

Abstract

Over exposure to Retinoic Acid (RA) has long been associated with increased bone fragility in both humans and animal models, and an elevated RA level caused by a loss-of-function mutation in the RA metabolizing enzyme CYP26B1 leads to the formation of fragmented calvarial plates in human fetuses. Despite the numerous *in vivo* and *in vitro* studies that address the effect of elevated RA levels on skeletogenesis, it remains unclear which cell population mediates the bone fragility phenotype, and /or compromised bone formation. In my thesis, I used the zebrafish as a model to understand the effect of RA on bone development and maintenance. To mimic the effect of the null *Cyp26b1* mutation, I exposed the fish to Cyp26 inhibitor (rambazole) or to RA, and was able to recapitulate the phenotypes seen in the human patient harbouring a null mutation in the *Cyp26b1* gene. I provide evidence that, similar to the *in vitro* data, over-exposure to RA *in vivo* induces a premature osteoblast-to-osteocyte differentiation in the zebrafish calvarial bone. This differentiation results in: 1) the depletion of the osteoblastic pool from the growing calvarial plate, and therefore a reduced osteoid matrix deposition, 2) a premature mineralization of the sutural matrix, leading to craniosynostosis, and 3) an increased recruitment and activation of osteoclasts (bone fragmentation). I also present evidence that, in the absence of osteoclasts, high RA levels do not have any effect on bone resorption. However, RA also fails to induce holes in the fish skull after the ablation of the mature osteoblasts, demonstrating the requirement of both cell populations to induce the fragmentation phenotypes, and that the RA-induced osteoclast recruitment is mediated by the osteoblasts.

Additionally, I analyzed the effect of RA on the development of a different intramembranous bone, fin rays. The expression patterns of different players in the RA signaling pathway (*raldh1a2*, *rargb*, and *cyp26b1*) suggest that RA signaling pathway plays a role in the fin ray outgrowth and segment patterning. I was able to show that, upon RA treatment, the fin longitudinal outgrowth was arrested, highlighting the importance of a proper inactivation of RA at the distal growing edge of the fin ray to allow fin ray elongation. Moreover, over-exposure to RA led to the loss of the joint lining

cells, which resulted in the loss of the joints and the fusion of adjacent segments. Therefore, in the fin rays, over-exposure to RA induces a distal growth arrest, and compromises the joint cell identity, highlighting the importance of a proper control of RA signaling pathway during bone patterning.

Zusammenfassung

Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen wird seit langem die Überexposition von Retinolsäure (RS) mit gesteigerter Fragilität der Knochen assoziiert. Erhöhte RS-Konzentrationen, die durch loss-of-function-Mutationen in dem RS-metabolisierendem Enzym CYP26B1 verursacht werden, führen zu fragmentierten Schädelkalottenplatten im menschlichem Fötus. Trotz zahlreicher in vivo und in vitro Studien, welche den Einfluss von erhöhten Retinolsäuremengen auf die Knochenentwicklung untersuchten, bleibt es dennoch unklar, welche Zellpopulationen für den Phänotyp von brüchigen Knochen und beeinträchtigter Knochenbildung verantwortlich sind. In meiner Arbeit nutze ich den Zebrafisch als Modell, um den Effekt von Retinolsäure auf die Entwicklung und Erhaltung von Knochen zu untersuchen. Um den Effekt der *Cyp26b1* Nullmutation zu imitieren, behandle ich die Fische mit dem Cyp26 Inhibitor Rambazole oder mit Retinolsäure. Durch diese Behandlung wurde der Phänotyp, der in menschlichen Patienten auftritt, die eine Nullmutation in *Cyp26b1* besitzen, im Fisch rekapituliert. Ähnlich zu vorangegangenen in vitro Studien zeigen meine Ergebnisse in vivo, dass die Überexposition von Retinolsäure eine vorzeitige Osteoblast-zu-Osteozyt-Differenzierung in der Schädelkalotte induziert. Diese Differenzierung resultiert: 1) in dem verfrühten Verbrauch von Osteoblasten aus dem Pool der wachsenden Schädelkalotte, und dadurch in einer geringeren Ablagerung osteoider Matrix, 2) in der vorzeitigen Mineralisierung der Suturenmatrix, die in einer Kraniosynostose resultiert, und 3) in einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten, was zu einer Fragmentierung der Knochen führt.

Weiterhin kann ich zeigen, dass Retinolsäure in Abwesenheit von Osteoklasten keinen Effekt auf den Knochenabbau hat. Auch nach genetischer Ablatierung von Osteoblasten ist Retinolsäure nicht in der Lage, eine Fragmentierung des Fischschädels zu induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass zur Induzierung des Knochenfragmentierung das Vorhandensein beider Zelltypen benötigt ist, und dass die RS-induzierte Rekrutierung von Osteoklasten durch Osteoblasten vermittelt wird.

Zusätzlich habe ich den Effekt von RS auf die Entwicklung eines anderen Knochens, des desmalen Flossenstrahls der Schwanzflosse, untersucht. Das Expressionsmuster verschiedener Komponenten des Retinolsäuresignalweg (*raldh1a2*, *rargb*, *cyp26b1*) deutet auf dessen Rolle in der Kontrolle des Wachstums und der Segmentierung der Flossenstrahlen hin. Ich konnte zeigen, dass unter Retinolsäurebehandlung das Längenwachstum arretiert war,

was zeigt, dass eine korrekte Inaktivierung der Retinolsäure an der Wachstumsfront des Flossenstrahls benötigt wird. Ausserdem führt die Überexposition von Retinolsäure zu einem Verlust der Zellen, die die Gelenke umgeben, was daraufhin zum Verlust der Gelenke und zur Fusion von angrenzenden Segmenten führt.