

Aus der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Humane Adipozyten produzieren FGF-2
und fördern die Proliferation von Osteoblasten und den OPG/
RANKL Quotienten
mit Einfluss auf die Bildung von Osteoklasten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Markus Christopher Kühn

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Sven Schinner

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Vera Grotheer

Meinen Eltern,

in ewiger Dankbarkeit für die bedingungslose Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kühn, M.C., Willenberg, H.S., Schott, M., Papewalis, C., Stumpf, U., Flohé, S., Scherbaum, W.A., Schinner, S., (2012), Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. *Mol Cell Endocrinol.*, 349(2), 180-188

Zusammenfassung

Die Osteoporose als typische altersassoziierte Erkrankung gewinnt aufgrund der alternden Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. Die durch die Osteoporose erniedrigte Knochendichte mit schlechterer Mikroarchitektur erhöht das Risiko für eine Fraktur mit weitreichenden individuellen, gesellschaftlichen und ökonomischen Folgen.

Verschiedene Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und sowohl der Knochendichte als auch dem Risiko für eine osteoporotische Fraktur beschrieben. Ein niedriges Körpergewicht steigert dieses Risiko, wohingegen ein höheres Körpergewicht dieses Risiko senkt. Der genaue Zusammenhang und die beteiligten Mechanismen sind nicht vollständig geklärt.

Fettgewebe ist mittlerweile als ein endokrines Organ etabliert. Die von ihm produzierten Hormone werden als Adipokine bezeichnet. Eine direkte Wirkung des Fettgewebes über Adipokine auf den Knochen wäre also denkbar und könnte die Verbindung zwischen Körpergewicht und Knochendichte erklären.

Diese Dissertation soll untersuchen, ob eine direkte und durch Adipokine vermittelte Wirkung von Adipozyten auf Osteoblasten vorliegt, wie diese sich äußert und durch welche Adipokine sie vermittelt wird.

Hierzu wurde Zellkulturmedium durch primäre humane Adipozyten konditioniert. Dadurch enthält es sämtliche Adipokine. Zellen einer murinen präosteoblastischen Zelllinie und auch primäre humane Präosteoblasten wurden diesem konditionierten Medium ausgesetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von Adipokinen zu einer verstärkten Proliferation der Präosteoblasten kam. Dies war abhängig vom FGF-Rezeptor 1 und der PI3-Kinase. Im konditionierten Medium konnte bFGF/FGF-2 nachgewiesen werden und die Wirkung des konditionierten Mediums konnte durch rekombinantes FGF-2 in Abhängigkeit vom FGFR1 und der PI3K imitiert werden. Auch wenn die Differenzierung zu reifen Osteoblasten nicht stimuliert wurde, konnte der OPG/RANKL Quotient gesteigert werden. Hierdurch hatten die behandelten Präosteoblasten einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung von Osteoklasten. Als Beleg für eine endokrin vermittelte Wirkung wurde FGF-2 in humanem Serum in Abhängigkeit vom BMI nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen positiven und endokrin durch Adipokine vermittelten Effekt des Fettgewebes auf Knochen hin. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge bietet die Möglichkeit, neue Ansätze zur Osteoporosetherapie auszumachen.

Summary

Osteoporosis as a typical age-related disease is becoming increasingly important due to the aging society. The reduced bone mineral density caused by osteoporosis with poorer microarchitecture increases the risk of a fracture with extensive individual, social and economic consequences.

Various studies have described a connection between body weight and both bone mineral density and the risk of an osteoporotic fracture. A low body weight increases this risk, whereas a higher body weight reduces this risk. The exact connection and the mechanisms involved are not fully understood.

Adipose tissue is now established as an endocrine organ. The hormones it produces are called adipokines. A direct effect of adipose tissue on bone by adipokines would be conceivable and could explain the connection between body weight and bone mineral density.

This dissertation is intended to investigate whether there is a direct and adipokine-mediated effect of adipocytes on osteoblasts, how it manifests itself and which adipokines mediate it.

For this purpose, cell culture medium was conditioned by primary human adipocytes so that it contained all adipokines. Cells from a murine preosteoblastic cell line and primary human preosteoblasts were exposed to this conditioned medium. It was shown that under the influence of adipokines the proliferation of preosteoblasts increased. This depended on FGF receptor 1 and PI3 kinase. bFGF/FGF-2 could be detected in the conditioned medium and the effect of the conditioned medium could be imitated by recombinant FGF-2 depending on FGFR1 and PI3K. Even if differentiation into mature osteoblasts was not stimulated, the OPG/RANKL ratio could be increased. As a result, the treated preosteoblasts had an inhibitory effect on the differentiation of osteoclasts. As evidence of an endocrine-mediated effect, FGF-2 was detected in human serum depending on BMI.

The results of this work indicate a positive endocrine and adipokine-mediated effect of adipose tissue on bone. A better understanding of these processes offers the possibility of identifying new targets for future agents for osteoporosis therapy.

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B	MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase	MSC	Mesenchymal Stem Sells
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
BMD	Bone Mineral Density	OPG	Osteoprotegerin
BMI	Body Mass Index	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
BMP	Bone Morphogenetic Protein	PTH	Parathyroid Hormone
Ca ²⁺	Calcium	RANK	Receptor Activator of NF- κ B
DKK	Dickkopf	RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
DXA	Dual X-ray Absorptiometrie	RAS	Rat Sarcoma Virus
ECM	Extracellular Matrix	SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	SRP1	Secreted Frizzled-related Protein 1
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur	STAT	Signal Transducers And Activators Of Transcription
FDA	Food and Drug Administration	TCF	T-Cell Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor	TNF	Tumor Necrosis Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor	TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor
FOXO1	Forkhead Box Protein O1	WNT	Kombination der Gen-Namen Wingless aus Drosophila und Int-1 aus der Maus
FRAME	Fracture Study In Postmenopausal Women With Osteoporosis		
FRS2 α	FGFR Substrate 2 α		
GAB1	GRB2-associated Binder 1		
GRB2	Growth Factor Receptor-bound 2		
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3 β		
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1		
IL-6	Interleukin-6		
JAK	Januskinase		
LEF1	Lymphocyte Enhancer Factor 1		
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Osteoporose.....	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Klassifikation	1
1.1.3	Diagnostik	1
1.1.4	Komplikationen	2
1.1.5	Therapie	2
1.2	Osteogenese.....	4
1.2.1	Intramembranöse und endochondrale Ossifikation	5
1.2.2	Osteoklasten	5
1.2.3	Osteoblasten.....	6
1.2.4	Osteozyten	6
1.3	Fibroblast Growth Factor (FGF) in der Osteogenese	6
1.4	OPG/RANKL/RANK.....	7
1.4.1	Receptor Activator of NF- κ B (RANK).....	7
1.4.2	Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)	7
1.4.3	Osteoprotegerin (OPG).....	8
1.5	Adipokine	8
1.5.1	Leptin	8
1.5.2	Adiponectin	9
1.5.3	Tumor Necrosis Factor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6).....	9
1.5.4	WNT-Signalweg.....	9
1.6	Ethikvotum	10
1.7	Ziel der Arbeit.....	11
2	Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation, Kühn, M.C., Willenberg, H.S., Schott, M., Papewalis, C., Stumpf, U., Flohé, S., Scherbaum, W.A., Schinner, S., Mol Cell Endocrinol., 349(2), 180-188, (2012)	12
3	Diskussion	13
3.1	Assoziation von Body Mass Index (BMI) und Bone Mineral Density (BMD)	13
3.2	Adipokine und Bone Mineral Density	14
3.3	Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) als endokrines Adipokin.....	15
3.4	Stärken und Schwächen der Arbeit	16
3.5	Schlussfolgerung.....	17
4	Bibliografie	18

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

1.1.1 Definition

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die mit erniedrigter Knochendichte und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens und damit mit einer verringerten Knochenstabilität einhergeht. Hierdurch steigt das Risiko für Frakturen, insbesondere im Bereich der Hüfte und der Wirbelkörper (1)(2).

1.1.2 Klassifikation

In den meisten Fällen, nämlich ca. 90%, liegt eine primäre Osteoporose vor. Hier wird unterschieden zwischen: Typ I, der postmenopausalen, durch hormoneller Umstellung bedingten Osteoporose bei Frauen, und Typ II, der senilen Osteoporose, bei der durch eine verminderte Anzahl und Funktion der Osteoblasten im Alter die Knochenmasse abnimmt. Die idiopathische Osteoporose ist selten. Sie wird unterteilt in die idiopathische juvenile Osteoporose (zwischen dem 8. und 14. Lebensjahr, gekennzeichnet durch Knochenschmerzen und Wirbelkörperfrakturen und sistiert wenige Jahre nach der Pubertät spontan) und die idiopathische Osteoporose junger Erwachsener (zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, betrifft vor allem rauchende Männer und die Wirbelsäule).

Unter die sekundären Formen der Osteoporose, die ca. 10% der Fälle ausmachen, fallen zum einen die medikamentös bedingten Erkrankungen, wie nach einer systemischen Langzeittherapie mit Glukokortikoiden (die dosisabhängig vor allem zu einem erhöhten Risiko für vertebrale Frakturen führt) sowie nach einer Langzeittherapie mit Protonenpumpenhemmern, Antiepileptika, Aromatasehemmern, inhalativen Glukokortikoiden und Serotonin-Wiederaufnahmehemmern. Außerdem können endokrinologische Erkrankungen zu einer sekundären Osteoporose führen: Endogenes Cushing-Syndrom, Hypogonadismus, Klimakterium praecox, primärer Hyperparathyreoidismus, Hypophyseninsuffizienz und Hyperthyreose.

Essstörungen können durch hormonellen Veränderungen und Mangelernährung ebenfalls zu einer sekundären Osteoporose führen (3).

1.1.3 Diagnostik

Bis zum Auftreten einer Fraktur ist die Osteoporose klinisch inapparent. Es treten also keine spezifischen Schmerzen oder Funktionseinschränkungen auf. Die Diagnose wird durch die Bestimmung der Knochendichte in einer *Dual X-ray*

Absorptiometrie (DXA)-Messung an der Lendenwirbelsäule und/oder dem proximalen Femur gestellt.

Eine Osteoporose liegt vor, wenn der Knochenmineralgehalt in dieser Messung um mehr als 2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20- bis 29-jährigen Frau abweicht. Die in Standardabweichungen angegebene Abweichung der Knochendichte von der einer 20- bis 29-jährigen Frau wird als T-Score bezeichnet. Bei einem T-Score zwischen -1,0 und -2,5 liegt eine Osteopenie vor (4).

1.1.4 Komplikationen

Komplikationen nach einer osteoporotischen Fraktur sind nicht selten und sind oft folgenschwer und weitreichend. Innerhalb eines Jahres nach der Fraktur versterben bis zu 20% der Patienten (5).

Auch nach einer erfolgreichen Akuttherapie einer osteoporotischen Hüftfraktur kann der Verlust der Mobilität und der Autonomie zu einem relevanten Verlust an Lebensqualität führen. Die Folgen können enorm sein. So zeigten verschiedene Studien, dass 40-60% der Patienten auch ein Jahr nach einer Hüftfraktur ihr vorheriges Mobilitätsniveau nicht wieder erreichen konnten. Ein Drittel der Patienten konnte nach der Fraktur auch über ein Jahr hinaus Aktivitäten zur Selbstfürsorge nicht mehr selbstständig ausführen. Jeder zehnte Patient musste innerhalb eines Jahres nach der Fraktur in einer Pflegeeinrichtung untergebracht werden (6).

Das Lebenszeitrisiko für traumatische Frakturen der Hüfte, der Wirbelkörper oder des Handgelenks wird auf annähernd 40% geschätzt und ist damit vergleichbar mit dem für koronare Herzerkrankungen (1). Bis zu jede zweite Frau und jeder vierte Mann erleiden in ihrem Leben eine osteoporotische Fraktur (7).

Generell kommt es mit dem Alter zu einer Abnahme der Knochendichte (8). Ein Grund für die deutlich gesteigerte Prävalenz einer Osteoporose bei Frauen sind die hormonellen Veränderungen, die sich in der Menopause einstellen (9).

1.1.5 Therapie

In den 1960er wurde entdeckt, dass Bisphosphonate die Kalzifikation und Resorption des Knochens günstig beeinflussen. Daraufhin wurden Wirkstoffe aus dieser Substanzgruppe zur Therapie der Osteoporose entwickelt.

Bisphosphonate gehören zu den antiresorptiven Therapeutika und sind aktuell die am häufigsten verwendete Therapie gegen eine Osteoporose. Sie sind anorganische Diphosphat-Analoga, die in der Knochenmatrix gebunden und von

Osteoklasten im Rahmen der der Knochenresorption aufgenommen werden. In Osteoklasten inhibieren sie die Farnesylpyrophosphat-Synthase, die ein Schlüsselenzym in der intrazellulären Signalübermittlung in Osteoklasten ist (10).

Ein weiteres antiresorptives Therapeutikum ist Denosumab. Denosumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der an *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) bindet, also die Wirkung von Osteoprotegerin, dem physiologischen Antagonisten von RANKL, nachahmt (weiteres siehe im Kapitel 1.4). Auf diese Weise wird eine Bindung von RANKL an *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) auf Osteoklasten und dadurch die Entwicklung und Funktion bzw. Aktivität von Osteoklasten verhindert (11).

Östrogene haben eine stimulierende Wirkung auf Knochengewebe, Brustgewebe und uterines Gewebe. Die therapeutisch eingesetzten selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) imitieren den Effekt von Östrogen auf den Knochen, stimulieren allerdings nicht das Gewebe der Brust oder des Uterus (12). Der am häufigsten zur Therapie der Osteoporose verwendete antiresorptive SERM ist Raloxifen (13).

Eine zweite Gruppe fasst osteoanabole Therapeutika zusammen. Diese erhöhen die Knochenmasse durch die Stimulation von Osteoblasten. Der am häufigsten verwendete Therapieansatz innerhalb dieser Gruppe ist die intermittierende Gabe von *Parathyroid Hormone* (PTH), welches die Saumzellen (ruhende Osteoblasten) aktiviert und dadurch zu einer erhöhten Anzahl an Osteoblasten mit vermehrter Knochenbildung führt (14). Wichtig ist hierbei die intermittierende Gabe von PTH, da chronisch erhöhte Serumlevel (wie beim primären Hyperparathyreoidismus) die Knochendichte verringern würden.

Teriparatid, oder auch rekombinantes humanes PTH(1-34) ist ein aktives Fragment des humanen PTH, das sowohl Osteoblasten direkt, als auch die renale Produktion von 1,25-Dihydroxycholecalciferol stimuliert (15, 16).

Abaloparatid ist ein synthetisches Analogon von Teriparatid mit vergleichbarer Wirkweise und Wirkung. Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) hat Abaloparatid für die Behandlung von Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit erhöhtem Frakturrisiko im Dezember 2022 zugelassen (17). In Deutschland wird dieser Wirkstoff noch nicht im klinischen Alltag verwendet. In den USA ist er bereits seit 2017 als zweiter osteoanaboler Wirkstoff zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose zugelassen(18).

Romosozumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der zur Therapie der Osteoporose 2019 von der *Food and Drug Administration* (FDA) und 2020 von der EMA zugelassen wurde. Durch die Bindung an Sclerostin wird dieses neutralisiert

und seine Wirkung dadurch inhibiert. Sclerostin wiederum hat eine inhibierende Wirkung auf den WNT-Signalweg. Es bindet an Low Density *Lipoprotein Receptor-Related Protein* (LRP5/6), den Co-Rezeptoren des WNT-Signalwegs und verhindert dadurch, dass entsprechende WNT-Liganden den kanonischen WNT-Signalweg aktivieren können. Somit unterbindet Romosozumab eine Hemmung des WNT-Signalwegs (weiteres siehe Kapitel 1.5.4).

Romosozumab gilt als *dual-acting* Wirkstoff, da durch seine Wirkung zum einen die Knochenresorption gehemmt und andererseits auch die Knochenformation gefördert wird (19). Es werden vermehrt *bone-lining cells* in Osteoblasten differenziert und deren Aktivität gesteigert, was zu einer erhöhten Synthese von extrazellulärer Knochenmatrix führt (20). Gleichzeitig wird die vorhandene und neu gebildete Knochensubstanz vor der Resorption durch Osteoklasten und damit vor dem Abbau geschützt. Es wurde in humanen Knochenbiopsien aus einer Untergruppe aus Patientinnen der multizentrischen, internationalen, randomisierten, doppel-blind und placebo-kontrollierten *Fracture Study In Postmenopausal Women With Osteoporosis* (FRAME) gezeigt, dass die unter Romosozumab abfallenden Resorptionsparameter auch über 12 Monate konstant erniedrigt blieben (21).

Dies führte zu einer raschen Verbesserung der Knochendichtewerte und einer signifikanten Reduktion des Frakturrisikos.

In der FRAME Studie, in der die Wirksamkeit der monatlichen Gabe von 210 mg Romosozumab über 12 Monate gegenüber Placebo untersucht wurde, wurden 6390 Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose eingeschlossen.

Mit dem Verum behandelte Patientinnen hatten eine signifikante Zunahme der Knochendichte im Bereich der Wirbelkörper (13,3 % höher als in der Placebogruppe) wie auch im Bereich des Femurhalses und der Hüfte (6-7 % höher als in der Placebogruppe) (22). Ebenso verhielt es sich mit dem Effekt auf das Frakturrisiko. Nach einer 12-monatigen Therapie mit Romosozumab war das Risiko für eine Wirbelkörperfraktur um 73 % reduziert. Der Effekt trat rasch ein, denn die drei Wirbelkörperfrakturen in der Romosozumab-Gruppe, die klinisch auffielen, traten nur innerhalb der ersten 2 Monate auf (23).

Allerdings ist der positive Effekt von Romosozumab auf die Knochendichte reversibel und verschwand ein Jahr nach Beendigung einer 24-monatigen Therapie und ohne anschließende Sequenztherapie mit einem antiresorptiven Wirkstoff vollständig (24).

1.2 Osteogenese

Das erwachsene Skelett unterliegt dynamischen Prozessen, durch die es innerhalb einer Dekade komplett erneuert wird (25). Hierbei halten sich anabole und katabole

Prozesse idealerweise die Waage, so dass trotz kontinuierlichem Knochenaufbaus und Knochenabbaus die Knochendichte und Knochenqualität unverändert bleiben.

1.2.1 Intramembranöse und endochondrale Ossifikation

Knochen kann auf zwei verschiedenen Arten gebildet werden: die intramembranöse Ossifikation und die endochondrale Ossifikation. Ausgangspunkt ist in beiden Fällen die mesenchymale Stammzelle (*mesenchymal stem cell*, MSC). Mesenchymale Stammzellen können sich zu Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren, abhängig von den hormonellen Signalen, denen sie ausgesetzt sind.

In einem ersten Schritt in beiden Arten der Ossifikation formen mesenchymale Stammzellen Kondensationen. Im Rahmen der intramembranösen Ossifikation differenzieren sich die Zellen der mesenchymalen Kondensation direkt zu Osteoblasten. Dies geschieht zum Beispiel im Bereich des Schädelknochens und in Bereichen der Claviculae. Im Rahmen der endochondralen Ossifikation bilden sich zunächst unreife, ruhende Chondrozyten im Zentrum der mesenchymalen Kondensation. Einige dieser Zellen fangen an, sich vermehrt zu teilen und eine extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) zu bilden (26, 27). Die Umwandlung des von Chondrozyten gebildeten Knorpels in mineralisierten Knochen ist ein komplexer Prozess. Präosteoblasten und Osteoklasten wandern aus dem Perichondrium in den hypertrophen Knorpel ein. Der hypertrophe Knorpel wird resorbiert. Präosteoblasten differenzieren zu reifen Osteoblasten, die eine mineralisierte Knochenmatrix bilden. Sind die reifen Osteoblasten mit der von ihnen gebildeten Knochenmatrix vollständig umgeben, differenzieren sie sich weiter in Osteozyten (28-30).

1.2.2 Osteoklasten

Osteoklasten sind polynukleäre Riesenzellen, die durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellreihe entstehen. Ihre Funktion ist die Resorption mineralisierter Knochenmatrix. Zu den kennzeichnenden Merkmalen, durch die sie sich identifizieren lassen, gehört die Expression der *tartrate-resistant acid phosphatase* (31, 32). Neben anderen Faktoren ist RANKL ein wesentlicher Faktor, der zur Differenzierung und für die Funktion von Osteoklasten notwendig ist (33, 34).

1.2.3 Osteoblasten

Osteoblasten sind die reifen und aktiven Zellen, die den Knochen formen. Sie entstehen aus Präosteoblasten, die wiederum aus mesenchymalen Stammzellen entstehen. Osteoblasten haben wichtige Aufgaben im Knochenumbau: sie produzieren und sezernieren Faktoren die die Bildung und Funktion von Osteoklasten fördern (wie zum Beispiel RANKL) oder aber hemmen (wie zum Beispiel Osteoprotegerin (OPG)). Sie produzieren die Proteine der Knochenmatrix und sind für die Mineralisation verantwortlich (35). Ein früher Differenzierungsmarker ist die alkalische Phosphatase (ALP), in späteren Stadien der Differenzierung erfolgt die Mineralisierung der Knochenmatrix durch Calcium-Ablagerungen (36, 37).

1.2.4 Osteozyten

Osteozyten entstehen aus einer Subpopulation von Osteoblasten, die terminal differenziert und von mineralisierter Knochenmatrix umgeben sind. Dort befinden sie sich in Flüssigkeits-gefüllten Lakunen und bilden über Canaliculi dendritische Ausläufer, mit denen sie untereinander und mit Osteoblasten an der Knochenoberfläche kommunizieren. Osteozyten werden durch mechanische Reize stimuliert und können so die Belastung des Knochens in den Knochenstoffwechsel transformieren. Sie sind mit 90-95 % die vorherrschende Zellart im Knochen (38-40).

1.3 Fibroblast Growth Factor (FGF) in der Osteogenese

Eine Vielzahl an Faktoren und ihre entsprechenden Signalwege regulieren die Proliferation und Differenzierung von Präosteoblasten zu Osteoblasten wie zum Beispiel: Proteine wie *bone morphogenetic proteins* (BMPs), Hormone wie PTH und WNT-Moleküle oder Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF).

Gegenwärtig sind 22 verschiedene FGFs bekannt, die eine unterschiedliche Affinität zu den 4 verschiedenen *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) haben. In Folge der Bindung eines FGF an einen FGFR (zusammen mit Heparin/Heparan Sulfat als Co-Faktor) können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, darunter die RAS-MAPK, JAK-STAT oder PI3K-AKT Signalwege.

Das Haupt-FGFR-Kinase-Substrat *FGFR Substrate 2a* (FRS2a), das mit der juxtamembranen Region des FGFR verbunden ist, wird durch die nach Bindung eines Liganden aktivierte Kinase des FGFR phosphoryliert. Phosphoryliertes FRS2a rekrutiert das Adapterprotein *Growth Factor Receptor-bound 2* (GRB2), das

wiederum das Adapterprotein *GRB2-associated Binder 1* (GAB1) rekrutiert. Hierdurch wird das Enzym *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K) aktiviert und durch dieses das Enzym Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert. Durch so aktiviertes AKT kann unter anderem der *Mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR) Komplex aktiviert werden, oder der *Forkhead Box Protein O1* (FOXO1) Transkriptionsfaktor, woraufhin dieser den Nucleus verlässt (41).

1.4 OPG/RANKL/RANK

Um das Skelett fortwährend an die auf es einwirkenden Kräfte anzupassen, aber gleichzeitig ein über das Maß hinausgehendes Eigengewicht zu vermeiden, ist eine enge Regulation von Osteoblasten und Osteoklasten und eine Rückkoppelung dieser beiden Zellarten notwendig. Hier sind OPG, RANKL, und RANK von großer Bedeutung.

1.4.1 Receptor Activator of NF- κ B (RANK)

RANK ist ein Transmembran-Protein mit einer fundamentalen Bedeutung für Bildung und Funktion reifer Osteoklasten (42). Es ist aber auch auf einer Vielzahl weiterer Zellen nachgewiesen worden. Krebszellen mit einem hohen Potenzial zur ossären Metastasierung, nämlich Mamma-Karzinom und Prostata-Karzinom, exprimieren ebenfalls RANK (43, 44).

Nach der Bindung von RANKL an RANK wird die *TNF receptor-associated factors* (TRAFs) Familie aktiviert. RANK/TRAF reguliert die Bildung, Aktivierung und die Funktion von Osteoklasten über verschiedene Signalwege zur Bildung reifer Osteoklasten sowie zur Aktivierung dieser (42, 45).

1.4.2 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

RANKL ist ein membrangebundenes Protein auf Osteoblasten. Es kommt jedoch auf auf anderen Zellen vor, so auf aktivierten T-Zellen, in Lymphknoten, in Brustdrüsen und in der Lunge (46). Durch proteolytische Spaltung oder alternatives Splicing kann es auch sezerniert werden (47, 48).

RANKL reguliert die Bildung, Aktivierung und die Funktion von osteoklastischen Vorläuferzellen und Osteoklasten über verschiedene Signalwege nach Bindung an seinen Rezeptor RANK an diesen Zellen (42, 49). Hierdurch wird die Knochenresorption gefördert.

1.4.3 Osteoprotegerin (OPG)

OPG wird unter anderem von Osteoblasten produziert (50). Es funktioniert als *decoy receptor* für RANKL, das es bindet und dadurch seine Bindung an RANK sowie die Aktivierung der nachfolgenden Signalwege verhindert (51, 52).

OPG *knock-out* Mäuse haben aufgrund einer dysregulierten Aktivierung von Osteoklasten eine verminderte Knochendichte mit Ausdünnung der trabekulären und kortikalen Strukturen. Es kommt zu einer gesteigerten Inzidenz an Frakturen (53).

OPG schützt den Knochen also vor Resorption, indem es an RANKL bindet und dessen Bindung an RANK verhindert. Damit ist die relative Konzentration von RANKL und OPG im Knochen eine wichtige Determinante der Knochendichte.

1.5 Adipokine

Das Fettgewebe und auch Adipozyten im Einzelnen sind inzwischen als endokrines Organ gut etabliert, das Zytokine, Hormone und Hormon-ähnliche Stoffe bildet, sezerniert und damit Einfluss auf die Funktion anderer Organe nimmt (54-59). Diese unterschiedlichen, von Adipozyten produzierten Signalmoleküle werden als Adipokine bezeichnet.

Einige dieser Adipokine haben eine bekannte Wirkung auf Knochenzellen.

1.5.1 Leptin

Leptin ist eines der bekanntesten Adipokine mit Wirkung auf den Knochen. Es ist ein Zytokin-ähnliches Hormon, das eine Schlüsselrolle im Energiehaushalt und der Appetitkontrolle spielt, indem es ein Sättigungsgefühl im Hypothalamus bewirkt (60). Bei übergewichtigen Personen liegt ein Zustand einer Leptin-Resistenz vor, so dass die Serumkonzentration erhöht ist. Auf den Knochen kann Leptin einerseits eine direkte, über periphere Signalwege vermittelte und anabole Wirkung haben (61, 62). Andererseits ist die indirekte, über das zentrale Nervensystem (und hier die hypothalamische Achse) vermittelte Wirkung katabol (63). Eine Unterbrechung des Leptin Signalweges durch ein *knock-out* des Leptinrezeptor-Gens in Ratten führt zu einer Reduktion des Knochenvolumens und der Knochendichte (64).

Eine Metaanalyse von 45 Studien zeigte, dass die Leptin-Serumkonzentration positiv mit der *Bone Mineral Density* (BMD) in postmenopausalen Frauen korreliert (65).

Andererseits konnte eine Auswertung der DXA-Messungen und Nüchtern-Leptin-Serumkonzentrationen von 5815 Datensätzen aus der *Third U.S. National Health*

and Nutrition Examination Survey (NHANES III) keine Assoziation zwischen der Leptin-Serumkonzentration und der BMD in prämenopausalen oder postmenopausalen Frauen finden. Die Serum-Leptinkonzentration schien die BMD nicht direkt zu beeinflussen (66).

1.5.2 Adiponectin

Adiponectin ist ein weiteres Adipokin mit Wirkung auf den Knochen. Adiponectin korreliert invers mit dem Körpergewicht. Erniedrigte Serumkonzentrationen werden bei Übergewicht, Diabetes und Insulinresistenz beobachtet (67, 68). Durch Adiponectin wird die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten gefördert (69).

1.5.3 Tumor Necrosis Factor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6)

Auch TNF α und IL-6 werden von Adipozyten gebildet und sezerniert, wobei die beiden Zytokine die Osteoklastogenese und Knochenresorption fördern, was z.B. auch in der Pathogenese der chronischen Polyarthrits eine Rolle spielt (70, 71).

1.5.4 WNT-Signalweg

Der kanonische WNT-Signalweg (Kombination der Gen-Namen Wingless aus *Drosophila* und Int-1 aus der Maus) erlangte Aufmerksamkeit als ein wichtiger Regulator der Knochenmasse, nachdem eine Genstudie aufdeckte, dass Mutationen im Gen, das LRP5 kodiert, ursächlich für die autosomal rezessive Erkrankung Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG) sind (72). Diese Erkrankung ist, neben bereits bei der Geburt vorhandenen Augenveränderungen, durch verminderte Knochenmasse und eine erhöhte Inzidenz von Osteoporosebedingten Frakturen gekennzeichnet. Bemerkenswert ist, dass die Skelettveränderungen auch heterozygote Träger der ursächlichen *loss-of-function* Allele des *LRP5* Gens betreffen (72).

Sowohl in genetischen Studien als auch in murinen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte gezeigt werden, dass die *loss-of-function* Mutation im *LRP5* Gen aufgrund einer herabgesetzten Proliferation von Osteoblasten zu einer verminderten Knochenmasse führt (73-76).

Es wird zwischen dem kanonischen (β -catenin abhängigen) und dem nicht-kanonischen (β -catenin unabhängigen) WNT-Signalweg unterschieden.

Die kanonische Signalübertragung erfolgt durch β -catenin, das in der Abwesenheit von WNT-Liganden durch einen Komplex aus *Glykogen Synthase Kinase-3 β* (GSK-3 β), *Adenomatous polyposis coli* (APC) und Axin phosphoryliert wird. Phosphoryliertes β -catenin wird ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert.

Binden WNT-Liganden, wie WNT1 oder WNT3a, an einen Komplex aus dem G-Protein-gekoppelten Frizzled-Rezeptor und einem LRP5/6 Co-Rezeptor, wird die Aktivität der GSK-3 β gehemmt, was zur zytoplasmatischen Akkumulation von β -catenin führt. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass β -catenin in den Nukleus transloziert, wo es einen Komplex aus *T-cell factor* (TCF)/*lymphocyte enhancer factor 1* (LEF1) und *CREB-binding protein* (CBP) aktiviert und dadurch die Expression entsprechender Zielgene induziert (77, 78).

Durch competitive Bindung an eine von vier β -Propeller-Domänen von LRP5/6 können Proteine der Dickkopf (DKK-1 bis 4) Protein Familie, *Secreted Frizzled-related Protein 1* (SFRP-1) oder Sclerostin den kanonischen WNT-Signalweg inhibieren (79, 80).

Der nicht-kanonische WNT-Signalweg ist ein allgemeiner Begriff für Signalwege, die nach Bindung eines WNT-Liganden, wie WNT1 oder WNT5a, ohne zytoplasmatische β -catenin Akkumulation einen Ca^{2+} - oder *planar cell polarity* (PCP)-abhängigen Signalweg aktivieren.

Im WNT/ Ca^{2+} Signalweg aktiviert die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration die *calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMK II) und die *protein kinase C* (PKC). Im WNT/PCP Signalweg erfolgt die Signalübertragung über *small G proteins* wie Rac und Rho (77, 81).

Wie weiter oben beschrieben wirkt ein neuer Wirkstoff zur Therapie der Osteoporose, der humanisierte monoklonale Antikörper Romosozumab, durch Beeinflussung des kanonischen WNT-Signalwegs, indem es Sclerostin bindet und neutralisiert. Dies führt zu einer raschen und signifikanten Zunahme der Knochendichte und Abnahme des Frakturrisikos.

1.6 Ethikvotum

Der Ethikantrag mit dem Titel „Einfluss von humanen Adipozyten auf humane adulte Knochenvorläuferzellen“ wurde am 19.02.2009 durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 3189 bewilligt.

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob Adipokine einen direkten Einfluss auf die Knochenbildung und Knochenqualität haben. Zudem sollte untersucht werden, welches Adipokin hierfür verantwortlich ist und über welche Mechanismen - also Proliferation, Differenzierung, Interaktion - dies geschieht.

Die Dissertation soll ein Beitrag zum Verständnis von vor einer Abnahme der Knochendichte schützender Faktoren sein. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge kann dazu führen, neue und weiterhin notwendige Ansätze in der Therapie der Osteoporose und der Osteoporose-assoziierten Frakturen zu entwickeln.

2. Publierte Originalarbeit

Molecular and Cellular Endocrinology 349 (2012) 180–188



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation

Markus C. Kühn^a, Holger S. Willenberg^a, Matthias Schott^a, Claudia Papewalis^a, Ulla Stumpf^b, Sascha Flohé^b, Werner A. Scherbaum^a, Sven Schinner^{a,*}

^a Department of Endocrinology, Diabetes and Rheumatology, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

^b Department of Traumatology and Handsurgery, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Received in revised form 12 September 2011

Accepted 15 October 2011

Available online 25 October 2011

Keywords:

Adipocytes

Osteoblasts

Osteoporosis

Obesity

bFGF

OPG/RANKL ratio

ABSTRACT

Several studies have reported a positive relationship of the body fat mass and bone density. However, it is not clear whether adipocyte-derived signaling molecules directly act on osteoblasts or osteoclasts. Therefore, we investigated the effect of fat cell-secreted factors on the proliferation and differentiation of preosteoblasts and the molecular mechanisms involved.

This stimulation led to an increased proliferation of MC3T3-E1 and primary preosteoblastic cells (2.8-fold and 1.5-fold, respectively; $p < 0.0001$), which could be reduced with inhibitors of protein tyrosine kinases, FGFR1 and PI3K. Concordantly, we found human adipocytes to secrete bFGF and bFGF to mimic the effect of adipocyte-secreted factors. The ratio of OPG/RANKL secretion in primary human preosteoblasts increased 9-fold (mRNA and protein) when stimulated with adipocyte-secreted factors. Moreover, osteoblasts which were prestimulated with adipocyte-secreted factors inhibited the formation of osteoclasts.

In conclusion, human adipocytes secrete factors that directly act on preosteoblasts and alter their crosstalk with osteoclasts. These *in vitro* findings reflect the higher bone mass in obese people and attribute it to effects of adipocyte-secreted factors on bone formation.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoporosis is a generalized skeletal disorder characterized by reduced bone mass and compromised bone quality, thus, eventually leading to an increased fracture risk (NIH Consensus, 2001).

At the age of 50, the lifetime risk for an osteoporotic fracture is 39.7–53.2% for women and 13.1–22.4% for men, respectively (Johnell and Kanis, 2005). In addition, osteoporotic fractures not

only cause high costs for health care systems worldwide but also lead to a significant increase in mortality (Borgstrom et al., 2006; 2007; Burge et al., 2007; Clark et al., 2008; Haussler et al., 2007; Johnell and Kanis, 2006; Konnopka et al., 2009). The WHO anticipates a worldwide increase in osteoporotic hip fractures from 1.7 million in 1990 to 6.3 million by 2050 (WHO, Press Release 1999). Therefore, it is of great clinical and socio-economic interest to understand risk-conferring and preventing mechanisms for osteoporosis.

After a proliferation step preosteoblasts start to differentiate into mature osteoblasts (Colnot, 2005). An early differentiation marker is the alkaline phosphatase (ALP) whereas matrix mineralization with calcium deposits occurs at a later step (Hoemann et al., 2009). Mature osteoblasts also produce osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), which have opposing effects on osteoclasts.

The association of adipose tissue mass and bone mass in humans has been investigated by several groups. The results are, however, controversial. While a few studies reported a negative association of the body mass index (BMI) with bone mineral density (BMD) (Beck et al., 2009; Travison et al., 2008; Zhao et al., 2007), the majority indicated a positive correlation between the BMI (Gnudi et al., 2009; Kinjo et al., 2007; Nguyen et al., 2005;

Abbreviations: ALP, Alkaline phosphatase; bFGF, Basic fibroblast growth factor; BMI, Body mass index; BMD, Bone mineral density; CM, Control medium; DKK, Dickkopf; EGF, Epidermal growth factor; FCCM, Fat-cell conditioned-medium; FGFR1, Fibroblast growth factor receptor type 1; JAK, Janus kinase; LRP, Low density lipoprotein receptor-related protein; M-CSF, Macrophage colony-stimulating factor; MEK, MAPK/ERK kinase; OPG, Osteoprotegerin; PDGF, Platelet-derived growth factor; PI3K, Phosphatidylinositol-3-kinase; PKA, Protein kinase A; RANK, Receptor activator of nuclear factor kappa B; RANKL, Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; SFRP, Secreted frizzled-related protein; TRAP, Tartrate-resistant acid phosphatase.

* Corresponding author. Tel.: +49 211 8117810; fax: +49 211 8117860.

E-mail addresses: markus-kuehn@uni-duesseldorf.de (Markus C. Kühn), holger.willenberg@uni-duesseldorf.de (H.S. Willenberg), matthias.schott@med.uni-duesseldorf.de (M. Schott), claudia.papewalis@uni-duesseldorf.de (C. Papewalis), Ulla.Stumpf@med.uni-duesseldorf.de (U. Stumpf), Sascha.Flohe@med.uni-duesseldorf.de (S. Flohé), Scherbaum@uni-duesseldorf.de (W.A. Scherbaum), sven.schinner@uni-duesseldorf.de (S. Schinner).

0303-7207/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mce.2011.10.018

von et al., 2007) or the body fat mass (Gnudi et al., 2007; Nguyen et al., 2005) and BMD, but the underlying mechanisms are not understood.

Adipose tissue is considered as an endocrine organ known to secrete various adipokines including leptin, adiponectin and Wnt molecules (Fischer-Posovszky et al., 2007; Rasouli and Kern, 2008; Schinner et al., 2005, 2008). The effects of individual adipokines on bone are summarized elsewhere (Gomez-Ambrosi et al., 2008; Reid, 2008). In the current study we therefore investigated the direct effects of human adipocytes through secreted factors on preosteoblast proliferation as well as differentiation and OPG/RANKL expression.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and proteins

Recombinant murine Sfrp1, Dkk1, RANKL and M-CSF and recombinant human bFGF were purchased from R&D Systems. I-OMe-AG 538, HNMPA-(AM)₃, JAK-Inhibitor I, PD173074 and Src-Inhibitor I were purchased from Calbiochem. All other inhibitors and chemicals were from Sigma–Aldrich.

2.2. Cell culture

The murine preosteoblastic cell line MC3T3-E1 and the murine osteoclast precursor cell line RAW264.7 were purchased from ATCC, USA. All cells were cultured in α -MEM (Invitrogen) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% FCS (culture medium) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. Medium was changed every 3–4 days.

2.3. Isolation of primary human preosteoblasts

Tissue samples of human bone were obtained from the femoral heads of patients undergoing elective surgery for partial hip replacement after femoral neck fracture ($n = 6$). Consent was obtained from the patients after the nature of the procedure had been explained. This study was approved by the ethics committee of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany (study number 3189). After surgery, tissue samples were immediately transferred to the laboratory. The isolation of primary human preosteoblasts has been described previously (Kuznetsov and Gehron, 1996). In brief, bone marrow was scraped into culture medium, filtered through 100 and 70 μ m cell strainer (BD Bioscience) and cultured for 24 h. Cells were washed with PBS (Invitrogen) to remove non-adherent cells and cultured until grown to 70% confluence. Culture medium was changed every 3–4 days. Thereafter, cells were trypsinized and kept frozen in nitrogen.

2.4. FCCM (fat-cell conditioned-medium)

The isolation of adipocytes and preparation of FCCM is well established and has been described previously (Ehrhart-Bornstein et al., 2003; Schinner et al., 2007, 2008). Tissue samples of human visceral adipose tissue were obtained from patients undergoing abdominal surgery ($n = 5$). The mean BMI was 33.4 (SD \pm 7.4) kg/m². Consent was obtained from the patients after the nature of the procedure had been explained. This study was approved by the ethics committee of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany (study number 2292).

In brief, adipose tissue samples were separated from fibrous material and blood vessels, minced and digested in Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB) containing BSA and collagenase type I. The digested tissue was filtered (250 μ m mesh) and washed with

KRB containing 0.1% BSA. For culture, 8 ml of isolated floating adipocytes were incubated in 20 ml serum-free α -MEM for 24 h. The conditioned medium was thereafter filtered. As control medium serum-free α -MEM (Invitrogen) was incubated at 37 °C without adipocytes for 24 h.

2.5. Osteoblast differentiation

For differentiation studies, cells were cultured in 6-well plates (Greiner Bio One) at a density of 200,000 cells/well. After 24 h, culture medium was replaced by serum-free α -MEM and control medium, FCCM, or serum-free α -MEM containing 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml L-ascorbic acid and 100 nM dexamethasone as a positive control (Sakaguchi et al., 2004) in a ratio of 1:1 for 14 days. The medium was changed every 3–4 days. For the last 24 h before harvesting cells were grown in 2 ml α -MEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% FCS.

2.6. Osteoclast differentiation

MC3T3-E1 cells were treated with control medium or fat-cell conditioned-medium in a ratio of 1:1 with α -MEM culture medium. The medium was changed every 3 days. After 14 days of stimulation, cells were cultured in α -MEM culture medium for 1 day. This osteoblast-conditioned medium was filtered and collected.

RAW264.7 cells were cultured in 48-well plates (Greiner Bio One) at a density of 7000 cells/well. After 24 h, culture medium was replaced by fresh α -MEM and osteoblast-conditioned medium in a ratio of 1:1. The medium was changed every 2 days. After 7 days of stimulation, cells were stained for tartrate-resistant acid phosphatase using a staining kit (Sigma).

2.7. Human serum samples

Human blood samples were obtained from 39 patients of our adipositas outpatient department. The study was performed according to the rules of the Declaration of Helsinki and all study patients gave informed written consent. The serum was separated from the cell fraction by centrifugation. Immediately after centrifugation the samples were stored at -20 °C until used. In our experiments the serum samples were subdivided into three groups ($n = 13$ each) ranging from 30 to 34.9, 35 to 39.9 and >40 kg/m².

2.8. ³H-Thymidine incorporation assay

For ³H-Thymidine incorporation assays MC3T3-E1 cells were plated at a density of 4000 and primary human preosteoblasts at a density of 3000 cells/well in culture medium in 96-well flat bottom cell culture plates. 18 h before harvesting on UniFilter-96 GF/C microplates (Perkin Elmer) cells were pulsed with 37 kBq ³H-Thymidine per well (Hartmann Analytic) After harvesting, thymidine incorporation was assessed using 25 μ l of a β -scintillation cocktail (Perkin Elmer) with a scintillation counter.

2.9. bFGF ELISA

We analyzed bFGF in FCCM by using a commercially available ELISA Kit (RayBiotech; #ELH-bFGF-001) according to the manufacturer's instructions. Each sample was assessed in duplicate.

2.10. Real-time reverse transcription PCR (RT-PCR)

Semiquantitative real-time reverse transcription PCR was performed as described previously (Schinner et al., 2008). β -Actin

was used as internal control. The primers were purchased from Qiagen. All experiments were carried out in triplicates and average cycling threshold (C_T) units were obtained as the average of the results. Relative quantification of the gene expression was calculated from three independent experiments using the comparative $\Delta\Delta C_T$ method and expressed relative to the solvent-treated CM-group as described previously (Haase et al., 2007).

2.11. Western immunoblots

Cells were lysed and centrifuged and the protein content was quantified. 7 μg of total protein were used for the SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with the appropriate primary antibody overnight. The primary antibodies used were: rabbit anti-RANKL (Acris Antibodies, #PP1086P1) at 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rabbit anti-OPG (Acris Antibodies, #AP06631PU-N) at 1:600, mouse anti- β -Actin (Sigma-Aldrich, #A5441) at 1:7500. Following incubation with HRP-coupled rabbit anti-mouse IgG (Abcam, #ab6728) at 1:2000 or goat anti-rabbit IgG (New England Biolabs, #7074) at 1:2000 the proteins were visualized by chemoluminescence. As a negative control we used lysis buffer that was subjected to the same procedures as the samples.

2.12. Determination of ALP activity

Primary human preosteoblasts were lysed, centrifuged and the protein content was quantified. ALP activity was determined using the Quantichrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (Biotrend) according to the manufacturer's instructions and related to the protein concentration of the samples.

2.13. Alizarin Red S staining

Alizarin Red S staining for determination of matrix mineralization has been described previously (Stanford et al., 1995). We slightly modified this protocol as follows. Primary human preosteoblasts were washed and fixed with methanol. After fixation, cells were rinsed once with *aqua dest.* and then stained with 40 mM Alizarin Red S followed by additional washing steps. Cells were rinsed with a series of ethanol solutions. For destaining, cells were incubated in 10% (w/v) cetylpyridinium-HCl. Alizarin Red S concentration of dye extracts was determined by absorbance at 562 nm using an Alizarin Red S standard curve in the same solution.

2.14. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. Significance was assumed at a *p*-value of less than 0.05.

3. Results

3.1. Adipocyte-secreted factors induce the proliferation of murine preosteoblastic cells

We assessed the effect of adipocyte-secreted factors on the proliferation of preosteoblastic cells. We treated murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells with fat-cell conditioned-medium (FCCM) for 48 h. As shown in Fig. 1A, treatment of MC3T3-E1 cells with FCCM resulted in a highly significant 2.8-fold increase in proliferation ($p < 0.0001$).

The Wnt-signaling pathway is a known regulator of osteoblast proliferation (Boland et al., 2004) and we have previously identified Wnt molecules in FCCM (Schinner et al., 2007). Therefore,

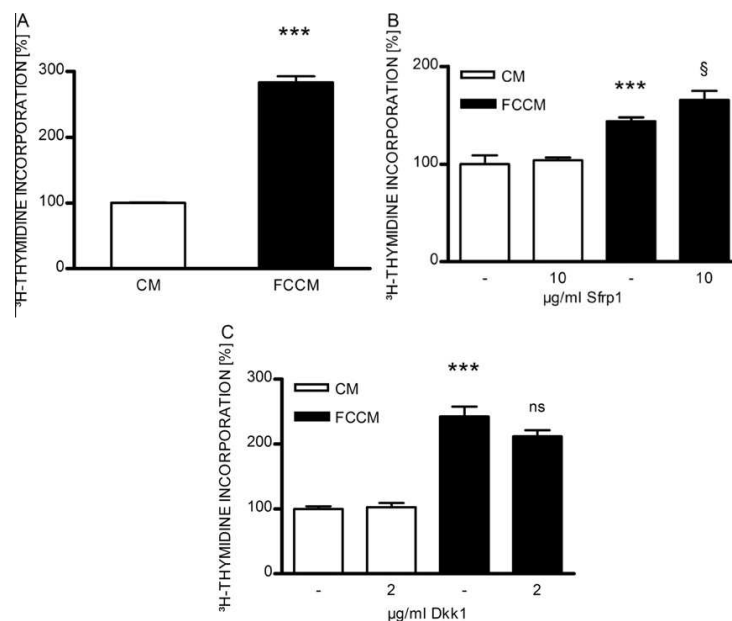


Fig. 1. Wnt antagonists do not significantly decrease FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with control medium (CM) or FCCM for 48 h. When indicated 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sfrp1 (b) or 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dkk1 (c) were added. The proliferation was measured by ^3H -Thymidine incorporation. Values are means of at least three experiments each performed in quadruplicate \pm SEM. **p* vs. CM. § *p* vs. FCCM.

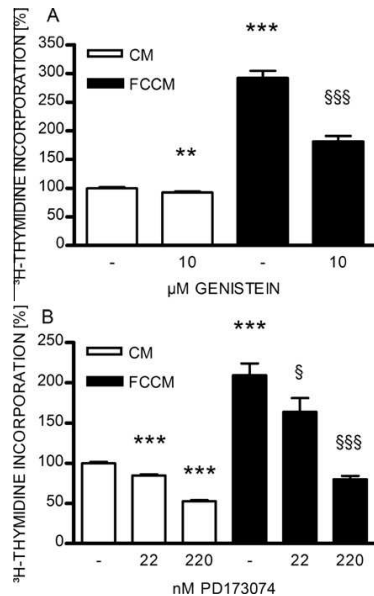


Fig. 2. Inhibition of protein tyrosine kinases and of the FGFR 1 decreases the FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with control medium (CM) or FCCM and with the indicated inhibitor for 48 h. (a) Protein tyrosine kinase inhibition by genistein, (b) inhibition of the FGFR1 by PD173074. The proliferation was measured by ^3H -Thymidine incorporation. Values are means of at least three experiments each performed in quadruplicate \pm SEM. **p* vs. CM. § *p* vs. FCCM.

we used the Wnt inhibitors Sfrp1 and Dkk1 to test whether the proliferative effect of FCCM on MC3T3-E1 cells was mediated by Wnt ligands. However, co-treatment with FCCM and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sfrp1 or 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dkk1 did not reduce the proliferative effect of FCCM on MC3T3-E1 cells (Fig. 1B and C).

3.2. Inhibition of FGF receptor type 1 reduces FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells

We tested the effect of the tyrosine-specific protein kinase inhibitor genistein on FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells. Co-treatment of MC3T3 cells with FCCM and 10 μM genistein significantly inhibited the proliferative action of FCCM (Fig. 2A). Genistein decreased the FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells by 53% ($p < 0.0001$), while basal proliferation was decreased only by 8% after genistein treatment ($p < 0.01$).

Inhibition of the EGF receptor with physiological doses of AG1478 had no inhibitory effects on the FCCM-induced proliferation (not shown). We performed dose–response curves for other receptor tyrosine kinase inhibitors, including I-OME-AG 538 (IGF-1 receptor), HNMPA-(AM)₃ (insulin receptor), AG1296 (PDGF receptor) and SB431542 (TGF- β receptor) and found them not to reduce the FCCM-stimulated proliferation of MC3T3-E1 cells at “physiological” concentrations (not shown). In contrast, administration of PD173074 (FGFR1 inhibitor; $\text{IC}_{50} = 21.5$ nM) decreased the FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells significantly and dose dependently (Fig. 2B). PD173074 had also an effect on basal proliferation, though, its effect on FCCM-stimulated proliferation was much more pronounced. It inhibited the FCCM-induced proliferation by 25% at 22 nM ($p < 0.05$) and by 75% at 220 nM ($p < 0.0001$). Of note, 220 nM PD173074 almost completely abolished the FCCM-induced proliferation. The used concentrations were well in the “physiological” range ($\text{IC}_{50} = 21.5$ nM).

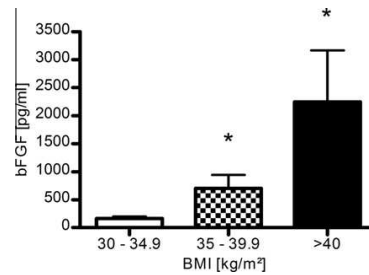


Fig. 3. Human serum bFGF increases with BMI Human serum samples were analyzed for bFGF concentrations. Values are means of 13 samples per group each measured in duplicate \pm SEM. **p* < 0.05.

3.3. Human adipocytes secrete basic fibroblast growth factor

In order to find a putative ligand for the FGFR1 and to investigate the role of FGFR1 in FCCM-stimulated preosteoblast proliferation, we assessed the concentration of bFGF in three different FCCM samples. The different batches of fat-cell conditioned-medium were obtained by cultivating the same amount of mature primary human visceral adipocytes from different donors in α -MEM for 24 h. The mean bFGF concentration in these three samples was 3188 (± 28.6) pg/ml, 3505 (± 28.9) pg/ml and 3765 (± 355.6) pg/ml.

To further test the hypothesis that human adipocytes secrete bFGF, we analyzed the bFGF concentration in human serum. As shown in Fig. 3, the serum bFGF concentration correlated positively with the BMI. bFGF levels increased with the BMI from 164.2 (± 35.4) pg/ml (30–34.9 kg/m²) to 702.1 (± 242.5) pg/ml (35–39.9 kg/m²) and 2245 (± 919.2) pg/ml (>40 kg/m²).

3.4. PI3K but not MEK is involved in FCCM-induced proliferation of preosteoblasts

Common downstream targets of receptor tyrosine kinases are PI3K and ERK. Treatment of MC3T3-E1 cells with U0126 (an inhibitor of MEK; $\text{IC}_{50} = 72$ nM for MEK1 and 58 nM for MEK2) had a general effect on proliferation which did not differ between controls and the FCCM-stimulated group (Fig. 4A, i.e. a decrease by 27% and 34%, respectively). In contrast, treatment of MC3T3-E1 cells with 20 μM LY29400 to inhibit the activity of PI3K ($\text{IC}_{50} = 1.4$ μM) abolished basal and stimulated proliferation almost completely. The effect was dose-dependently with a reduction by 23% ($p < 0.0001$) with 1 μM LY294002 (Fig. 4B). Furthermore, we found the following intracellular signaling molecules not to be involved in FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells: Inhibition of PKA with H-89 decreased the proliferation only at “supraphysiological” concentrations (not shown). The same was seen with the Src-Inhibitor 1 (not shown). The JAK-Inhibitor 1 ($\text{IC}_{50} = 15$ nM for JAK1, 1 nM for JAK2 and 5 nM for JAK3) did not decrease the proliferation of FCCM-treated MC3T3-E1 cells but instead increased it by 72% ($p < 0.05$) (Fig. 4C).

3.5. bFGF stimulates the proliferation of MC3T3-E1 cells and is inhibited by FGFR1 and PI3K inhibitors

We tested the hypothesis that bFGF from the adipocyte-conditioned medium can induce the proliferation of preosteoblasts via the FGF receptor type 1 and that this involves the action of PI3K. For this reason MC3T3-E1 cells were stimulated with 2 ng/ml recombinant human bFGF alone or preincubated for 30 min. with the FGFR1 inhibitor PD173074 or the PI3K inhibitor LY294002,

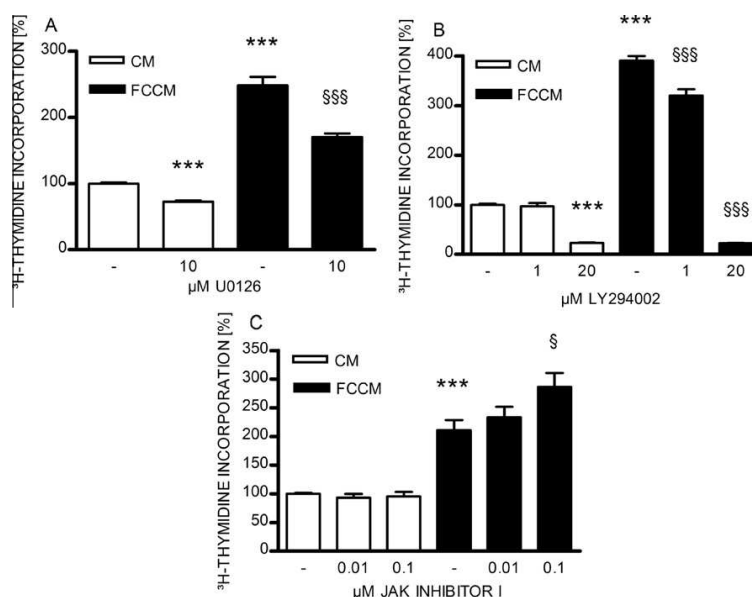


Fig. 4. PI3K is involved in FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with control medium (CM) or FCCM and with the indicated inhibitor for 48 h. (a) Inhibition of ERK by U0126, (b) inhibition of PI3K by LY294002, (c) inhibition of JAK by JAK-inhibitor I. The proliferation was measured by ³H-Thymidine incorporation. Values are means of at least three experiments each performed in quadruplicate \pm SEM. **p* vs. CM. § *p* vs. FCCM.

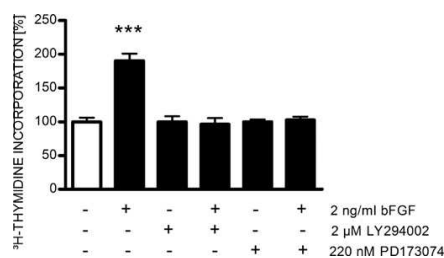


Fig. 5. bFGF stimulates MC3T3-E1 proliferation via FGFR1 and PI3K. MC3T3-E1 cells were cultured for 48 h in the presence of recombinant human bFGF, PD173074 or LY294002 as indicated. The proliferation was measured by ³H-Thymidine incorporation. Values are means of three experiments each performed in quadruplicate \pm SEM. ****p* < 0.0001.

respectively, and thereafter stimulated with recombinant murine bFGF. Here, we demonstrate bFGF alone to be sufficient to increase the proliferation of the preosteoblastic MC3T3-E1 cell line significantly to 190% ($p < 0.0001$) of the control (Fig. 5). Addition of 220 nM PD173074 or 2 μM LY294002 both inhibited the stimulatory action of bFGF on proliferation.

3.6. Adipocyte-secreted factors induce the proliferation of primary human preosteoblasts

To test whether the above mentioned effects were also true in primary osteoblasts, we treated primary human preosteoblasts with FCCM. The proliferation of primary human preosteoblasts was increased to 150% ($p < 0.0001$) of the control after treatment with FCCM for 48 h. As shown in Fig. 6A–C, inhibition of protein tyrosine kinases (by genistein), FGFR1 (by PD173074) and PI3K (by LY294002) also resulted in a decreased FCCM-induced proliferation of primary human preosteoblasts. After treatment with 10 μM genistein, the FCCM-induced proliferation was reduced by

79% ($p = 0.01$). Treatment with 22 nM PD173074 decreased the FCCM-induced proliferation by 58% ($p < 0.01$) and with 220 nM PD173074 to almost the same level as the respective control. Treatment with 10 μM LY294002 decreased it completely.

3.7. Regulation of OPG and RANKL mRNA expression by adipocyte-secreted factors

We treated primary human preosteoblasts with FCCM for 14 days and analyzed OPG and RANKL gene expression using real-time reverse transcription PCR. Treatment of primary human preosteoblasts with FCCM for 14 days resulted in a marked but not significant increase in OPG mRNA levels to 221% ($p = 0.08$) and a significant decrease in RANKL mRNA levels to 24% ($p < 0.01$) of the control group. Hence, the OPG/RANKL mRNA ratio was increased 9.21-fold after treatment with FCCM for 14 days (Fig. 7A).

This effect in mRNA expression was paralleled on the protein level: after treatment with FCCM for 14 days OPG protein was highly upregulated while RANKL protein was downregulated (Fig. 7B).

3.8. Adipocyte-secreted factors inhibit osteoclast formation by modulating the osteoblasts-osteoclast crosstalk

In a next step we examined whether the increase of the OPG/RANKL ratio in osteoblasts prompted by adipocyte-secreted factors is functionally relevant to inhibit the formation of osteoclasts from precursors. The osteoclast precursor cell line RAW264.7 was treated with conditioned-medium from osteoblasts which were cultured in control medium (CM-OB) or pretreated with FCCM (FCCM-OB). In a subset of cells we added 10 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL to the osteoblast-conditioned medium to stimulate osteoclast formation. After 7 days, some tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive multinucleated cells were present in the CM-OB group but absent in the FCCM-OB group (Fig. 8A and B). Addition of M-CSF and RANKL had the expected effect to stim-

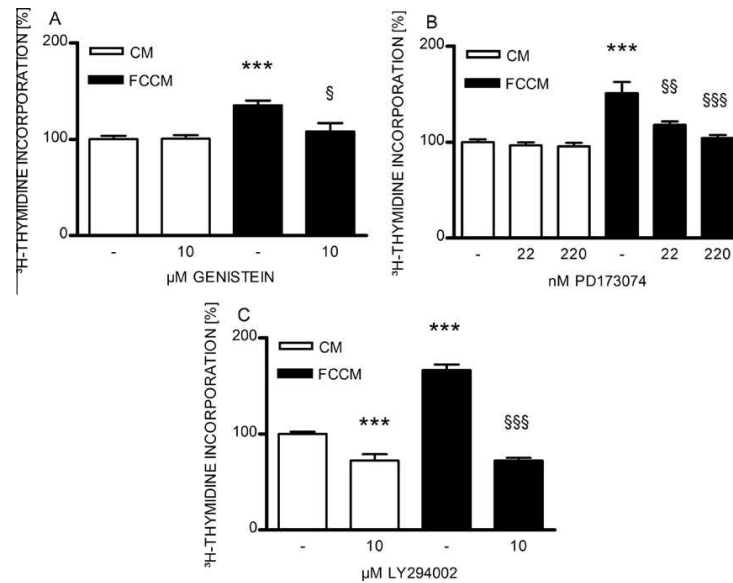


Fig. 6. FCCM induces proliferation of primary human preosteoblasts involving FGFR1 and PI3K. Inhibition of (a) protein tyrosine kinase, (b) the FGFR1 and (c) the PI3K resulted in reduced proliferation of primary human preosteoblasts after treatment with FCCM. Primary human preosteoblasts were treated with control medium (CM) or FCCM and with the indicated inhibitor for 48 h. The proliferation was measured by ³H-Thymidine incorporation. Values are means of at least three experiments each performed in quadruplicate \pm SEM. **p* vs. CM. § *p* vs. FCCM.

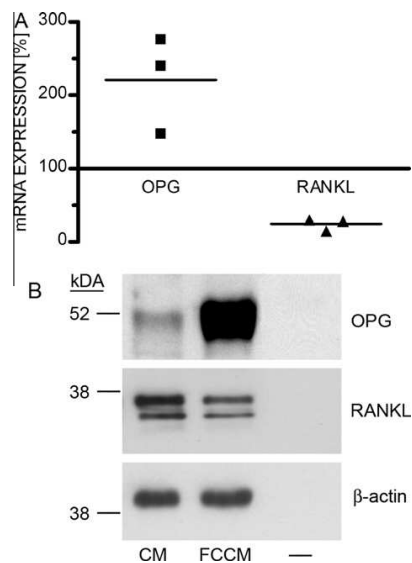


Fig. 7. FCCM increases the OPG/RANKL ratio in primary human osteoblastic cells. (a) Expression of OPG and RANKL mRNA by primary human preosteoblasts after treatment with FCCM for 14 days was assessed by real-time reverse transcription PCR. Values are means of three independent experiments each performed in triplicate and express the mRNA expression of the FCCM-treated group relative to the control group (100%). (b) Total protein lysate of primary human preosteoblasts was analyzed with the indicated antibody after treatment with control medium (CM) or FCCM for 14 days. Three independent experiments were performed. A representative result is depicted.

ulate osteoclast formation and therefore increase the number of TRAP positive multinucleated cells (Fig. 8C). However, the osteoclast formation was markedly decreased in the FCCM-OB group (Fig. 8D).

3.9. Differentiation of primary human preosteoblasts is not influenced by adipocyte-secreted factors

Analysis of the early osteoblasts differentiation marker ALP showed no significant difference in mRNA expression between the control and the FCCM group after treatment with FCCM for 14 days (Fig. 9A). This result was confirmed by a colorimetric assay which determines the ALP activity via hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate showing no difference between the control and the FCCM group after 14 days (Fig. 9B). To ensure the osteogenic potential of the isolated primary cells we also treated them with an osteogenic differentiation medium as a positive control (Sakaguchi et al., 2004). Indeed, administration of this differentiation medium clearly increased the ALP activity to 522% ($p < 0.05$) of the control.

In addition we analyzed the extracellular calcium content using Alizarin Red S staining. Primary human preosteoblasts were treated with FCCM or control medium for 14 days and stained with Alizarin Red S. Administration of osteogenic differentiation medium caused an increase in bound dye to 224% ($p < 0.05$). However, treatment with FCCM did not lead to an altered Alizarin Red S staining indicating no influence on matrix mineralization (Fig. 9C).

4. Discussion

Clinical studies on the association of the BMI with BMD in humans are inconsistent. However, the majority of studies indicate a positive correlation (Gnudi et al., 2009; Kinjo et al., 2007; Nguyen et al., 2005; von et al., 2007). The correlation between BMI and BMD in the different studies might be confounded by less physical activity in very obese subjects. Another explanation is varying nutritional behavior among the participants which can also affect bone quality and strength.

The adipose tissue is a well established endocrine organ (Marinou et al., 2010) whose secreted factors (adipokines) act on various organs throughout the body. In previous works, we could demonstrate effects of adipocyte-secreted factors on adrenocortical cells

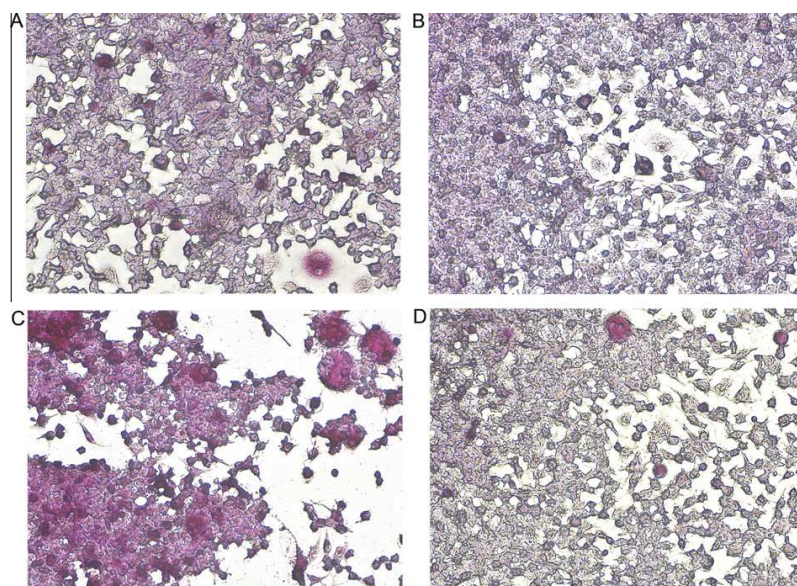


Fig. 8. FCCM-stimulated osteoblasts inhibit osteoclast formation. Osteoclast precursor RAW264.7 cells were cultured for 7 days in conditioned medium from osteoblasts, which in turn have been cultured in the presence of CM (a and c) or FCCM (b and d). To stimulate osteoclast formation, 10 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL were added (c and d). TRAP positive cells are red (photograph with 20 \times magnification). Experiments were performed with FCCM obtained from three different donors. The depicted results are representative.

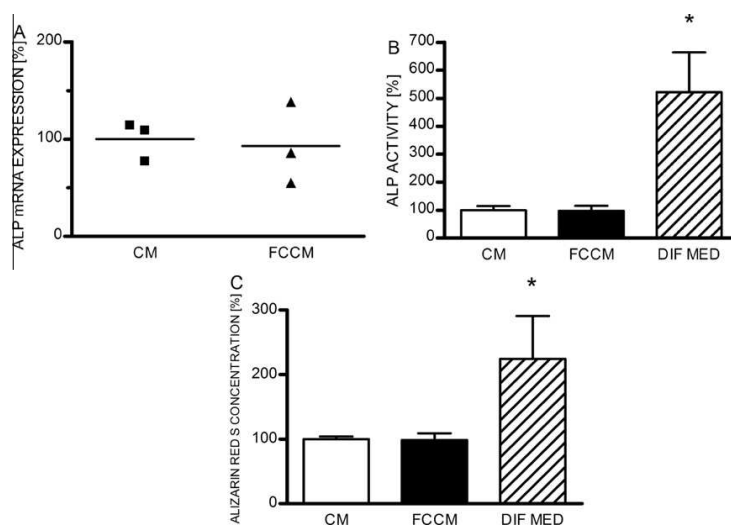


Fig. 9. Osteogenic differentiation of primary human preosteoblasts is not influenced by FCCM. Primary human preosteoblasts of three different donors were treated with control medium (CM), FCCM or differentiation medium (DIF MED) for 14 days. (a) Analysis of ALP mRNA expression by primary human preosteoblasts assessed by real-time reverse transcription PCR. (b) ALP activity of the cell lysate was determined colorimetrically via hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate. (c) Primary human preosteoblasts were stained with Alizarin Red S. Afterwards, the dye was extracted and the concentration determined colorimetrically. Values are means of three experiments \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. CM.

(Schinner et al., 2007) and on pancreatic β -cells (Schinner et al., 2008).

With this study, we could demonstrate mature primary human visceral adipocytes to secrete factors that increase the proliferation of the murine preosteoblastic cell line MC3T3-E1 and of primary human preosteoblasts *in vitro*. This finding is in line with some previous data (Benayahu et al., 1993) but in seeming contrast with

some other reports (Elbaz et al., 2010; Maurin et al., 2000, 2002). However, the respective experimental settings vary widely (use of adipocyte–osteoblast co-culture systems; stimulation with fatty acids as opposed to adipocyte-conditioned medium; use of conditioned medium from adipocytes and osteoblasts together).

We believe that the experimental approach used in our current study offers a good model to investigate possible endocrine effects

of adipocytes on osteoblasts. In line with this, we found the serum levels of bFGF (see below) – as a candidate molecule to mediate the effects on bone – to be correlated with the BMI.

Since we found Wnt-signaling molecules to mediate the effects of FCCM on adrenocortical cells and pancreatic β -cells (Schinner et al., 2007, 2008) in our previous studies and since the Wnt-signaling pathway is known to regulate osteoblast proliferation (Boland et al., 2004), we treated MC3T3-E1 cells with the Wnt-signaling antagonists Dkk1 and Sfrp1 in addition to FCCM. However, this did not reduce the FCCM-induced proliferation significantly. Instead, co-treatment of MC3T3-E1 cells with FCCM and 10 μ g/ml Sfrp1 actually resulted in an increased proliferation (Fig. 1B). Sfrp1 can stimulate or antagonize the Wnt-signaling pathway depending on the cellular context (Bovolenta et al., 2008). However, Üren and colleagues found Sfrp1 concentrations as high as 10 μ g/ml to inhibit the Wnt-signaling pathway in a bioassay (Uren et al., 2000). These data argue against a role of Wnt-signaling in the proliferative action of FCCM on preosteoblasts.

Another possible candidate adipokine for the proliferative action of FCCM on preosteoblasts is leptin for which a direct promoting effect on osteoblast proliferation has been shown (Gomez-Ambrosi et al., 2008). Leptin activates an intracellular signaling cascade involving JAK. In our experiments inhibition of JAK with the JAK-inhibitor I even increased the FCCM-induced proliferation of MC3T3-E1 cells (Fig. 4C). This might be explained by inhibited IL-6 signaling. IL-6 is secreted by adipocytes and known to inhibit the proliferation of osteoblasts (Bellido et al., 1997; Li et al., 2008) using JAK for intracellular signal transduction (Bellido et al., 1997; Heinrich et al., 2003). Consequently, blocking this pathway further increased the proliferation of preosteoblasts stimulated by other adipocyte-secreted factors.

We tested a number of inhibitors and found the proliferative effect of adipocyte-secreted factors on murine and human preosteoblasts to depend on the FGFR1 and PI3K (see Figs. 2B, 4B and 6B, 6C). Moreover, in line with previous findings showing the expression and secretion of bFGF (FGF-2) in human subcutaneous adipocytes (Gabrielsson et al., 2002; Patel et al., 2005) we further demonstrate the secretion of bFGF by mature primary human visceral adipocytes. bFGF binds to the FGFR1 in MC3T3-E1 cells (Agas et al., 2008) and was shown to activate PI3K in human osteoblasts (Debiais et al., 2004). Several groups have shown bFGF to induce the proliferation of osteoblastic cells *in vitro* (Dupree et al., 2006; Moursi et al., 2002; Shimoaka et al., 2002). It is reasonable to assume the involvement of multiple growth factors and signaling pathways in the FCCM-induced proliferation but we suggest bFGF as one good candidate to mediate the proliferative effects of adipocytes on preosteoblasts. This is supported by the finding that the bFGF induced proliferation of MC3T3-E1 cells depends on activation of the FGFR1 and PI3K (Fig. 5), which mimics the action of FCCM. Moreover, we found increasing circulating bFGF concentrations with a higher BMI and demonstrated isolated human adipocytes to secrete bFGF *in vitro*.

It is well in line with the common paradigm of bone development that adipocyte-secreted factors promote proliferation but not differentiation of preosteoblastic cells. A promoting effect on proliferation of preosteoblasts but a missing or even inhibiting effect on osteogenic differentiation has been demonstrated for various factors (Baksh et al., 2007; Boland et al., 2004). Such opposing action is reasonable in order to assure a coordinated bone development. To maintain a pool of precursor cells it is important that these cells do not leave the cell cycle in order to differentiate. Later, during the differentiation process further proliferation would derogate the function and integrity of the formed tissue. Consequently, proliferation and differentiation are regulated by different factors. Even though the conditioned-medium contains

all factors secreted by adipocytes the promitotic factors outweigh obviously.

The adult skeleton is subjected to a dynamic remodeling process resulting in its complete replacement every decade (Alliston and Derynck, 2002). Responsible for this process are the extracellular matrix-producing osteoblasts and the bone-resorbing osteoclasts. Osteoblasts produce RANKL and OPG, two molecules with opposing effects on osteoclasts. RANKL interacts with RANK on osteoclasts to favor osteoclast differentiation and activation. The soluble decoy receptor OPG can also bind RANKL but then prevents RANKL-RANK interaction (Simonet et al., 1997). Thus, the OPG/RANKL ratio decides on the coupling of bone resorption to bone formation. We showed for the first time that human adipocytes regulate the expression of OPG and RANKL in human osteoblastic cells *in vitro* (see Fig. 7A and B) with osteoblastic cells not only producing less osteoclast-activating RANKL but also more OPG which blocks the RANKL-RANK interaction on osteoclasts. Concordantly, the formation of osteoclasts from precursors was markedly inhibited by conditioned medium from osteoblasts which were preincubated with adipocyte-secreted factors (Fig. 8). Therefore we conclude, that adipocytes not only stimulate the proliferation of preosteoblasts but also influence the interaction between osteoblasts and osteoclasts leading to a reduced number of bone-resorbing osteoclasts.

How can this be brought into a context with the missing effect of adipocyte-secreted factors on osteoblastic differentiation? Even though bFGF plays a role in osteoblast differentiation (Nauman et al., 2003; Park et al., 2007; Teplyuk et al., 2007), we found no effect of adipocyte-secreted factors – which also contain bFGF – on osteoblast differentiation. The variety of factors included in the FCCM might modulate the sole bFGF effects. Here, OPG and RANKL apparently do not serve as pure differentiation markers for bone matrix producing osteoblasts, as which they are also used, but rather as functional markers for the interaction of osteoblasts with osteoclasts. The importance of this modulation of bone turnover is highlighted by denosumab – a new agent for osteoporosis treatment – which is an antibody directed against RANKL and thereby imitating the action of OPG.

In conclusion, we showed that human adipocytes secrete factors which directly act on preosteoblastic cells. Referring to other adipocyte-secreted factors such as leptin or adiponectin, which enter the circulation to reach their target tissues, it is tempting to speculate that the observed effects on preosteoblasts are also mediated in an endocrine way. Human adipocyte-secreted factors increase the proliferation of preosteoblastic cells *in vitro* at least in part via the FGFR1 and the PI3K and bFGF is a good candidate to mediate the proliferative effects of adipocytes on preosteoblasts. Hence, the pool of preosteoblasts increases, then leading to more cells capable of differentiating into mature osteoblasts through other stimuli. Furthermore, adipocytes increase the OPG/RANKL ratio in preosteoblasts through their secreted factors *in vitro* which might result in a decreased paracrine stimulation of osteoclasts. These findings could explain the higher bone mass in obese people and attribute it to a direct endocrine effect of adipocyte-secreted factors on osteoblasts.

Acknowledgements

We thank Birgit Mülders-Opgenoorth for excellent technical assistance.

References

- Agas, D., Marchetti, L., Menghi, G., Materazzi, S., Materazzi, G., Capacchietti, M., Hurley, M.M., Sabbieti, M.G., 2008. Anti-apoptotic Bcl-2 enhancing requires

- FGF-2/FGF receptor 1 binding in mouse osteoblasts. *J. Cell Physiol.* 214, 145–152.
- Alliston, T., Derynck, R., 2002. Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature* 416, 686–687.
- Baksh, D., Boland, G.M., Tuan, R.S., 2007. Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J. Cell Biochem.* 101, 1109–1124.
- Beck, T.J., Petit, M.A., Wu, G., LeBoff, M.S., Cauley, J.A., Chen, Z., 2009. Does obesity really make the femur stronger? BMD, geometry, and fracture incidence in the women's health initiative-observational study. *J. Bone Miner. Res.* 24, 1369–1379.
- Bellido, T., Borba, V.Z., Roberson, P., Manolagas, S.C., 1997. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 138, 3666–3676.
- Benayahu, D., Zipori, D., Wientroub, S., 1993. Marrow adipocytes regulate growth and differentiation of osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1245–1252.
- Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., Tuan, R.S., 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* 93, 1210–1230.
- Borgstrom, F., Sobocki, P., Strom, O., Jonsson, B., 2007. The societal burden of osteoporosis in Sweden. *Bone* 40, 1602–1609.
- Borgstrom, F., Zethraeus, N., Johnell, O., Lidgren, L., Ponzer, S., Svensson, O., Abdon, P., Ornstein, E., Lunsjö, K., Thorngren, K.G., Sernbo, I., Rehnberg, C., Jonsson, B., 2006. Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. *Osteoporos. Int.* 17, 637–650.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* 121, 737–746.
- Burge, R., Dawson-Hughes, B., Solomon, D.H., Wong, J.B., King, A., Tosteson, A., 2007. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025. *J. Bone Miner. Res.* 22, 465–475.
- Clark, P., Carlos, F., Barrera, C., Guzman, J., Maetzel, A., Lavielle, P., Ramirez, E., Robinson, V., Rodriguez-Cabrera, R., Tamayo, J., Tugwell, P., 2008. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos. Int.* 19, 269–276.
- Colnot, C., 2005. Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis. *J. Cell Biochem.* 95, 688–697.
- Debiais, F., Lefevre, G., Lemonnier, J., Le, M.S., Lasmoles, F., Mascarelli, F., Marie, P.J., 2004. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent, -beta-catenin-independent signaling pathway. *Exp. Cell Res.* 297, 235–246.
- Dupree, M.A., Pollack, S.R., Levine, E.M., Laurencin, C.T., 2006. Fibroblast growth factor 2 induced proliferation in osteoblasts and bone marrow stromal cells: a whole cell model. *Biophys. J.* 91, 3097–3112.
- Ehrhart-Bornstein, M., Lamounier-Zepter, V., Schraven, A., Langenbach, J., Willenberg, H.S., Barthel, A., Hauner, H., McCann, S.M., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R., 2003. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14211–14216.
- Elbaz, A., Wu, X., Rivas, D., Gimble, J.M., Duque, G., 2010. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J. Cell Mol. Med.* 14, 982–991.
- Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Hochberg, Z., 2007. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm. Metab. Res.* 39, 314–321.
- Gabrielson, B.G., Johansson, J.M., Jennische, E., Jernas, M., Itoh, Y., Peltonen, M., Olbers, T., Lonn, L., Lonroth, H., Sjostrom, L., Carlsson, B., Carlsson, L.M., Lonn, M., 2002. Depot-specific expression of fibroblast growth factors in human adipose tissue. *Obes. Res.* 10, 608–616.
- Gnudi, S., Sitta, E., Fiumi, N., 2007. Relationship between body composition and bone mineral density in women with and without osteoporosis: relative contribution of lean and fat mass. *J. Bone Miner. Metab.* 25, 326–332.
- Gnudi, S., Sitta, E., Lisi, L., 2009. Relationship of body mass index with main limb fragility fractures in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Metab.* 27, 479–484.
- Gomez-Ambrosi, J., Rodriguez, A., Catalan, V., Fruhbeck, G., 2008. The bone-adipose axis in obesity and weight loss. *Obes. Surg.* 18, 1134–1143.
- Haase, M., Schott, M., Bornstein, S.R., Malendowicz, L.K., Scherbaum, W.A., Willenberg, H.S., 2007. CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor. *J. Endocrinol.* 192, 459–465.
- Haussler, B., Gothe, H., Gol, D., Glaeske, G., Pientka, L., Felsenberg, D., 2007. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. *Osteoporos. Int.* 18, 77–84.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Hoemann, C.D., El-Gabalawy, H., McKee, M.D., 2009. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 318–323.
- Johnell, O., Kanis, J., 2005. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* 16 (Suppl. 2), S3–S7.
- Johnell, O., Kanis, J.A., 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* 17, 1726–1733.
- Kinjo, M., Setoguchi, S., Solomon, D.H., 2007. Bone mineral density in adults with the metabolic syndrome: analysis in a population-based US Sample. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4161–4164.
- Konopka, A., Jerusel, N., Konig, H.H., 2009. The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany: estimation for 2002 and projection until 2050. *Osteoporos. Int.* 20, 1117–1129.
- Kuznetsov, S., Gehron, R.P., 1996. Species differences in growth requirements for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 59, 265–270.
- Li, Y., Backesjo, C.M., Haldosen, L.A., Lindgren, U., 2008. IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. *Cytokine* 43, 165–173.
- Marinou, K., Tousoulis, D., Antonopoulos, A.S., Stefanadis, E., Stefanadis, C., 2010. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int. J. Cardiol.* 138, 3–8.
- Maurin, A.C., Chavassieux, P.M., Frappart, L., Delmas, P.D., Serre, C.M., Meunier, P.J., 2000. Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26, 485–489.
- Maurin, A.C., Chavassieux, P.M., Vericel, E., Meunier, P.J., 2002. Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. *Bone* 31, 260–266.
- Moursi, A.M., Winnard, P.L., Winnard, A.V., Rubenstrunk, J.M., Mooney, M.P., 2002. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. *Cleft Palate Craniofac. J.* 39, 487–496.
- Nauman, E.A., Sakata, T., Keaveny, T.M., Halloran, B.P., Bikle, D.D., 2003. BFGF administration lowers the phosphate threshold for mineralization in bone marrow stromal cells. *Calcif. Tissue Int.* 73, 147–152.
- Nguyen, N.D., Pongchayakul, C., Center, J.R., Eisman, J.A., Nguyen, T.V., 2005. Abdominal fat and hip fracture risk in the elderly: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *BMC. Musculoskelet. Disord.* 6, 11.
- Consensus, NIH, 2001. Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7–29, 2000: highlights of the conference. *South Med J.* 94.
- Park, S.J., Kim, S.J., Rhee, Y., Byun, J.H., Kim, S.H., Kim, M.H., Lee, E.J., Lim, S.K., 2007. Fidgetin-like 1 gene inhibited by basic fibroblast growth factor regulates the proliferation and differentiation of osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 22, 889–896.
- Patel, N.G., Kumar, S., Eggo, M.C., 2005. Essential role of fibroblast growth factor signaling in preadipocyte differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1226–1232.
- Rasouli, N., Kern, P.A., 2008. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, S64–S73.
- Reid, I.R., 2008. Relationships between fat and bone. *Osteoporos. Int.* 19, 595–606.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Ichinose, S., Shinomiya, K., Muneta, T., 2004. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 104, 2728–2735.
- Schinner, S., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R., Barthel, A., 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet. Med.* 22, 674–682.
- Schinner, S., Ulgen, F., Papewalis, C., Schott, M., Woelk, A., Vidal-Puig, A., Scherbaum, W.A., 2008. Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51, 147–154.
- Schinner, S., Willenberg, H.S., Krause, D., Schott, M., Lamounier-Zepter, V., Krug, A.W., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A., 2007. Adipocyte-derived products induce the transcription of the STAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int. J. Obes. (Lond)* 31, 864–870.
- Shimoaka, T., Ogasawara, T., Yonamine, A., Chikazu, D., Kawano, H., Nakamura, K., Itoh, N., Kawaguchi, H., 2002. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J. Biol. Chem.* 277, 7493–7500.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Woodson, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W.J., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319.
- Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J., 1995. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J. Biol. Chem.* 270, 9420–9428.
- Tepluyk, N.M., Haupt, L.M., Ling, L., Dombrowski, C., Mun, F.K., Nathan, S.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S., Cool, S.M., van Wijnen, A.J., 2009. The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts. *J. Cell Biochem.* 107, 144–154.
- Travis, T.G., Araujo, A.B., Esche, G.R., Beck, T.J., McKinlay, J.B., 2008. Lean mass and not fat mass is associated with male proximal femur strength. *J. Bone Miner. Res.* 23, 189–198.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W.G., Muraiso, K., Bottaro, D.P., Cumberledge, S., Rubin, J.S., 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 4374–4382.
- von, M.D., Safii, S., Jassal, S.K., Svartberg, J., and Barrett-Connor, E., 2007. Associations between the metabolic syndrome and bone health in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos. Int.* 18, 1337–1344.
- WHO Press Release, 1999. Osteoporosis: Both health organizations and individuals must act now to avoid an impending epidemic. <http://www.who.int/inf-pr-1999/en/pr99-58.html>.
- Zhao, L.J., Liu, Y.J., Liu, P.Y., Hamilton, J., Recker, R.R., Deng, H.W., 2007. Relationship of obesity with osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1640–1646.

3 Diskussion

3.1 Assoziation von Body Mass Index (BMI) und Bone Mineral Density (BMD)

Viele Studien zeigen eine direkte Korrelation zwischen dem *Body Mass Index* (BMI) und der BMD. So konnte gezeigt werden, dass ein niedriger BMI ein wichtiger Risikofaktor für eine geringe BMD und einen zunehmenden Knochenverlust in postmenopausalen Frauen ist (82). Die BMD, also der trabekuläre und kortikale Mineralsalzgehalt, steigt bzw. sinkt mit dem BMI (83). Eine niedrige BMD ist ein wichtiger Risikofaktor für osteoporotische Frakturen und insbesondere auch für hüftgelenksnahe Frakturen (84).

Unabhängig davon, dass ein deutliches Untergewicht an sich aufgrund der Mangelernährung und veränderten hormonellen Situation ein Risikofaktor für Frakturen ist (85), konnten Studien zeigen, dass ein niedriger BMI mit einem erhöhten Risiko für Frakturen einhergeht. In der prospektiven Kohortenstudie *Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women* (GLOW) wurde 2014 unter Einschluss von 52.629 Frauen gezeigt, dass der BMI invers mit dem Risiko für hüftgelenksnahe Frakturen und klinisch manifeste Wirbelkörperfrakturen korreliert (86).

Eine andere populationsbasierte Kohortenstudie mit 1.713.225 Personen zeigte, dass sowohl niedriges Körpergewicht als auch Gewichtsverlust unabhängige Risikofaktoren für Frakturen sind bzw. das Risiko für eine Fraktur im Beobachtungszeitraum von 2 Jahren erhöhen (87).

In einer Studie mit übergewichtigen Patienten konnte gezeigt werden, dass Übergewicht zu einer höheren Knochendichte führt und vor Osteoporose schützt (88). Andere Studien kommen zu einem ähnlichen Ergebnis. Außerdem gibt es Hinweise, dass Übergewicht den Knochenabbau im Alter verlangsamt (89). Ein höheres Körpergewicht korreliert negativ mit dem postmenopausalen Verlust an Knochenmasse und schützt also den Knochen im Alter (90).

Vor dem Hintergrund der alternden Gesellschaft und der damit verbundenen steigenden Prävalenz osteoporotischer Frakturen mit entsprechenden Komplikationen und persönlichen, gesellschaftlichen sowie ökonomischen Langzeitfolgen, ist es von großer Bedeutung die Mechanismen zu verstehen, die die BMD erhöhen und somit das Risiko einer Fraktur verringern.

3.2 Adipokine und Bone Mineral Density

Zum Zeitpunkt der Arbeit war allerdings nicht klar, über welche Mechanismen, außer dem höheren Körpergewicht, Adipositas zu einer höheren BMD führt. Ob dies über die größere physische Belastung geschieht, oder inwieweit das Fettgewebe über die von ihm sezernierten Signalmoleküle, die Adipokine, direkt den Knochen, also die Anzahl und Funktion der Osteoblasten sowie die Funktion der Osteoklasten beeinflussen kann.

Und auch heute sind die Daten dazu noch uneinheitlich. Weiter oben wurden die unterschiedlichen und zum Teil gegensätzlichen Effekte von Leptin auf die BMD erwähnt (siehe Kapitel 1.5.1).

In einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse von 57 Artikeln wurde die Assoziation zwischen verschiedenen Adipokinen und der BMD analysiert. Dabei zeigte sich, dass Adiponectin invers mit der BMD korreliert, wohingegen höhere Leptin-Level mit einer gesteigerten BMD assoziiert sind (91).

In einer anderen Metaanalyse von 11 Studien wurde gezeigt, dass bei Patienten mit seniler Osteoporose die Leptin-Serumkonzentration signifikant erniedrigt war, wohingegen sich die Adiponectin-Serumkonzentration nicht signifikant zur Kontrollgruppe mit normaler BMD unterschied (92).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Adipozyten Adipokine sezernieren, die die Proliferation von Präosteoblasten fördern, also den Pool der Zellen vergrößern, die sich dann zu reifen und funktionellen Osteoblasten differenzieren können. Außerdem zeigt diese Arbeit, dass reife Osteoblasten, und zwar reife primäre humane Osteoblasten, unter dem Einfluss von Adipokinen, die direkt von primären Adipozyten gewonnen wurden, den OPG/RANKL-Quotienten dahingehend günstig beeinflussen, dass Osteoklasten *in vitro* in einem geringeren Ausmaß reifen. Dies könnte letztendlich zu einer geringeren Knochenresorption und damit Steigerung der Knochendichte führen.

Andere Arbeiten haben einen hemmenden Effekt von Adipozyten auf Präosteoblasten postuliert (93-95). Allerdings unterscheiden sich die experimentellen Vorgehensweisen stark. Es wurden zum einen Adipozyten-Osteoblasten-Kokulturen verwendet, in denen es auch durch direkten Zellkontakt oder parakrine Rückkoppelung zu anderen Ergebnissen gekommen sein kann. Zum anderen wurden die Präosteoblasten mit Fettsäuren statt mit konditionierten Medium, das eben die komplexe Gesamtheit der sezernierten Faktoren enthält, behandelt.

Der Hintergrund für die Verwendung eines solchen von Adipozyten konditionierten Mediums ist die Überzeugung, dass dieses im experimentellen Setting am besten

das Serum als Transportmedium für Hormone und in diesem Fall insbesondere Adipokine repräsentiert.

3.3 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) als endokrines Adipokin

Zunächst war noch unklar, welches Adipokin über welchen Signalweg die demonstrierten Effekte von Adipozyten auf Osteoblasten vermittelt.

Für den WNT-Signalweg war eine wichtige Rolle in der Osteogenese bereits bekannt. WNT3a, als typischer Ligand des kanonischen WNT-Signalwegs, führt *in vitro* zu einer gesteigerten Proliferation von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen. Darüberhinaus hemmt es deren osteogene Differenzierung (96).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor bereits die Rolle von WNT-Molekülen als Adipokine und deren Wirkung auf andere Organe aufzeigen (56, 57). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit war jedoch durch die Hemmung des kanonischen WNT-Signalwegs mittels Dickkopf-1 (DKK-1) oder SFRP-1 keine Hemmung der osteogenen Wirkung von Adipokinen möglich.

Allerdings konnte durch die konsekutive Verwendung von spezifischen Inhibitoren FGF-2 als wahrscheinliches Adipokin, das seine Wirkung über den FGFR1 vermittelt, herausgearbeitet werden. Diese Wirkung beinhaltet zunächst sowohl eine gesteigerte Proliferation von Präosteoblasten (in diesem Fall *in vitro* in einer murinen Zellkultur und bei primären humanen Präosteoblasten), als auch ein verändertes Verhältnis zwischen OPG und RANKL in den stimulierten Präosteoblasten. Und zwar wurde das Verhältnis dahingehend verändert, dass der Quotient ansteigt, wodurch die Stimulierung von Osteoklasten verringert wird.

Eine Differenzierung der unreifen Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten konnte durch das von Adipozyten konditionierte Medium allerdings nicht gefördert werden. Auf den ersten Blick steht dies im Widerspruch zu der zuvor beschriebenen Steigerung der Proliferation von Präosteoblasten und des OPG/RANKL-Quotienten. Aus biologischer Sicht macht es aber durchaus Sinn, dass ein Faktor nur die Proliferation von Vorläuferzellen fördert, also einen ausreichenden Pool aufrecht erhält und nicht Zellen dazu bringt, diesen Vorrat zu verlassen. Die Differenzierung müsste danach also durch andere Faktoren erfolgen. Eine solche stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Präosteoblasten, aber hemmende Wirkung auf die Differenzierung wurde zuvor auch schon von anderen Arbeitsgruppen für andere Faktoren gezeigt (96, 97).

Das fibroblast-growth-factor-Netzwerk besteht aus 22 Liganden (FGF-1 bis -23, FGF-15 ist das murine Ortholog zu FGF-19) und 4 Rezeptoren (FGFR1-4) (98). Die verschiedenen FGFs werden in intrakrine, parakrine und endokrine FGFs unterteilt

(99). Zu den endokrinen FGFs zählen FGF-15/19, FGF-21 und FGF-23 (100). FGF-1, FGF-10 und insbesondere FGF-21 sind als Adipokine gut bekannt (99, 101, 102). FGF-2 zählt zu der Gruppe der parakrinen FGFs, die Heparin/Heparan Sulfat, welches in der extrazellulären Matrix sämtlicher Gewebe in hohem Maße vorhanden ist, als Co-Faktor für die Bindung an einen FGFR benötigen (103).

Vor uns hatten erst wenige Arbeitsgruppen FGF-2 im Serum nachgewiesen (104-108). Der Nachweis von FGF-2 im Serum lässt darauf schließen, dass es neben der bekannten parakrinen auch eine endokrine Wirkweise haben kann. In der vorliegenden Arbeit konnten wir mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

(ELISA) ebenfalls FGF-2 in humanen Serumproben nachweisen und darüber hinaus sogar eine positive Korrelation zum BMI aufzeigen. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein wesentlicher Anteil des im Serum nachgewiesenen FGF-2 aus Adipozyten stammt und mit steigendem BMI zunimmt. Passend hierzu lies sich auch im Medium, das durch primäre humane Adipozyten konditioniert wurde, mittels ELISA FGF-2 nachweisen.

FGF-2 ist ein guter Kandidat für das gesuchte Adipokin, das die beschriebenen Effekte vermittelt. Seine Hemmung reduzierte die Stimulation durch von Adipozyten konditioniertes Medium. Die Wirkung dieses Mediums konnte durch die Hinzugabe von rekombinantem FGF-2 imitiert werden. Wir zeigten, dass primäre humane Präadipozyten *in vitro* FGF-2 sezernieren. In humanen Serumproben konnten wir eine positive Korrelation der Konzentration von FGF-2 und dem BMI des Spenders nachweisen. Dies alles passt gut zu einer Produktion durch Adipozyten und es legt eine endokrine Wirkweise nahe.

3.4 Stärken und Schwächen der Arbeit

Einschränkend muss man zu den hier präsentierten Daten sagen, dass sie experimentell und *in vitro* gewonnen wurden. Es wird also nicht der gesamte Organismus mit seinen komplexen Interaktionen der verschiedenen Organe in letzter Konsequenz berücksichtigt. So beeinflussen nicht nur Adipozyten andere Organe durch Adipokine, sondern auch Osteokine und Myokine werden von Knochen- bzw. Muskelzellen gebildet und sezerniert (109). Eine Zellkultur ist ein künstliches Arrangement, das nur isoliert betrachtet werden kann.

Dies kann aber auch ein Vorteil eines experimentellen *in vitro* Ansatzes sein. Hier lassen sich nämlich homogene Zellpopulationen züchten, die ohne Störfaktoren und unter gleichbleibenden Bedingungen untersucht und gezielt manipuliert werden können. Hierdurch lässt sich z.B. eine Wirkungskette durch sequentielle Blockade oder Stimulation gut untersuchen und die gemessenen Effekte können kausal einer

Variablen zugeordnet werden. Durch den Einsatz von primären humanen Zellen lässt sich zudem die genetische Veränderung, die die meisten Zelllinien *per se* mit sich bringen, vermeiden. Auch eine Interspezies-Varianz lässt sich hierdurch umgehen.

Die Übertragung, Bestätigung und weiterführende Erforschung der hier beschriebenen Ergebnisse und dargestellten Mechanismen *in vivo* sollte Gegenstand künftiger Arbeiten sein. Dabei könnte auch der Einfluss von Adipokinen und speziell FGF-2 auf die tatsächliche Knochenqualität *in vivo* und das Frakturrisiko untersucht werden.

3.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Adipozyten *in vitro* tatsächlich einen direkten Effekt auf Knochenzellen haben und dass dieser durch Adipokine, in diesem Fall FGF-2, vermittelt wird. Durch die mutmaßlich endokrine Wirkung von FGF-2 und Stimulation von Präosteoblasten durch FGF-2 als Adipokin kommt es zu einer Vermehrung von Präosteoblasten. Osteoklasten werden dagegen gehemmt. Dies spricht für einen direkten und hormonell vermittelten Zusammenhang zwischen BMI und BMD. Außerdem schaffen die Ergebnisse neue Einsichten in die Mechanismen, wie Untergewicht ein Risiko für eine Osteoporose darstellt und Übergewicht vor einer Abnahme der BMD und letztendlich vor einer Osteoporose schützt.

Das Verständnis dieser Vorgänge kann neue Ansätze zur Entwicklung von Wirkstoffen zur Therapie der Osteoporose liefern.

4 Bibliografie

1. World Health Organization (WHO) Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis. Prevention and management of osteoporosis : report of a WHO scientific group. 2003 [zitiert am 11.04.2024]. Verfügbar unter: <https://iris.who.int/handle/10665/42841>.
2. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, Scientific Advisory Board of the European Society for C, Economic Aspects of O, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019;30(1):3-44.
3. Powers PS. Osteoporosis and eating disorders. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 1999;12(2):51-7.
4. Dachverband Osteologie e.V. (DVO). Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ab dem 50. Lebensjahr. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. 2023 [zitiert am 11.04.2024]. Verfügbar unter: [https://dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202023%20-%20Letzter%20Stand%20der%20Dokumente,%2012.10.2023/Leitlinie%2031.10.2023/DVO%20Leitlinie%20zur%20Diagnostik%20und%20Therapie%20der%20Osteoporose%20Version%202.1.%202023%20\(002\).pdf](https://dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202023%20-%20Letzter%20Stand%20der%20Dokumente,%2012.10.2023/Leitlinie%2031.10.2023/DVO%20Leitlinie%20zur%20Diagnostik%20und%20Therapie%20der%20Osteoporose%20Version%202.1.%202023%20(002).pdf).
5. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet.* 1999;353(9156):878-82.
6. Dyer SM, Crotty M, Fairhall N, Magaziner J, Beaupre LA, Cameron ID, et al. A critical review of the long-term disability outcomes following hip fracture. *BMC Geriatr.* 2016;16(1):158.
7. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2005;16 Suppl 2:S3-7.
8. May H, Murphy S, Khaw KT. Age-associated bone loss in men and women and its relationship to weight. *Age Ageing.* 1994;23(3):235-40.
9. Karlamangla AS, Burnett-Bowie SM, Crandall CJ. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(4):695-708.
10. Ebetino FH, Sun S, Cherian P, Roshandel S, Neighbors JD, Hu E, et al. Bisphosphonates: The role of chemistry in understanding their biological actions and structure-activity relationships, and new directions for their therapeutic use. *Bone.* 2022;156:116289.
11. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract.* 2012;66(12):1139-46.
12. Yan MZ, Xu Y, Gong YX, Liu JM, Lu SY, Huang L, et al. Raloxifene inhibits bone loss and improves bone strength through an Opg-independent mechanism. *Endocrine.* 2010;37(1):55-61.

13. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 2003;348(7):618-29.
14. Rendina-Ruedy E, Rosen CJ. Parathyroid hormone (PTH) regulation of metabolic homeostasis: An old dog teaches us new tricks. *Mol Metab.* 2022;60:101480.
15. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology.* 1997;138(11):4607-12.
16. Martin TJ, Sims NA, Seeman E. Physiological and Pharmacological Roles of PTH and PTHrP in Bone Using Their Shared Receptor, PTH1R. *Endocr Rev.* 2021;42(4):383-406.
17. European Medicines Agency (EMA). Eladynos (Abaloparatid). [zitiert am 11.04.2024]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/eladynos>.
18. Le Henaff C, Finnie B, Pacheco M, He Z, Johnson J, Partridge NC. Abaloparatide Has the Same Catabolic Effects on Bones of Mice When Infused as PTH (1-34). *JBMR Plus.* 2023;7(2):e10710.
19. Rauner M, Taipaleenmaki H, Tsourdi E, Winter EM. Osteoporosis Treatment with Anti-Sclerostin Antibodies-Mechanisms of Action and Clinical Application. *J Clin Med.* 2021;10(4).
20. Eriksen EF, Chapurlat R, Boyce RW, Shi Y, Brown JP, Horlait S, et al. Modeling-Based Bone Formation After 2 Months of Romosozumab Treatment: Results From the FRAME Clinical Trial. *J Bone Miner Res.* 2022;37(1):36-40.
21. Chavassieux P, Chapurlat R, Portero-Muzy N, Roux JP, Garcia P, Brown JP, et al. Bone-Forming and Antiresorptive Effects of Romosozumab in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Bone Histomorphometry and Microcomputed Tomography Analysis After 2 and 12 Months of Treatment. *J Bone Miner Res.* 2019;34(9):1597-608.
22. Cosman F, Crittenden DB, Ferrari S, Khan A, Lane NE, Lippuner K, et al. FRAME Study: The Foundation Effect of Building Bone With 1 Year of Romosozumab Leads to Continued Lower Fracture Risk After Transition to Denosumab. *J Bone Miner Res.* 2018;33(7):1219-26.
23. Geusens P, Oates M, Miyauchi A, Adachi JD, Lazaretti-Castro M, Ebeling PR, et al. The Effect of 1 Year of Romosozumab on the Incidence of Clinical Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Results From the FRAME Study. *JBMR Plus.* 2019;3(10):e10211.
24. McClung MR, Brown JP, Diez-Perez A, Resch H, Caminis J, Meisner P, et al. Effects of 24 Months of Treatment With Romosozumab Followed by 12 Months of Denosumab or Placebo in Postmenopausal Women With Low Bone Mineral Density: A Randomized, Double-Blind, Phase 2, Parallel Group Study. *J Bone Miner Res.* 2018;33(8):1397-406.
25. Alliston T, Derynck R. Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature.* 2002;416(6882):686-7.

26. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62.
27. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015;80:14-8.
28. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):176-90.
29. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell.* 2010;19(2):329-44.
30. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
31. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003;4(8):638-49.
32. Kagiya T. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8).
33. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256(3):449-55.
34. Cramer EEA, de Wildt BWM, Hendriks JGE, Ito K, Hofmann S. Integration of osteoclastogenesis through addition of PBMCs in human osteochondral explants cultured ex vivo. *Bone.* 2024;178:116935.
35. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8(5):751-64.
36. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(4):318-23.
37. Hosseini V, Paryan M, Koochaki A, Cesaire HM, Mohammadi-Yeganeh S. Mir-4699 promotes the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab.* 2023;41(4):481-91.
38. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281-90.
39. Webster DJ, Schneider P, Dallas SL, Muller R. Studying osteocytes within their environment. *Bone.* 2013;54(2):285-95.
40. Creecy A, Damrath JG, Wallace JM. Control of Bone Matrix Properties by Osteocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:578477.
41. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-66.
42. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
43. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer.* 2006;107(2):289-98.

44. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol.* 2006;26(3):1002-13.
45. Li L, Sapkota M, Gao M, Choi H, Soh Y. Macrolactin F inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing Akt, MAPK and NFATc1 pathways and promotes osteoblastogenesis through a BMP-2/smad/Akt/Runx2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:202-9.
46. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008;29(2):155-92.
47. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001;142(4):1419-26.
48. Walsh NC, Alexander KA, Manning CA, Karmakar S, Wang JF, Weyand CM, et al. Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL. *Genes Immun.* 2013;14(5):336-45.
49. Elson A, Anuj A, Barnea-Zohar M, Reuven N. The origins and formation of bone-resorbing osteoclasts. *Bone.* 2022;164:116538.
50. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12(1):17-25.
51. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(6):457-75.
52. Takegahara N, Kim H, Choi Y. RANKL biology. *Bone.* 2022;159:116353.
53. 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.
54. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56.
55. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med.* 2005;22(6):674-82.
56. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, et al. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(5):864-70.
57. Schinner S, Ulgen F, Papewalis C, Schott M, Woelk A, Vidal-Puig A, Scherbaum WA. Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia.* 2008;51(1):147-54.
58. Ulgen F, Kuhn MC, Cupisti K, Herder C, Willenberg HS, Schott M, et al. The CB-1 receptor antagonist rimonabant modulates the interaction between adipocytes and pancreatic beta-cells in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011;119(1):41-6.

59. Deepika F, Bathina S, Armamento-Villareal R. Novel Adipokines and Their Role in Bone Metabolism: A Narrative Review. *Biomedicines*. 2023;11(2).
60. Perakakis N, Farr OM, Mantzoros CS. Leptin in Leanness and Obesity: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(6):745-60.
61. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999;140(4):1630-8.
62. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem*. 2002;85(4):825-36.
63. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207.
64. Bao D, Ma Y, Zhang X, Guan F, Chen W, Gao K, et al. Preliminary Characterization of a Leptin Receptor Knockout Rat Created by CRISPR/Cas9 System. *Sci Rep*. 2015;5:15942.
65. Liu K, Liu P, Liu R, Wu X, Cai M. Relationship between serum leptin levels and bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2015;444:260-3.
66. Ruhl CE, Everhart JE. Relationship of serum leptin concentration with bone mineral density in the United States population. *J Bone Miner Res*. 2002;17(10):1896-903.
67. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
68. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3815-9.
69. Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim JB. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*. 2009;27(9):2254-62.
70. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):282-90.
71. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Aizaki Y, Tanaka S, Sekikawa M, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6-Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2021;73(7):1145-54.
72. 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.
73. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, 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.

74. Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, et al. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23698-711.
75. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, et al. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone*. 2007;40(3):587-96.
76. Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, et al. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res*. 2008;23(4):499-506.
77. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(9):1649-57.
78. Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-99.
79. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, Van Hul W. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res*. 2007;22(5):708-16.
80. Cheng Z, Biechele T, Wei Z, Morrone S, Moon RT, Wang L, Xu W. Crystal structures of the extracellular domain of LRP6 and its complex with DKK1. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(11):1204-10.
81. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:117-48.
82. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res*. 1999;14(9):1622-7.
83. Sukumar D, Schluskel Y, Riedt CS, Gordon C, Stahl T, Shapses SA. Obesity alters cortical and trabecular bone density and geometry in women. *Osteoporos Int*. 2011;22(2):635-45.
84. De Laet C, Kanis JA, Oden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005;16(11):1330-8.
85. Han S, Park J, Nah S, Jang HD, Han K, Hong JY. Severity of underweight and risk of fracture: a Korean nationwide population-based cohort study. *Sci Rep*. 2022;12(1):10153.
86. Compston JE, Flahive J, Hosmer DW, Watts NB, Siris ES, Silverman S, et al. Relationship of weight, height, and body mass index with fracture risk at different sites in postmenopausal women: the Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women (GLOW). *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):487-93.

87. Kim JG, Hong JY, Park J, Park SM, Han K, Kim HJ, Yeom JS. Risk of fracture according to temporal changes of low body weight changes in adults over 40 years: a nationwide population-based cohort study. *BMC Public Health*. 2023;23(1):948.
88. Maimoun L, Mura T, Leprieur E, Avignon A, Mariano-Goulart D, Sultan A. Impact of obesity on bone mass throughout adult life: Influence of gender and severity of obesity. *Bone*. 2016;90:23-30.
89. Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res*. 2015;30(5):920-8.
90. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Sharpe SJ, Gamble GD. Determinants of the rate of bone loss in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):950-4.
91. Mangion D, Pace NP, Formosa MM. The relationship between adipokine levels and bone mass-A systematic review. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2023;6(3):e408.
92. Wang J, Liu S, Zhao Y, Naqvi S, Duan R. The association between serum adipokines levels with senile osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1193181.
93. Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Meunier PJ. Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone*. 2000;26(5):485-9.
94. Maurin AC, Chavassieux PM, Vericel E, Meunier PJ. Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. *Bone*. 2002;31(1):260-6.
95. Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble JM, Duque G. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):982-91.
96. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2004;93(6):1210-30.
97. Baksh D, Boland GM, Tuan RS. Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2007;101(5):1109-24.
98. Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):181.
99. Ohta H, Itoh N. Roles of FGFs as Adipokines in Adipose Tissue Development, Remodeling, and Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:18.
100. Phan P, Saikia BB, Sonnaila S, Agrawal S, Alraawi Z, Kumar TKS, Iyer S. The Saga of Endocrine FGFs. *Cells*. 2021;10(9).
101. Fasshauer M, Bluher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):488-99.
102. Liu L, Shi Z, Ji X, Zhang W, Luan J, Zahr T, Qiang L. Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(5):272.

103. Chen L, Fu L, Sun J, Huang Z, Fang M, Zinkle A, et al. Structural basis for FGF hormone signalling. *Nature*. 2023;618(7966):862-70.
104. Pichon MF, Moulin G, Pallud C, Pecking A, Floiras JL. Serum bFGF (basic fibroblast growth factor) and CA 15.3 in the monitoring of breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2000;20(2B):1189-94.
105. Johansson A, Larsson A, Nygren I, Blennow K, Askmark H. Increased serum and cerebrospinal fluid FGF-2 levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 2003;14(14):1867-9.
106. Seida A, Wada J, Kunitomi M, Tsuchiyama Y, Miyatake N, Fujii M, et al. Serum bFGF levels are reduced in Japanese overweight men and restored by a 6-month exercise education. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(11):1325-31.
107. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E, Morera R, Ricevuti L, Cazzola P, et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(5):573-7.
108. Amir R, Ben-Sira D, Sagiv M. Igf-I and fgf-2 responses to wingate anaerobic test in older men. *J Sports Sci Med*. 2007;6(2):227-32.
109. Kirk B, Feehan J, Lombardi G, Duque G. Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(4):388-400.