

ZUSAMMENFASSUNG

Osteoporose ist eine sehr häufig auftretende Erkrankung, die weltweit mehr als 200 Millionen Menschen betrifft. Effektive Therapieoptionen sowie Krankheitsvorbeugung werden durch steigende Behandlungskosten und zunehmenden sozioökonomischen Problemen von Tag zu Tag wichtiger. Weltweit sind momentan fast drei Viertel der älteren Menschen von einer zu geringen Knochendichte sowie einem zu hohen Risiko Knochenbrüche zu erleiden betroffen. Interessanterweise wurde gezeigt, dass eine genetische Prädisposition in 60 – 80 % der Patienten für die entstandene Osteoporose ausschlaggebend ist.

Plastin 3 (*PLS3*) Mutationen führen zu einer X-chromosomalen primären Osteoporose bei Männern und einem variablen Phänotyp, von unbeeinträchtigt bis hin zu leichten Frakturen, bei Frauen. Darüber hinaus trägt ein einzelner Nukleotidpolymorphismus in *PLS3* die bisher stärkste Assoziation bei für Frauen eine postmenopausale Osteoporose zu entwickeln. *PLS3* ist ein F-Aktin Bündelungs- und Bindungsprotein, welches in etwa 5% der Gesamtbevölkerung, mit bisher unbekanntem Konsequenzen, überexprimiert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Überexpression von *PLS3* eine schützende Funktion für Patienten mit der Motoneuronenkrankheit Spinale Muskelatrophie (SMA) einnimmt. Bislang ist die Rolle von *PLS3* in der Knochenhomöostase und die Auswirkungen welche zur Entstehung von Osteoporose beitragen ungeklärt. Allerdings ist *PLS3* in allen relevanten Zelltypen im Knochen, nämlich Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, exprimiert. Interessanterweise führt eine Herunterregulierung von *p13* durch Morpholinos in Zebrafischen zu einer Fehlbildung der kraniofazialen Morphologie des Kopfes und insbesondere des Kiefers. Durch eine zusätzliche Überexpression von humaner *PLS3* mRNA konnte dieser Phänotyp gerettet werden, was die wo mögliche Rolle von *PLS3* in der Knochenentwicklung erneut unterstreicht.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Funktion von *PLS3* im Knochen aufzuklären, indem genetisch veränderte Mäuse in denen *P13* entweder ausgeschaltet (KO) oder das humane *PLS3* überreguliert wurde (OE) verwendet wurden. Folgende Fragestellungen wurden gesetzt: 1) Wie wirkt sich *P13* KO und *PLS3* OE auf die pathophysiologische Knochenmorphologie in Mäusen aus? 2) Welcher Knochenzelltyp ist durch *P13* KO und *PLS3* OE funktionell oder morphologisch betroffen? 3) Welches ist der zugrunde liegende molekulare Mechanismus, welcher für den beobachteten Phänotyp ursächlich ist? 4) Welche anderen knochenbezogenen Signalwege könnten vom Verlust oder der Überexpression von *PLS3* betroffen sein?

In dieser Studie untersuchten wir die Knochenmorphologie mittels Mikro-CT und 3-Punkt-Biege-Test und zeigen, dass *P13* KO Mäuse einen bei Männchen stärker als bei Weibchen ausgeprägten osteoporotischen Phänotyp aufweisen, der den menschlichen Phänotyp widerspiegelt. Im Gegensatz dazu zeigen *PLS3* OE Tiere eine erhöhte kortikale

Knochendichte in beiden Geschlechtern, sowie eine erhöhte Knochenstärke bei Weibchen. Immunhistologische Färbungen von Femurschnitten zeigten, dass die Anzahl an Osteoklasten in 5 Tage alten *PLS3* OE Tieren signifikant reduziert, aber in 3 Monate alten Tieren wiederhergestellt war. Die Osteoklastenzahl war in *Pls3* KO Mäusen unbeeinflusst und die frühe Mineralisierung sowie Chondrozyten-Differenzierung war in keinem der Mausmodelle beeinflusst. Infolge dessen wurde die Funktion von primären Osteoklasten untersucht, die aus dem Knochenmark des Oberschenkels isoliert und differenziert wurden. Es zeigte sich eine Zunahme der Resorptionsaktivität in *Pls3* KO und eine Abnahme dieser in *PLS3* OE Mäusen. Darüber hinaus zeigten Immunfluoreszenzfärbungen, dass die podosomalen Strukturen in *Pls3* KO sowie in *PLS3* OE Osteoklasten eher podosomale Cluster anstatt Ringe aufwiesen. Interessanterweise waren in Osteoklasten von *PLS3* OE Mäusen nahezu gar keine podosomalen Strukturen aufzufinden. Um den dieser Funktionsstörung zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu entschlüsseln, wurden infolgedessen essentielle Proteine des NFκB Signalweges, die für die Osteoklastendifferenzierung essentiell sind, mittels Western-Blotting von extrahierten Proteinen aus Osteoklastenkulturen untersucht. Bemerkenswerterweise zeigte sich ein bedeutender Anstieg an RELA (NFκB Untereinheit p65) in *PLS3* OE Osteoklasten, während dieses Protein in *Pls3* KO Zellen unverändert war. In diesem Zusammenhang wurde eine bisher unbekannte Interaktion zwischen *PLS3* und dem NFκB Repressionsfaktor (NKRF) durch Massenspektrometrie und Co-Immunpräzipitation aufgedeckt. Interessanterweise konnten wir mittels quantitativer real-time PCR zeigen, dass die mRNA Expression des Hauptregulators der Osteoklastogenese, der nukleäre Faktor der aktivierenden T-Zellen 1 (*Nfatc1*) in *PLS3* OE herunterreguliert und in *Pls3* KO Osteoklasten hochreguliert ist. Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkulturen zeigten, dass diese Veränderung mit der nukleären Translokation von NKRF korrelierte. Genau genommen führte eine reduzierte nukleäre Lokalisation von NKRF in *Pls3* KO Osteoklasten zu einer erhöhten Expression von *Nfatc1*. Im Gegensatz dazu erfolgte eine verringerte *Nfatc1* Expression infolge einer erhöhten nukleären Lokalisation von NKRF in *PLS3* OE Zellen. Daher vermuten wir, dass die Funktion von Osteoklasten durch die *PLS3*-vermittelte Translokation von NKRF und die damit verbundene transkriptionelle Repression von *Nfatc1* modifiziert wird. Dies führt demnach zu Osteoporose in *Pls3* KO und einer erhöhten kortikalen Knochendichte und Knochenstärke in *PLS3* OE Mäusen. Zusammengefasst ist *PLS3* ein neuer und entscheidender Regulator für die Funktion von Osteoklasten durch dessen Einfluss auf den NFκB-NKRF-NFATC1-Signalweg.

Schlußendlich wurde eine Transkriptomanalyse von primären Osteoklasten aus männlichen und weiblichen 3 Monate alten *Pls3* KO und *PLS3* OE Mäusen untersucht, um differentiell exprimierte Gene zu entschlüsseln. Wir entdeckten Veränderungen in verschiedenen Kandidatengenen, die an der Entstehung von Osteoporose und Osteoarthritis beteiligt sind.

Darüber hinaus wurden differentiell exprimierte Gene gefunden, die auf eine mögliche Beeinträchtigung des intrazellulären Transportes in *Pls3* KO und *PLS3* OE Osteoklasten hinweisen, welche möglicherweise zum Knochenphänotyp beitragen. Da dies vorläufige Daten sind, ist in Zukunft eine eingehendere Analyse erforderlich, um das gesamte Interaktom von *PLS3* und seine Auswirkungen auf die Knochenhomöostase besser zu verstehen.