relevante biologische Prozesse auszulösen (14), wurde die FGF23-Konzentration in unseren Versuchen im Nährmedium der MLO-Y4-Zellen bestimmt. Um zu überprüfen, ob die Stimulation der Zelllinie mit den Neuropeptiden SP und  $\alpha$ CGRP die Synthese von FGF23 beeinflusst, könnte in zukünftigen Studien der FGF23-ELISA mit Zelllysaten von MLO-Y4-Zellen wiederholt werden.

### 4.3. Einfluss der Abwesenheit von SP und $\alpha$ CGRP auf die Genexpression in murinen Röhrenknochen in vivo

#### 4.3.1. Genexpression in murinen Röhrenknochen aus Wildtyp-Mäusen

Um den Einfluss der Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf Osteozyten auch in vivo untersuchen zu können, wurde die Genexpression der sensiblen Neuropeptide, deren Rezeptoren und der in Tabelle 3 aufgelisteten Osteozytenmarker in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen,  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen mittels qPCR analysiert. Vor dem Vergleich der Genexpression in Knochen der verschiedenen Genotypen wurde die absolute Expression der zu untersuchenden Gene in Knochen von Wildtyp-Mäusen bestimmt. Ein hoher Ct-Wert steht für eine geringe Expression, während ein niedriger Ct-Wert eine starke Expression ausdrückt.



**Abbildung 24:** Expression der im Rahmen dieses Projekts untersuchten Gene in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen. Der Graph stellt die absoluten Ct-Werte der Expression von sensiblen Neuropeptiden (1), Rezeptoren für sensible Neuropeptide (2), Osteoblastenmarker (3), einem Regulator der Osteozytenmorphologie (4), Regulatoren der Osteoblastogenese (5), Regulatoren der Osteoklastogenese (6), Mediatoren der Mechanorezeption (7), Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsels (8) und der endogenen Kontrolle (Referenzgen, 9) in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen dar. n = 4.

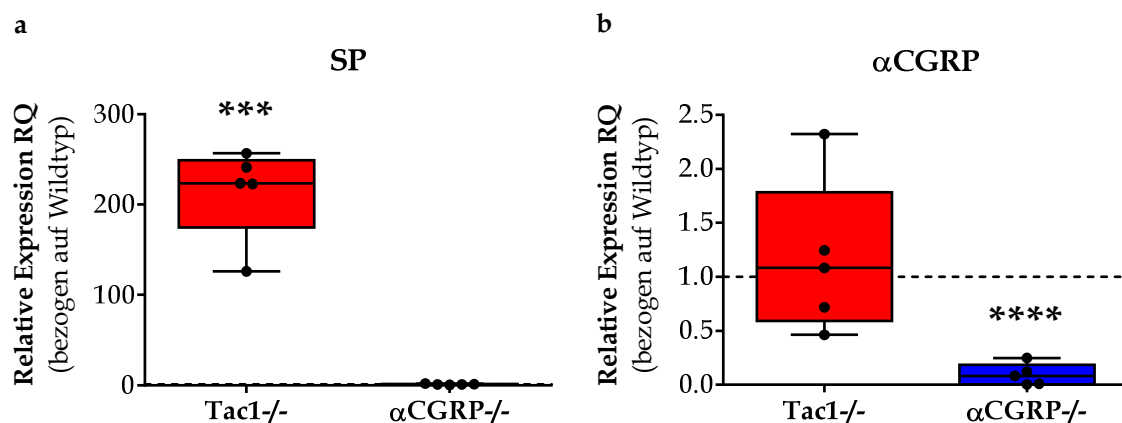
Im Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen werden die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP mäßig exprimiert (medianer Ct-Wert von SP: 34,58 / medianer Ct-Wert von  $\alpha$ CGRP: 31,53). Die Genexpression des SP-Rezeptors NK1R ist ebenfalls eher gering, während die  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponenten CRLR und Ramp1 eine höhere mRNA-Expression aufweisen (medianer Ct-Wert von NK1R: 30,23 / medianer Ct-Wert von CRLR: 23,62 / medianer Ct-Wert von Ramp1: 18,78). Im Knochen von Wildtyp-Mäusen werden die Osteoblasten-spezifischen Gene ALP und OSX ebenso wie der Osteozyten-spezifische Marker E11 stark exprimiert (medianer Ct-Wert von ALP: 19,82 / medianer Ct-Wert von OSX: 24,56 / medianer Ct-Wert von E11: 24,89). Die Genexpression der LRP-Antagonisten SOST und DKK1 und der Osteoklastogenese-Regulatoren RankL und MCSF liegt ebenfalls auf einem hohen Niveau, während mRNA für OPG im murinen Röhrenknochen nur mäßig exprimiert wird (medianer Ct-Wert von SOST: 25,49 / medianer Ct-Wert von DKK1: 20,86 / medianer Ct-Wert von RankL: 24,23 / medianer Ct-Wert von OPG: 30,75 / medianer Ct-Wert von MCSF: 22,39). Die Mediatoren der Mechanorezeption GJA1 und PKD1 werden im Knochen von Wildtyp-Mäusen stark und CD44 mäßig exprimiert (medianer Ct-Wert von GJA1: 20,52 / medianer Ct-Wert von PKD1: 25,05 / medianer Ct-Wert von CD44: 30,78). Auch Modulatoren des Vitamin-D-Stoffwechsels und des Phosphat-Haushalts werden in den Zellen von murinen Röhrenknochen auf mRNA-Ebene stabil exprimiert. Die Genexpression von DMP1 und PHEX ist hoch und die Genexpression von FGF23 ist mäßig (medianer Ct-Wert von DMP1: 19,41 / medianer Ct-Wert von PHEX: 21,43 / medianer Ct-Wert von FGF23: 28,07).

Aus den ermittelten absoluten Ct-Werten kann gefolgert werden, dass die aus den Knochen isolierte RNA nicht aus einer einzelnen Zellpopulation stammt. Die starke Genexpression von Osteoblastenmarkern (ALP, OSX) und von Markern für junge Osteozyten (E11, DMP1, PHEX) sowie für reife Osteozyten (SOST, FGF23) deutet

darauf hin, dass die isolierte RNA sowohl aus Osteoblasten als auch aus Osteozyten in allen Stadien der Osteozytogenese stammt.

### 4.3.2. Einfluss auf die Genexpression von sensiblen Neuropeptiden in vivo

Die Deletion von SP beziehungsweise  $\alpha$ CGRP in Mäusen führt zu einer kompensatorisch erhöhten Serumkonzentration des entsprechenden nicht-deletierten Neuropeptids (230). Daher wurde im Rahmen dieses Projekts die Expression der Neuropeptide im Knochen von Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen auf mRNA-Ebene untersucht.



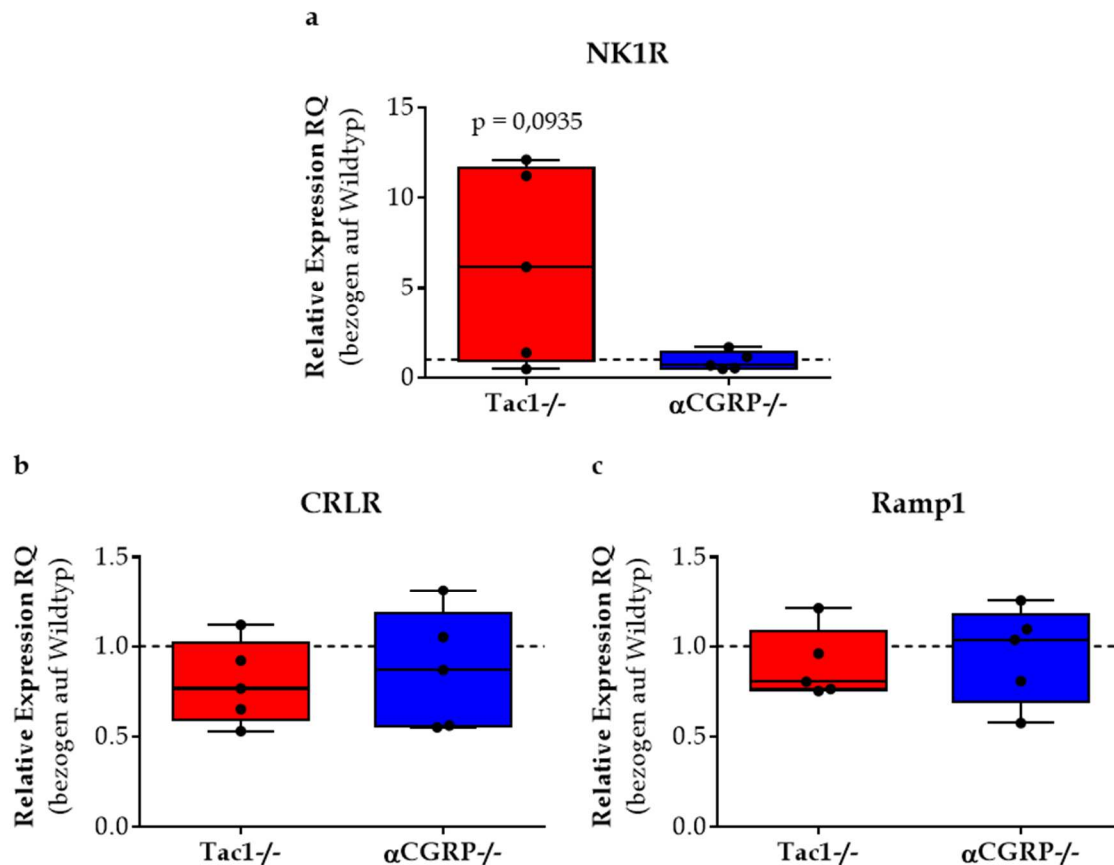
**Abbildung 25: Genexpression von SP (a) und  $\alpha$ CGRP (b) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5. \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 (One sample t test).**

Die Abwesenheit von SP beziehungsweise  $\alpha$ CGRP beeinflusst die Genexpression des jeweils anderen Neuropeptids im Knochen nicht (SP in  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>: Median: 1,029; p = 0,9085 /  $\alpha$ CGRP in Tac1<sup>-/-</sup>: Median: 1,166; p = 0,6311). Die Deletion von SP führt zu einer hochsignifikanten Hochregulierung der Genexpression eines zu SP ähnlichen Moleküls, dessen mRNA nach Umschreibung in cDNA von den SP-Primern erkannt wird (Median: 223,7; p = 0,0007). Bei diesem handelt es sich am wahrscheinlichsten um Hemokinin 1 (Kapitel 5.3).  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse weisen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine hochsignifikant verringerte Genexpression von  $\alpha$ CGRP auf (Median: 0,08163; p < 0,0001).



### 4.3.3. Einfluss auf die Genexpression von Neuropeptidrezeptoren in vivo

Es wurde der Einfluss der Abwesenheit von SP und  $\alpha$ CGRP in Mäusen auf die Genexpression des SP-Rezeptors NK1R und des  $\alpha$ CGRP-Rezeptordimers – bestehend aus den Untereinheiten CRLR und Ramp1 – in Knochenzellen untersucht.

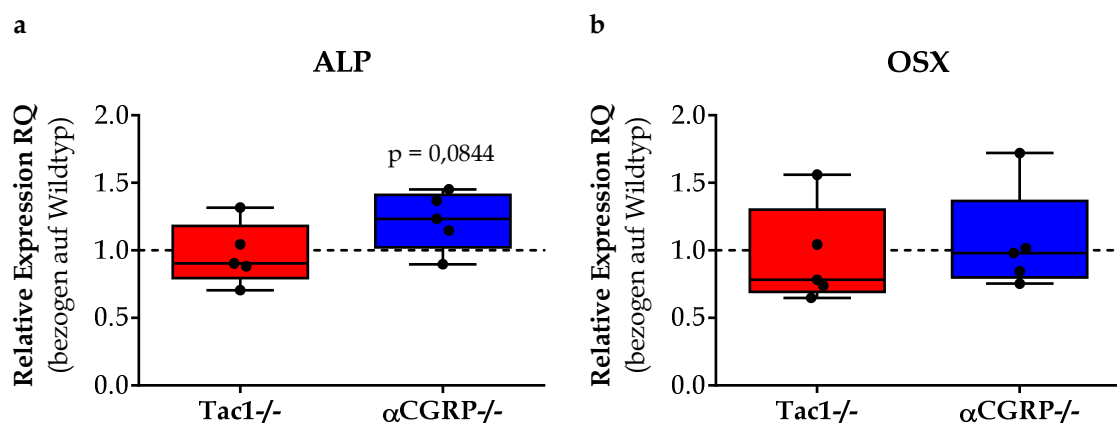


**Abbildung 26:** Genexpression von NK1R (a), CRLR (b) und Ramp1 (c) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5.

Tac1-Knockout-Mäuse exprimieren in Röhrenknochen tendenziell mehr mRNA für den SP-Rezeptor NK1R als Wildtyp-Mäuse (Median: 6,179;  $p = 0,0935$ ), während die Genexpression von NK1R in  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen nicht wesentlich verändert ist ( $p > 0,1$ ). Die Deletion von SP und  $\alpha$ CGRP führt zu keinen relevanten Regulierungen der Genexpression der  $\alpha$ CGRP-Rezeptoruntereinheiten CRLR und Ramp1 in murinen Röhrenknochen ( $p > 0,1$ ).

#### 4.3.4. Einfluss auf die Genexpression von Osteoblastenmarkern in vivo

Die aus murinen Röhrenknochen isolierte RNA stammt zu einem großen Teil aus Osteoblasten und Osteozyten (Kapitel 4.3.1). Es wurden zahlreiche Effekte von sensiblen Neuropeptiden auf die Differenzierung, Proliferation und Aktivität von Osteoblasten beobachtet (Kapitel 1.3.2.2 und 1.3.3.2). Zudem wurde beschrieben, dass Osteozyten möglicherweise zu funktionalen Osteoblasten dedifferenzieren können (240). Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die Anzahl beziehungsweise Aktivität der im Knochen vorhandenen Osteoblasten analysiert, indem die Genexpression der Osteoblastenmarker ALP und OSX in Röhrenknochen aus Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen mit denen aus Wildtyp-Mäusen verglichen wurde.

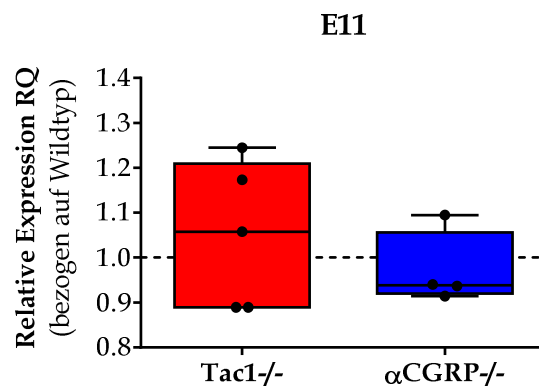


**Abbildung 27: Genexpression von ALP (a) und OSX (b) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5.**

Die Deletion von SP und  $\alpha$ CGRP führt zu keinen wesentlichen Veränderungen der Genexpression der Osteoblastenmarker ALP und OSX in murinen Röhrenknochen.

#### 4.3.5. Einfluss auf die Genexpression eines Markers der Osteozytenmorphologie in vivo

Das Transmembranprotein E11 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der osteozytären Dendriten und ist während der Osteozytogenese das früheste spezifisch in Osteozyten nachzuweisende Protein (Kapitel 1.2.1). Der Vergleich der Genexpression von E11 in Knochen aus Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen erlaubt daher Rückschlüsse auf den Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Osteozytenmorphologie (Dendritenausbildung) sowie auf die Osteozytogenese.

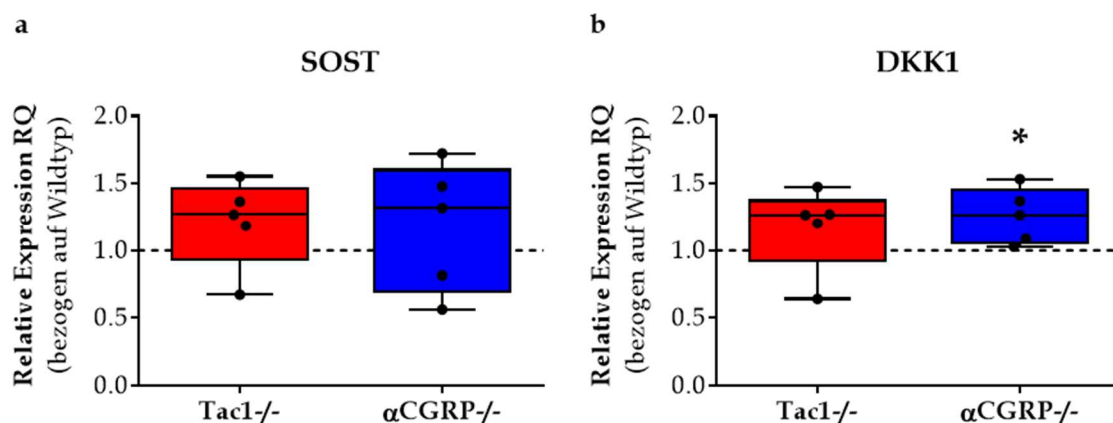


**Abbildung 28:** Genexpression von E11 in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 4 – 5.

Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse weisen keine veränderte Genexpression von E11, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, im Knochen auf ( $p > 0,1$ ).

#### 4.3.6. Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoblastogenese in vivo

Die Knochen von Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen zeigen eine vermehrte Sklerosierung verglichen mit den Knochen von Wildtyp-Mäusen (230). Um den Einfluss von Osteozyten auf die durch Abwesenheit von SP und  $\alpha$ CGRP induzierte Sklerosierung zu untersuchen, wurde die Genexpression von osteozytären Mediatoren, die die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten (Kapitel 4.3.7) regulieren, in murinen Knochen der unterschiedlichen Genotypen (Tac1<sup>-/-</sup>,  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>, Wildtyp) miteinander verglichen. Für die Analyse des Einflusses von SP und  $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Regulierung der Knochen-bildenden Osteoblasten wurde die Genexpression der LRP-Antagonisten SOST und DKK1 (Kapitel 1.2.2.1) in murinen Röhrenknochen untersucht.

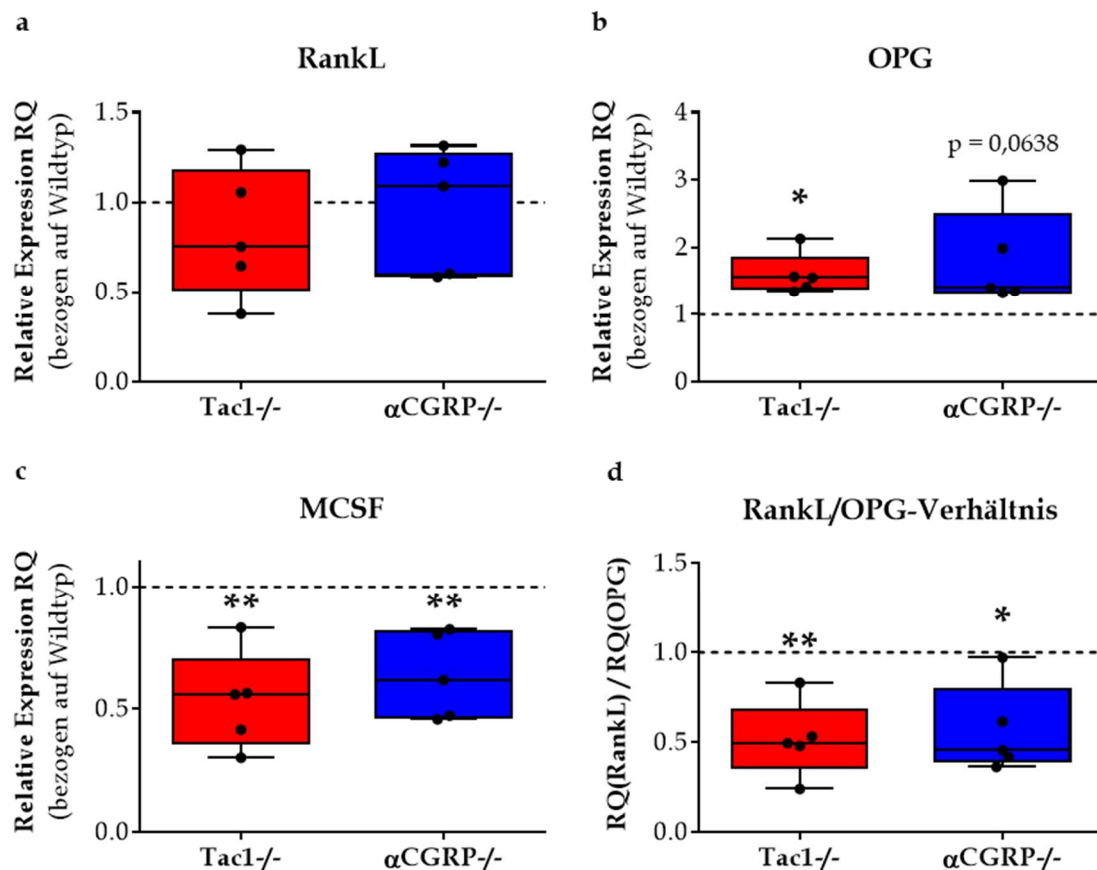


**Abbildung 29: Genexpression von SOST (a) und DKK1 (b) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5. \* p < 0,05 (One sample t test).**

Der Einfluss der Deletion von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Genexpression der osteozytären Osteoblastogenese-Inhibitoren SOST und DKK1 in murinen Röhrenknochen ist gering. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen weisen Tac1-Knockout-Mäuse keine wesentlichen Veränderungen der Genexpression von SOST und DKK1 auf (p > 0,1), während im Knochen aus  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen eine signifikant erhöhte Genexpression von DKK1 (Median: 1,268; p = 0,0488) bei unveränderter SOST-Expression (p > 0,1) zu beobachten ist.

### 4.3.7. Einfluss auf die Genexpression von Regulatoren der Osteoklastogenese in vivo

Osteozyten könnten durch SP- beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-vermittelte Veränderungen der Regulierung der Osteoklastogenese zum sklerotischen Knochenphänotyp in Tac1- beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen (230) beitragen. Um zu untersuchen, inwiefern die osteozytäre Regulierung von Osteoklasten durch SP und  $\alpha$ CGRP moduliert wird, wurde die Genexpression der von Osteozyten exprimierten Osteoklastogenese-Regulatoren RankL, OPG und MCSF (Kapitel 1.2.2.1) in murinen Röhrenknochen aus Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen mit denen aus Wildtyp-Mäusen verglichen.



**Abbildung 30: a – c: Genexpression von RankL (a), OPG (b) und MCSF (c) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (One sample t test).**

**d: Verhältnis der Genexpression von RankL und OPG in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) in Relation zum Verhältnis der Genexpression von RankL und OPG in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (One sample t test).**

Die Abwesenheit von SP und  $\alpha$ CGRP in vivo führt zu keinen relevanten Veränderungen der Genexpression von RankL im Knochen in Relation zu Wildtyp-Mäusen (p > 0,1). Die Genexpression von OPG im Knochen ist, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, in Tac1-Knockout-Mäusen signifikant erhöht und in  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen tendenziell erhöht (Tac1<sup>-/-</sup>: Median: 1,555; p = 0,0119 /  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>: Median: 1,401; p = 0,0638). Dies resultiert in einer signifikanten Reduktion des RankL/OPG-Verhältnisses im Knochen von Tac1- und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen in Relation auf das RankL/OPG-Verhältnis im Knochen von Wildtyp-Mäusen um etwa 50% (Tac1<sup>-/-</sup>: Median: 0,4961; p = 0,0068 /  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>: Median: 0,4565; p = 0,0167).

In Röhrenknochen sowohl von Tac1- als auch von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen wird hochsignifikant weniger mRNA für MCSF exprimiert als in Knochen von Wildtyp-Mäusen (Tac1<sup>-/-</sup>: Median: 0,5593; p = 0,0064 /  $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>: Median: 0,6184; p = 0,0096).

#### 4.3.8. Einfluss auf die Genexpression von Mediatoren der Mechanorezeption in vivo

Um den Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Mechanorezeption in vivo zu untersuchen, wurden Unterschiede in der Genexpression der osteozytären Mediatoren CD44, GJA1 und PKD1 (Kapitel 1.2.2.2) im Knochen von Tac1- beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen bestimmt.

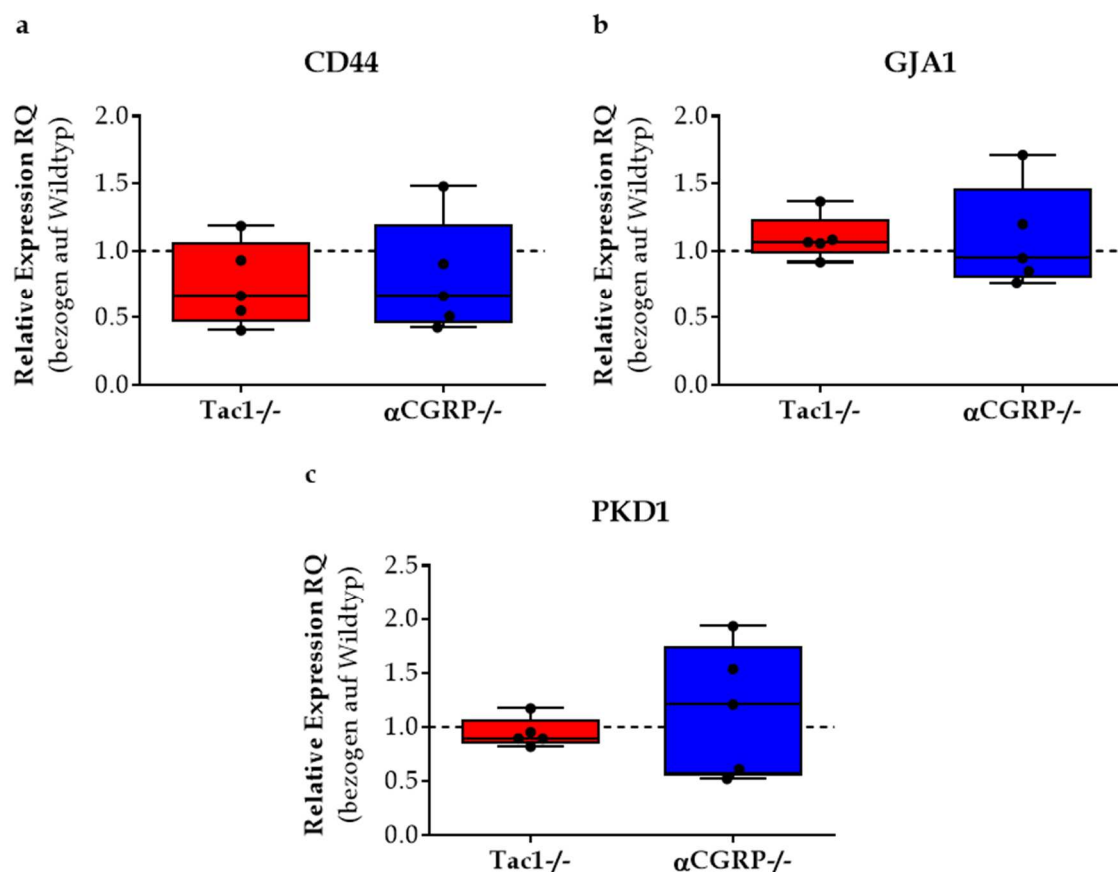
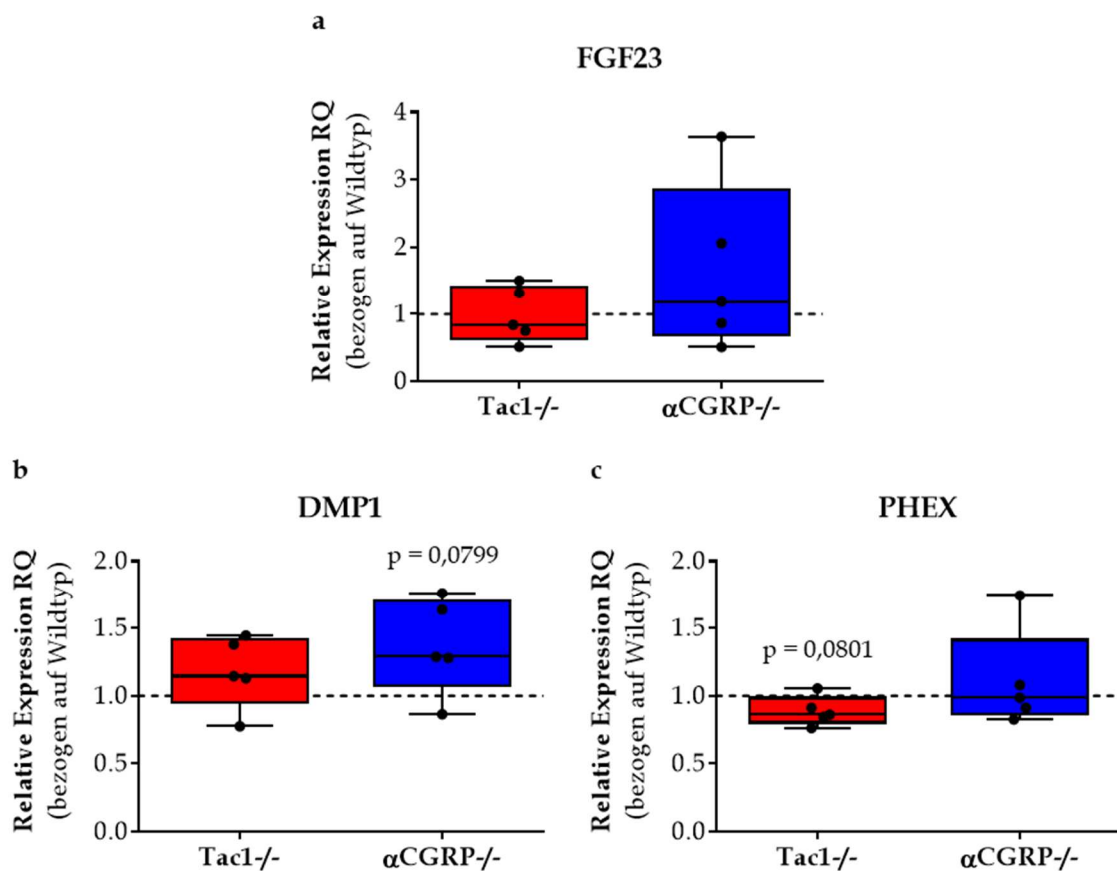


Abbildung 31: Genexpression von CD44 (a), GJA1 (b) und PKD1 (c) in Röhrenknochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (Tac1-/-) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP-/-) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von CD44, GJA1 und PKD1 zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt.

### 4.3.9. Einfluss auf die Genexpression von Modulatoren des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts in vivo

Osteozyten synthetisieren FGF23 und regulieren über dessen Sekretion den Vitamin-D-Phosphat-Stoffwechsel. Die Menge an synthetisiertem FGF23 wird in Osteozyten durch Expression von DMP1 und PHEX gesteuert (Kapitel 1.2.2.3). Im Rahmen dieses Projekts wurde untersucht, ob die Deletion von SP und  $\alpha$ CGRP die Genexpression von FGF23, DMP1 und PHEX in murinen Röhrenknochen beeinflusst.



**Abbildung 32:** Genexpression von FGF23 (a), DMP1 (b) und PHEX (c) in Röhrenknochen von SP-defizienten  $Tac1$ -Knockout-Mäusen ( $Tac1^{-/-}$ ) und  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen ( $\alpha$ CGRP $^{-/-}$ ) in Relation zur Genexpression in Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen (1, Kalibrator, gestrichelte Linie). Die Genexpression ist auf die endogene Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 5.

Die Genexpression von DMP1 ist in Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen tendenziell höher als in Knochen von Wildtyp-Mäusen (Median: 1,289; p = 0,0799). Im Knochen von  $Tac1$ -Knockout-Mäusen wird tendenziell weniger mRNA für PHEX exprimiert als im Knochen von Wildtyp-Mäusen (Median: 0,8879; p = 0,0801). Weitere



Unterschiede der Genexpression von FGF23, DMP1 und PHEX in Knochen von Tac1-beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurden nicht beobachtet ( $p > 0,1$ ).

## 5. Diskussion

SP und  $\alpha$ CGRP sind Neurotransmitter des sensiblen Nervensystems, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert werden und vielfältige Wirkungen auf den Organismus ausüben. Auch den Knochenstoffwechsel scheinen die beiden Neuropeptide maßgebend zu beeinflussen, wobei die exakten Mechanismen zu einem großen Teil noch unbekannt sind. Die vorliegende Studie soll zur Klärung einiger der noch offenen Fragen beitragen, indem der Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf Osteozyten-ähnliche Zellen untersucht wird.

### 5.1. Nachweis der Expression der Rezeptoren für SP und $\alpha$ CGRP in Osteozyten

Das sensible Neuropeptid SP greift durch Modulation der Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten aktiv in den Knochenstoffwechsel ein. Da diese Effekte durch den Rezeptor NK1R vermittelt werden, ist ein Nachweis von NK1R in Osteozyten die Voraussetzung für potenzielle SP-vermittelte Regulierungen in Osteozyten (164), (170), (171).

Wir konnten die Expression des NK1-Rezeptors in MLO-Y4-Osteozyten sowohl auf Genebene mittels qPCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen. Damit bestätigen unsere Ergebnisse die Studien von Goto et al. und Fristad et al., die ebenfalls zeigten, dass Osteozyten den SP-Rezeptor NK1R exprimieren (181), (182). Somit sind Osteozyten potenziell in der Lage, auf Exposition zu dem sensiblen Neuropeptid SP zu reagieren.

Die Diskrepanz zwischen geringer mRNA-Expression und starker Expression auf Proteinebene könnte durch ein ausgeprägtes intrazelluläres Recycling des NK1-Rezeptors erklärt werden (241). Hierfür spricht auch die sowohl in unseren Immunfluoreszenzfärbungen als auch von Goto et al. detektierte starke Immunreaktivität von NK1R im Zytoplasma (181). Auch in mRNA, die aus

Röhrenknochen von Wildtyp-Mäusen isoliert wurde, wurde nur eine schwache Genexpression von NK1R nachgewiesen.

Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen des NK1-Rezeptors, die möglicherweise unterschiedliche Effekte nach Aktivierung durch Tachykinine vermitteln (170). Da die in unseren Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper sowohl den full-length NK1R als auch den truncated NK1R erkennen, kann keine Aussage über die Verteilung der beiden Spleißvarianten in MLO-Y4-Osteozyten getroffen werden.

Das sensible Neuropeptid  $\alpha$ CGRP vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über ein Rezeptordimer, das aus dem 7TM-Rezeptor CRLR und dem Ko-Rezeptor Ramp1 besteht. Da Ramp1 durch Glykolysierung von CRLR dessen Ligandenspezifität herstellt und für den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche sowie für die Bindung eines Liganden unerlässlich ist, ist der Nachweis beider Rezeptorkomponenten in Osteozyten eine essenzielle Voraussetzung für potenzielle Reaktionen der Zellen auf Exposition zu  $\alpha$ CGRP (206), (207), (208). Die Expression von CRLR und Ramp1 wurde bereits in Osteoblasten und Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen nachgewiesen wurden (218), (219), (220), während bisher keine Untersuchungen bezüglich der Expression des  $\alpha$ CGRP-Rezeptors in Osteozyten publiziert wurden.

Wir konnten erstmalig die Expression der beiden  $\alpha$ CGRP-Rezeptoruntereinheiten CRLR und Ramp1 in MLO-Y4-Osteozyten auf Genebene und auf Proteinebene nachweisen. Mittels qPCR ermittelten wir höhere Ct-Werte für Ramp1 als für CRLR, entsprechend einer höheren Genexpression von CRLR als von Ramp1. Dies könnte dadurch begründet sein, dass CRLR neben Ramp1 noch für weitere Proteine der Ramp-Familie zur Bildung anderer Rezeptordimere (AM<sub>1</sub>- und AM<sub>2</sub>-Rezeptor) zur Verfügung steht, während Ramp1 hauptsächlich an CRLR und nur in geringem Ausmaß noch an CTR bindet (206), (207), (208), (209), (210). Auf Proteinebene konnte mittels Western Blotting und Immunfluoreszenzfärbungen für beide Rezeptorkomponenten eine stabile Expression in MLO-Y4-Osteozyten nachgewiesen werden. Sowohl für CRLR als auch für Ramp1 zeigte sich in spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen ein stärkeres Fluoreszenzsignal im Zytoplasma als in der Zellmembran. Die perinukleären Intensitätsmaxima des Fluoreszenzsignals

suggerieren, dass beide  $\alpha$ CGRP-Rezeptoruntereinheiten zu einem großen Teil getrennt voneinander im endoplasmatischen Retikulum vorliegen. Das zwar schwächere, aber dennoch eindeutig detektierbare Fluoreszenzsignal in der Umgebung der Zellmembran, lässt vermuten, dass ein kleinerer Teil der Rezeptorkomponenten als Rezeptorkonjugat CRLR/Ramp1 an die Zelloberfläche transportiert wird und für die Aktivierung durch den Liganden  $\alpha$ CGRP zur Verfügung steht (206), (207), (208). Auf Grundlage unserer Ergebnisse postulieren wir, dass Osteozyten in der Lage sind, Stimuli des sensiblen Neuropeptids  $\alpha$ CGRP über das Rezeptordimer CRLR/Ramp1 wahrzunehmen und entsprechend zu reagieren.

## 5.2. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Proliferation und Apoptose von Osteozyten

Zahlreiche Studien wiesen einen Einfluss von sensiblen Neuropeptiden auf die Zellteilung und den Zelltod von Osteoblasten und Osteoklasten nach (188), (231). Um entsprechende Effekte auch in Osteozyten offenzulegen, untersuchten wir, inwiefern eine Stimulation von Osteozyten-ähnlichen Zellen der Zelllinie MLO-Y4 mit SP, einem NK1R-Agonisten und einem NK1R-Antagonisten sowie mit  $\alpha$ CGRP und einem  $\alpha$ CGRP-Rezeptor-Antagonisten die Proliferation und Apoptose der Zellen beeinflusst. Nach Stimulation mit SP in hoher ( $10^{-8}$  M) und niedriger Konzentration ( $10^{-10}$  M) sowie dem entsprechenden Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zeigten sich bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden keine relevanten Veränderungen der Zellproliferation. In unseren Versuchen wurden die gleichen SP-Konzentrationen wie in früheren Studien, die einen positiven Effekt von SP auf die Proliferation von Osteoblasten-Vorläuferzellen nachweisen konnten, verwendet (185), (188), (193). Die Zellteilung von reifen Osteoblasten wurde in einer Studie von Wang et al. durch SP hingegen nicht beeinflusst (185). Vor diesem Hintergrund erscheint es logisch, dass die Proliferation von Osteozyten-ähnlichen MLO-Y4-Zellen, die Zellen in einer noch weiter fortgeschrittenen Differenzierungsphase als reife Osteoblasten repräsentieren (14), ebenfalls nicht in relevantem Ausmaß durch SP verändert wird. Auch die Apoptoserate von MLO-Y4-Osteozyten war in unseren Versuchen nach Stimulation mit SP in beiden Konzentrationen ( $10^{-8}$  M und  $10^{-10}$  M) zu allen gemessenen Zeitpunkten (nach Stimulation für 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden) weitgehend unverändert im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Der spezifische NK1R-Antagonist L733,060 erhöhte jedoch bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden die Apoptoserate in MLO-Y4-Zellen tendenziell. Dies könnte auf eine antiapoptotische Wirkung von SP bei hinreichend langer Expositionsdauer hindeuten. Niedermair et al. beschrieben eine erhöhte Apoptoserate in Osteoblasten aus SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen (231). Auch Yang et al. gehen von einer SP-vermittelten Hemmung der Apoptose in Osteoblasten aus (242). Jedoch war die in unseren Stimulationsversuchen beobachtete Veränderung der Apoptoserate nur gering und konnte bei kombinierter Stimulation

mit dem NK1R-Antagonisten und SP nicht kompensiert werden. Der Einfluss von SP auf die Proliferation und Apoptose von Osteozyten wurde in bisherigen Studien nicht untersucht. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die überlebensfördernde Wirkung von SP auf Osteoblasten mit weiter fortschreitender Differenzierung der Zellen abnimmt oder sogar verloren geht.

Das sensible Neuropeptid  $\alpha$ CGRP beeinflusste in unseren Stimulationsversuchen weder die Proliferation noch die Apoptose der Osteozyten-ähnlichen Zelllinie MLO-Y4 wesentlich. In diesen Punkten scheinen sich Osteozyten von Zellen in weniger fortgeschrittenen Differenzierungsphasen der Osteoblastenlinie zu unterscheiden. BMSCs sichern in Gegenwart von  $\alpha$ CGRP ihren Fortbestand durch Erhöhung ihrer Proliferationsrate bei gleichzeitiger Verminderung ihrer Apoptoserate, wobei die BMSCs jedoch zum Teil erst nach mehrtägiger Stimulation mit Veränderungen der Proliferations- und Apoptoserate reagierten, während in unseren Versuchen die Stimulationsdauer der MLO-Y4-Osteozyten nur maximal 24 Stunden betrug (220), (224), (225). Auch in reifen Osteoblasten, die sich hinsichtlich des Differenzierungsgrads zwischen BMSCs und jungen MLO-Y4-Osteozyten befinden, scheint  $\alpha$ CGRP zum einen die Proliferation zu fördern und zum anderen eine antiapoptotische Wirkung zu haben (224), (243). Unsere Daten suggerieren, dass der Einfluss von  $\alpha$ CGRP auf die Zellteilung und den Zelltod mit weiter fortschreitender Differenzierung hin zu jungen Osteozyten schwindet.

### 5.3. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die endogene Expression sensibler Neuropeptide und deren Rezeptoren in Osteozyten

Die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP werden in einer Vielzahl von Zellen aus neuronalen und nicht-neuronalen Geweben exprimiert (174), (213), (214). Auch Zellen des muskuloskelettalen Systems, wie beispielsweise Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten, synthetisieren und sezernieren sensible Neuropeptide (231), (244). Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob auch Osteozyten in der Lage sind, SP und  $\alpha$ CGRP selbst zu synthetisieren.

Unsere Versuche zeigten sowohl für SP als auch für  $\alpha$ CGRP eine schwache mRNA-Expression in unstimulierten Osteozyten-ähnlichen Zellen der Zelllinie MLO-Y4. Daher scheinen Osteozyten die Fähigkeit aufzuweisen, die sensiblen Neuropeptide potenziell selbst zu synthetisieren. Auf die Untersuchung der Sekretion von SP und  $\alpha$ CGRP auf Proteinebene wurde aber aufgrund der nur sehr schwachen Expression auf mRNA-Ebene (Ct-Werte in der qPCR lagen für beide Neuropeptide über einem Wert von 35) verzichtet. Um zu untersuchen, ob trotz niedriger Expression auf mRNA-Ebene eine relevante Proteinexpression von SP und  $\alpha$ CGRP vorliegt, könnten in zukünftigen Studien die Neuropeptidkonzentrationen in Zelllysaten oder Überständen von MLO-Y4-Zellen mittels spezifischer ELISA ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden die Einflüsse der Stimulationen von MLO-Y4-Osteozyten mit SP und  $\alpha$ CGRP auf die endogene Genexpression der Neuropeptide analysiert, um mögliche autoregulatorische Prozesse offenzulegen. Eine exogene Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP, einem NK1R-Agonisten und einem NK1R-Antagonisten hatte keinen Einfluss auf die endogene SP-Expression. Somit scheint die Stimulation mit SP in Osteozyten nicht zur selben Reaktion zu führen wie in Knochenmarksmakrophagen, die nach exogener SP-Stimulation ohne mechanische Belastung eine tendenziell und mit mechanischer Belastung eine signifikant verringerte endogene SP-Expression aufweisen (238). Die endogene  $\alpha$ CGRP-Expression wurde in MLO-Y4-Osteozyten durch exogene Stimulation mit  $\alpha$ CGRP und einem  $\alpha$ CGRP-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls nicht beeinflusst. Auch die endogene Expression des jeweils anderen Neuropeptids wurde durch exogene Stimulation mit

SP und  $\alpha$ CGRP nicht wesentlich verändert. Zudem konnten wir in vivo keine Regulierung der Expression von  $\alpha$ CGRP im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen und keine Regulierung der Expression von SP im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen nachweisen. Muschter et al. stellten jedoch in Tac1-Knockout-Mäusen eine erhöhte Serumkonzentration von  $\alpha$ CGRP und in  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen eine erhöhte Serumkonzentration von SP fest (230). Da unsere Ergebnisse gegen eine parakrine oder autokrine Regulierung der endogenen Neuropeptid-Expression in Knochenzellen sprechen, postulieren wir, dass Knochenzellen nicht zur kompensatorisch erhöhten Serumkonzentration von SP beziehungsweise  $\alpha$ CGRP bei Deletion des jeweils anderen Neuropeptids beitragen. Es ist naheliegend, dass es stattdessen stärkere Neuropeptid-assoziierte Autoregulationsmechanismen in anderen Zellarten geben muss.

Wir konnten mittels qPCR im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen eine signifikante Hochregulierung der Genexpression eines mit SP verwandten Peptids, dessen mRNA nach Umschreibung in cDNA von den SP-Primern erkannt wird, feststellen. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen wird die Expression dieses Peptids im Knochen durch Deletion von SP um mehr als 200-fach erhöht. Wir gehen davon aus, dass es sich bei dem detektierten Peptid um Hemokinin 1 – ein mit SP eng verwandtes Mitglied der Tachykinin-Familie, das durch das Gen Tac4 kodiert wird und daher in Tac1-Knockout-Mäusen exprimiert wird, handelt (169). Da Hemokinin 1 hinsichtlich seiner Primärstruktur große Ähnlichkeiten mit der Aminosäuresequenz von SP aufweist, sehen wir eine Erkennung von Hemokinin 1 durch die SP-Primer als sehr wahrscheinlich an (245). Ein ähnliches Phänomen wurde von Niedermair et al. beschrieben, die im Serum von Tac1-Knockout-Mäusen ein zu SP ähnliches Peptid, bei dem es sich am wahrscheinlichsten ebenfalls um Hemokinin 1 handelt, detektierten (231). Hemokinin 1 vermittelt seine Wirkung wie auch SP hauptsächlich durch den NK1-Rezeptor und scheint agonistisch zu SP zu agieren (164), (170), (171), (245). Unsere Daten suggerieren eine starke Hochregulierung von Hemokinin 1 im Knochen durch die Deletion von SP. Ein Knockout des Gens Tac1 könnte also in Knochenzellen kompensatorisch zu einer vermehrten Transkription des Gens Tac4 und somit im Sinne eines starken Regulationsmechanismus innerhalb der Tachykinin-Familie zu einer vermehrten Expression von Hemokinin 1 führen.



Neben dem Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf die endogene Neuropeptid-Expression in Osteozyten wurden im Rahmen dieser Studie auch potenzielle Neuropeptid-induzierte Änderungen der Expression der entsprechenden Rezeptoren analysiert. Effekte der Neuropeptid-Stimulation auf die Expression von Neuropeptid-Rezeptoren wurden bereits in anderen Zellen beschrieben. Muschter et al. detektierten in murinen Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit SP eine verminderte Genexpression des SP-Rezeptors NK1R und nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP eine verminderte Genexpression von Ramp1 bei jedoch erhöhter Genexpression der anderen  $\alpha$ CGRP-Rezeptoruntereinheit CRLR unter mechanischer Belastung (238). Backman et al. beschrieben auch in Tenozyten eine verminderte Expression des NK1-Rezeptors nach exogener Stimulation mit SP (246).

Wir konnten im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen eine verglichen mit Wildtyp-Mäusen tendenziell um etwa das 5-fache erhöhte mRNA-Expression von NK1R feststellen. Diese Daten implizieren eine ähnliche inhibitorische Wirkung von SP auf die SP-Rezeptor-Expression in Knochenzellen wie in Knochenmarksmakrophagen und in Tenozyten (238), (246). In vitro zeigten sich in MLO-Y4-Osteozyten hingegen keine relevanten Veränderungen der NK1R-Expression nach Stimulation mit SP, wobei sich die in unseren Stimulationsversuchen verwendete SP-Konzentration ( $10^{-8}$  M) von der von Muschter et al. ( $10^{-10}$  M) und Backman et al. ( $10^{-7}$  M) verwendeten SP-Konzentration unterscheidet (238), (246). Das sensible Neuropeptid  $\alpha$ CGRP scheint basierend auf unseren Ergebnissen keinen Einfluss auf die NK1R-Expression in Knochenzellen zu haben.

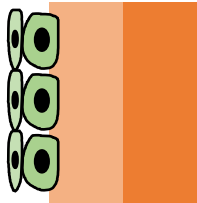
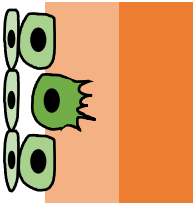
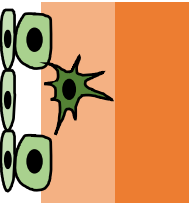
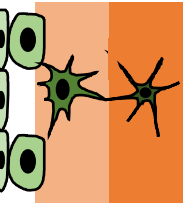
Die Genexpression der beiden  $\alpha$ CGRP-Rezeptor-Untereinheiten CRLR und Ramp1 unterschied sich weder in mit  $\alpha$ CGRP stimulierten MLO-Y4-Osteozyten noch im Knochen aus  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen im Vergleich zur Genexpression in nicht stimulierten MLO-Y4-Osteozyten beziehungsweise im Knochen von Wildtyp-Mäusen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Anwesenheit des Liganden  $\alpha$ CGRP die Expression seines Rezeptors in Osteozyten nicht beeinflusst. Auch in Knochenmarksmakrophagen konnten nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP in der auch in unseren Versuchen verwendeten Konzentration von  $10^{-8}$  M keine signifikanten Regulierungen von CRLR und Ramp1 beobachtet werden. Nur unter mechanischer Belastung reagierten Knochenmarksmakrophagen auf die Präsenz von  $\alpha$ CGRP mit

einer erhöhten Expression der  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponente CRLR (238). Die Untersuchung der Expression der Neuropeptid-Rezeptoren in Osteozyten unter mechanischer Belastung war jedoch im Rahmen der vorliegenden Studie nicht vorgesehen.

Zusammenfassend suggerieren unsere Ergebnisse, dass Osteozyten potenziell in der Lage sind, die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP selbst zu synthetisieren. Unsere Daten lassen auf einen Regulationsmechanismus der endogenen Neuropeptid-Expression in Knochenzellen schließen. Der Knockout des für SP kodierenden Gens führt im murinen Knochen zu einer starken Hochregulierung der Genexpression eines zu SP verwandten Mitglieds der Tachykinin-Familie, bei dem es sich am wahrscheinlichsten um Hemokinin 1 handelt. Das sensible Neuropeptid SP scheint die Expression seines Rezeptors NK1R in Knochenzellen zu inhibieren, während die Expression der  $\alpha$ CGRP-Rezeptorkomponenten CRLR und Ramp1 durch Präsenz ihres Liganden  $\alpha$ CGRP nicht beeinflusst wird.

## 5.4. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Differenzierung und Morphologie von Osteozyten

Sensible Neuropeptide modulieren die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten (188), (189), (220), (224), (225). Da sich reife Osteoblasten durch weitere Differenzierung zu Osteozyten weiterentwickeln, untersuchten wir, ob die weitere Differenzierung von jungen Osteozyten ebenfalls durch SP und  $\alpha$ CGRP beeinflusst wird. Hierfür wählten wir aus jedem Stadium der Osteozytogenese ein bis zwei charakteristische Marker aus (Tabelle 1). Die Genexpression dieser Marker wurde im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und im Knochen von Wildtyp-Mäusen verglichen. Entsprechende Unterschiede wurden in Tabelle 14 dargestellt, um mögliche Umverteilungen der osteozytären Differenzierungsstadien in Knockout-Mäusen offenzulegen.

	Osteoblast		Osteoid-Osteozyt		mineralisierender Osteozyt	reifer Osteozyt	
							
	ALP	OSX	E11	PHEX	DMP1	SOST	FGF23
Tac1 <sup>-/-</sup>	→	→	→	→	→	→	→
$\alpha$ CGRP <sup>-/-</sup>	(↑)	→	→	→	(↑)	→	→

**Tabelle 14: Unterschiede der Expression von charakteristischen Markergenen der verschiedenen Differenzierungsstadien vom Osteoblast zum reifen Osteozyt im Knochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen beziehungsweise  $\alpha$ CGRP-defizienten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen (→: Genexpression in Knockout- und Wildtyp-Mäusen ist im Wesentlichen gleich, (↑): Genexpression in Knockout-Mäusen ist tendenziell höher als in Wildtyp-Mäusen).**

Unsere Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Expression der Markergene im Knochen von Knockout- und Wildtyp-Mäusen für jede untersuchte

Differenzierungsphase von Osteoblasten und Osteozyten. Somit ist in der mRNA, die aus gesamten Knochen isoliert wurde und daher aus verschiedenen Zellarten und ihren unterschiedlichen Differenzierungsstufen stammt, durch Knockout von SP oder  $\alpha$ CGRP kein Differenzierungsstadium der Osteoblastenlinie über- oder unterrepräsentiert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann kein Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Differenzierung von jungen Osteozyten nachgewiesen werden. Frühere Studien beschrieben, dass reife Osteozyten unter bestimmten Voraussetzungen wieder Markergene aus früheren Differenzierungsphasen exprimieren können und möglicherweise sogar wieder zu Osteoblasten dedifferenzieren können (33). Eine Induktion der Dedifferenzierung von reifen Osteozyten durch die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP konnte durch unsere Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Von besonderem Interesse hinsichtlich der Differenzierung vom Osteoblasten zum jungen Osteozyten ist das Markergen E11, das im frühesten Differenzierungsstadium von Osteozyten exprimiert wird (23). Die in unseren qPCR-Untersuchungen ermittelte hohe Genexpression von E11 in MLO-Y4-Osteozyten unterstreicht, dass MLO-Y4-Osteozyten unreife Osteozyten repräsentieren (14). Die Genexpression von E11 in MLO-Y4-Osteozyten wurde jedoch durch Stimulation mit den sensiblen Neuropeptiden nicht wesentlich beeinflusst. In vivo führte der Knockout der Gene für SP und  $\alpha$ CGRP ebenfalls zu keinen Veränderungen der Genexpression von E11 im murinen Knochen. Da das Transmembranprotein E11 eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von Dendriten während der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten spielt, ergibt sich durch unsere Ergebnisse kein Anhalt für eine durch E11 vermittelte Veränderung der Morphologie von Osteozyten durch die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP (23), (24).

## 5.5. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Modulation des Knochenumbaus

Osteozyten werden als die Hauptregulatoren des Knochenumbaus angesehen. Sie sind in der Lage, die Differenzierung sowohl von Osteoblasten zu inhibieren – vermittelt durch die LRP-Antagonisten DKK1 und SOST – sowie von Osteoklasten zu modulieren – vermittelt durch die die Osteoklastogenese stimulierenden Moleküle MCSF und RankL und durch das inhibitorische Protein OPG (15).

Ein Kernthema des vorliegenden Projekts war die Frage, ob und inwiefern das sensible Neuropeptid SP die osteozytär vermittelte Knochenmodulation beeinflusst. Unsere Untersuchungen konnten keine Beeinflussung der osteozytären Expression der Osteoblastogenese-Inhibitoren DKK1 und SOST durch SP feststellen. Die Genexpression von DKK1 in MLO-Y4-Osteozyten wurde weder durch Stimulation mit SP noch mit einem NK1R-Agonisten und einem NK1R-Antagonisten verändert. Auch in aus Röhrenknochen von Tac1-Knockout-Mäusen isolierter mRNA konnte keine veränderte Expression von DKK1, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, detektiert werden. Der SP-Einfluss auf die Expression von SOST konnte in vitro nicht analysiert werden, da MLO-Y4-Osteozyten SOST nicht oder nur geringfügig exprimieren (Ct-Werte in der qPCR lagen stets über einem Wert von 38). Die fehlende SOST-Expression ist dadurch erklärbar, dass MLO-Y4-Osteozyten junge Osteozyten, deren umgebende Matrix noch nicht mineralisiert ist, repräsentieren (14). SOST wird jedoch ausschließlich in reifen Osteozyten exprimiert (31), (46). In vivo war eine Untersuchung von SOST möglich, da in der aus murinen Röhrenknochen isolierten mRNA eine stabile SOST-Expression vorlag. Es konnten jedoch keine Unterschiede der Genexpression von SOST in Röhrenknochen von Tac1-Knockout-Mäusen und von Wildtyp-Mäusen identifiziert werden. Weil es sich bei DKK1 und SOST um zwei potente und die am besten erforschten von Osteozyten exprimierten Osteoblastogenese-Modulatoren handelt, erscheint auf Basis unserer Ergebnisse eine Beeinflussung der osteozytären Regulation der Osteoblastendifferenzierung durch SP unwahrscheinlich, ist aber dennoch nicht vollständig ausgeschlossen, da Osteozyten weitere Osteoblastogenese-regulierende Mediatoren, wie beispielsweise Neuropeptid Y, SFRP1, PGE<sub>2</sub>, IGF-1, NO, Wnt-

Proteine und ATP, synthetisieren, deren Beeinflussung durch SP im Rahmen dieses Projekts nicht untersucht wurde (14), (33), (54).

Frühere Studien postulierten einen direkten Einfluss des sensiblen Neuropeptids SP auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten. Einige Autoren beschrieben eine SP-vermittelte Induktion der Osteoblastogenese durch Hochregulierung von OSX in mesenchymalen Stammzellen sowie eine erhöhte ALP-Aktivität in Osteoblasten-Vorläuferzellen nach Stimulation mit SP, während andere Studien davon ausgehen, dass SP durch Unterdrückung von Osteoblasten-spezifischen Genen die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten hemmt (185), (190), (192), (193). Aufgrund dieser konträren Befunde untersuchten wir die Expression der Osteoblasten-spezifischen Gene ALP und OSX im murinen Knochen in Abwesenheit von SP. Unsere Analysen zeigten jedoch keine Unterschiede der Genexpression von ALP und OSX im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Somit konnten wir keine direkte Beeinflussung von Osteoblasten durch SP nachweisen. Möglicherweise werden potenzielle durch die Abwesenheit von SP hervorgerufene Regulierungen der Genexpression der beiden Osteoblasten-Markern jedoch durch die in Kapitel 5.3 beschriebene kompensatorische Hochregulierung von Hemokinin 1 in Tac1-Knockout-Mäusen kaschiert.

Um den Einfluss des Neuropeptids SP auf die osteozytäre Modulierung der Differenzierung von Osteoklasten offenzulegen, analysierten wir die Genexpression der Osteoklastogenese-fördernden Mediatoren RankL und MCSF sowie des Osteoklastogenese-hemmenden Mediators OPG in mit SP stimulierten MLO-Y4-Osteozyten und im Knochen von SP-defizienten Tac1-Knockout-Mäusen. In vivo zeigte sich in Tac1-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine tendenziell verminderte Genexpression von RankL bei gleichzeitig signifikant erhöhter Expression von OPG im Knochen. Die Verschiebung der RankL/OPG-Achse zugunsten von OPG in Tac1-Knockout-Mäusen könnte zu einer Inhibierung der Osteoklastogenese führen und lässt den Schluss zu, dass SP die Differenzierung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption über die RankL/OPG-Achse induzieren könnte (61), (62).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von Liu et al. und Matayoshi et al., die eine SP-induzierte Erhöhung des RankL/OPG-Verhältnisses bereits in

Osteoblasten und in Synovialfibroblasten beschrieben haben (184), (199). Inwiefern explizit Osteozyten zur veränderten Genexpression von RankL und OPG in Tac1-Knockout-Mäusen beitragen, kann auf der Grundlage unserer Versuche nicht abschließend geklärt werden, da die untersuchte mRNA unselektiv aus murinen Röhrenknochen isoliert wurde und damit nicht nur aus Osteozyten stammt, sondern auch mRNA aus anderen Knochenzellen enthält. Die stabile Expression von Osteozyten-spezifischen Markern, wie beispielsweise E11 und SOST, in unserer aus murinen Röhrenknochen isolierten mRNA spricht jedoch für einen relevanten Anteil von osteozytärer mRNA innerhalb der untersuchten mRNA und lässt vermuten, dass Osteozyten an der Verschiebung der RankL/OPG-Achse in Tac1-Knockout-Mäusen beteiligt sind. Hierfür spricht auch, dass Niedermair et al. in aus Tac1-Knockout-Mäusen isolierten Osteoblasten keine veränderte OPG-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellten (231). Somit ist es wahrscheinlich, dass Osteoblasten nicht oder nur geringfügig zu der von uns detektierten Hochregulierung von OPG in murinen Knochen aus Tac1-Knockout-Mäusen beitragen und der beobachtete Effekt stattdessen auf regulatorischen Prozessen in Osteozyten beruht. Zudem gelten Osteozyten generell als die Hauptproduzenten von RankL, da zum einen in vitro die RankL-Expression in Osteozyten höher ist als in Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläuferzellen und zum anderen Mäuse, deren RankL-Expression in Osteozyten spezifisch deletiert wurde, während sie in anderen Zellen erhalten blieb, einen stark osteopetrotischen Knochenphänotyp entwickelten (58), (59), (60). Darüber hinaus führt im Mausmodell auch eine spezifisch in Osteozyten verminderte OPG-Expression bei unveränderter OPG-Expression in Osteoblasten und anderen Zellen zu einer gesteigerten Knochenresorption (67). Der in zahlreichen Studien nachgewiesene relevante Beitrag der Osteozyten zur Aufrechterhaltung des RankL/OPG-Verhältnisses spricht für eine osteozytäre Beteiligung der von uns detektierten Reduktion des RankL/OPG-Verhältnisses in Tac1-Knockout-Mäusen. Gegen einen durch Osteozyten vermittelten Effekt spricht jedoch, dass in vitro eine Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP zu keinen relevanten Veränderungen der Genexpression von RankL und OPG führte. Dies könnte jedoch auch an den Bedingungen unserer Stimulationsversuche, wie beispielsweise der verwendeten SP-Konzentration oder der Stimulationsdauer, liegen. Andere Studien zeigten in Abhängigkeit der SP-

Konzentration und der Stimulationsdauer teils konträre Wirkungen von SP auf die Genexpression in Osteoblasten und Osteoklasten (176), (183), (193), (231). Ebenso wurden in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums der stimulierten Osteoblasten und Osteoklasten unterschiedliche SP-Wirkungen auf Genebene beschrieben (231). Übertragen auf Osteozyten erscheint es möglich, dass MLO-Y4-Osteozyten, die junge Osteozyten repräsentieren (14), anders auf die Stimulierung mit SP reagieren als reife Osteozyten. Um die Rolle von Osteozyten bei der Verschiebung der RankL/OPG-Achse in Tac1-Knockout-Mäusen hinreichend klären zu können, müssten in zukünftigen Studien Osteozyten aus Röhrenknochen von Tac1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen isoliert werden und die Versuche dann mit mRNA, die aus den isolierten Osteozyten extrahiert wurde, wiederholt werden. Zudem wurde im Rahmen dieser Studie die auf Genebene detektierte Verschiebung des RankL/OPG-Verhältnisses nicht auf Proteinebene verifiziert.

Neben dem RankL/OPG-System regulieren Osteozyten die Osteoklastogenese noch durch zahlreiche andere Modulatoren, zu deren wichtigsten Vertretern MCSF gehört (33). Wir verglichen daher die Genexpression von MCSF in Röhrenknochen von Tac1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen und stellten eine signifikant verminderte MCSF-Expression im Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen fest. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass SP die Genexpression von MCSF in murinen Röhrenknochen fördert. Da MCSF eine tragende Rolle im Prozess der Osteoklastogenese spielt, könnte die SP-vermittelte Hochregulierung von MCSF zu einer Induktion der Differenzierung und Proliferation von Osteoklasten und damit zu einer Verschiebung der Knochenhomöostase in Richtung einer vermehrten Knochenresorption führen (70), (71), (72). Auch dieses Ergebnis konnte jedoch *in vitro* nicht bestätigt werden, da mit SP stimulierte MLO-Y4-Osteozyten im Vergleich zu unstimulierten Zellen keine veränderte Genexpression von MCSF aufwiesen. Möglicherweise liegt dies daran, dass die in unseren Stimulationsversuchen verwendete SP-Konzentration zu hoch war, da auch Knochenmarksmakrophagen nur auf Stimulation mit niedriger ( $10^{-10}$  M), nicht aber mit hoher SP-Konzentration ( $10^{-8}$  M), mit signifikanten Veränderungen der MCSF-Expression reagieren (238). Zudem kann aufgrund der unselektiven mRNA-Extraktion aus murinen Knochen keine belastbare Aussage über die Zellarten, in denen die SP-vermittelte Regulation der MCSF-Expression stattfinden, getroffen



werden. Daten von Muschter et al., die nach Stimulation von RAW264.7-Zellen mit SP konzentrationsabhängig eine Verminderung der Genexpression von MCSF feststellten, suggerieren, dass Knochenmarksmakrophagen nicht zu der von uns beobachteten SP-induzierten Erhöhung der MCSF-Expression im Knochen insgesamt beitragen (238). Dies liegt möglicherweise daran, dass im Zuge der RNA-Isolierung aus murinen Röhrenknochen das Knochenmark sorgfältig aus dem Knochen herausgespült wurde und die von uns isolierte RNA somit nur zu einem sehr geringen Anteil aus Knochenmarksmakrophagen stammen dürfte.

Insgesamt sprechen sowohl die vermehrte Expression von OPG mit der damit einhergehenden Reduktion des RankL/OPG-Verhältnisses als auch die verminderte Expression von MCSF in Tac1-Knockout-Mäusen für eine Osteoklastogenesefördernde Wirkung von SP. Diese Ergebnisse erscheinen vor dem Hintergrund des von Muschter et al. beschriebenen Knochenphänotyps von Tac1-Knockout-Mäusen, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit zunehmendem Alter eine starke Sklerosierung des subchondralen Knochens aufweisen (230), plausibel. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine durch die Abwesenheit von SP induzierte Reduktion der Osteoklastogenese zum sklerotischen Phänotyp beitragen kann.

Im Hinblick auf die Rolle des sensiblen Neuropeptids SP im Knochenstoffwechsel insgesamt ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, ob SP eine anabole oder katabole Rolle zugeschrieben werden kann. Es existieren multiple Studien über den Einfluss von SP auf die Osteoblastogenese, die konträre Ergebnisse hinsichtlich einer Osteoblasten-stimulierenden oder -inhibierenden Wirkung von SP lieferten (183), (184), (185), (186), (187), (188), (189), (190), (191), (192), (193). Unsere Studie konnte keinen Einfluss von SP auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten nachweisen. Hinsichtlich des SP-vermittelten Effekts auf die Osteoklastogenese ist die Studienlage jedoch eindeutiger. Unsere Befunde unterstützen die Ergebnisse zahlreicher Studien, die ebenfalls eine Osteoklasten-stimulierende Wirkung von SP und eine SP-induzierte Steigerung der Knochenresorption nachwiesen (176), (185), (194), (195), (196), (197), (198), (199). Unsere Daten sprechen somit für eine katabole Wirkung von SP im Knochenstoffwechsel.

Das sensible Neuropeptid  $\alpha$ CGRP beeinflusst die Knochenhomöostase durch direkte Modulation sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten (220), (224), (225),

(228), (229). Bisher wurde nicht untersucht, inwiefern  $\alpha$ CGRP sich auf die durch Osteozyten vermittelte Regulierung der Knochen-bildenden und -resorbierenden Zellen auswirkt.

Der LRP-Antagonist DKK1 wird im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermehrt exprimiert. Da Osteozyten die Hauptproduzenten von DKK1 im Knochen sind, beruht der beobachtete Effekt mutmaßlich auf einer Hochregulierung der DKK1-Expression in Osteozyten (51), (52). Somit könnte der von Cornish et al. und Wang et al. festgestellten Förderung der Osteoblasten-Differenzierung durch  $\alpha$ CGRP eine Unterdrückung des Osteoblastogenese-Inhibitors DKK1 in Osteozyten zugrunde liegen (220), (224). Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Kayalar et al., die eine durch  $\alpha$ CGRP vermittelte Inhibierung der DKK1-Expression in Fibroblasten beschrieben (247). Auch die von Schinke et al. beobachtete Osteopenie im Knochen von über sechs Monate alten  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen könnte zum Teil dadurch bedingt sein, dass aufgrund der fehlenden Gegenregulation von  $\alpha$ CGRP die Osteoblastogenese durch DKK1 gehemmt wird (221). Da in unseren Versuchen die Genexpression von DKK1 im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen zwar signifikant, jedoch nur in geringem Ausmaß erhöht war (im Median um das 1,3-fache erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen), dürfte die  $\alpha$ CGRP-induzierte Veränderung der DKK1-Expression jedoch nur eine geringe Rolle bei der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase spielen. In vitro hatte die Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit  $\alpha$ CGRP keinen Einfluss auf die DKK1-Expression. Möglicherweise liegt die Ursache der fehlenden Regulation der DKK1-Expression durch  $\alpha$ CGRP jedoch in einer zu geringen Dauer der Stimulation der Zellen. Osteoblasten reagierten in einigen früheren Untersuchungen erst nach einer deutlich länger als 24 Stunden andauernden  $\alpha$ CGRP-Stimulation mit Veränderungen der Genexpression (220), (225). Die Genexpression des zweiten untersuchten Osteoblastogenese-Inhibitors SOST war in vivo nach Deletion von  $\alpha$ CGRP weitgehend unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In vitro konnten  $\alpha$ CGRP-induzierte Veränderungen der SOST-Expression nicht untersucht werden, da die von uns verwendete Zelllinie MLO-Y4 aufgrund des Differenzierungsstadiums der Zellen SOST nicht in relevantem Ausmaß exprimiert (14). Insgesamt könnte  $\alpha$ CGRP durch Unterdrückung des Osteoblastogenese-Inhibitors DKK1, nicht aber von

SOST, die Differenzierung von Osteoblasten fördern und somit eine anabole Wirkung im Knochenstoffwechsel vermitteln.

Da zahlreiche frühere Studien eine positive Wirkung von  $\alpha$ CGRP auf die Aktivität von Osteoblasten und die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen in Osteoblasten nachweisen konnten, verglichen wir die Genexpression von ALP und OSX in Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen (220), (224), (225). Wir stellten jedoch keine Veränderung der Genexpression von ALP und OSX im murinen Knochen nach Deletion von  $\alpha$ CGRP fest und konnten daher keine direkte Beeinflussung von Osteoblasten durch  $\alpha$ CGRP nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieben Wang et al. und Liang et al. eine  $\alpha$ CGRP-induzierte Erhöhung der Expression von ALP in Osteoblasten-Vorläuferzellen. Beide Studien untersuchten jedoch den Einfluss von  $\alpha$ CGRP auf die ALP-Expression in BMSCs in vitro, während wir die ALP-Expression im murinen Knochen aus  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen analysierten. Somit scheint  $\alpha$ CGRP zwar die Expression von ALP in Osteoblasten-Vorläuferzellen zu erhöhen, jedoch auf Grundlage unserer Daten die Expression von ALP und OSX im Knochen insgesamt nicht zu beeinflussen (220), (225). Im Einklang mit unseren Daten fanden Niedermair et al. ähnliche Konzentrationen von ALP im Serum von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen (243).

Bezüglich des Einflusses von  $\alpha$ CGRP auf die Differenzierung von Osteoklasten deuten einige Studien darauf hin, dass  $\alpha$ CGRP durch Hemmung der Knochenresorption eine anabole Wirkung im Knochenstoffwechsel hat. Yoo et al. und He et al. beobachteten nach Stimulation von Osteoblasten-Vorläuferzellen mit  $\alpha$ CGRP in vitro eine verminderte Expression von RankL bei erhöhter Expression von OPG mit daraus resultierender Hemmung der Osteoklastogenese (226), (227). Dem gegenüber stehen jedoch die Ergebnisse von Villa et al., die in einer humanen Osteoblasten-Zelllinie in Präsenz von  $\alpha$ CGRP eine verminderte Expression von OPG feststellten (248). Wir beobachteten im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unveränderte Genexpression von RankL sowie eine tendenziell erhöhte Genexpression von OPG. Die damit einhergehende Verringerung des RankL/OPG-Verhältnisses spricht für eine Induktion der Osteoklastogenese durch  $\alpha$ CGRP und somit für eine  $\alpha$ CGRP-induzierte katabole Auslenkung der

Knochenhomöostase (61), (62). Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Daten von Villa et al. und widersprechen jedoch den Studien von Yoo et al. und He et al. (226), (227), (248). Möglicherweise bestehen neben den von Yoo et al. und He et al. beschriebenen  $\alpha$ CGRP-induzierten Veränderungen der RankL- und OPG-Expression in BMSCs noch andere gegenläufige Regulationsmechanismen der Expression der beiden Osteoklastogenese-Modulatoren in anderen Knochenzellen, die der Regulierung in Osteoblasten-Vorläuferzellen überlegen sind, sodass im Knochen insgesamt eine entgegengesetzte Verschiebung des RankL/OPG-Verhältnisses als in Osteoblasten-Vorläuferzellen resultiert (226), (227). Die Ergebnisse unserer in-vitro-Versuche, die nach Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit  $\alpha$ CGRP keine relevanten Veränderungen der Genexpression von RankL und OPG zeigten, legen nahe, dass Osteozyten nicht mit Osteoblasten-Vorläuferzellen um die Auslenkung der RankL/OPG-Achse konkurrieren. Auf Basis der Daten von Villa et al. lässt sich hingegen vermuten, dass reife Osteoblasten durch  $\alpha$ CGRP-induzierte Hemmung der OPG-Expression die durch ihre Vorläuferzellen ausgelöste Verschiebung des RankL/OPG-Verhältnisses überkompensieren (248).

Neben einer Modulierung des RankL/OPG-Systems beobachteten wir zudem, dass  $\alpha$ CGRP durch Beeinflussung einer weiteren Stellschraube die Osteoklastogenese regulieren könnte. Im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen fanden wir eine signifikant verringerte Genexpression von MCSF, verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Dieses Ergebnis suggeriert, dass  $\alpha$ CGRP die Expression des Osteoklastogenese-fördernden Mediators MCSF stimulieren könnte, und impliziert eine  $\alpha$ CGRP-induzierte Steigerung der Knochenresorption (70), (71), (72). In vitro verringerte hingegen die Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit  $\alpha$ CGRP die Genexpression von MCSF tendenziell. Da dieser Effekt bei kombinierter Stimulation mit  $\alpha$ CGRP und dem  $\alpha$ CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> vollständig aufgehoben wurde, gehen wir davon aus, dass die  $\alpha$ CGRP-induzierte tendenzielle Reduktion der MCSF-Expression in MLO-Y4-Osteozyten spezifisch ist und auf Aktivierung des Rezeptorkomplexes CRLR/Ramp1 beruht. Daher scheinen Regulationsmechanismen in Osteozyten nicht zur verringerten MCSF-Expression im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen beizutragen. Knochenmarksmakrophagen reagieren wie auch MLO-Y4-Osteozyten laut den Ergebnissen von Muschter et al. auf Stimulation mit  $\alpha$ CGRP mit einer

Reduktion der MCSF-Expression und sind daher vermutlich ebenfalls nicht für die verminderte MCSF-Expression im Knochen von  $\alpha$ CGRP-defizienten Mäusen verantwortlich (238). Hierfür spricht auch, dass die in unseren Versuchen aus Knochen isolierte RNA aufgrund der zuvor durchgeführten Extrahierung des Knochenmarks aus dem Knochen vermutlich zum überwiegenden Anteil nicht aus Knochenmarksmakrophagen stammt. Da Osteoblasten ebenfalls MCSF exprimieren, könnte eine durch Abwesenheit von  $\alpha$ CGRP hervorgerufene regulatorische Verminderung der MCSF-Expression in Osteoblasten für die reduzierte MCSF-Expression im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen verantwortlich sein (70), (71), (72).

Insgesamt impliziert sowohl die von uns detektierte Verminderung des RankL/OPG-Verhältnisses als auch die Verminderung der MCSF-Expression in aus Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen isolierter mRNA eine Osteoklastogenese-fördernde und somit katabole Wirkung von  $\alpha$ CGRP im Knochenstoffwechsel (61), (62), (70), (71), (72). Regulatorische Prozesse in Osteozyten scheinen auf Basis unserer in-vitro-Stimulationsversuche bei diesen Mechanismen keine Rolle zu spielen. Konträr zu unseren Ergebnissen wird dem Neuropeptid  $\alpha$ CGRP von den meisten diesbezüglich existierenden Studien eine anabole Funktion zugeschrieben (221), (222), (223), (224), (225), (226), (227), (228), (229). Villa et al. gehen davon aus, dass der Osteoklastogenese-fördernde Effekt von  $\alpha$ CGRP zu einer lokalen Aktivierung des Knochenumbaus führt, der im weiteren Verlauf – vermittelt durch  $\alpha$ CGRP-induzierte Differenzierung und Aktivierung von Osteoblasten – in einer in Summe gesteigerten Knochenbildung resultiert, sodass  $\alpha$ CGRP insgesamt betrachtet eine anabole Funktion im Knochenstoffwechsel aufweist (248). Zudem gehen Schinke et al. davon aus, dass die anabole Rolle von  $\alpha$ CGRP und der damit einhergehende osteopore Knochenphänotyp in  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen nicht auf einer Inhibierung der Knochenresorption, sondern auf einer Steigerung der durch Osteoblasten vermittelten Knochenbildung beruht (221).

## 5.6. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die Mechanorezeption in Osteozyten

Osteozyten nehmen als wichtigste Mechanosensoren des Knochens äußere physikalische Reize wahr, generieren daraufhin intrazelluläre biochemische Signale, die über Gap Junctions interzellulär weitergeleitet werden und schließlich in der Modulation des Knochenaufbaus und der Knochenresorption resultieren (14). Unsere Studie analysierte den Einfluss von SP und  $\alpha$ CGRP auf die Expression des für die Mechanorezeption wichtigen Adhäsionsproteins CD44, des für die Mechanotransduktion essenziellen Proteins GJA1 und des in Zilien vorkommenden Transmembranproteins PKD1.

Unsere Stimulationsversuche zeigten eine signifikant erhöhte Genexpression von CD44 in MLO-Y4-Osteozyten nach Stimulierung mit dem NK1R-Agonisten GR73632. Dieses Ergebnis deutet auf eine potenziell vermehrte Synthese des Adhäsionsproteins CD44 nach Aktivierung des NK1-Rezeptors hin. Die Folge davon könnte möglicherweise eine gesteigerte Sensitivität für mechanische Reize sein (14). Kritisch ist jedoch anzumerken, dass die Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP nicht zu einer vermehrten CD44-Expression führte und die Stimulation mit einem NK1R-Antagonisten keine verminderte CD44-Expression zur Folge hatte. Zudem erscheint aufgrund der nur gering erhöhten Genexpression nach Stimulation mit dem NK1R-Agonisten (Genexpression nach Stimulation mit dem NK1R-Agonisten ist im Median etwa um das 1,4-fache erhöht im Vergleich zu unstimulierten MLO-Y4-Osteozyten) die biologische Relevanz des Effekts fraglich. Wir verzichteten daher auf die Analyse von Stimulations-induzierten Veränderungen der Proteinexpression von CD44. Darüber hinaus führte eine Deletion des für SP kodierenden Tachykinin-Gens in vivo zu keiner relevanten Veränderung der CD44-Expression im murinen Knochen.

Die Genexpression von GJA1 und PKD1 war in unseren Versuchen weder in vitro nach Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP, einem NK1R-Agonisten und einem NK1R-Antagonisten noch in vivo nach Deletion von SP im Mausmodell verändert.

Frühere Studien suggerieren eine Tachykinin-vermittelte Modulation der Mechanorezeption in unterschiedlichen mechanosensitiven Zellen. Beispielsweise inhibiert die Blockade des NK1-Rezeptors die Reaktion auf mechanische Reize in

Chondrozyten (239). Des Weiteren beeinflusst mechanische Belastung die Expression von SP und NK1R in Knochenmarksmakrophagen (238). Auf der Grundlage unserer Daten scheint auch in Osteozyten eine durch Tachykinine induzierte Erhöhung der Sensitivität auf mechanische Stimuli denkbar zu sein – möglicherweise durch vermehrte Expression des Adhäsionsproteins CD44.

Nach Stimulation von MLO-Y4-Zellen mit  $\alpha$ CGRP stellten wir hingegen keine wesentlichen Veränderungen der Expression von CD44, GJA1 und PKD1 fest. Auch im in-vivo-Modell konnten keine Unterschiede der Genexpression der für die Mechanorezeption relevanten Mediatoren zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen detektiert werden.

Frühere Studien legen einen Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die Mechanorezeption in unterschiedlichen Zellen nahe (238), (239). Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Unsere Ergebnisse deuten auf eine mögliche Steigerung der Mechanosensitivität von Knochenzellen durch Erhöhung der Expression des Adhäsionsproteins CD44 nach Aktivierung des NK1-Rezeptors hin. Die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP scheinen aufgrund fehlender Regulationen von GJA1 und PKD1 die Ausbildung der für die Mechanotransduktion relevanten Gap Junctions und der für die Mechanosensation wichtigen Zilien in Knochenzellen nicht zu beeinflussen.

## 5.7. Einfluss von SP und $\alpha$ CGRP auf die osteozytäre Modulation des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts

Osteozyten synthetisieren und sezernieren – reguliert durch die endogenen Mediatoren DMP1, PHEX und MEPE – das Hormon-ähnliche Protein FGF23, das vielfältige Funktionen in unterschiedlichen Organen erfüllt (14). Wir untersuchten den Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf die Expression von FGF23, DMP1 und PHEX in Osteozyten.

In vitro konnte keine Veränderung der Genexpression von FGF23 und DMP1 nach Stimulation von MLO-Y4-Osteozyten mit SP, einem NK1R-Agonisten und einem NK1R-Antagonisten festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine tendenzielle Reduktion der Genexpression von PHEX in mit SP stimulierten MLO-Y4-Zellen. Dieser Effekt kann aufgrund der im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen unveränderten PHEX-Expression in gleichzeitig mit SP und dem spezifischen NK1R-Antagonisten L733,060 stimulierten Zellen auf den NK1-Rezeptor zurückgeführt werden. PHEX inhibiert die Expression von FGF23 in Osteozyten (117), (131). Unser Ergebnis könnte daher auf eine SP-vermittelte Steigerung der FGF23-Expression in Osteozyten durch Unterdrückung der Expression von PHEX schließen lassen. Bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden konnte jedoch noch keine Veränderung der mRNA-Expression von FGF23 in mit SP stimulierten MLO-Y4-Zellen beobachtet werden. Möglicherweise führt eine SP-vermittelte Inhibierung der PHEX-Expression erst nach einer längeren Stimulationsdauer zu einer Erhöhung der FGF23-Expression in MLO-Y4-Zellen. Unsere in-vivo-Versuche widersprechen dieser These jedoch, da eine Deletion von SP zu einer tendenziell niedrigeren Expression von PHEX führt und die Expression von FGF23 in Knochenzellen nicht beeinflusst. Auf der Basis unserer Untersuchungen kann daher davon ausgegangen werden, dass SP keinen biologisch relevanten Einfluss auf die osteozytäre Modulation des Vitamin-D-Phosphat-Haushaltes besitzt.

MLO-Y4-Osteozyten, die mit  $\alpha$ CGRP stimuliert wurden, exprimierten signifikant mehr für FGF23 kodierende mRNA als unstimulierte MLO-Y4-Osteozyten. Da  $\alpha$ CGRP prinzipiell sowohl an CRLR als auch an CTR – jeweils in Verbindung mit Ramp1 –



binden kann, untersuchten wir, durch welchen der beiden Rezeptordimere der beobachtete Effekt vermittelt wird (209), (210). Die durch Stimulation mit  $\alpha$ CGRP hervorgerufene Erhöhung der FGF23-Expression wurde in Gegenwart des spezifisch gegen CRLR/Ramp1 gerichteten Antagonisten CGRP<sub>8-37</sub> vollständig aufgehoben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der beobachtete Effekt durch CRLR/Ramp1 und nicht durch CTR/Ramp1 vermittelt wird. Die von uns nach Stimulation beobachtete Steigerung der FGF23-Expression um etwa das Dreifache könnte biologische Relevanz haben und aufgrund der endokrinen Funktionen von FGF23 zahlreiche Auswirkungen weit über den Knochen hinaus nach sich ziehen. Eine  $\alpha$ CGRP-induzierte vermehrte FGF23-Expression könnte durch Inhibierung der renalen Calcitriol-Synthese den Calcitriol-Spiegel im Serum reduzieren und damit unter anderem die Knochenmineralisierung hemmen sowie durch Steigerung der renalen Phosphat-Ausscheidung und Verminderung der enteralen Phosphat-Aufnahme den Phosphat-Spiegel im Serum senken (99), (100), (101), (102), (103), (104), (106). Der in einer in-vivo-Studie beschriebene reduzierte Serumspiegel von Phosphat in mit CGRP behandelten Hühnern könnte daher durch FGF23 vermittelt werden (249). Neben der Modifikation der osteo-renalen Kommunikation könnte eine durch  $\alpha$ CGRP verursachte Steigerung der osteozytären FGF23-Expression zu einer verminderten Parathormon-Sekretion in den Nebenschilddrüsen führen und Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System haben (107), (108), (113), (114). Jedoch ist die von uns gemessene Erhöhung der FGF23-Expression nach Stimulation mit  $\alpha$ CGRP aufgrund der generell nur sehr geringen FGF23-Expression in MLO-Y4-Osteozyten (Ct-Werte für FGF23 in der qPCR lagen stets über einem Wert von 30) kritisch zu hinterfragen. FGF23 wird fast ausschließlich in fest in Matrix eingebettete enddifferenzierte Osteozyten und nur in geringem Maße in unreifen MLO-Y4-Osteozyten exprimiert (14), (97). Um die Reproduzierbarkeit des beobachteten Effekts auf Proteinebene zu untersuchen, ermittelten wir die FGF23-Konzentration im Nährmedium von mit sensiblen Neuropeptiden und deren Rezeptorantagonisten stimulierten MLO-Y4-Osteozyten und unstimulierten Kontrollen mittels spezifischem FGF23-ELISA. Die gemessenen FGF23-Konzentrationen waren jedoch so gering, dass keine Aussage über den Einfluss der Neuropeptide auf die Sekretion von FGF23 in MLO-Y4-Osteozyten getroffen werden kann. In zukünftigen Studien könnte die

Proteinkonzentration statt nur im Nährmedium auch in Zelllysaten von MLO-Y4-Zellen bestimmt werden, um zu detektieren, ob FGF23 intrazellulär synthetisiert wird. Zudem könnte anhand einer Zellreihe von Osteozyten in einer späteren Differenzierungsphase als MLO-Y4-Osteozyten untersucht werden, ob eine Behandlung von reifen Osteozyten mit  $\alpha$ CGRP Auswirkungen auf die FGF23-Expression auf Gen- und Proteinebene hat.

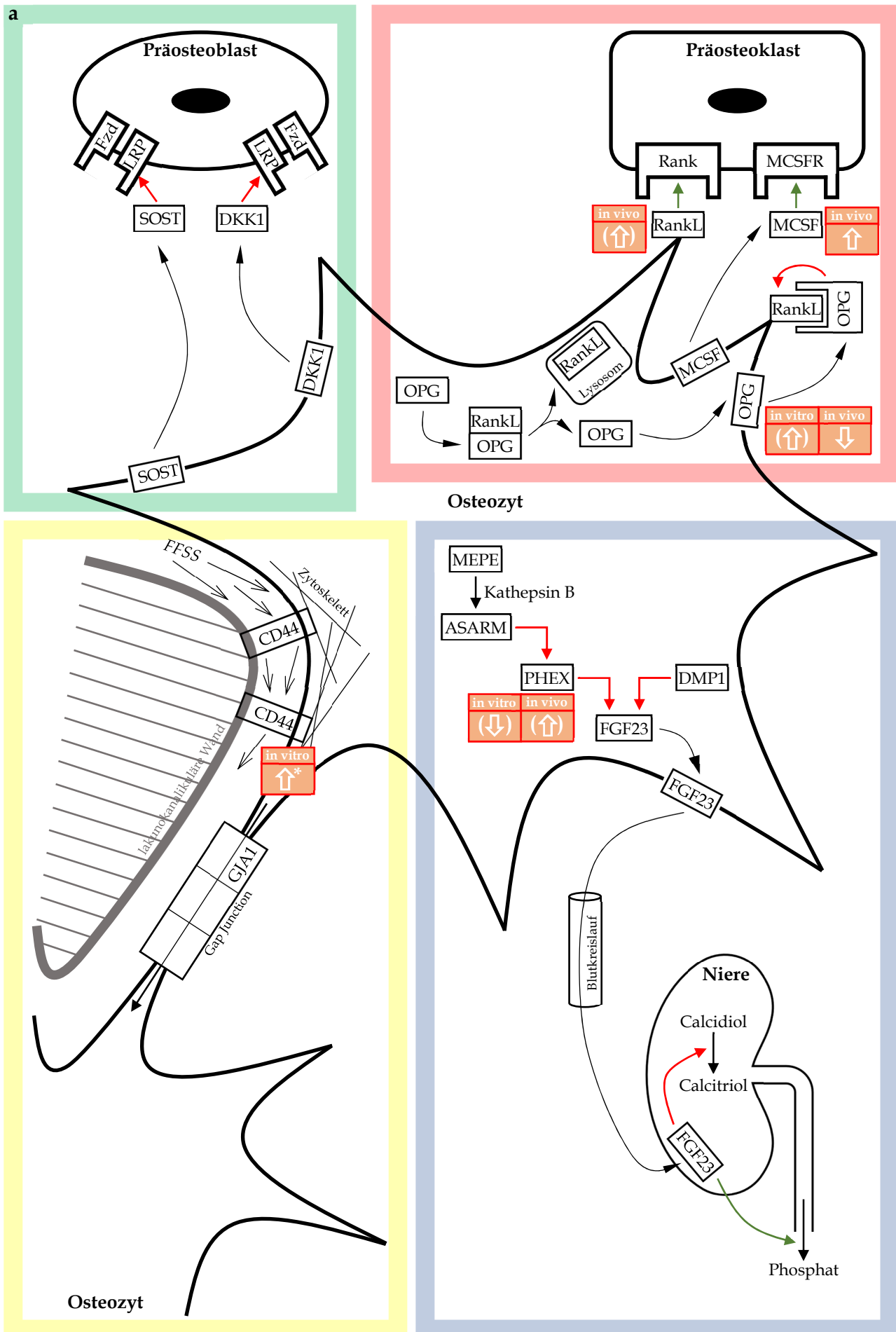
In vivo scheint eine Deletion von  $\alpha$ CGRP im Mausmodell keinen Einfluss auf die FGF23-Expression im Knochen zu haben. Somit konnte die in vitro beobachtete  $\alpha$ CGRP-induzierte Steigerung der FGF23-Expression in vivo nicht reproduziert werden. Die fehlende Regulation der FGF23-Expression im Knochen von  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen könnte jedoch dadurch erklärt werden, dass  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäuse noch immer  $\beta$ CGRP exprimieren, da  $\alpha$ CGRP und  $\beta$ CGRP durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden (203). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit und der vergleichbaren Wirkungsweise der beiden Peptide könnte eine potenziell durch Deletion von  $\alpha$ CGRP hervorgerufene Reduktion der FGF23-Expression durch die Anwesenheit von  $\beta$ CGRP kompensiert werden (203), (204), (205). Um dies zu verifizieren, wären Untersuchungen mit einem Mausmodell mit gleichzeitiger spezifischer Deletion des für  $\alpha$ CGRP und des für  $\beta$ CGRP kodierenden Gens nötig.

Eine Beeinflussung der Genexpression von DMP1 und PHEX – der endogenen Regulatoren der osteozytären FGF23-Expression – durch  $\alpha$ CGRP konnte in unseren Versuchen weder in vitro noch in vivo beobachtet werden.

Harris et al. registrierten eine deutlich verminderte Expression von DMP1 in MCSF-Knockout-Mäusen und postulierten, dass MCSF ein wichtiger parakriner oder autokriner Regulator der DMP1-Expression in Osteozyten und Osteoblasten sein könnte (72). In unseren in-vivo-Versuchen detektierten wir in der mRNA aus Knochen von Tac1-Knockout-Mäusen und  $\alpha$ CGRP-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine signifikant verminderte MCSF-Expression bei jedoch unveränderter DMP1-Expression. Die daraus resultierende Schlussfolgerung, dass eine verminderte MCSF-Expression keinen regulatorischen Einfluss auf die DMP1-Expression hat, widerspricht der These von Harris et al. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass sich unsere Aussagen nur auf Effekte auf Genebene, jedoch nicht auf Proteinebene, beziehen können.

Zusammenfassend kann auf Grundlage unserer Ergebnisse zwar *in vitro* von einer  $\alpha$ CGRP-induzierten Steigerung der Genexpression von FGF23 in Osteozyten, jedoch nicht von einer vermehrten Sekretion des entsprechenden Genprodukts ausgegangen werden. Die Sekretion von FGF23 stellt jedoch eine Voraussetzung für eine endokrine Wirkung dar. *In vivo* hatte die Deletion von  $\alpha$ CGRP keine Auswirkungen auf die Genexpression FGF23 im Knochen. Die endogenen Regulatoren der FGF23-Expression DMP1 und PHEX wurden durch  $\alpha$ CGRP nicht beeinflusst.

**a**



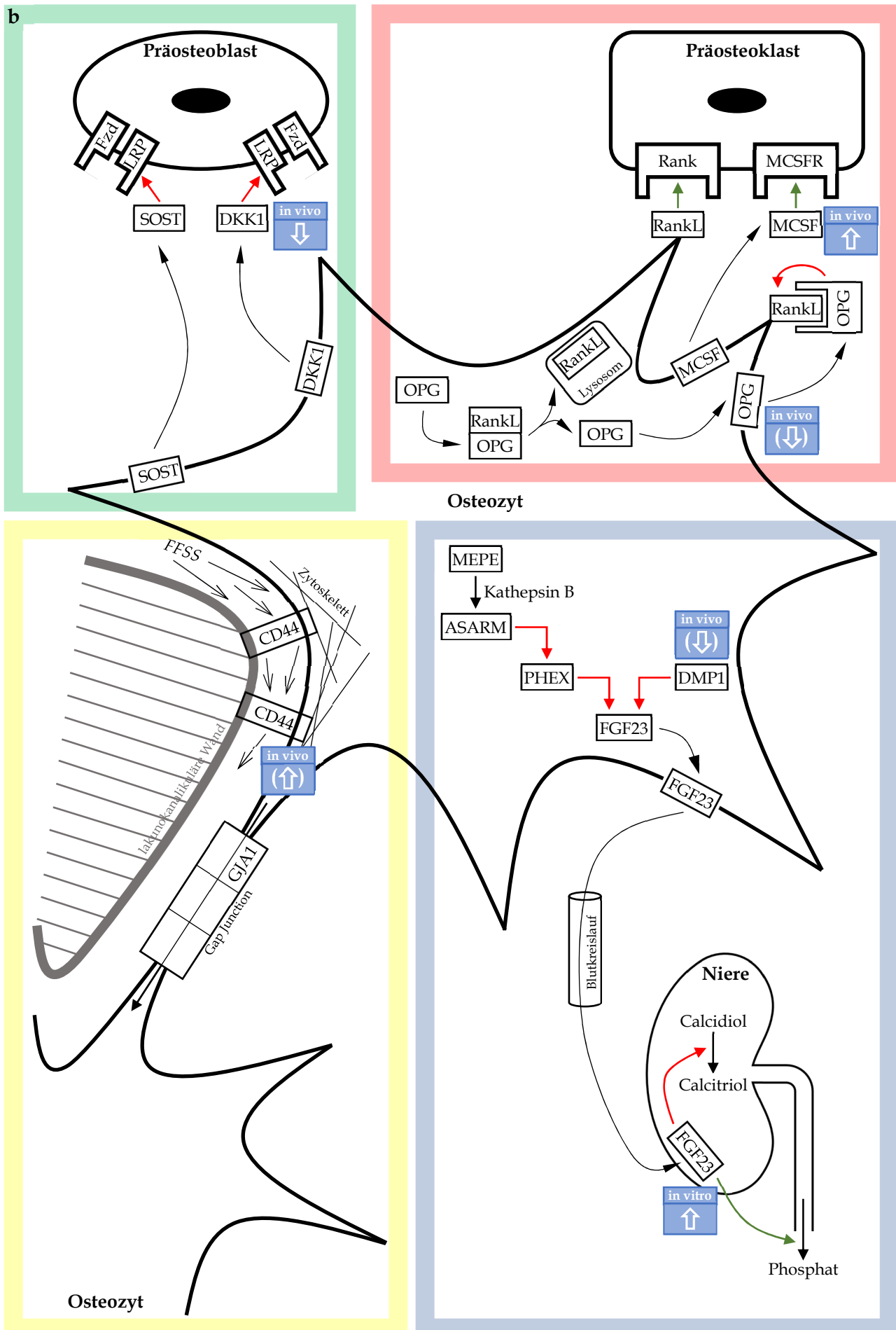


Abbildung 33: Zusammenfassende schematische Übersicht über die Einflüsse der sensiblen Neuropeptide SP (a) und  $\alpha$ CGRP (b) auf die Funktionen von Osteozyten (grüne Umrandung: Regulierung der Osteoblastogenese, rote Umrandung: Regulierung der Osteoklastogenese, gelbe Umrandung: Mechanorezeption, blaue Umrandung: Regulierung des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts):

Regulierungen der Genexpression einzelner Mediatoren in unseren in-vitro- und in-vivo-Versuchen wurden mit Pfeilen gekennzeichnet ( $\uparrow$ : signifikant positiver Effekt von SP bzw.  $\alpha$ CGRP, ( $\uparrow$ ): tendenziell positiver Effekt von SP bzw.  $\alpha$ CGRP,  $\downarrow$ : signifikant negativer Effekt von SP bzw.  $\alpha$ CGRP, ( $\downarrow$ ): tendenziell negativer Effekt von SP bzw.  $\alpha$ CGRP,  $\uparrow^*$ : signifikant positiver Effekt des NK1R-Agonisten GR73632). Grüne Pfeile symbolisieren Stimulierung bzw. Aktivierung, rote Pfeile stellen Inhibierung bzw. Inaktivierung dar (ASARM: Acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif, DKK1: Dickkopf 1, DMP1: Dentin matrix protein 1, FFSS: Fluid Flow Shear Stress, FGF23: Fibroblast Growth Factor 23, Fzd: Frizzled, GJA1: Gap junction alpha-1 protein (Connexin 43), LRP: Low-density-lipoprotein-related proteine, MCSF: Macrophage colony-stimulating factor, MCSFR: Macrophage colony-stimulating factor receptor, MEPE: Matrix extracellular phosphoglycoprotein, OPG: Osteoprotegerin, PHEX: Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome, Rank: Receptor activator of NF $\kappa$ B, RankL: Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand, SOST: Sklerostin).

## 6. Zusammenfassung / Summary

Der Gegenstand der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf verschiedene metabolische Prozesse in murinen Osteozyten-ähnlichen Zellen.

Wir konnten anhand der Zelllinie MLO-Y4 nachweisen, dass Osteozyten-ähnliche Zellen sowohl den SP-Rezeptor NK1R als auch beide Komponenten des  $\alpha$ CGRP-Rezeptors CRLR/Ramp1 auf mRNA- und Proteinebene exprimieren. Zudem weisen Osteozyten-ähnliche Zellen eine schwache endogene Genexpression der Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP auf. Die vermehrte Genexpression eines zu SP strukturell ähnlichen Peptids, bei dem es sich am wahrscheinlichsten um Hemokinin 1 handelt, im Knochen von SP-defizienten Mäusen deutet auf einen starken Kompensationsmechanismus innerhalb der Tachykinin-Familie hin. Die Expression des NK1-Rezeptors scheint in Knochenzellen durch seinen Liganden SP gehemmt zu werden. Weitere Einflüsse der Neuropeptide auf die Expression ihrer Rezeptoren konnten wir nicht feststellen.

Die Proliferation und Differenzierung von jungen Osteozyten-ähnlichen Zellen scheint durch SP und  $\alpha$ CGRP nicht wesentlich verändert zu werden. SP könnte jedoch eine antiapoptotische Wirkung auf Osteozyten-ähnliche Zellen haben.

Wir konnten verschiedene Einflüsse der Neuropeptide auf den Knochenstoffwechsel nachweisen. Unsere Ergebnisse suggerieren eine katabole Wirkung von SP im Knochenumbau, die durch Steigerung der Osteoklastogenese, jedoch nicht durch Beeinflussung der Osteoblastogenese, vermittelt wird. SP scheint die Differenzierung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption zum einen durch Erhöhung des RankL/OPG-Verhältnisses und zum anderen durch Förderung der MCSF-Expression im Knochen zu induzieren.  $\alpha$ CGRP könnte durch Hemmung der DKK1-Expression in Knochenzellen die Differenzierung von Osteoblasten fördern und so die Knochenhomöostase in anaboler Weise auslenken. Gleichzeitig induziert  $\alpha$ CGRP möglicherweise lokal den Knochenumbau durch Erhöhung des RankL/OPG-Verhältnisses und durch Steigerung der MCSF-Expression im Knochen.

Auch die Mechanorezeption und die osteozytäre Regulation des Vitamin-D-Phosphat-Haushalts könnten durch sensible Neuropeptide beeinflusst werden. Unsere Ergebnisse deuten auf eine mögliche Steigerung der Mechanosensitivität von Knochenzellen durch Erhöhung der Expression des Adhäsionsproteins CD44 nach Aktivierung des NK1-Rezeptors hin. Das Neuropeptid  $\alpha$ CGRP könnte durch Erhöhung der FGF23-Expression in Osteozyten die osteo-renale Kommunikation modulieren.

Es sollte jedoch als Limitation vermerkt werden, dass diese Ergebnisse fast ausschließlich auf Genexpressionsstudien beruhen, welche von der Proteinexpression erheblich abweichen können und häufig nicht mit dieser korrelieren.

The subject of the present study was to investigating the influence of the sensory neuropeptides SP and  $\alpha$ CGRP on metabolic processes in murine osteocyte-like cells.

Using the MLO-Y4 cell line, we were able to demonstrate that osteocyte-like cells express both the SP receptor NK1R and both components of the  $\alpha$ CGRP receptor CRLR/Ramp1 at mRNA and protein level. Additionally, osteocytes show weak endogenous gene expression of the neuropeptides SP and  $\alpha$ CGRP. The increased gene expression of a peptide structurally similar to SP, most likely Hemokinin 1, in bones of SP-deficient mice suggests a strong compensatory mechanism within the tachykinin family. The expression of the NK1 receptor in bone cells appears to be inhibited by its ligand, SP. We did not observe any further influences of the neuropeptides on the expression of their receptors.

The proliferation and differentiation of young osteocyte-like cells do not seem to be significantly altered by SP and  $\alpha$ CGRP. However, SP might have an anti-apoptotic effect on osteocyte-like cells.

However, we were able to detect effects of the neuropeptides on bone metabolism. Our results suggest a catabolic effect of SP in bone remodeling, mediated by an increase in osteoclastogenesis but not by influencing osteoblastogenesis. SP appears to induce the differentiation of osteoclasts and thus bone resorption, on the one hand, by increasing the RankL/OPG ratio and, on the other hand, by promoting MCSF expression in bone.  $\alpha$ CGRP may induce the differentiation of osteoblasts by suppressing DKK1 expression in bone cells, thus redirecting bone homeostasis in an anabolic manner.



Simultaneously,  $\alpha$ CGRP may locally induce bone remodeling by increasing the RankL/OPG ratio and enhancing MCSF expression in bone.

Mechanoreception and the osteocytic regulation of vitamin D-phosphate homeostasis could also be influenced by sensory neuropeptides. Our results indicate a potential increase in the mechanosensitivity of bone cells through upregulation of the adhesion protein CD44 following activation of NK1 receptor. The neuropeptide  $\alpha$ CGRP may modulate osteo-renal communication by increasing FGF23 expression in osteocytes.

However, it should be noted as a limitation that these results are almost exclusively based on gene expression studies, which can significantly differ from protein expression and often do not correlate with it.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
>	größer als
<	kleiner als
-/-	Knockout
°C	Grad Celsius
αCGRP	alpha-Calcitonin gene-related peptide
βCGRP	beta-Calcitonin gene-related peptide
Δ	Delta (Differenz)
μg	Mikrogramm
μg/μl	Mikrogramm pro Mikroliter
μg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
μm	Mikrometer
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
AM	Adrenomedullin
AMY	Amylin
APC	Adenomatosis polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASARM	Acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCS	Bovine Calf Serum
BMM	Bone Marrow Macrophage
BMP	Bone morphogenic proteine
BMSC	Bone Marrow Stem Cell
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
BSP	Bone Sialoprotein
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
C*	CGRP <sub>8-37</sub> (αCGRP-Rezeptorantagonist)
CA	California
Ca	Calcium
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CapG	Macrophage-capping protein
Cbfa1	Core-binding factor subunit alpha 1
cDNA	complementary DNA

cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO	Colorado
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRLR	Calcitonin receptor-like receptor
CRSP	Calcitonin receptor-stimulating peptide
Ct	Threshold Cycle
CTR	Calcitonin-Rezeptor
Cu	Kupfer
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DKK1	Dickkopf 1
DMP1	Dentin matrix protein 1
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
Dsh	Dishevelled
DSTN	Destin
DTT	Dithiothreitol
E11	Podoplanin
ECL	extracellular loop (extracelluläre Schleife)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii, et aliae, et alia (und andere)
EXCARBON	Exploring Articular Cartilage and Subchondral Bone Degeneration and Regeneration in Osteoarthritis
FBS	Fetal Bovine Serum
FFSS	Fluid Flow Shear Stress
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
for	forward (vorwärts)
Fzd	Frizzled
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GR	GR73632 (NK1R-Agonist)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GJA1	Gap junction alpha-1 protein (Connexin 43)
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GOI	Gene of Interest
GR	GR73632 (NK1R-Agonist)
GSK	Glykogensynthase-Kinase
H	Wasserstoff
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1
ICL	intracellular loop (intrazelluläre Schleife)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IL	Illinois

IMD	Intermedin
kDa	Kilodalton
L	L733,060 (NK1R-Antagonist)
l	Liter
Leu	Leucin
LRP	Low-density-lipoprotein-related protein
Lys	Lysin
M	Molar (Mol pro Liter)
MA	Massachusetts
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCS	Mesenchymal Stem Cell
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCSFR	Macrophage colony-stimulating factor receptor
MEM	Minimum Essential Medium
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
Met	Methionin
ml	Milliliter
MLO-Y4	Murine Long Bone Osteocyte Y4 (Zelllinie)
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
mm	Millimeter
MO	Missouri
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
ng/ $\mu$ l	Nanogramm pro Mikroliter
NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
NKR	Neurokinin-Rezeptor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NY	New York
O	Sauerstoff
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSX	Osterix
P	Passage
P	Phosphat
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered saline
PC1	Polycystin 1
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
Phe	Phenylalanin

PHEX	Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome
PKD1	Polycystic kidney disease 1
PPT	Prä-Protachykinin
Pro	Prolin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
Ramp	Receptor activity-modifying protein
Rank	Receptor Activator of NF $\kappa$ B
RankL	Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand
rev	reverse (rückwärts)
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
RQ	Relative Quantification (Relative Expression)
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SIBLING	Small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins
SOST	Sclerostin
SOX9	SRY-box transcription factor 9
SP	Substanz P
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Tac1	Tachykinin 1
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TMD	Transmembrandomäne
T <sub>M</sub>	Melting temperature (Schmelztemperatur)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TSP	Thrombospondin
T-TBS	Tris-buffered saline with tween
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
WA	Washington
WI	Wisconsin
x	mal

## Literaturverzeichnis

1. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus - LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2018.
2. Deller T. Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. 5. Auflage. München: Elsevier; 2018.
3. Aumüller G. Anatomie. 5., korrigierte Auflage; 2020. (Duale Reihe).
4. Mammal anatomy: An illustrated guide. New York: Marshall Cavendish; 2010.
5. Benninghoff A, Drenckhahn D, Waschke J. Taschenbuch Anatomie. 3. Auflage; 2020.
6. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9(5):641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504.
7. Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. Genome Biol 2003; 4(7):222. doi: 10.1186/gb-2003-4-7-222.
8. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Di Jiang. Transcriptional regulation of osteoblasts. Cells Tissues Organs (Print) 2009; 189(1-4):144-52. doi: 10.1159/000151747.
9. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. Cell 1997; 89(5):765-71. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80259-7.
10. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. Cell 1997; 89(5):747-54. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
11. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Cell 2002; 108(1):17-29. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
12. Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. Med Sci Monit Basic Res 2016; 22:95-106.
13. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658.
14. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. Endocr Rev 2013; 34(5):658-90. doi: 10.1210/er.2012-1026.
15. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. J Bone Miner Res 2010; 26(2):229-38. doi: 10.1002/jbmr.320.
16. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 2000; 21(2):115-37. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395.
17. Prideaux M, Loveridge N, Pitsillides AA, Farquharson C. Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation. PLoS ONE 2012; 7(5):e36786. doi: 10.1371/journal.pone.0036786.
18. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. Ann N Y Acad Sci 2010; 1192:437-43. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x.
19. Dudley HR, Spiro D. THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS. J Biophys Biochem Cytol 1961; 11(3):627-49. doi: 10.1083/jcb.11.3.627.
20. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Dev Dyn 2006; 235(1):176-90. doi: 10.1002/dvdy.20603.

21. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W et al. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 1):147–56. doi: 10.1242/jcs.01581.
22. Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem* 2006; 281(44):33814–24. doi: 10.1074/jbc.M607290200.
23. Staines KA, Javaheri B, Hohenstein P, Fleming R, Ikpegbu E, Unger E et al. Hypomorphic conditional deletion of E11/Podoplanin reveals a role in osteocyte dendrite elongation. *J Cell Physiol* 2017; 232(11):3006–19. doi: 10.1002/jcp.25999.
24. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y et al. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12):4539–52. doi: 10.1128/MCB.02120-05.
25. Lu Y, Yuan B, Qin C, Cao Z, Xie Y, Dallas SL et al. The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment. *J Bone Miner Res* 2011; 26(2):331–40. doi: 10.1002/jbmr.226.
26. Dabiri GA, Young CL, Rosenbloom J, Southwick FS. Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. A unique member of the gelsolin/villin family expressed primarily in macrophages. *J Biol Chem* 1992; 267(23):16545–52.
27. Southwick FS, DiNubile MJ. Rabbit alveolar macrophages contain a Ca<sup>2+</sup>-sensitive, 41,000-dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem* 1986; 261(30):14191–5.
28. Hatanaka H, Ogura K, Moriyama K, Ichikawa S, Yahara I, Inagaki F. Tertiary Structure of Destrin and Structural Similarity between Two Actin-Regulating Protein Families. *Cell* 1996; 85(7):1047–55. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81305-7.
29. Guo D, Keightley A, Guthrie J, Veno PA, Harris SE, Bonewald LF. Identification of osteocyte-selective proteins. *Proteomics* 2010; 10(20):3688–98. doi: 10.1002/pmic.201000306.
30. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR et al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2011; 26(7):1425–36. doi: 10.1002/jbmr.345.
31. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, Wilt E de, Karperien M et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199(6):805–14. doi: 10.1084/jem.20031454.
32. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 2007; 12:3068–92.
33. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol* 2020; 82:485–506. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034332.
34. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010; 285(33):25103–8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087.
35. Elefteriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(19-20):2339–49. doi: 10.1007/s00018-005-5175-3.
36. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell* 2001; 107(4):513–23. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00571-2.

37. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002; 157(2):303–14. doi: 10.1083/jcb.200201089.
38. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(9):3324–9. doi: 10.1073/pnas.0408742102.
39. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 3):395–402. doi: 10.1242/jcs.02826.
40. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(9):1649–57. doi: 10.1007/s00018-016-2425-5.
41. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004; 131(8):1663–77. doi: 10.1242/dev.01117.
42. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 2006; 25(57):7482–91. doi: 10.1038/sj.onc.1210055.
43. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280(29):26770–5. doi: 10.1074/jbc.M504308200.
44. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Current Biology* 2001; 11(12):951–61. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00290-1.
45. Rassow J. Biochemie: Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe).
46. Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 2005; 19(13):1842–4. doi: 10.1096/fj.05-4221fje.
47. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(20):19883–7. doi: 10.1074/jbc.M413274200.
48. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal* 2003; 22(23):6267–76. doi: 10.1093/emboj/cdg599.
49. Li X, Ominsky MS, Niu Q-T, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008; 23(6):860–9. doi: 10.1359/jbmr.080216.
50. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Proll S et al. Bone Dysplasia Sclerosteosis Results from Loss of the SOST Gene Product, a Novel Cystine Knot-Containing Protein. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3):577–89.
51. Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006; 39(4):754–66. doi: 10.1016/j.bone.2006.03.017.
52. Paic F, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P et al. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* 2009; 45(4):682–92. doi: 10.1016/j.bone.2009.06.010.
53. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 2006; 21(6):934–45. doi: 10.1359/jbmr.060311.
54. Igwe JC, Jiang X, Paic F, Ma L, Adams DJ, Baldock PA et al. Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity. *J. Cell. Biochem.* 2009; 108(3):621–30. doi: 10.1002/jcb.22294.



55. Tanaka K, Yamaguchi Y, Hakeda Y. Isolated chick osteocytes stimulate formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Metab* 1995; 13(2):61–70. doi: 10.1007/BF01771319.
56. Zhao S, Zhang YKY, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11):2068–79. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.11.2068.
57. Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazzi P et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol* 2005; 36(1-2):59–67. doi: 10.1007/s10735-004-3839-1.
58. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717):315–23. doi: 10.1038/16852.
59. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; 17(10):1231–4. doi: 10.1038/nm.2452.
60. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011; 17(10):1235–41. doi: 10.1038/nm.2448.
61. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S et al. 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. doi: 10.1073/pnas.95.7.3597.
62. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 1999; 25(1):109–13. doi: 10.1016/S8756-3282(99)00121-0.
63. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12(9):1260–8. doi: 10.1101/gad.12.9.1260.
64. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247(3):610–5. doi: 10.1006/bbrc.1998.8697.
65. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 1997; 89(2):309–19. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
66. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15(1):2–12. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.1.2.
67. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol* 2010; 30(12):3071–85. doi: 10.1128/MCB.01428-09.
68. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S et al. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2013; 28(9):1936–49. doi: 10.1002/jbmr.1941.
69. Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2010; 25(9):1907–21. doi: 10.1002/jbmr.89.

70. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993; 91(1):257–63. doi: 10.1172/JCI116179.
71. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999; 190(12):1741–54. doi: 10.1084/jem.190.12.1741.
72. Harris SE, MacDougall M, Horn D, Woodruff K, Zimmer SN, Rebel VI et al. Meox2Cre-mediated disruption of CSF-1 leads to osteopetrosis and osteocyte defects. *Bone* 2012; 50(1):42–53. doi: 10.1016/j.bone.2011.09.038.
73. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS ONE* 2011; 6(10):e25900. doi: 10.1371/journal.pone.0025900.
74. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007; 5(6):464–75. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.001.
75. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics* 1994; 27(3):339–60. doi: 10.1016/0021-9290(94)90010-8.
76. Burra S, Nicolella DP, Francis WL, Freitas CJ, Mueschke NJ, Poole K et al. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(31):13648–53. doi: 10.1073/pnas.1009382107.
77. Temiyasathit S, Jacobs CR. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192:422–8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05243.x.
78. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* 2006; 281(41):30884–95. doi: 10.1074/jbc.M604772200.
79. Xiao Z, Dallas M, Qiu N, Nicolella D, Cao L, Johnson M et al. Conditional deletion of Pkd1 in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice. *FASEB J* 2011; 25(7):2418–32. doi: 10.1096/fj.10-180299.
80. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 1994; 9(1):39–44. doi: 10.1002/jbmr.5650090106.
81. Li Y, Zhong G, Sun W, Zhao C, Zhang P, Song J et al. CD44 deficiency inhibits unloading-induced cortical bone loss through downregulation of osteoclast activity. *Sci Rep* 2015; 5:16124. doi: 10.1038/srep16124.
82. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 1981; 33(5):509–12. doi: 10.1007/bf02409482.
83. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(4):285–94. doi: 10.1038/nrm1072.
84. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J Bone Miner Res* 2001; 16(2):249–59. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.2.249.
85. Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2010; 30(1):206–19. doi: 10.1128/MCB.01844-08.

86. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 2005; 16(7):3100–6. doi: 10.1091/mbc.e04-10-0912.
87. Siller-Jackson AJ, Burra S, Gu S, Xia X, Bonewald LF, Sprague E et al. Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J Biol Chem* 2008; 283(39):26374–82. doi: 10.1074/jbc.M803136200.
88. Grimston SK, Brodt MD, Silva MJ, Civitelli R. Attenuated response to in vivo mechanical loading in mice with conditional osteoblast ablation of the connexin43 gene (Gja1). *J Bone Miner Res* 2008; 23(6):879–86. doi: 10.1359/jbmr.080222.
89. Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, Davison A, Sharkey N, Bronson S et al. Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS ONE* 2011; 6(8):e23516. doi: 10.1371/journal.pone.0023516.
90. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283(9):5866–75. doi: 10.1074/jbc.M705092200.
91. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008; 42(1):172–9. doi: 10.1016/j.bone.2007.09.047.
92. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE et al. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2003; 18(5):807–17. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.5.807.
93. Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 2007; 52(7):684–90. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.12.010.
94. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE. *Calcif Tissue Int* 2010; 87(5):461–8. doi: 10.1007/s00223-010-9407-7.
95. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 2009; 24(10):1651–61. doi: 10.1359/jbmr.090411.
96. Fritton SP, Weinbaum S. Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech* 2009; 41:347–74. doi: 10.1146/annurev.fluid.010908.165136.
97. Ubaidus S, Li M, Sultana S, Freitas PHL de, Oda K, Maeda T et al. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2009; 58(6):381–92. doi: 10.1093/jmicro/dfp032.
98. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444(7120):770–4. doi: 10.1038/nature05315.
99. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(11):6500–5. doi: 10.1073/pnas.101545198.
100. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004; 113(4):561–8. doi: 10.1172/JCI19081.
101. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS et al. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit

- growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology* 2004; 145(7):3087–94. doi: 10.1210/en.2003-1768.
102. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(2):F282–91. doi: 10.1152/ajprenal.90742.2008.
103. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3):429–35. doi: 10.1359/JBMR.0301264.
104. Gray RW, Omdahl JL, Ghazarian JG, DeLuca HF. 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase. Subcellular location and properties. *J Biol Chem* 1972; 247(23):7528–32.
105. Kolek OL, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(6):G1036–42. doi: 10.1152/ajpgi.00243.2005.
106. Miyamoto K-i, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 2005; 9(4):331–5. doi: 10.1111/j.1744-9987.2005.00292.x.
107. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117(12):4003–8. doi: 10.1172/JCI32409.
108. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerström G, Jonsson KB et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; 195(1):125–31. doi: 10.1677/JOE-07-0267.
109. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(4):F882–9. doi: 10.1152/ajprenal.00360.2010.
110. Rhee Y, Bivi N, Farrow E, Lezcano V, Plotkin LI, White KE et al. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone* 2011; 49(4):636–43. doi: 10.1016/j.bone.2011.06.025.
111. Blau JE, Collins MT. The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Rev Endocr Metab Disord* 2015; 16(2):165–74. doi: 10.1007/s11154-015-9318-z.
112. Hori M, Shimizu Y, Fukumoto S. Minireview: fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and bone metabolism. *Endocrinology* 2011; 152(1):4–10. doi: 10.1210/en.2010-0800.
113. Mirza MAI, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis* 2009; 205(2):385–90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.001.
114. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 2011; 121(11):4393–408. doi: 10.1172/JCI46122.
115. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1:33–40.
116. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N et al. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001; 16(11):2017–26. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.11.2017.
117. Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ et al. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J* 2011; 25(8):2551–62. doi: 10.1096/fj.10-177816.

118. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 2006; 38(11):1310–5. doi: 10.1038/ng1905.
119. Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res* 2005; 20(12):2169–77. doi: 10.1359/JBMR.050815.
120. Liu S, Zhou J, Tang W, Menard R, Feng JQ, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(2):E254–61. doi: 10.1152/ajpendo.90201.2008.
121. Bhatia A, Albazzaz M, Espinoza Orías AA, Inoue N, Miller LM, Acerbo A et al. Overexpression of DMP1 accelerates mineralization and alters cortical bone biomechanical properties in vivo. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012; 5(1):1–8. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.08.026.
122. Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet* 2006; 38(11):1248–50. doi: 10.1038/ng1868.
123. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2003; 2(8):552–8. doi: 10.1038/nmat945.
124. He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *J Biol Chem* 2004; 279(12):11649–56. doi: 10.1074/jbc.M309296200.
125. Rangiani A, Cao Z, Sun Y, Lu Y, Gao T, Yuan B et al. Protective roles of DMP1 in high phosphate homeostasis. *PLoS ONE* 2012; 7(8):e42329. doi: 10.1371/journal.pone.0042329.
126. Dussold C, Gerber C, White S, Wang X, Qi L, Francis C et al. DMP1 prevents osteocyte alterations, FGF23 elevation and left ventricular hypertrophy in mice with chronic kidney disease. *Bone Res* 2019; 7:12. doi: 10.1038/s41413-019-0051-1.
127. Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG et al. Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1200–9. doi: 10.1172/JCI119276.
128. Thompson DL, Sabbagh Y, Tenenhouse HS, Roche PC, Drezner MK, Salisbury JL et al. Ontogeny of Phex/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2):311–20. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.2.311.
129. Westbroek I, Rooij KE de, Nijweide PJ. Osteocyte-specific monoclonal antibody MAb OB7.3 is directed against Phex protein. *J Bone Miner Res* 2002; 17(5):845–53. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.5.845.
130. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. *Nat Genet* 1995; 11(2):130–6. doi: 10.1038/ng1095-130.
131. Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao Z-S, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem* 2003; 278(39):37419–26. doi: 10.1074/jbc.M304544200.
132. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(1):E38–49. doi: 10.1152/ajpendo.00008.2006.
133. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(11):4957–60. doi: 10.1210/jc.2002-021105.
134. Igarashi M, Kamiya N, Ito K, Takagi M. In situ localization and in vitro expression of osteoblast/osteocyte factor 45 mRNA during bone cell differentiation. *Histochem J* 2002; 34(5):255–63. doi: 10.1023/a:1021745614872.

135. Rowe PSN, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D et al. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone* 2004; 34(2):303–19. doi: 10.1016/j.bone.2003.10.005.
136. Rowe PSN, Garrett IR, Schwarz PM, Carnes DL, Lafer EM, Mundy GR et al. Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). *Bone* 2005; 36(1):33–46. doi: 10.1016/j.bone.2004.09.015.
137. Liu S, Rowe PSN, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol* 2007; 192(1):261–7. doi: 10.1677/joe.1.07059.
138. Dobbie H, Unwin RJ, Faria NJR, Shirley DG. Matrix extracellular phosphoglycoprotein causes phosphaturia in rats by inhibiting tubular phosphate reabsorption. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(2):730–3. doi: 10.1093/ndt/gfm535.
139. Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge A-M et al. Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology* 2008; 149(4):1757–72. doi: 10.1210/en.2007-1205.
140. Guo R, Rowe PSN, Liu S, Simpson LG, Xiao Z-S, Darryl Quarles L. Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(1):38–45. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02125-3.
141. Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 2008; 23(10):1638–49. doi: 10.1359/jbmr.080601.
142. Jain A, Fedarko NS, Collins MT, Gelman R, Ankrom MA, Tayback M et al. Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8):4158–61. doi: 10.1210/jc.2003-032031.
143. Grönblad M, Liesi P, Korkala O, Karaharju E, Polak J. Innervation of human bone periosteum by peptidergic nerves. *Anat Rec* 1984; 209(3):297–9. doi: 10.1002/ar.1092090306.
144. Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 1988; 9(1):165–71. doi: 10.1016/0196-9781(88)90023-X.
145. Bjurholm A. Neuroendocrine peptides in bone. *Int Orthop* 1991; 15(4):325–9. doi: 10.1007/bf00186871.
146. Hill EL, Elde R. Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res* 1991; 264(3):469–80. doi: 10.1007/bf00319037.
147. Hukkanen M, Kontinen YT, Rees RG, Santavirta S, Terenghi G, Polak JM. Distribution of nerve endings and sensory neuropeptides in rat synovium, meniscus and bone. *Int J Tissue React* 1992; 14(1):1–10.
148. Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD et al. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* 2002; 113(1):155–66. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00165-3.
149. Eleftheriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(19-20):2339–49. doi: 10.1007/s00018-005-5175-3.
150. Ikeuchi M, Wang Q, Izumi M, Tani T. Nociceptive sensory innervation of the posterior cruciate ligament in osteoarthritic knees. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012; 132(6):891–5. doi: 10.1007/s00402-012-1478-7.

151. Offley SC, Guo T-Z, Wei T, Clark JD, Vogel H, Lindsey DP et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res* 2005; 20(2):257–67. doi: 10.1359/JBMR.041108.
152. Poole KES, Reeve J, Warburton EA. Falls, fractures, and osteoporosis after stroke: time to think about protection? *Stroke* 2002; 33(5):1432–6. doi: 10.1161/01.str.0000014510.48897.7d.
153. Dauty M, Perrouin Verbe B, Maugars Y, Dubois C, Mathe JF. Supralesional and sublesional bone mineral density in spinal cord-injured patients. *Bone* 2000; 27(2):305–9. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00326-4.
154. Jones LM, Legge M, Goulding A. Intensive exercise may preserve bone mass of the upper limbs in spinal cord injured males but does not retard demineralisation of the lower body. *Spinal Cord* 2002; 40(5):230–5. doi: 10.1038/sj.sc.3101286.
155. Maïmoun L, Fattal C, Sultan C. Bone remodeling and calcium homeostasis in patients with spinal cord injury: a review. *Metab Clin Exp* 2011; 60(12):1655–63. doi: 10.1016/j.metabol.2011.04.005.
156. Madsen JE, Hukkanen M, Aune AK, Basran I, Møller JF, Polak JM et al. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (351):230–40.
157. Niedermair T, Kuhn V, Doranehgard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J et al. Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. *Matrix Biol* 2014; 38:22–35. doi: 10.1016/j.matbio.2014.06.007.
158. Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br* 1987; 69(4):521–4.
159. Grässel S, Muschter D. Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology. *Int J Mol Sci* 2017; 18(5). doi: 10.3390/ijms18050931.
160. Salo PT, Seeratten RA, Erwin WM, Bray RC. Evidence for a neuropathic contribution to the development of spontaneous knee osteoarthritis in a mouse model. *Acta Orthop Scand* 2002; 73(1):77–84. doi: 10.1080/000164702317281459.
161. Suri S, Gill SE, Massena de Camin S, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(11):1423–8. doi: 10.1136/ard.2006.063354.
162. Wang H, Zhang X, He J-Y, Zheng X-F, de Li, Li Z et al. Increasing expression of substance P and calcitonin gene-related peptide in synovial tissue and fluid contribute to the progress of arthritis in developmental dysplasia of the hip. *Arthritis Res Ther* 2015; 17:4. doi: 10.1186/s13075-014-0513-1.
163. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol* 1971; 232(29):86–7. doi: 10.1038/newbio232086a0.
164. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):285–322. doi: 10.1124/pr.54.2.285.
165. Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature* 1983; 306(5938):32–6. doi: 10.1038/306032a0.
166. Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(18):7074–8. doi: 10.1073/pnas.83.18.7074.
167. Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(3):881–5. doi: 10.1073/pnas.84.3.881.

168. Bonner TI, Affolter H-U, Young AC, Young WS. A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide, neurokinin B. *Molecular Brain Research* 1987; 2(3):243-9. doi: 10.1016/0169-328X(87)90031-3.
169. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(13):1652-63. doi: 10.1007/s00018-004-4035-x.
170. Steinhoff MS, Mentzer B von, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* 2014; 94(1):265-301. doi: 10.1152/physrev.00031.2013.
171. Yin J, Chapman K, Clark LD, Shao Z, Borek D, Xu Q et al. Crystal structure of the human NK1 tachykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(52):13264-9. doi: 10.1073/pnas.1812717115.
172. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 1997; 31(6):537-63. doi: 10.1016/S0143-4179(97)90001-9.
173. Lai J-P, Ho WZ, Kilpatrick LE, Wang X, Tuluc F, Korchak HM et al. Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(20):7771-6. doi: 10.1073/pnas.0602563103.
174. Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 2004; 494(2-3):233-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.05.016.
175. Lerner UH, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8(2):154-65.
176. Li F-X-Z, Xu F, Lin X, Wu F, Zhong J-Y, Wang Y et al. The Role of Substance P in the Regulation of Bone and Cartilage Metabolic Activity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11:77. doi: 10.3389/fendo.2020.00077.
177. Palma C, Manzini S. Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 81(1-2):127-37. doi: 10.1016/S0165-5728(97)00167-7.
178. Hornby PJ. Central neurocircuitry associated with emesis. *The American Journal of Medicine* 2001; 111(8):106-12. doi: 10.1016/S0002-9343(01)00849-X.
179. Li W-W, Guo T-Z, Liang D-y, Sun Y, Kingery WS, Clark JD. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology* 2012; 116(4):882-95. doi: 10.1097/ALN.0b013e31824bb303.
180. Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 2006; 31(3):251-72. doi: 10.1007/s00726-006-0335-9.
181. Goto T, Yamaza T, Kido MA, Tanaka T. Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res* 1998; 293(1):87-93. doi: 10.1007/s004410051100.
182. Fristad I, Vandevaska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa SJ, Hals Kvinnsland I. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res* 2003; 311(3):383-91. doi: 10.1007/s00441-002-0691-z.
183. Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides* 2007; 41(1):25-31. doi: 10.1016/j.npep.2006.11.002.
184. Liu H-J, Yan H, Yan J, Li H, Chen L, Han L-R et al. Substance P Promotes the Proliferation, but Inhibits Differentiation and Mineralization of Osteoblasts from Rats with Spinal Cord Injury via RANKL/OPG System. *PLoS ONE* 2016; 11(10):e0165063. doi: 10.1371/journal.pone.0165063.



185. Wang et al. Substance P Stimulates Bone Marrow Stromal Cell Osteogenic Activity, Osteoclast Differentiation, and Resorption Activity in Vitro. *Bone* 2009; 45(2).
186. Kingery WS, Offley SC, Guo T-Z, Davies MF, Clark JD, Jacobs CR. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section. *Bone* 2003; 33(6):927–36. doi: 10.1016/j.bone.2003.07.003.
187. Shih C, Bernard GW. Neurogenic Substance P Stimulates Osteogenesis In Vitro. *Peptides* 1997; 18(2):323–6. doi: 10.1016/S0196-9781(96)00280-X.
188. Mei G, Xia L, Zhou J, Zhang Y, Tuo Y, Fu S et al. Neuropeptide SP activates the WNT signal transduction pathway and enhances the proliferation of bone marrow stromal stem cells. *Cell Biol Int* 2013; 37(11):1225–32. doi: 10.1002/cbin.10158.
189. Fu S, Mei G, Wang Z, Zou Z-L, Liu S, Pei G-X et al. Neuropeptide substance P improves osteoblastic and angiogenic differentiation capacity of bone marrow stem cells in vitro. *Biomed Res Int* 2014; 2014:596023. doi: 10.1155/2014/596023.
190. Sun H-b, Chen J-c, Liu Q, Guo M-f, Zhang H-p. Substance P stimulates differentiation of mice osteoblast through up-regulating Osterix expression. *Chin J Traumatol* 2010; 13(1):46–50.
191. Ma WH, Liu YJ, Wang W, Zhang YZ. Neuropeptide Y, substance P, and human bone morphogenetic protein 2 stimulate human osteoblast osteogenic activity by enhancing gap junction intercellular communication. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48(4):299–307. doi: 10.1590/1414-431X20144226.
192. Azuma H, Kido J-i, Ikeda D, Kataoka M, Nagata T. Substance P enhances the inhibition of osteoblastic cell differentiation induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2004; 75(7):974–81. doi: 10.1902/jop.2004.75.7.974.
193. Adamus MA, D?browski ZJ. Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow-derived osteogenic cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 2001; 81(3):499–506. doi: 10.1002/1097-4644(20010601)81:3<499::AID-JCB1063>3.0.CO;2-Y.
194. Sohn SJ. Substance P upregulates osteoclastogenesis by activating nuclear factor kappa B in osteoclast precursors. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(2):130–3. doi: 10.1080/00016480410017710.
195. Goto T, Yamaza T, Kido MA, Takana T. Substance P Activates Osteoclast Formation and Osteoclastic Bone Resorption through the Neurokinin-1 Receptor. *Acta Histochem. Cytochem.* 2001; 34(1):31–8. doi: 10.1267/ahc.34.31.
196. Sun Y-M, Luo S-J, Zhao Y-H. Substance P regulates function of osteoclasts via neurokinin-1 receptor. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006; 24(1):60–2.
197. Mori T, Ogata T, Okumura H, Shibata T, Nakamura Y, Kataoka K. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262(2):418–22. doi: 10.1006/bbrc.1999.1220.
198. Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *J Biol Chem* 2003; 278(10):8286–93. doi: 10.1074/jbc.M206421200.
199. Matayoshi T, Goto T, Fukuhara E, Takano H, Kobayashi S, Takahashi T. Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(3):756–64. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.055.
200. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982; 298(5871):240–4. doi: 10.1038/298240a0.

201. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 304(5922):129–35. doi: 10.1038/304129a0.
202. Goodman EC, Iversen LL. Calcitonin gene-related peptide: Novel neuropeptide. *Life Sciences* 1986; 38(24):2169–78. doi: 10.1016/0024-3205(86)90568-0.
203. Hay DL, Garelja ML, Poyner DR, Walker CS. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *Br J Pharmacol* 2018; 175(1):3–17. doi: 10.1111/bph.14075.
204. Katafuchi T, Kikumoto K, Hamano K, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N. Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribution, and biological activity. *J Biol Chem* 2003; 278(14):12046–54. doi: 10.1074/jbc.M207970200.
205. Steenbergh PH, Höppener JWM, Zandberg J, Lips CJM, Jansz HS. A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Letters* 1985; 183(2):408–12. doi: 10.1016/0014-5793(85)80820-6.
206. Aiyar N, Rand K, Elshourbagy NA, Zeng Z, Adamou JE, Bergsma DJ et al. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. *J Biol Chem* 1996; 271(19):11325–9. doi: 10.1074/jbc.271.19.11325.
207. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393(6683):333–9. doi: 10.1038/30666.
208. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):233–46. doi: 10.1124/pr.54.2.233.
209. Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ et al. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* 1999; 56(1):235–42. doi: 10.1124/mol.56.1.235.
210. Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner DR, Sexton PM. Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol* 2005; 67(5):1655–65. doi: 10.1124/mol.104.008615.
211. Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31(10):476–83. doi: 10.1016/j.tips.2010.06.006.
212. Walker CS, Hay DL. CGRP in the trigeminovascular system: a role for CGRP, adrenomedullin and amylin receptors? *Br J Pharmacol* 2013; 170(7):1293–307. doi: 10.1111/bph.12129.
213. Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2014; 94(4):1099–142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013.
214. Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neuroscience Letters* 1985; 57(2):125–30. doi: 10.1016/0304-3940(85)90050-3.
215. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 1996; 17(5):533–85. doi: 10.1210/edrv-17-5-533.
216. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313(5997):54–6. doi: 10.1038/313054a0.
217. Arkless K, Argunhan F, Brain SD. CGRP Discovery and Timeline. *Handb Exp Pharmacol* 2019; 255:1–12. doi: 10.1007/164\_2018\_129.

218. Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and  $\beta$ -adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neuroscience Letters* 1997; 233(2-3):125–8. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00649-6.
219. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 2008; 104(3):920–33. doi: 10.1002/jcb.21674.
220. Wang L, Shi X, Zhao R, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone* 2010; 46(5):1369–79. doi: 10.1016/j.bone.2009.11.029.
221. Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P et al. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res* 2004; 19(12):2049–56. doi: 10.1359/JBMR.040915.
222. Valentijn K, Gutow AP, Troiano N, Gundberg C, Gilligan JP, Vignery A. Effects of calcitonin gene-related peptide on bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1997; 21(3):269–74. doi: 10.1016/S8756-3282(97)00142-7.
223. Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, Guerder S, Kapadia S, Gundberg C et al. Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7):1067–74. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1067.
224. Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Gamble GD, Cooper GJ et al. Comparison of the effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1999; 14(8):1302–9. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.8.1302.
225. Liang W, Zhuo X, Tang Z, Wei X, Li B. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation and osteogenic differentiation of osteoporotic rat-derived bone mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem* 2015; 402(1-2):101–10. doi: 10.1007/s11010-014-2318-6.
226. Yoo Y-M, Kwag JH, Kim KH, Kim CH. Effects of neuropeptides and mechanical loading on bone cell resorption in vitro. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):5874–83. doi: 10.3390/ijms15045874.
227. He H, Chai J, Zhang S, Ding L, Yan P, Du W et al. CGRP may regulate bone metabolism through stimulating osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation. *Mol Med Rep* 2016; 13(5):3977–84. doi: 10.3892/mmr.2016.5023.
228. Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJS, Reid IR. Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone* 2001; 29(2):162–8. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00494-X.
229. Zaidi M, Fuller K, Bevis PJ, GainesDas RE, Chambers TJ, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide inhibits osteoclastic bone resorption: a comparative study. *Calcif Tissue Int* 1987; 40(3):149–54. doi: 10.1007/bf02555699.
230. Muschter D, Fleischhauer L, Taheri S, Schilling AF, Clausen-Schaumann H, Grässel S. Sensory neuropeptides are required for bone and cartilage homeostasis in a murine destabilization-induced osteoarthritis model. *Bone* 2020; 133:115181.
231. Niedermair T, Schirner S, Seebröcker R, Straub RH, Grässel S. Substance P modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts. *Sci Rep* 2018; 8(1):9199. doi: 10.1038/s41598-018-27432-y.
232. Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M et al. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(5):2630–5.
233. Lu JT, Son YJ, Lee J, Jetton TL, Shiota M, Moscoso L et al. Mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14(2):99–120. doi: 10.1006/mcne.1999.0767.

234. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997; 12(12):2014–23. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.12.2014.
235. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156–9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
236. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1(2):581–5. doi: 10.1038/nprot.2006.83.
237. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005; 146(11):4577–83. doi: 10.1210/en.2005-0239.
238. Muschter D, Beiderbeck A-S, Späth T, Kirschneck C, Schröder A, Grässel S. Sensory Neuropeptides and their Receptors Participate in Mechano-Regulation of Murine Macrophages. *Int J Mol Sci* 2019; 20(3). doi: 10.3390/ijms20030503.
239. Millward-Sadler SJ, Mackenzie A, Wright MO, Lee H-S, Elliot K, Gerrard L et al. Tachykinin expression in cartilage and function in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Arthritis and rheumatism* 2003; 48(1):146–56.
240. Torreggiani E, Matthews BG, Pejda S, Matic I, Horowitz MC, Grcevic D et al. Preosteocytes/osteocytes have the potential to dedifferentiate becoming a source of osteoblasts. *PLoS ONE* 2013; 8(9):e75204. doi: 10.1371/journal.pone.0075204.
241. Roosterman D, Cottrell GS, Schmidlin F, Steinhoff M, Bunnett NW. Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J Biol Chem* 2004; 279(29):30670–9.
242. Yang J, Nie J, Fu S, Liu S, Wu J, Cui L et al. The fast track to canonical Wnt signaling in MC3T3-E1 cells protected by substance P against serum deprivation-induced apoptosis. *Cell Biol Int* 2017; 41(1):71–8. doi: 10.1002/cbin.10676.
243. Niedermair T, Schirner S, Lasheras MG, Straub RH, Grässel S. Absence of  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts in an age-dependent way. *Mech Ageing Dev* 2020; 189:111265. doi: 10.1016/j.mad.2020.111265.
244. Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grässel S. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis and rheumatism* 2012; 64(3):729–39. doi: 10.1002/art.33449.
245. Morteau O, Lu B, Gerard C, Gerard NP. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol* 2001; 2(12):1088. doi: 10.1038/ni1201-1088.
246. Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PLoS ONE* 2011; 6(11):e27209. doi: 10.1371/journal.pone.0027209.
247. Kayalar O, Oztay F. CGRP induces myofibroblast differentiation and the production of extracellular matrix in MRC5s via autocrine and paracrine signalings. *J Biochem Mol Toxicol* 2022; 36(12):e23204. doi: 10.1002/jbt.23204.
248. Villa I, Mrak E, Rubinacci A, Ravasi F, Guidobono F. CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(3):C529–37. doi: 10.1152/ajpcell.00354.2005.
249. Ancill AK, Bascal ZA, Whitaker G, Dacke CG. Effects of rat and chicken calcitonin gene-related peptides (CGRP) upon calcium metabolism in chicks. *Regul Pept* 1990; 30(3):231–8. doi: 10.1016/0167-0115(90)90098-h.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich auf dem langen Weg der Promotion begleitet und unterstützt haben, sehr herzlich.

Besonders danke ich Frau Prof. Dr. Susanne Grässel, die mir die Promotion in ihrer Abteilung für experimentelle Orthopädie ermöglicht hat und mich mit ihrer fachlichen Expertise begleitet hat. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Dominique Muschter für die hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeiten. Zudem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ZMB Biopark Regensburg für die kollegiale Zusammenarbeit in einer angenehmen Atmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Frau Tanja Späth, die mir bei fachlichen Fragen und Herausforderungen stets zur Seite stand. Ich danke auch meinem Kollegen, Herrn Dr. Christoph Lukas, für den wertvollen interkollegialen Austausch sehr herzlich.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Studienzeit begleitet, ermutigt und gefördert haben und für mich stets eine unverzichtbare Stütze waren. Für ihre unermüdliche und bedingungslose Unterstützung bedanke ich mich vor allem bei meinen Eltern, Marion und Hubert Eder, meiner Schwester, Selina Eder, und meinen Großeltern, Frieda und Anton Stäblein. Ihnen widme ich diese Dissertation.