

## Summary

Osteoporosis is one of the most common bone diseases in the world, associated with a high rate of morbidity and mortality. It is characterized by deteriorated bone microarchitecture and low bone mass, leading to an increased risk for bone fractures. In 50-85% of all cases, genetic factors are responsible for osteoporosis development. In this context, mutations in *PLS3* have been identified, being causative for the development of X-linked osteoporosis in human. However, the underlying pathomechanism by which *PLS3* leads to osteoporosis remains elusive. In order to unravel the effect of *PLS3* in bone pathology and cellular mechanisms, our lab demonstrated that *Pls3* KO mice developed osteoporosis, whereas *PLS3* OE exhibited a hyperostotic phenotype. Moreover, impairment of the osteoclast function was detected, as seen by abnormal bone resorption and podosome formation, which was caused by a *PLS3*-dependent misregulation of the NFκB pathway. Additionally, genes, involved in vesicular trafficking, essential for osteoclast polarization and function, were found to be differentially expressed in osteoclasts from *Pls3* KO and *PLS3* OE mice. Since previous work indicated major implications of the ubiquitous *Pls3* KO on the osteoclasts, the first part of this thesis aimed to reveal if, indeed, the osteoclasts are the major cell system affected by the loss of *Pls3*, thereby being causative for osteoporosis development. This part of the work will be presented as a complete, independent chapter (chapter 1, part I) in form of a manuscript. Here, we generated osteoclast-specific *Pls3* KO (*Pls3<sup>fl/fl</sup>;LysMCre<sup>tg/0</sup>*) mice and could demonstrate enhanced resorptive activity of their osteoclasts *in vitro*. However, the osteoclast-specific *Pls3* KO mice did not exhibit an osteoporotic phenotype *in vivo* in 12-, 24-, and 48-week-old mice as determined by micro-CT and three-point bending test. Therefore, we concluded that the loss of *Pls3* solely in osteoclasts is not sufficient to cause osteoporosis as observed in the ubiquitous *Pls3* KO mice, but that alternative cell types of the bone might be implicated in their function through the loss of *Pls3*, and this combination leads to osteoporosis. As we still detected a strong effect of *Pls3* loss on the resorptive function of osteoclasts, in the second part of this thesis (chapter 2), we aimed to deeper understand the molecular mechanisms underlying the dysfunction of the osteoclasts in ubiquitous *Pls3* KO and *PLS3* OE mice. Based on the differential expression of genes involved in vesicular trafficking, which were identified in ubiquitous *Pls3* KO and *PLS3* OE mice in the previous work, here our objective was to uncover how dysregulated *PLS3* levels affect vesicular trafficking and vesicular trafficking-related organelles in osteoclasts. This chapter of the thesis will be presented as a monography, introducing the whole field of research, whereby the results are divided into part II and III. Through the detailed analysis of consecutive endocytic steps, we showed that the ubiquitous *Pls3* KO and *PLS3* OE impaired endosome maturation and acidification in osteoclasts, which might directly influence bone resorptive function, and could thereby result in the osteoporotic and hyperostotic phenotype detected in *Pls3* KO and *PLS3* OE osteoclasts, respectively.

## Zusammenfassung

Osteoporose ist weltweit eine der am häufigsten auftretenden Knochenerkrankungen, die mit einer hohen Morbidität und Sterblichkeit einhergeht. Sie wird durch eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochens und eine geringe Knochenmasse charakterisiert, welche letztendlich zu einem erhöhten Risiko für Knochenfrakturen führen. In 50-85% aller Fälle sind genetische Faktoren für die Entwicklung einer Osteoporose verantwortlich. In diesem Zusammenhang wurden Mutationen in *PLS3* identifiziert, die für die Entwicklung eines X-chromosomalen Erbgangs der Osteoporose im Menschen verantwortlich sind. Jedoch bleibt der zugrunde liegende Pathomechanismus, durch welchen *PLS3* zu Osteoporose führt, ungeklärt. Um herauszufinden, welchen Effekt *PLS3* in der Knochenpathologie und den zellulären Mechanismen hat, konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass *Pls3* KO Mäuse eine Osteoporose entwickeln, wohingegen *PLS3* OE Mäuse einen hyperostotischen Phänotyp vorweisen. Außerdem konnte aufgrund einer abnormalen Knochenresorption und fehlerhaften Bildung von Podosomen in diesen Mäusen eine Beeinträchtigung der Funktion der Osteoklasten festgestellt werden, welche durch eine *PLS3*-abhängige Fehlregulierung des NFκB-Signalwegs verursacht wurde. Zudem wurde die differenzielle Expression von Genen, die im vesikulären Transport involviert und kritisch für die Polarisation und Funktion der Osteoklasten sind, in *Pls3* KO und *PLS3* OE Osteoklasten identifiziert. Da die vorangegangene Arbeit bedeutende Auswirkungen des ubiquitären *Pls3* KO auf die Osteoklasten aufdecken konnte, wurde in dem ersten Teil dieser Arbeit das Ziel verfolgt, herauszufinden, ob tatsächlich die Osteoklasten das hauptsächliche Zellsystem sind, die durch den Verlust von *Pls3* beeinträchtigt sind und dadurch für die Entwicklung einer Osteoporose verantwortlich sind. Dieser Teil der These wird als ein vollständiges und unabhängiges Kapitel in der Form eines Manuskripts präsentiert. Um dieses Ziel zu verfolgen, haben wir Osteoklasten-spezifische *Pls3* KO (*Pls3<sup>fl/fl</sup>;LysMCre<sup>tg/0</sup>*) Mäuse generiert und konnten *in vitro* eine erhöhte Knochenresorption in den Osteoklasten zeigen. Jedoch wiesen die Osteoklasten-spezifischen *Pls3* KO Mäuse *in vivo* in einem Alter von 12-, 24- und 48-Wochen keinen osteoporotischen Phänotyp auf, wie wir durch Mikro-CT und 3-Punkt Biegeversuch zeigen konnten. Daraus konnten wir schließen, dass der alleinige Verlust von *Pls3* in den Osteoklasten nicht ausreicht, eine Osteoporose, so wie sie in den ubiquitären *Pls3* KO Mäusen auftritt, zu verursachen. Allerdings könnten ebenfalls alternative Zelltypen des Knochens durch den Verlust von *PLS3* in ihrer Funktion

gestört sein und diese Kombination könnte letztendlich zu Osteoporose führen. Da wir dennoch herausfinden konnten, dass der Verlust von *Pls3* einen starken Effekt auf die Knochenresorption der Osteoklasten hat, verfolgten wir im zweiten Teil dieser Arbeit das Ziel, den molekularen Mechanismus, der der Störung der Osteoklasten in den ubiquitären *Pls3* KO und *PLS3* OE Mäusen unterliegt, zu verstehen. Basierend auf der differentiellen Expression der Gene, die im vesikulären Transport involviert sind und in den ubiquitären *Pls3* KO and *PLS3* OE Mäusen in der vorangegangenen Arbeit identifiziert wurden, konnten wir hier aufzudecken, wie die Fehlregulation der *PLS3*-Level den vesikulären Transport und die mit dem vesikulären Transport verbundenen Organellen beeinträchtigt. Dieses Kapitel wird in Form einer Monografie präsentiert, mit einer Einführung in das Forschungsfeld, wobei die Ergebnisse in Teil II und III aufgeteilt wurden. Durch die detaillierte Analyse der konsekutiven Schritte der Endozytose konnten wir zeigen, dass sowohl der ubiquitäre *Pls3* KO als auch *PLS3* OE die Reifung der Endosomen und die Ansäuerung in den Osteoklasten beeinträchtigt und dies somit zu dem osteoporotischen bzw. hyperostotischen Phänotyp in *Pls3* KO und *PLS3* OE Osteoklasten führen könnte.