UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. Michael Amling

Die Rolle der Osteomakrophagen im Knochenremodeling

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristofer Folker Ernst Wintges aus München

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.07.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Thorsten Schinke

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter/in: Prof Dr. Wolfgang Rüther

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	5
1.1.	Aufbau und Funktion des Knochens	5
1.2.	Knochenzellen	7
1.2.1	. Osteoblasten	7
1.2.2	2. Osteozyten	8
1.2.3	8. Knochenbelegzellen	9
1.2.4	l. Osteoklasten	9
1.2.5	5. Knochenmarkszellen	
1.3.	Knochenremodeling	
1.4.	Osteoporose	
1.5. 1.5	Lrp5 5.1. Der Wnt-Signalweg	15 16
1.6.	Vorarbeiten	
2.	AUFGABENSTELLUNG	20
3.	MATERIAL	21
3.1.	Chemikalien	21
3.2.	Mäuse	21
3.3.	Zellkulturmedien und Lösungen	21
3.4.	Zellkultur	
3.5.	Antikörper	
3.6.	Material zur Anreicherung CD11b – positiver Zellen	
3.7.	Primer	
3.8.	Laborgeräte	24
3.9.	Statistische Auswertung	25
4.	METHODEN	26
4.1.	Molekularbiologische Methoden	
4.2	1.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	
4.2	1.2. Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
4.2	1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA	
4.2	1.4. Gewinnung von KNA aus Zellen	
4		

4.1.6.	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	29
4.1.7.	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	29
4.1.8.	Microarray-Genchip-Analyse	
4.2. His	tologie und Morphologie	
4.2.1.	Calceinmarkierung und Präparation der Mäuse	
4.2.2.	Präparation der Skelette	31
4.2.3.	Kontaktradiographie und μ CT-Analyse	
4.2.4.	Biomechanische Testung	
4.2.5.	Acrylat- und Paraffin-Histologie	
4.2.6.	Färbungen	34
4.2.7.	Immunhistologie	37
4.2.8.	Histomorphometrie	
4.3. Zel	lbiologische Methoden	
4.3.1.	Gewinnung und Kultivierung von primaren Mausosteoblasten	
4.3.2.	Gewinnung von Osteoklasten aus Knochenmarskszellen	
4.3.3.	Dentin-Resorption	
4.3.4.	TRAP–Aktivitätsnachweis	
4.3.5.	Alizarinrot–Färbung	43
4.3.6.	Alizarinrot-Quantifizierung	
4.3.7.	Magnetische Zellauftrennung mit CD11b-Antikörper	
4.3.8.	Durchflusszytometrie (FACS)	
5. ERG	EBNISSE	47
		47
5.1. Ana	alyse des Knochenphanotyps (cl5-defizienter Mause	
52 An:	alvse der zellulären Ursachen des Phänotyns <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse	51
5.2. Ana	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse	51
5.2. Ana 5.3. Ost	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin	51 ng 56
5.2. Ana 5.3. Ost	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin	51 ng 56
5.2. Ana5.3. Ost5.4. Ana	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse	51 ng 56 60
5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse	51 ng 56 60
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	51 ng 56 60 65
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1 Cal 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	51 ng 56 60 65
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	51 ng 56 60 65
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen	51 ng 56 60 65 65
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen	51 ng 56 60 65 65
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5	51 ng 56 60 65 65 66 68
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen eomakrophagen, ein neuer Spieler im Knochenremodeling	51 ng 56 60 65 65 66
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen eomakrophagen, ein neuer Spieler im Knochenremodeling	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen eomakrophagen, ein neuer Spieler im Knochenremodeling	51 ng 56 60 65 65 66 68 73
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5 5 swirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen eomakrophagen, ein neuer Spieler im Knochenremodeling AMMENFASSUNG	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5	51 ng 56 60 65 65 66 68 73 74
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	51 ng 56 60 65 65 66 68 73 74 76
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION 5	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 11.2. Li 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse KUSION	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 11.2. Li 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aua 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 11.2. Li 11.3. P 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse	
 5.2. Ana 5.3. Ost 5.4. Ana 6. DISS 6.1. Ccl 6.2. Aus 6.3. Ost 7. ZUSA 8. AUS 9. LITE 10. AB 11. AN 11.1. D 11.2. Li 11.3. P 12. ED 	alyse der zellulären Ursachen des Phänotyps <i>Ccl5</i> -defizienter Mäuse eomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodelin alyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse	

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion des Knochens

Das sehr detaillierte, komplexe und harmonische Zusammenspiel unserer Sinne, des Nervensystems und der Muskeln wäre ohne die rund 200 Knochen des menschlichen Skelettes unmöglich. Die Knochen liefern dabei das bewegliche Gerüst, welches als Bewegungs-, Halte- und Stützapparat unseren Bewegungen ihre Einzigartigkeit verleiht. Zusätzlich bietet das Skelett Schutz für die inneren Organe, dient als Reservoir für zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine und liefert mit dem Knochenmark die passende Umgebung für die Blutbildung. Darüber hinaus kontrolliert es, als Speicherort für Calcium- und Phosphationen, zusammen mit den Nieren die Aufrechterhaltung des Mineral- und Säure-Basen-Haushaltes [Taichman, 2005]. Morphologisch ist das Skelett aus 20% kortikalem (Kompakta) und 80% trabekulärem Knochen (Spongiosa) aufgebaut, was dem Knochen seine einzigartige Leichtbauweise verleiht. Kortikaler Knochen besteht aus Osteonen, so genannten Haverschen Systemen, und umgibt schützend den Knochen-marksraum, den der trabekuläre Knochen mit seiner schwammartigen, traktoriellen Bauweise auskleidet. Je nach Funktion und Lage im menschlichen Körper variiert jedoch die Zusammensetzung aus kortikalem und trabekulärem Knochen. So besteht die Wirbelsäule aus 25%, der Femurkopf aus 50% und der Radiusschaft sogar aus 95% kortikalem Knochen [Clarke, 2008]. Über das gesamte Menschleben muss das Skelett den unterschiedlichsten Belastungen, seien es lediglich Alttagstätigkeiten oder sogar Sportarten mit hohen mechanischen Belastungen, trotzen [Carbuhn et al., 2010; Patel DR., 2010]. Hierbei wird ihnen einerseits eine gewisse Steifigkeit für Bewegungen gegen die Schwerkraft und statische Belastungen und gleichzeitig eine gewisse Flexibilität für die Energieabsorption bei elastischen und plastischen Verformungen abverlangt [Currey JD., 1984]. Dieses Gleichgewicht zwischen Steifigkeit und Flexibilität des jeweiligen Knochens wird hierbei durch den unterschiedlichen Mineralisationsgehalt im Knochen erlangt [Seeman E. et al., 2008]. Je höher der Gehalt an anorganischen Salzen, desto größer ist seine Steifigkeit und umso geringer seine Elastizität. Für ein optimales Gleichgewicht hat die Natur einen Mineralisationsgehalt von 65% eingelagertem Hydroxylapatit ($[Ca_3(PO_4)_2]_3Ca(OH)_2$) gewählt. Die restlichen 35% sind nicht

mineralisierte Matrix, die zu etwa 90% aus Typ I-Kollagen und 10% aus nichtkollagenen Matrixproteinen wie Proteoglykanen und Glykoproteinen (Fibronektin, Osteopontin, Osteocalcin, Thrombospondin und Bonesialo-protein) besteht [Green J., 1994]. Diese Zusammensetzung verleiht dem Knochen dieselbe Elastizität wie Eichenholz (130.000 kg/cm²), dieselbe Zugfestigkeit wie Kupfer (1.700 kg/cm²), eine größere Druckfestigkeit als Sand- oder Kalkstein (1.500 kg/cm²) und dieselbe Biegesteifigkeit von Flussstahl (1.800 kg/cm²) [Wick, 2005]. Wenngleich diese Werte der einzelnen mechanischen Eigenschaften des Knochens unverwüstlich erscheinen, so führt doch ein geringes Missverhältnis im sensiblen Gleichgewicht zwischen Knochenformation und Knochenresorption zu Veränderungen in der Knochenmikroarchitektur und damit zu einem erhöhten Frakturrisiko. Um diese außergewöhnliche mechanische Beschaffenheit des Knochens gleichbleibend aufrecht zu erhalten, ist daher ein ständiger Knochenumbau absolut notwendig. So werden jährlich 10% der gesamten Knochenmasse erneuert, um alten, abgenutzten, mit Mikrofrakturen versehenen, durch neugebildeten Knochen zu ersetzten [Cohen MM., 2006]. Dies ist möglich, da der Knochen keine tote Materie darstellt, sondern ein lebendiges Organ, bestehend aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen (Abbildung 1.1), die in so genannten Bone Multicellular Units (BMU) in enger kommunikativer Beziehung zueinander stehen und interagieren [Parfitt, 2002].



Abbildung 1.1: Humane Knochenhistolgogie: Dargestellt sind durch Goldner-Färbung mineralisierter Knochen (grün), die einzelnen Knochenzellen und ihre räumliche Interaktion: Resorbierende Osteoklasen (mit + markiert), synthetisierende Osteoblasten (mit * markiert) und "ruhende" Osteozyten (mit → markiert).

1.2. Knochenzellen

1.2.1. Osteoblasten

Osteoblasten entwickeln sich unter dem Einfluss spezifischer Proteine aus Knochenmarksvorläuferzellen, die den multipotenten mesenchymalen Stammzellen angehören [*Lo Celso et al., 2009*] und die Fähigkeit besitzen sich entweder zu Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten, Fibroblasten oder Osteoblasten zu differenzieren [*Bianco et al., 2001*].

Den initialen Übergang von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen leiten Proteine des Wnt/ β -Catenin Signalweges ein [Logan & Nusse, 2004]. Auf diesen folgt die weitere Differenzierung zu maturen Osteoblasten, für die vor allem der Transkriptionsfaktor Runx2 (runt-related transcription factor 2) verantwortlich ist [Ducy et al., 1997]. Dabei reguliert Runx2 über die Bindung an die Osteoblastenspezifische Bindungsstelle OSE2 auf der DNA die Genexpression zahlreicher für die Osteoblastogenese benötigten Gene wie Osteocalcin (BGP), Typ I-Kollagen, BSP (bone sialoprotein), akalische Phosphatase und viele mehr [Camilleri & McDonald, 2006]. Die gravierenden Auswirkungen eines Defektes dieses Transkriptionsfaktors für die Skelettbildung konnte erstmals in Runx2-defizienten Mäusen gezeigt werden, bei denen es zum Fehlen von reifen Osteoblasten und damit zu einer fehlenden Verknöcherung des Skeletts kommt [Otto et al., 1997]. Eine heterozygote Mutation von RUNX2 beim Menschen führt zur cleidokranialen Dysplasie (CCD), einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, die durch Knochenunterund Fehlentwicklung gekennzeichnet ist [Otto et al., 2003].

Neben Runx2 konnten zahlreiche weitere Faktoren für die Zelldifferenzierung von Osteoblasten identifiziert werden. So regulieren zum Beispiel Wachstumsfaktoren wie BMPs (bone morphogenetic proteins) und FGFs (fibroblast growth factors) die Osteoblasten-differenzierung direkt über die Transkription von Runx2 [*Franceschi et al., 2003*]. Außerdem spielen viele endokrine und parakrine Faktoren wie Vitamin D₃, Östrogen, Parathormon (PTH), Insulin, Leptin sowie Serotonin [*Yadav et al., 2008*] eine entscheidende Rolle in der Regulation der Differenzierung und Funktion des Osteoblasten. In Ansammlungen von mehreren hundert, typischerweise kuboidalen Zellen entlang der Knochenoberfläche sind die Osteoblasten nach ihrer Differenzierung

verantwortlich für die Sekretion der nicht-mineralisierten Knochenmatrix (Osteoid) und deren Mineralisation [*Soltanoff et al., 2009*].

1.2.2. Osteozyten

Im Verlauf des Remodelings verlieren die Osteoblasten ihre Polarität und es kommt zu einer ungeordneten Osteoidsekretion, wodurch sich 30% der ausgereiften Osteoblasten in Lakunen in den neugebildeten bzw. später mineralisierten Knochen "einmauern". Über die Zwischenstufen "osteoblastic osteocyte" und "osteoid osteocyte" [Nefussi et al., 1991] differenzieren sie sich zu Osteozyten, die über 95% aller Knochenzellen ausmachen [Marotti, 1996]. Während der Differenzierung verlieren die Osteoblasten einen Großteil ihrer Zellorganellen und des Zytoplasmas sowie viele ihrer spezifischen Gene [Franz-Odendaal et al., 2006] und es kommt gleichzeitig zur Ausbildung langer Zellausläufer, so genannter Dendriten. Die Dendriten bilden über zahlreiche mikrofeine Knochenkanäle, Canalikuli, ein Netzwerk mit benachbarten Osteozyten sowie Osteoblasten, Osteoklasten und sogar Knochenmarkszellen [Kamioka, 2001; Matsuo, 2008]. Dieses Netzwerk ermöglicht einerseits die Kommunikation über direkten Zellkontakt (gap junctions), insbesondere aus Connexin 43 bestehend, und andererseits über endokrine Signalmoleküle. Genaue molekularbiologische Differenzierungsmechanismen sind bisher nicht aufgeklärt, jedoch scheint Dmp1 (Dentin matrix protein 1) eine wichtige Rolle zu spielen, da Dmp-1-defziente Mäuse eine Ostemalazie entwickeln [Feng et al., 2006].

Die Hauptaufgabe der Osteozyten wird bislang in der Funktion als Mechanosensor gesehen, der mechanische Belastungen in biomechanische Signale umwandelt [*Burger and Klein–Nulend, 1999; Tatsumi et al., 2007*]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Osteozyten ohne mechanischen Stimulus nicht überlebens- und funktionsfähig sind [*Burger et al., 2003*].

Einige Osteozyten besitzen außerdem die Fähigkeit, Knochen um die Osteozytenlakune herum zu resorbieren. Dieser Prozess, als Osteozytenosteolyse bezeichnet, dient in Situationen des gesteigerten Mineralverbrauches (Laktation, Winterschlaf, Schwangerschaft) bei Wirbeltieren möglicherweise der gesteigerten Mineralfreisetzung aus dem Knochen [*Haller and Zimny*, *1978; Steinberg et al.*, *1981;*

R

Kwiecinski, 1985]. Darüber hinaus werden weitere mögliche Aufgaben wie Calcium-Sensing [*Kamioka et al., 1995*], Osteoidreifung und Mineralisation [*Mikuni–Takagaki, 1995*], Regulierung des Mineralstoffwechsel [*Feng et al., 2006*] sowie der Osteoklastendifferenzierung und Osteoklastenaktivierung [*Zhao et al., 2002*] postuliert.

1.2.3. Knochenbelegzellen

Kommt es nicht zur Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten bzw. gehen diese nicht in den kontrollierten Zelltod, die Apoptose, über, dann entstehen so genannte Knochenbelegzellen [Rochefort et al., 2010]. Wie ein Endothel, das die Gefäße auskleidet, bedecken diese Zellen kontinuierlich die gesamte ruhende Knochenoberfläche und grenzen sie vom Knochenmark ab [Deldar et al., 1985]. Sie sind flach, kommunizieren mit benachbarten Zellen über Gap junctions und exprimieren Osteoblasten-spezifische Gene wie alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Osteonectin [Hauge et al., 2001]. Nach bisheriger Meinung regulieren sie den Mineralhaushalt des Knochens [Davis et al., 1975, Mathews et al., 1978] und beeinflussen das Wachstum und die Vermehrung von Knochenmarkszellen [McClean & Urist, 1968]. Außerdem wird ihnen die Funktion nicht-mineralisierten Knochen zu verdauen und damit die Knochenresorption einzuleiten zugeschrieben [Chambers et al., 1985].

1.2.4. Osteoklasten

Osteoklasten, die als einzige Zellen im menschlichen Körper die Fähigkeit besitzen Knochen zu resorbieren, stellen die Gegenspieler der knochenbildenden Osteoblasten dar [*Bar-Shavit, 2007*]. Die mehrkernigen, TRAP-positiven (tartrate resistant acid phosphatase) Zellen differenzieren sich durch Fusion aus monozytären hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie unter dem Einfluss von verschiedenen Hormonen sowie lokalen und systemischen Faktoren. Dabei spielen besonders die beiden, von Osteoblasten und Stromazellen, in löslicher und membrangebundener Form gebildeten Zytokine M-Csf (Macrophage Colony

q

Stimulating Factor) und Rankl (receptor activator of nuclear factor-κB ligand) eine entscheidende Rolle [*Teitelbaum & Ross, 2003*].

M-Csf, das an seinen Rezeptor Csf1r (Colony Stimulating Factor Receptor 1) auf Vorläuferzellen bindet, ist vor allem für deren Zellproliferation sowie - überleben verantwortlich. Rankl, auch Trance (Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine) genannt, gehört zur tumor necrosis factor (TNF)-Superfamilie und bindet an den auf Vorläuferzellen exprimierten Transmembranrezeptor Rank (receptor activator of nuclear factor-kB), was zur Aktivierung und Differenzierung zu reifen Osteoklasten führt [Cohen S., 2006]. Antagonisieren lässt sich dieser Prozess durch das ebenfalls von Osteoblasten sezernierte Opg (Osteoprotegerin), welches wie Rank zur Tnf-Rezeptor-Superfamilie gehört. Opg bindet Rankl kompetitiv, inhibiert dessen Aktivität am Rank-Rezeptor und reguliert somit die Osteoklastogenese [Cohen MM., 2006]. Mäuse, bei denen entweder Rankl oder Rank fehlen entwickeln eine schwere Osteopetrose aufgrund des Verlustes der kompletten Osteoklasten [Kong et al., 1999], wohingegen Opg-defiziente Mäuse eine schwere Osteoporose entwickeln [Simonet et al., 1997]. Daneben existieren weitere Faktoren, die direkt über die Bildung von Rankl auf die Osteoklastogenese Einfluss nehmen. Dazu zählen Vitamin D₃, Interleukin 1 (IL-1) und 6 (IL-6), Tumor necrosis factor α (TNF- α) sowie Parathormon (PTH) und Glukokortikoide [Cohen S., 2006].

Der Prozess der Knochenresorption findet in so genannten Howship-Lakunen auf der mineralisierten Kochenoberfläche statt. Dabei binden die Osteoklasten über Integrinrezeptoren ($\alpha_v\beta_3$) an die Matrixproteine Osteopontin und BSP [*Ross & Teitelbaum, 2005*]. Dies führt zur Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes mit Formation eines Aktinrings und einer sogenannten "sealing zone", wodurch es für die anstehende Resorption zur Ausbildung eines abgeschlossenen, extrazellulären Kompartimentes zwischen Osteoklast und Knochen kommt [*Vaananen et al., 2000*]. Zusätzlich entsteht durch Auffaltung der Plasmamembran über der Resorptionslakune die sogenannte "ruffled border", die eine Oberflächenvergrößerung bewirkt. Über diese Membran werden durch die Carboanhydrase intraosteoklastär gebildete Protonen (H⁺-ATPase) zusammen mit Chloridionen (Clcn7) und lysosomalen Enzymen in die Resorptionslakune ausgeschüttet. Es kommt zur Ansäuerung auf einen pH-Wert

von 4-5 durch die gebildete Salzsäure (HCI), was zur Auflösung des Hydroxylapatits führt. Die gleichzeitig durch das saure Milieu aktivierten Enzyme, vor allem Cathepsin K, bewirken die Spaltung des freigelegten Typ I-Kollagens und damit den Abbau der organischen Matrix [*Gowen et al., 1999*]. Die anfallenden Abbauprodukte, wie Calcium, Phosphat, Kollagenfragmente usw. transportiert der Osteoklast dabei ständig durch Transzytose in die Zirkulation. Nach abgeschlossener Resorption verliert der Osteoklast wieder seine polarisierte Struktur und wandert entweder zum nächsten Resorptionsort oder unterliegt dem programmierten Zelltod, der Apoptose.

1.2.5. Knochenmarkszellen

In unmittelbarer Nachbarschaft zum Knochen liegt das Knochenmark. Diese enge räumliche Lagebeziehung ermöglicht eine Interaktion zwischen Knochenzellen und diversen immunrelevanten Zellen des Knochenmarkes. Auch als Osteoimmunolgie bezeichnet, führt dieser Prozess zum wechselseitigen Einfluss beider Systeme [*Arron & Choi, 2000*]. Dabei konnte gezeigt werden, dass neben Osteoblasten auch aktivierte T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und synoviale Fibroblasten in der Lage sind, Rankl zu bilden und damit einen direkten Einfluss auf die Osteoklastogenese auszuüben [*Gravallese et al., 2000; Kong et al., 1999; Manabe et al., 2001*]. Außerdem sezernieren T-Zellen proinflammatorische Zytokine, wie Tnf- α , Il-1 β und Il-17, die die Rankl-Expression in Osteoblasten stimulieren [Miranda-Carus et al., 2006]. Abgesehen davon hemmen T-Zellen auch gleichzeitig die Osteoklastogenese, indem sie inhibitorische Zytokine, wie II-4, Il-10, Il-12 und Inf-y bilden [Walsh et al., 2006].

Auf der anderen Seite dieser Wechselbeziehung beeinflussen auch Knochenzellen das Immunsystem. So wirken zum Beispiel Osteoblasten regulatorisch auf die B-Zellreifung [*Wu et al., 2008*]. Dieses Zusammenspiel lässt sich auch unter normalen physiologischen Bedingungen beobachten, jedoch scheint es vor allem bei autoimmunen und entzündlichen Geschehen, wie zum Beispiel rheumatoider Athritis, eine Rolle zu spielen.

1.3. Knochenremodeling

Beim Prozess des Knochenumbaus, auch Knochenremodeling genannt, sind die osteoblastäre Knochenneubildung und die osteoklastäre Knochenresorption quantitativ, räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmt. Neben Osteoblasten und Osteoklasten, sind auch Osteozyten, Knochenbelegzellen und Knochenmarkszellen, wie T- und B-Zellen, am Prozess des Knochenremodeling beteiligt [Sims and Gooi, 2008]. Dieser zeitlebens kontinuierlich ablaufende Prozess schließt sich beim Menschen an die Pubertät an und dient bis zum Ausfall der Gonadenfunktion zur Gleichgewichtserhaltung der Knochenmasse [Frost, 1969]. Dabei existiert im gesunden adulten Knochen ein konstantes Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation, was durch ein enges Zusammenspiel beider Prozesse erlangt wird, auch "coupling" genannt [Karsdal et al., 2007]. Der zeitliche asynchrone Ablauf vollzieht sich dabei in fünf aufeinanderfolgenden Phasen. In der Aktivierungsphase, der ersten Phase, differenzieren sich Osteoklasten aus hämatopo-etischen Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagenlinie und werden an die ruhende Knochenoberfläche rekrutiert. In der zweiten Phase, der Resorptionsphase, kommt es anschließend zur Knochenresorption, die in der Umkehrphase durch Apoptose der Osteoklasten beendet wird. In der Bildungsphase kommt es zur Ausdifferenzierung von Osteoblasten, die Osteoid sezernieren, das anschließend mineralisiert. Schlussendlich wird mit der Terminierungsphase der Remodelingprozess durch Interaktionen zwischen Osteozyten und Osteoblasten beendet [Henriksen et al, 2009]. Um ein einwandfreies Remodeling unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten ist ein Zusammenspiel systemischen komplexes von und lokalen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen, PTH, Calcitonin und Vitamin D₃, sowie zentralnervösen Regulationsmechanismen entscheidend [Takeda and Karsenty, 2001]. Kommt es jedoch zu einer Inbalance zwischen Knochenformation und -resorption, sind die Folge Veränderungen in der Knochenstabilität und Störungen der Mineralhomöostase, wie z.B. bei der Osteopetrose, Osteoporose und anderen Knochenerkrankungen.

1.4. Osteoporose

"Die Osteoporose ist eine chronische Skeletterkrankung, charakterisiert durch eine Verminderung der Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit entsprechend reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturneigung" [Consensus Development Conference Hong Kong, 1993]. Laut WHO zählt die Osteoporose neben Diabetes mellitus Typ II, Myokardinfarkt und arterieller Hypertonie zu den häufigsten Volkskrankheiten der westlichen Welt. Frauen erkranken dabei sechsmal häufiger an Osteoporose als Männer und speziell Frauen nach der Menopause sind besonders häufig betroffen. Im Jahr 2003 betrug die Prävalenz der Osteoporose in Deutschland 7,8 Millionen, wobei die Prävalenz mit einem höheren Alter korrelierte [Häussler et al. 2007]. Durch eine vorliegende Störung des Calcium-Phosphathaushalts, kommt es bei der Osteoporose und zu einer Gleichgewichtsverschiebung von Knochenformation und -resorption hin zu einer negativen Knochenbilanz. Dabei kann es entweder zu einer vermehrten Resorption, einer verminderten Formation oder beidem zugleich kommen. Dies führt zu einem porösen, instabilen Knochen mit einer rarifizierten trabekulären Mikroarchitektur und resultierend einer erhöhten Knochenbrüchigkeit [Amling et al., 1994]. Klinisch manifestiert sich die Osteoporose durch chronische Schmerzen und Frakturen im Bewegungsapparat, wobei besonders häufig Wirbelkörper, der distale Radius und das proximale Femur, betroffen sind [Jakob et al., 2007].

Einteilen lässt sich die Osteoporose in primäre (unbekannte Ätiologie) und sekundäre Osteoporoseformen (bekannte Ätiologie). Zu den primären Formen werden die idiopathische juvenile, die postmenopausale (Typ I) sowie die senile Osteoporose (Typ II) gerechnet. Für alle drei Formen sind eine Reihe von Risikofaktoren bekannt, wobei die eigentlichen Ursachen bisher noch ungeklärt sind:

- 1. Genetische Faktoren: positive Familienanamnese, weibliches Geschlecht, kaukasische und asiatische Rasse [*Jakob et al., 2007*]
- 2. Ernährungsbedingte Faktoren: calciumarme und faserreiche Kost, hohe Phosphat- und Proteinzufuhr [*Heaney et al., 1999*]

- 3. Verschiedene exogene Faktoren: geringe UV-Exposition, Bewegungsmangel [*Priemel et al., 2010*]
- 4. Hormonelle Faktoren: Östrogenmangel, Nullipara [Jakob et al., 2007]

Die sekundäre Osteoporose ist eine fakultative Begleiterscheinung bekannter endokriner Grunderkrankungen wie einer Hyperthyreose, eines Cushing-Syndroms oder eines Hyperparathyreoidismus. Daneben kann sich eine Osteoporose aber auch auf dem Boden einer onkologischen, immunologischen oder metabolischen Erkrankung wie dem Plasmozytom, der rheumatoiden Athritis, der Spondylitis ancylosans und der Homozystinurie entwickeln. Ferner führen auch eine verminderte Knochenbeanspruchung nach operativen Eingriffen und Nebenwirkungen von Medikamenten, v.a. durch Glukokortikoide, zu einer Osteoporose.

Mit der zukünftigen demographischen Entwicklung zu einer immer älter werdenden Bevölkerung mit einer zunehmend immobilen Lebensweise wird die Osteoporose in naher Zukunft ein noch ernsteres gesundheitliches Problem darstellen. Man muss davon ausgehen, dass in den nächsten 20 Jahren die Zahl der Osteoporose-bedingten Frakturen und die momentanen jährlichen Kosten von 5,4 Milliarden Euro in Deutschland sich verdoppeln werden [Häussler et al., 2006]. Zur Zeit gibt es jedoch noch keine erfolgreiche medikamentöse Therapie, um den fortschreitenden Knochenmasseverlust aufzuhalten, sondern nur zu verlangsamen. Hierzu zählen Basistherapiemaßnahmen wie Calcium-D₃-Supplementierung, und Vitamin Bewegungstherapie und Eliminierung von Risikofaktoren, wie Alkohol und Rauchen, sowie Schmerztherapie und antiresorptive Therapie. Zu den bisher verfügbaren antiresorptiven Therapieansätzen gehören Östrogene [Riggs et al., 2002; Rossouw, 2002], Gestagene, Calcitonin, Vitamin-D₃-Metabolite und Bisphosphonate [Rodan, 1997; Baran, 2001, Harris, 2001; Delmas, 2002; Daragon and Pouplin, 2004] sowie Denosumab, ein humaner Rankl-Antikörper [Cummings et al., 2009]. Dabei stellt zum jetzigen Zeitpunkt die Therapie mit Bisposphonaten die Therapie der Wahl dar. Zu den primär osteoanabolen Therapieansätzen gehören Flourid- und Strontiumsalze [Meunier et al., 2004], anabole Steroide, Parathormon [Seeman and Delmas, 2001; Neer et al., 2001; Miyakoshi, 2004], Wachstumshormone, Prostaglandine [Yoshida et *al., 2002; Vrotsos et al., 2003*] und lokale Wachstumsfaktoren. Diese bisherigen Therapieansätze führen allerdings nur zu einem geringen Knochenmassezugewinn, maximal 2% pro Jahr [*Rodan and Martin, 2000*], und damit nur zu einer geringen Frakturrisikosenkung. Um in naher Zukunft das zunehmende Patientengut angemessen zu behandeln ist es daher von besonderer Wichtigkeit, neue und bessere Ansatzpunkte für eine osteoanabole Therapie, die die Proliferation und Differenzierung des Osteoblasten als Ziel besitzen, zu finden.

1.5. Lrp5

Die Suche nach möglichen osteoanabolen Therapieansätzen führte in den letzten 20 Forschung nach relevanten Genen in erblich Jahren zur bedingten Knochenerkrankungen, die einen Einfluss auf das Knochenremodeling ausüben könnten. Von besonderem Interesse für die Regulierung der Knochenmasse wurde dabei der Genlocus 11q12-13, der für eine Vielzahl von monogen bedingten Erkrankungen wie zum Beispiel dem autosomal-rezessiv vererbten Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom [Gong et al., 2001], bei dem es beim Menschen durch eine inaktivierende Mutation zur Ausbildung einer schweren juvenilen Osteoporose mit einhergehender Erblindung kommt, verantwortlich gemacht. Allen diesen Erkrankungen liegen dabei unterschiedliche Mutationen im Gen, welches für Lrp5 (Low-density lipoprotein receptor-related-protein 5) kodiert, zugrunde. Zusätzlich konnten verschiedene klinische Studien zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen natürlichen Lrp5-Polymorphismen in der Bevölkerung und einer erhöhten Knochendichte (BMD; bone mineral densitiy) besteht [Koh et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004; Ferrari et al., 2005; Zhang et al., 2005]. Lrp5 ist ein LDL-Rezeptor, der ausschließlich auf der Zellmembran von Osteoblasten, nicht aber auf Osteoklasten exprimiert wird, was ihn als Ziel für eine osteoanabole Therapie interessant machte. Im Jahre 2002 konnten die Vermutungen, dass LRP5 einen Einfluss auf das Knochenremodeling ausüben könnte, auch erstmals durch die Entdeckung einer aktivierenden Mutation (Gly171Val) im LRP5-Gen bestätigt werden. Diese verursacht eine Osteosklerose, also eine Erkrankung mit erhöhter Knochendichte, bedingt durch eine Überaktivierung der Knochenformation [Little et al., 2002; Boyden et al., 2002].

Tierversuche mit Mäusen, in denen die Gly171Val-Mutation überexprimiert wird, bestätigten die Beobachtungen im Menschen [*Babij et al., 2003*]. Mittlerweile sind weitere Mutationen bekannt, die alle ebenfalls in Mensch und Maus zu einer erhöhten Knochenmasse führen [*van Wesenbeeck et al., 2003; Ai et al., 2005*].

1.5.1. Der Wnt-Signalweg

Seit dieser Entdeckung erlangte der Wnt-Signalweg, in welchem Lrp5 als Co-Rezeptor für die Signaltransduktion fungiert, einen großen Stellenwert in der Knochenforschung. Seit der Entdeckung des ersten Wnt-Liganden 1982 durch Nusse und Varmus konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Regulierung der embryonalen Knochenentwicklung und der Knochenmasse sowie bei der Knorpelentwicklung spielt [*Westendorf et al., 2004; Hartmann and Tabin, 2001*].

Wnt-Moleküle stellen dabei eine Proteinfamilie sekretorischer Glykoproteine dar, die nach der Amalgamierung aus dem Protoonkogen "int-1" und dem "Wingless"-Protein der Fruchtfliege Drosophila melanogaster benannt werden [*Nusse & Varmus, 1982; Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980*]. Bis heute wurden 19 Moleküle dieser Familie in Mensch und Maus identifiziert [*van Amerongen & Nusse, 2009*], von denen man weiß, dass sie in vitro von Osteoblasten gebildet werden können [*Zhang et al., 2004; Kato et al., 2002*].

Aufgrund ihrer Fähigkeit eine maligne Transformation von C57MG-Zellen zu induzieren, besteht eine historische Unterteilung der Wnt-Liganden in sogenannte "kanonische" (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8, Wnt10b) und "nicht-kanonische" (Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt11) [*Wong et al., 1994*]. Diese Einteilung erfolgt heutezutage allerdings nicht mehr, sondern wurde durch die Einteilung nach der Aktivierung der unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionswege des Wnt-Signalweges weitgehend ersetzt. Dabei werden in der Literatur vier unterschiedliche Signalwege unterschieden: Der kanonische Wnt/β-Catenin-, der Wnt/Ca²⁺ (Calcium abhängige)-, der Wnt/Planar cell polarity (Wnt/PCP)- und der Wnt/Proteinkinase A (PKA)-Signalweg [*Moon et al., 2002; Nelson et Nusse, 2004*].

Den bisher am besten untersuchten und verstandenen Signalweg stellt dabei der β -Catenin- abhängige, kanonische Signalweg dar. Hierbei bindet ein kanonischer Wnt-

Ligand an einen 7-Transmembranrezeptor der Frizzled-Familie (Fzd) und den Wnt-Korezeptor Lrp5/Lrp6 [Cong et al., 2004]. Es kommt zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine und der Rekrutierung des intrazellulären Moleküls Dishevelled (Dv1) zur Plasmamembran [Angers and Moon, 2009], wodurch es über noch nicht genau verstandene Abläufe zur Phosphorylierung von PPPSPxS-Motiven im C-Terminus von Lrp6 kommt [Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005]. Dies führt zur Ausbildung einer hochaffinen Bindungsstelle, an welche Axin bindet. Dadurch kommt es zur Auflösung des Inaktivierungskomplex (destruction complex) für β-Catenin, bestehend aus den Proteinen Axin, Apc (Adenomatous Polyposis Coli), Gsk3β (Glycogen Sythase Kinase 3β) und Ck1 α (Casein Kinase 1 α) [Seto and Bellen, 2004; Angers and Moon, 2009]. β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und dem Proteasom zur Degradation zugeführt, sondern als aktive, unphosphorylierte Form in den Zellkern transloziert, wo es zusammen mit Tcf (T-cell fator)-Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern der Lef (Lymphoid enhancer binding protein factor)-Familie interagiert und die Genexpression von Wnt-Zielgenen wie Axin2 und Naked induziert [Mosimann et al, 2009; Angers and Moon, 2009].

Die anderen drei Signalwege, die auch als nicht-kanonische Wnt-Signalwege zusammengefasst werden, wirken dabei β -Catenin-unabhängig über die Bindung von nicht-kanonischen Wnt-Liganden an einen Rezeptor der Frizzled-Familie und an die Ko-Rezeptoren Ror2 und Ryk, nicht aber über Lrp5/Lrp6 [*Gordon and Nusse, 2006*]. Dabei kommt es beim Wnt/Ca²⁺-Signalweg zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, was wiederum zur Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen Kinasen CamKII (Calcium-calmodulin dependent kinase II) und PKC (Protein Kinase C) führt, wodurch es zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wie Nfat kommt [*Wang and Malbon, 2003; Kohn and Moon,* 2005]. Dieser Signalweg ist entscheidend für die Regulierung der Zellmigration sowie Zelladhäsion während der Gastrulation des Embryos und für die Tumorsuppression [*Torres et al., 1996; Kühl, 2004*]. Außerdem inhibiert er den kanonischen Wnt-Signalweg über eine GSK-3 β -unabhängige Förderung des β -Catenin-Abbaus [*Topol et al., 2003*].

Beim Wnt/PCP-Signalweg kommt es nach Bindung durch einen nicht-kanonischen Wnt-Liganden zur Induktion der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der Nemo-like-

Kinase (NLK) über die Aktivierung der kleinen GTPasen Rho und Rac [*Huelsken and Behrens, 2002; Habas und Dawid, 2005*]. Er kontrolliert die zytoskelettalen Organisation und Zellpolarität sowie Zellmigration durch Modifikationen des Aktin-Zytoskelettes [*Habas et al., 2003*]. Der Wnt/PKA-Signalweg ist der bisher noch am wenigsten untersuchte Wnt-Signalweg. Bisher bekannt ist, dass er durch die Aktivierung von Proteinen der CREB (cAMP respsonce element binding proteins)-Familie die myogene Genexpression während der Entwicklung modifiziert [*Chen et al., 2005*].

1.6. Vorarbeiten

Da es bisher keine Arbeiten über die Rolle der Frizzled-Rezeptorfamilie im Osteoblasten gab, wurde in Vorarbeiten ihre Rolle für den Knochenstoffwechsel untersucht. Dabei konnte erstmals mit Hilfe einer Affymetrix-Genchipanalyse gezeigt werden, dass das Gen Frizzled-9 als einziges Gen der Frizzled-Rezeptorfamilie während der Osteoblastendifferenzierung, parallel zu bekannten Osteoblastengenen induziert wird. Zusätzlich konnte mittels in-situ Hybridisierung die Genexpression im Osteoblasten nachgewiesen werden. Um einen möglichen physiologischen Einfluss auf die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten und somit auf die Knochenformation zu identifizieren, wurde daraufhin ein Fzd-9-defizientes Mausmodell analysiert [*Albers et al., 2011*].

Die Untersuchungen anhand von undekalzifizierten Wirbelkörperhistologien im Alter von 24 und 52 Wochen zeigten eine um 30% verringerte Knochenmasse im Vergleich zu Wildtypmäusen (*Abbildung 1.6 A*). In der histomorphometrischen Auswertung fiel weiter auf, dass der skelettale Phänotyp mit einer signifikanten Erniedrigung der Osteoblastenzahl einher ging (*Abbildung 1.6 B und C*). Analysen der Resorption ergaben keinen Unterschied zu Wildtypkontrollen. Da der Knochenphänotyp anscheinend aufgrund einer verminderten Knochenformation bedingt ist, wurden als nächstes Fzd9^{-/-} Osteoblasten ex vivo analysiert. Dabei zeigte sich in einem BrdU-Proliferationsassay, dass Fzd9-defiziente Osteoblasten im Vergleich zu Wildtyp-Osteoblasten eine verminderte Proliferationsfähigkeit besitzen. Außerdem konnte

zusätzlich eine verminderte Mineralisationsfähigkeit von 50% in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden (*Abbildung 1.6 D*).



Abbildung 1.6: Vorarbeiten zu Fzd9-defizienten Mäusen: (**A**) Unentkalkte 4 μm dicke Histologie von Wirbelkörpern nach Kossa/van Gieson gefärbt. (**B und C**) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter: Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (TbTh), Trabekelanzahl (TbN), Trabekelabstand (TbSp), Osteoblastenanzahl (ObN/BPm) und Knochenformationsrate (BFR/BS). (**D**) Dargestellt sind Osteoblasten-Zellkulturen an unterschiedlichen Tagen der Differenzierung in einer Versilberungs-Färbung. (**E**) Auswertung der Genchipanalyse Fzd9-defizienter Osteoblasten.

Um die Ursache des vorliegenden zellautonomen Defektes in Differenzierung und Funktion der Fzd9^{-/-} Osteoblasten zu eruieren, wurde daraufhin eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt, um mögliche Zielgene eines Fzd9-abhängigen Signalweges zu identifizieren. Hierfür wurde eine Affymerix-Genchip-Analyse mit Osteoblasten von Wildtyp- und Fzd9-defizienten Mäusen an Tag 10 der Differenzierung durchgeführt. Dabei fiel auf, dass bekannte Osteoblastenmarker, wie Runx2, Col1a1, Bglap, Ibsp und Dmp1 in den Fzd9-defizienten Osteoblasten nicht wesentlich verändert

waren, dafür aber besonders Gene für Chemokine der Chemokinsubfamilien CC- und CXC- (Ccl2, Ccl5, Cxcl5 usw.) stark in ihrer Expression beeinträchtigt waren (*Abbildung 1.6 E*). Diese Ergebnisse konnten mittels quantitativer RT-PCR in drei unabhängig voneinander isolierten Osteoblastenkulturen bestätigt werden. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob einige dieser Gene mögliche unbekannte Zielgene des kanonischen oder nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs sind. Dazu wurden primäre Wildtyposteoblasten an Tag 10 der Differenzierung für sechs Stunden entweder mit rekombinantem Wnt5a oder rekombinantem Wnt3a stimuliert und anschließend die Expression der Gene Ccl2, Ccl5 und Cxcl5 mittels quantitativer RT-PCR analysiert [*Albers et al., 2011*]. Es fiel auf, dass die Chemokine durch den nicht-kanonischen Wnt-Liganden signifikant induziert wurden (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle für die Induktion von Wnt3a wurde die Expression von Axin2 bestimmt, die wie erwartet signifikant induziert wurde.

2. Aufgabenstellung

Chemokine scheinen eine entscheidende Rolle im physiologischen Knochenremodeling zu besitzen. Beispielsweise regulieren sie die Knochenresorption über die Migration von Osteoblastenvorläufezellen aus dem Knochenmark zum Knochen [*Li et al., 2007; Kim et al. 2006; Miyamoto et al., 2009*], ebenfalls sind sie verantwortlich für eine geregelte Knochenformation [*Lisignoli et al., 2002; Lisignoli et al., 2007*]. Da bekannt ist, dass das Chemokin Ccl5 einen *in vitro* Effekt auf Osteoblasten hat, soll nun in dieser Arbeit die *in vivo* Rolle im physiologischen Knochenremodeling von Ccl5 erfolgen. Hierbei soll ein Ccl5-defizientes Mausmodel histologisch und histomorphometrisch analysiert werden und der molekulare bzw. zelluläre Mechanismus eines möglichen Knochenphänotyps mittels Zellkulturexperimenten weiter untersucht werden.

3. Material

3.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Gibco (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Restriktionsendonukleasen, Taq-Polymerase, Desoxyribo-nukleotidtrisphosphate, DNA-Ladepuffer und andere Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche (Mannheim), rekombinante Proteine von der Firma PeproTech (Hamburg) bezogen. Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p.A. Qualität auf.

3.2. Mäuse

Die Ccl5-defizienten Mäuse wurden vom Jackson Laboratory bezogen. Die Ccr5defizienten Mäuse wurden uns in einer Kooperation mit der Immunologie UKE unter Leitung von Frau Tiegs zur Verfügung gestellt. Alle Tiere entstammen einem C57Bl6-Hintergrund. Sie wurden in der Tierhaltung des UKE, Hamburg unter pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. Sie unterlagen einem geregelten Tag-Nacht-Rhythmus und erhielten eine standardisierte Diät. Die Analysen erfolgten an mindestens sechs weiblichen Tieren pro Gruppe jeweils im Alter von 24 und 52 Wochen. Alle Experimente wurden nach institutionellen Vorgaben der Pflege und Verwendung von Versuchstieren in der Forschung durchgeführt und von der Ethikkommission genehmigt.

3.3. Zellkulturmedien und Lösungen

Fötales Rinder Serum (Osteoblast)	HyClone, Waltham, USA
Fötales Rinder Serum (Osteoklast)	<i>Bio Whittaker,</i> Basel
Minimum Essential Medium Eagle, Alpha mod.	Sigma, München
Collagenase from Clostridium hystoliticum Type 1A	Sigma, München

Dispase Grade II (#04.942.078.001) Rekombinantes murines M-CSF Rekombinantes murines sRANKL Ascorbat β-Glycerophosphat Penicillin/Streptomycin (#15140)

3.4. Zellkultur

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml und 2,5ml Falcon Reaktionsgefäße, 15ml und 50 ml Filter, Bottle Top Filter, 0,45µm Gewebekulturplatten Gewebekulturschalen Kanülen, Gr20, 100 Sterican Pipettenspitzen Pipettenspitzen mit Filter Serologische Pipetten Spritzen, 1ml Spritzen, 20ml Zellsieb, 100µm Roche, Mannheim PeproTech, Hamburg Peprotech, Hamburg Sigma, München Sigma, München Gibco, Karlsruhe

Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Carl Roth, Karlsruhe VWR, Darmstadt Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Braun, Melsungen Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürnbrecht BD Falcon, Heidelberg BD Falcon, Heidelberg BD Falcon, Heidelberg

3.5. Antikörper

Die für die durchflusszytometrischen Analysen sowie Immunhistologie verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 3.5.1 und 3.5.2 aufgeführt. Der verwendete Fc-Block wurde von der Firma Serotec, Düsseldorf bezogen.

Antikörper	Antigen	Färbung	Hersteller
Ratte anti-Maus-CD11b	CD11b	PE	BD Biosciences Pharmigen
Ratte anti-Maus-CD4	CD4	APC – H7	BD Biosciences Pharmigen
Ratte anti-Maus-CD8	CD8	FITC	BD Biosciences Pharmigen
Ratte anti-Maus-F4/80	F4/80	APC	eBioscience

Tabelle 3.5.1: Antikörper für die Knochenmark-FACS-Analysen

Primäre Antikörper	Antigen	Hersteller
Ratte anti-Maus-F4/80	F4/80	Abcam
Maus anti-Human-CD68	CD68	Dako
Sekundäre Antikörper	Antigen	Hersteller
Hase anti-Ratte-F4/80	F4/80	Dako
Lines anti Maura CdCO	CDC9	Daka

Tabelle 3.5.2: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistologien

3.6. Material zur Anreicherung CD11b – positiver Zellen

Zur magnetischen Anreicherung der CD11b-positiven Zellen wurden MACS–CD11b-MicroBeats von der Firma Miltenyi Biotec (#130-049-601), Bergisch Gladbach, eingesetzt. Die MACS MS-Seperation Columns (#130-042-201) stammten ebenfalls von Miltenyi Biotec., Bergisch Gladbach, sowie der Magnetical particle concentrator (Macs Multi Stand, #018005). Der verwendete MACS-Puffer (1:20) setzte sich zusammen aus einem Anteil MACS BSA Stocksoultion (#130-091-376) und zu neunzehn Anteilen autoMACS[™] Rinsing Solution (#130-091-222). Beide Lösungen stammten wie auch der Rest von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach.

3.7. Primer

Die Sequenzen der Primer für das Ccl5-Wildtyp und -"Knockout"-Gen wurden vom Jackson Laboratory, Maine USA entworfen. Die Sequenzen für die Primer der Ccr5-Wildtyp und –"Knockout"-Gene erhielten wir von der Arbeitsgruppe Tiegs, UKE Hamburg. Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Tabelle 3.7.1 gibt Auskunft über die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer.

Amplifiziertes Allel	Name des Primers	Oligonukleoidsequenz
Ccl5-"Knockout"-Allel:	Forward primer: Ccl5 KO for	5'- TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG -3
	Reverse primer: Ccl5 KO rev	5'- TTG GAA AGA AGG GGA GGT CT -3'
Ccl5-Wildtyp-Allel:	Forward primer: Ccl5 WT for	5'- ATG CAT CTC CCA CAG CCT CT -3'
	Reverse primer: Ccl5 WT rev	5'- TTG GAA AGA AGG GGA GGT CT -3'
Bandenlängen	Knockout: 300 bp	Wildtyp: 192 bp
Ccr5-"Knockout"-Allel:	Forward primer: Ccr5 KO for	5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC -3'
	Reverse primer: Ccr5 KO rev	5'- AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC -3'
Ccr5-Wildtyp-Allel:	Forward primer: Ccr5 WT for	5'- CAG GCA ACA GAG ACT CTT GG -3'
	Reverse primer: Ccr5 WT rev	5'- TCA TGT TCT CCT GTG GAT CG -3'
Bandenlängen	Knockout: 280 bp	Wildtyp: 203 bp

Tabelle 3.7.1: Wildtyp- und Knockoutoligonukleotidprimer für die Genotypisierung der Ccl5- und Ccr5-Mäuse

3.8. Laborgeräte

Analysenwaage BP 221S	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage BL 600	Sartorius, Göttingen
Autotechnikon	<i>Bavimed,</i> Birkenau
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
FACS-Canto II Flow Cytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Gelkammern, WIDE MINI-SUB CELL GT	BioRad, München
Gelsystem, Mini Protean 3 System	BioRad, München
Geldokumentation	BioRad, München
Kamera, AxioCam	Zeiss, Göttingen
Kamera, EOS 10D	Canon, Krefeld
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen
Mikrotom, Microtec Cut 4060E	Enno Vieth, Hamburg
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
PCR Cycler, Mastercycler ep	Eppendorf, Hamburg
pH Meter MP 220	<i>Mettler Toledo,</i> Giessen
Photometer, Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare, München
Röntgenentwickler, OPTIMAX	Protec, Oberstenfeld

74

Faxitron Röntgengerät Faxitron X-ray Xray Wheeing Illinois, USA Rührmixer, Minishaker MS1 IKA, Staufen Schleifmaschine, Phoenix Alpha Buehler, Stuttgart Schüttler Duomax 1030 Heidolph, Kelheim Schüttelinkubator, GFL 3031 GFL, Burgwedel Sterile Arbeitsbank, Hera Safe Heraeus, Hanau UV-Tisch Bio Rad, München Video Graphic Printer, UP-895 MD Sony, Berlin Wasserbad, GFL 1086 GFL, Burgwedel Zentrifuge, Megafuge 1.0R Heraeus, Hanau Zentrifuge, Biofuge pico Heraeus, Hanau Zentrifuge, Centrifuge 5415 D *Eppendorf*, Hamburg

3.9. Statistische Auswertung

Von den gesammelten Daten wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Mittels der univarianten Varianzanalyse wurden die Gruppen gegeneinander untersucht. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 definiert. P-Werte <0,05 wurden mit einem (*), < 0,001 mit zwei (**) und < 0,0005 (***) mit drei Sternchen angegeben.

Corp.,

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

5mm lange Schwanzbiopsien wurden die Nacht über mit 50µl Proteinkinase K (10mg/ml) in 700µl Mausschwanz-Lyse Puffer bei 55° C inkubiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden 700µl Rotiphenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhlätnis 25:24:1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugegeben und der Ansatz nach kräftigem Schütteln für 3 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. 500µl der oberen Phase wurden in ein neues Eppendorftube überführt und nochmals mit gleichem Volumen Rotiphenol ausgeschüttelt. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Eppendorftube überführt und nochmals mit gleichem Volumen Rotiphenol ausgeschüttelt. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Eppendorftube überführt und die genomische DNA durch Zusetzen von 400µl Isopropanol unter erneuter Zentrifugation bei 13.000rpm für 8 Minuten ausgefällt. Anschließend wurde der komplette Überstand vorsichtig abgenommen und das entstandene DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol (4° C) gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugations-schritt bei 13.000rpm für 2 Minuten. Nach erneuter Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurde das Pellet anschließend in 50µl TE–Puffer für mehrere Stunden gelöst.

Mausschwanz-Lysis-Puffer:	50ml 1M Tris, pH 8,0
	200ml 0,5M EDTA, pH 8,0
	100ml 1M NaCl
	50ml 20% SDS
	600ml H ₂ O destilliert
Proteinase K-Lösung:	250mg Proteinase K

25ml H₂O destilliert

4.1.2. Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Folgenden wurde die DNA mit Hilfe der Methode der PCR durch eine thermostabile DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert. Die Polymerasekettenreaktion stellt dabei eine sensible Methode zur Vermehrung von nur in geringen Mengen vorliegenden DNA-Sequenzen dar. Dabei liefern sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) durch ihr freies 3'-OH bzw. 5'-OH-Ende den Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Jeder Vervielfältigungszyklus besteht dabei aus drei Schritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung bei 94° C, erfolgt die Trennung der DNA-Stränge. Danach lagern sich die Primer (Annealing) bei einer spezifischen Temperatur, abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer, an den Matritzenstrang an, der im letzten Schritt bei 72° C verlängert wird (Elongation). Die Einzelheiten zum Reaktionsansatz für die Genotypisierung der Mauslinien zeigt die Tabelle 4.1.2.1. Zur Verringerung der Ausbildung von unspezifischen Amplifikaten wurde in einzelnen Fällen 10% DMSO hinzugefügt. Um einen vorzeigtigen Beginn der Enzymreaktion zu vermeiden, wurden die Ansätze bis zum Polymerisationsbeginn auf Eis gelagert. Die Tabelle 4.1.2.2 fasst die PCR-Bedingungen für die einzelnen Genotypisierungen zusammen.

Reagenzien	Ansatz für Wildtyp und Knockout-PCR
DNA-Template (1:10 verdünnt)	2 μΙ
10x Taq-Polymerase-Puffer inkl. MgCl ₂	2 μΙ
Vorwärtsprimer (200µM)	3 μΙ
Rückwärtsprimer (200µM)	3 μΙ
dNTPs (2,5mM)	0,5 μΙ
Dream-Taq-Polymerase	0,5 μΙ
H ₂ O destilliert	10 µl
Gesamtvolumen	20µl

Tabelle 4.1.2.1: Zusammensetzung des Reaktionsansatz für die Genotypisierungs-PCR der Wildtyp- und Knockout-Mäuse

Ccl5												
Temperatur	94° C	94° C 94° C 58° C				72° C			°C	4° C		
Zeit	2 min	30 s	30 sec 45 se			1 min 1 n		nin	າ ∞			
Zyklenzahl	1 x	30					1	. x 1		1 x		
Ccr5												
Temperatur	94° C	94° C	64° C	72° C	94° C	58° C	72	° C	72°	С	4° C	
Zeit	3 min	20 sec	30 sec	35 sec	20 sec	30 sec	35	sec	3 m	3 min ∞		
Zyklenzahl	1 x		12 x			25 x			1 x1 x			
Taballa 4.1.2.2. DCD Custominatellumana für die Construisierung der Celf, und Cerf Mäuse												

Tabelle 4.1.2.2: PCR-Cyclereinstellungen für die Genotypisierung der Ccl5- und Ccr5-Mäuse

4.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Die gewonnene DNA wurde im Weiteren, in Abhängigkeit der aufzutrennenden DNA– Fragmente, gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde 1-1,5g Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) in 100ml 1xTAE-Puffer unter Wärmezufuhr in einem Mikrowellenofen aufgekocht. Zu dem flüssigen Gel wurden 5µl Ethidiumbromid hinzugefügt und in eine horizontale Gelkammer zum Gelieren gegossen. Das gehärtete Gel wurde anschließend in eine mit 1xTAE Puffer gefüllte Laufkammer gegeben, 20µl der DNA mit 4µl 6xDNA-Gel-Ladepuffer gemischt und der komplette Ansatz im elektrischen Feld bei 60-120V über 30 bis 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Auswertung und photographische Festhaltung anhand des DNA–Markers 1kb Plus unter einem UV–Transilluminator bei 254nm.

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Azetat
	50mM EDTA
	pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
6 x DNA-Gel-Ladepuffer:	10mM Tris-HCl (pH 7,6)
	0,03% Bromphenol blau
	0,03% Xylen Cyanol FF
	60% Glycerol
	60mM EDTA

4.1.4. Gewinnung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (#74104) von Quiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Das Verfahren basiert auf dem Einsatz einer Silica-Gel-Membran, an die die RNA bindet. Stoffe, die die RNA verunreinigen würden, können mit Hilfe verschiedener Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden. Zur Lyse der Zellen wurden diese im RLT–Lysepuffer (Quiagen) aufgenommen und über einen QIAshredder[®] zentrifugiert.

4.1.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem SuperScript[®] III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen #18080-400) nach Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 500ng bis 1µg RNA unter Verwendung von Oligo(dT)₂₀ Primern umgeschrieben.

4.1.6. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Konzentrationsbestimmungen von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen erfolgte photometrisch an einem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000. Dabei wurde ein Wert von 1,8 für DNA und 2,0 bis 2,2 für RNA des Koeffizienten aus den Wellenlängen 260/280nm angenommen, da dieser Wert einen guten Indikator für eine Kontamination mit Proteinen darstellt, welche durch ihre aromatischen Reste ein Absorptionsmaximum bei 280nm aufweisen.

4.1.7. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

ELISA bezeichnet ein immunologisches Verfahren, bei dem mit Hilfe einer enzymatischen Antikörper-Farbreaktion Proteine, Hormone und Enzyme in Proben nachgewiesen werden können. Für die Messung der Kollagenabbauprodukte (Crosslaps) der Osteoklasten im Serum wurde ein Rat Laps[™] Elisa der Firma IDS (Immunodiagnostic systems), Frankfurt, verwendet. Für die Bestimmung von Opg im Kulturmedium von Osteoblasten und Osteomakrophagen wurde ein Mouse Opg Immunoassay der Firma R&D Systems, Minneapollis, benutzt. An die Anleitung des Herstellers wurde sich jeweils gehalten. Im Falle der Bestimmung aus dem Kulturmedium wurde 1:200 verdünnt.

4.1.8. Microarray-Genchip-Analyse

Die Affymetrix-Genchip-Analyse ermöglicht eine vergleichende genomweite Expressions-analyse. In dieser Arbeit wurde die Microarray-Genchip-Analyse angewendet, um die Genexpression zwischen CD11b-positiven-Zellen und CD11bnegativen-Zellen zu vergleichen. Die Generierung der cRNA, sowie die Hybridisierung, das Scannen der Genchips und die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Streichert und Kristin Klaetschke aus der Klinischen Chemie, UKE, Hamburg. Für jede Analyse wurden 5µg RNA in cDNA umgeschrieben und die biotinylierte cRNA mit Hilfe des IVT-Labeling Kit der Firma Affymetrix nach Angaben des Herstellers hergestellt. Für die Hybridisierung auf dem Genchip (Affymetrix MG 430 2.0) erfolgte die Inkubation der cRNA in eine Hybridisierungslösung bei 45° C für 16 Stunden und ein Waschschritt in der Affymerix Fluidics Station 450. Der Scan der Genchips erfolgte dann mit dem Affymetrix Gene Chip Scanner 7G und die Signale wurden mit der GCOS Software von Affymerix prozessiert, bevor die Vergleichsanalysen mit dem Affymerix MAS Algorithmus erfolgten.

4.2. Histologie und Morphologie

4.2.1. Calceinmarkierung und Präparation der Mäuse

Für die Messung des Knochenzuwachses wurde den Mäusen 9 und 2 Tage vor Exitus 100µl Calcein intraperitoneal injiziert. Calcein ist ein Fluorochromfarbstoff mit einem Anregungsmaximum bei 495nm und einem Abstrahlmaximum bei 515nm. Nach Injektion lagert sich das Calcein bei Neubildung des Knochens in die mineralisierte Knochenmatrix ein und bildet mit Calcium einem Chelatkomplex aus. Anhand der über die 7 Tage gebildeten Calcein-Doppelbanden ist es möglich, die Knochenzuwachsrate (BFR, bone formation rate) in Wirbelkörpern und Tibiae zu quantifizieren.

Calcein-Lösung:

0,2g NaCl 0,5g Natriumbicarbonat 25ml H₂O destilliert 0,25g Calcein (Sigma, # C-0875) steriles Filtrieren, Lagerung bei 4° C

4.2.2. Präparation der Skelette

Den Mäusen wurde eine Inhalationsnarkose mit Diethylether (Roth 5920.2) in letaler Dosis verabreicht. Nach einer Blutentnahme aus dem Herzen, wurden die Organe morphologisch untersucht und entweder für die paraffinhistologische Aufarbeitung aufbewahrt oder entfernt. Anschließend wurde das komplette muskoloskeletalle System freipräpariert und die Skelette auf Korkplatten gestreckt und in 3,7%igem PBS– gepuffertem Formaldehyd für 24 Stunden fixiert, bevor sie anschließend dauerhaft in 80%igem Ethanol überführt wurden. Das gewonnene Blut wurde anschließend für 10 Minuten bei 4.000rpm zentrifugiert und das gewonnene Serum bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

4.2.3. Kontaktradiographie und µCT-Analyse

Vor Entnahme der Knochenpräparate für die histologische/histomorphometrische Analyse wurde eine Kontaktradiographie von jedem Mausskelett angefertigt. Dabei wurden die Mausskelette bei 35kV für 2 Sekunden geröntgt und anschließend photographisch dokumentiert (Faxitron, Xray; Firma: Faxitron Xray Corp,. Wheeling Illinois, USA; Röntgenfilme: Mamory HDR PQ, Firma: Agfa, Mechele, Belgien).

Für die dreidimensionale Darstellung wurden die Lendenwirbelkörper L5 und L6 in einem μ CT 40 (Scanco Medical, Basserdorf, Schweiz) mit 40kV/114 μ A bei einer Auflösung von 12 μ m bzw. die Femora als Querschnitt der Diaphyse bei einer Auflösung von 10 μ m gescannt. Zur Auswertung der Rohdaten diente das μ CT Evaluation Programm V4.4A (Scanco Medical, Basserdorf, Schweiz).

4.2.4. Biomechanische Testung

Um die biomechanische Stabilität von Mauswirbelkörpern und -femora zu bestimmen wurden diese einer biomechanischen Belastungstestung unterzogen. Dazu wurden die fixierten Knochen nach Freipräparation vom Muskelgewebe im Rhinoceros 3.0 (Mc. Neel) eingespannt und ein Stempel mit steigender Kraft auf die Mitte des Knochens gedrückt bis ein Ermüdungsbruch auftrat. Dabei erfolgte die digitale Aufnahme der Daten mit der Software TestExpert V10.1. Die errechneten Daten ergaben Maximalkraft, Steifigkeit und Energie bis zum Versagen (Fmax).

4.2.5. Acrylat- und Paraffin-Histologie

Für die histologische Analyse wurden jeweils die rechte und linke Tibia, die Lendenwirbelkörper L1 bis L4 und auffällige Organe in ein Autotechnikon zur Entwässerung überführt und je nach Art der nachfolgenden Histologie nach folgendem Schemata in einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt (Tabelle 4.2.5.1). Die Knochenpräparate für die Paraffinhistologie wurden zuvor noch für zwei bis drei Tage bei 37° C je nach Alter und Verkalkungsgrad in 20%igem EDTA entkalkt.

	1
Unentkalkte Acrylathistologie	Entkalkte Paraffinhistologie
70 % Ethanol für 2 Stunden	70 % Ethanol für 2 Stunden
80 % Ethanol für 3 Stunden	80 % Ethanol für 1 Stunden
96 % Ethanol für 3 Stunden	96 % Ethanol für 2 Stunden
100 % Ethanol für 4 Stunden	100 % Ethanol für 2 Stunden
	Xylol für 2 Stunden
	Paraffin 60° C für 3 Stunden

Tabelle 4.2.5.1: Vorbereitung der Knochenpräparate für die jeweilige spätere histologische Aufarbeitung

Für die unentkalkte Acrylathistologie wurden die Knochenpräparate anschließend in zwei 24-stündige Gewebeinfiltrationen in Methylmethacrylatlösung I und II gelagert. Danach erfolgte das Einbetten in LPG-BPO-Methacrylat-Gemisch, welches innerhalb von 24 Stunden bei 4° C zu Akrylatblöcken polymerisierte. Nach Aushärtung und Anschleifen der Blockoberflächen mit Schleifpapier erfolgte das Anfertigen von Sagitalschnitten. Für die Analyse der Knochenformation durch die Calceimarkierung wurde ein 12µm dicker Schnitt hergestellt. Für die Analyse der Mineralisation und der zellulären Parameter erfolgte die Anfertigung von zwei 4 µm dicken Schnitten, welche im Anschluss Toluidinblau bzw. von Kossa/van Giesson gefärbt wurden. Alle Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Cut 4060E, MocroTech, München) angefertigt, auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgebracht, mit Hilfe von 80%igem Isopropanol versetzt und mit Butylether gestreckt. Über Nacht trockneten die Schnitte im Wärmeschrank bei 60° C in einer Presse und waren anschließend bereit für den Färbeprozess.

Die entkalkten Knochenpräparate und Organe wurden nach Entwässerung im Autotechnikon in 60° C warmes Paraffin eingebettet und bei 4° C ausgehärtet. Anschließend wurden 3µm dicke Schnitte am Schlittenmikrotom (HN40, Firma Jung, Heidelberg) angefertigt und diese auf polysinbeschichtete Objektträger (Menzel GmbH) aufgezogen. Nach einer Stunde Fixierung im Trockenschrank bei 65° C waren die Schnitte für immunhistologische Färbungen sowie TRAP–Färbungen zur Analyse der aktiven Osteoklasten vorbereitet.

Methylmethacrylatlösung I und II:	1000ml entstabilisiertes Methylmethacrylat
	(Merk, #800590)
	3,3g Benzoylperoxid (Merk, #801641)
Giesslösung:	1000ml Methylmethacrylat
	100ml LPG (Nonyl-Phenol, Sigma Aldrich,
	#74430)
	3,3g Benzoylperoxid
	Zugabe von N,N Dimethyl-p-Toluidin

くく

(Endkonzen-tration von 0,5%) vor dem Gießen.

Gelatinelösung:0,5g Gelatine (Sigma-Aldrich, #G-180)50ml H20 destilliert (< 60° C)</td>2ml Chromalaunlösung)

20%iges EDTA:200g Titriplex III (Merck, ,108418)1000ml H2OpH 7,2 (mit konzentrierter NaOH einstellen)

4.2.6. Färbungen

Zur Vorbereitung aller Färbungen wurden alle 4µm dicken Schnitte zunächst dreimalig für 5 Minuten in 2-(Methoxyethyl)-acetat (Merck, #806061) entplastiniert, um den Kunststoff aus den Schnitten zu lösen, und nachfolgend in einer absteigenden Alkoholreihe schrittweise Wasser zugeführt (Tabelle 4.2.6.1).

> 100% Ethanol für 2 Minuten 100% Ethanol für 2 Minuten 96% Ethanol für 2 Minuten 80% Ethanol für 2 Minuten 70% Ethanol für 2 Minuten 50% Ethanol für 2 Minuten

Tabelle 4.2.6.1: Vorbereitung der histologischen Präparate auf den Färbeprozess

Im Anschluss wurden die Schnitte noch kurz in destilliertem Wasser gespült und danach in den Färbeprozess überführt. Dabei wurde die Hälfte der Schnitte mit Toluidinblau und die andere Hälfte nach von Kossa versilbert und nach van Gieson gegengefärbt. Vor der histomorphometrischen Analyse wurden dann noch alle Präparatschnitte nach jeweils 5-minutiger Inkubation in drei Xylol-Lösungen mit DPXhistology-mounting (Sigma, #44581) und Objektgläsern eingedeckt.

4.2.6.1. Toluidinblau-Färbung

Nachdem die Schnitte ausreichend gewässert wurden erfolgte die Inkubation für 30 Minuten in 1%iger Toluidinblau-Lösung bei pH 4,5. Nach einem weiteren kurzen Spülgang in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert (Tabelle 4.2.6.1.1) und mit DPX (s.o.) eingedeckt.

> 50% Ethanol für 2 Minuten 70% Ethanol für 2 Minuten 80% Ethanol für 2 Minuten 96% Ethanol für 2 Minuten 100% Ethanol für 2 Minuten

Tabelle 4.2.6.1.1: Nachbearbeitung der histologischen Präparate nach dem Färbeprozess

Toluidinlösung:

1g Toluidinblau O 100ml H₂O destilliert pH 4,5 (einstellen mit 0,1% NaOH u. 0,1% HCl)

4.2.6.2. Von Kossa/van Gieson-Färbung

Die Versilberung nach von Kossa erfolgte nach nachfolgendem Schema (Tabelle 4.2.6.2.1):

3%ige Silbernitratlösung	für 5 Minuten
Destilliertes Wasser	für 10 Minuten
Sodaformollösung	für 5 Minuten
Leitungswasser	für 10 Minuten
5%ige Natriumthiosulfatlösung	für 5 Minuten
Leitungswasser	für 10 Minuten

Tabelle 4.2.6.2.1: Schema der Versilberung nach von Kossa

Danach wurde zur Gegenfärbung in van Gieson-Lösung für 20 Minuten inkubiert, kurz in Leitungswasser und einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 4.2.6.2.2) gespült und mit DPX (s.o.) eingedeckt.

> 80 % Ethanol kurz spülen 96 % Ethanol kurz spülen 100 % Ethanol kurz spülen 100 % Ethanol kurz spülen

Tabelle 4.2.6.2.2: Nachbearbeitung der histologischen Präparate nach dem Färbeprozess

3%ige Silbernitratlösung:	3g Silbernitrat (Merck, #1.01512.0100)	
	100 ml H ₂ O destilliert	
5%ige Natriumthiosulfatiosung:	5g Natriumthiosulfat	
	100ml H ₂ O destilliertes	
Sodaformollösung:	12,5g Natriumcarbonat	
	187ml H_2O destilliert	
	62,5ml 37%ige Formalinlösung	
van Gieson-Lösung:	2,5g Säurefuchsin (Merck, #105231)	
	900ml gesättigte Pikrinsäure (Sigma-Aldrich,	
	#80456)	
	100ml Glycerin	
	5ml konzentrierte Salpetersäure	

4.2.6.3. TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)-Aktivitätsnachweis

Für die Analyse von aktiven Osteoklasten diente der spezifische Marker TRAP. Nach zweimaliger Entparaffinierung in Xylol für 5 Minuten und Rehydrierung in einer
absteigenden Alkoholreihe der Paraffinschnitte erfolgte die Inkubation in TRAP–Puffer und anschließend in TRAP–Färbunglösung für 30 Minuten.

Nach einem Waschschritt in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Meyers Hämalaun gegengefärbt und anschließend mit fließendem Wasser für 10 Minuten bewässert, bevor sie mit wässrigem Eindeckmedium (DAKO, #S3025) eingedeckt wurden.

Trap-Puffer:	40mM Azetat
	10mM Natriumtartrat
	pH 5,0 (bei 4° C lagern)

Trap-Substratlösung:

5mg Naphtol ASMX Phosphat in 500μl N,N- Dimethylformamid lösen und mit 50ml TRAP-Puffer mischen; 30mg Fast Red Violet LB Salz (darin lösen und sofort für die Färbung verwenden

4.2.7. Immunhistologie

Im ersten Schritt wurden die Paraffinhistologien bei 60° C für 45 Minuten nachfixiert, für zwei mal 7 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 4.2.7.1) bewässert.

100 % Ethanol für 2 Minuten (3 mal)	
96 % Ethanol für 2 Minuten	
80 % Ethanol für 2 Minuten	
70 % Ethanol für 2 Minuten	
50 % Ethanol für 2 Minuten	
destilliertes Wasser für 5 Minuten	



Als nächstes wurden die Gewebeproben für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinase K-Lösung in einer feuchten Kammer angedaut und anschließend mit TBS für 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Blockung der endogenen Peroxidase über 15 Minuten mit 3 %igem H₂O₂ unter Lichtausschluss. Nach zwei Waschgängen mit Leitungswasser und TBS für 5 Minuten, wurden die Gewebeproben mit TBS/0,02% Tween 20 (Firma Dako, Hamburg) über 7 Minuten permeabilisiert und erneut mit TBS für 5 Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5% NGS/TBS (Firma Dako, Hamburg) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer geblockt und im Folgenden die Schnitte mit dem primären Antikörper (1:200 Verdünnung in 15 BSA/TBS) bei 4° C inkubiert. Danach erfolgten wiederum drei Waschschritte mit TBS für 5 Minuten, TBS/0,02% Tween 20 für 10 Minuten und wiederum TBS für 5 Minuten. Hierauf wurden die Paraffinschnitte mit dem sekundären Antikörper (1:200 Verdünnung in BSA/TBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend wiederum für 5 Minuten mit TBS, für 10 Minuten mit TBS/0,02% Tween 20 und für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Für die Enzymkonjugation wurden die Schnitte anschließend mit einem Streptovidin/HRP-Gemisch (1:200 Verdünnung in 1% BSA/TBS; Firma Dako, Hamburg) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen (5 Minuten TBS, 10 Minuten TBS/0,02% Tween 20 und 5 Minuten TBS) wurde das Substrat (DAB) für 30 Minuten hinzugegeben und mit H₂O gewaschen.

Danach wurden die Schnitte mit Meyers-Hämalaunlösung (Firma Merck, Darmstadt) für 1 Minute gegengefärbt und mit Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Zuletzt wurden die Schnitte in eine aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und zum Auswerten mit DPX eingedeckt.

Proteinase K-Lösung:

250mg Proteinase K 25ml H₂O destilliert 10xTBS

24,2g TrisBase 80g NaCl pH 7,6 einstellen auf 1000ml auffüllen

4.2.8. Histomorphometrie

Nach der Trocknung des Klebstoffes für 24 Stunden unter einer Abzugshaube, konnten die Präparate histologisch begutachtet und histomorphometrisch ausgewertet werden.

Dabei erfolgten alle Analysen gemäß standartisiertem Verfahren [*Parfitt et al., 1987*] mit Hilfe des automatischen Bildanalysesystems Osteomeasure (Osteometrix Inc., Atlanta, Georgia, USA) und des Bioquant Histomorphometrie-Systems. Dies erlaubt Aussagen über statische und dynamische Parameter der Knochenstruktur sowie über deren Formation und Resorption in einer zweidimensionalen Darstellung zu machen. Anhand der von Kossa gefärbten Schnitte von Wirbelsäule und Tibia erfolgte dabei die Beurteilung der Knochentrabekel und des Osteoids. Dazu wurde das trabekuläre Knochenvolumen (bone volume per tissue volume, BV/TV in %), die Trabekelanzahl (trabecular number, TbN in mm⁻¹), der Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln

(trabecular space, TbSp in µm) und die Trabekeldicke (trabecular thickness, TbTh in

μm) bestimmt.

Quantitative Analyse der Knochenformation und -resorption erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Timo Beil, Institut für Osteologie und Biomechanik, UKE, Hamburg. Hierzu wurde anhand der unentkalkten Toluidinblau-Schnitte die Anzahl der Osteoblasten bzw. Osteoklasten im Verhältnis zur Knochenoberfläche (Osteoblasts/Osteoclasts Number per Bone Surface, ObN/BS bzw. OcN/BS in mm⁻¹) sowie deren Oberfläche im Verhältnis zur Knochenoberfläche (Osteoblast/Osteoclast Surface per Bone Surface, ObS/BS und OcS/BS in %) bestimmt. Mit Hilfe der ungefärbten 12 µm dicken Schnitten ließ sich unter fluoreszierendem Licht zusätzlich noch der dynamische histomorphometrische Parameter der Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche (Bone formation rate, BFR/BS in $\mu m^3/\mu m^2/year$) messen.

4.3. Zellbiologische Methoden

4.3.1. Gewinnung und Kultivierung von primären Mausosteoblasten

Für die Generierung von primären Osteoblasten wurden Schädeldächer neugeborener Mäuse im Alter von 3-5 Tagen auf Höhe des Hinterhauptsloches seitlich mit einer Schere vom restlichen Schädel getrennt und das Chondrocranium mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt. Das Gehirn und die Kopfhaut sowie sonstige Gewebereste wurden mittels Pinzette und Skalpell entfernt. Nachdem die Schädeldächer in 1xPBS gewaschen wurden, wurden sie in 2ml vorgewärmte Verdaulösung pro Schädeldach überführt und 20 Minuten bei 220rpm bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Schädeldächer erneut für 30 Minuten in frischer Verdaulösung inkubiert. Der neu gewonnene Überstand wurde durch ein 100µm Zellsieb filtriert und gesammelt. Danach wurde bei 3500rpm für drei Minuten zentrifugiert und das Pellet in Kulturmedium aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und in einer Dichte von 25x10⁴/ml auf 12well-Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37° C und einer 5,5%igen CO₂-Sättigung sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95%rH für bis zu 25 Tage kultiviert. Beim Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurde das Kulturmedium durch das Differenzierungsmedium ersetzt und die Zellen bis zum Zeitpunkt der Analyse weiter jeden 2. Tag mit frischem Medium versorgt.

Verdaulösung:

50ml α-MEM 0,1g Collagenase Typ Ia 0,2g Dispase Grade II steril filtrieren

Kulturmedium:

500ml α-MEM 3,7g Natriumhydrogencarbonat (pH 7,4) 10% fetales Kälberserum Osteoblast 1% Penicillin/Streptomycin Differenzierungsmedium:

Kulturmedium 10mM β-Glycerophosphat 50µl Ascorbinsäure

4.3.2. Gewinnung von Osteoklasten aus Knochenmarskszellen

Die Generierung von Osteoklasten erfolgte aus Knochenmarkszellen der Femora und Tibiae mindestens 8 Wochen alter Mäuse. Hierzu wurden die Mäuse mit Diethylether getötet, die Femora und Tibiae herauspräpariert, kurz in 80%igem Ethanol desinfiziert und in sterilem PBS gewaschen, bevor beide Enden mit einer Schere eröffnet wurden. Anschließend wurde das Knochenmark aus dem Markraum mit einer Kulturmediumgefüllten 10ml-Spritze herausgespült und durch ein 100 µm Zellsieb filtiert, bevor es bei 3500 rpm für drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Danach wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, gezählt und in einer Dichte von 10 x $10^6/ml$ auf Kulturschalen ausplattiert.

Die Zellen wurden bei 37° C und einer 5,5%igen CO₂-Sättigung sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95% rH für bis zu 15 Tage kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, wobei am ersten Tag nach Kultivierung zuerst die ausplattierten, nicht-adhärenten Zellen abgesaugt wurden. Ab Tag 5 nach Ausplattierung wurde das Kulturmedium durch das Differenzierungsmedium ersetzt.

> 500ml α-MEM 2,2g Natriumhydrogencarbonat (pH 6,9) 10% fetales Kälberserum Osteoklast 1% Penicillin/Streptomycin 1% 1,25-Dihydroxy-Vitamin D

Differenzierungsmedium:

Kulturmedium:

Kulturmedium 20ng/ml murines M-CSF 40ng/ml murines sRANKL

4.3.3. Dentin-Resorption

Um die Aktivität von Osteokalsten ex vivo zu quantifizieren, wurden Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark auf Dentin-Stücke ausplattiert und mit Differenzierungs-medium kultiviert. Nach 15 Tagen Kultivierung wurden die Dentinstücke von den adhärenten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und Inkubation in Natriumhypochlorid befreit. Danach erfolgt die Färbung der resorbierten Oberfläche in 0,2%iger Toluidinblau-Lösung und die photographische Dokumentation.

4.3.4. TRAP-Aktivitätsnachweis

Für die Analyse der multinukleären Osteoklasten in den Kulturen wurden eine TRAP-Färbung der bis zum 10. Tag kultivierten Zellen angefertigt. TRAP (tatrate-resistant acid phosphatase) ist ein Enzym, das ausgereifte Osteoklasten bilden und sich zur Identifikation eignet.

Für die Färbung wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit kaltem Methanol 5 Minuten fixiert. Nach zwei Waschschritten mit destilliertem Wasser wurden die Zellen in TRAP-Substratlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss konnten die rot gefärbten multinukleären TRAP-positiven Zellen mittels Raster ausgezählt und fotografiert werden.

Trap-Substratlösung:

5mg Naphtol ASMX Phosphat in 500μl N,N- Dimethylformamid lösen und mit 50ml TRAP-Puffer mischen; 30mg Fast Red Violet LB Salz (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) darin lösen und sofort für die Färbung verwenden Trap-Puffer:

40mM Azetat 10mM Natriumtartrat pH 5,0 (bei 4° C lagern)

4.3.5. Alizarinrot-Färbung

Um einen Mineralisationsprozess in den Osteoblastenkulturen nachweisen zu können, wurden die Zellen Alzarinrot gefärbt. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Chelatkomplexes zwischen dem Calcium der Extrazellulärmatrix und dem Alzarinrot-Farbstoff wodurch die Mineralisationskerne rot erscheinen.

Für die Färbung erfolgte zuerst die Fixation mit eiskaltem 90%igem Ethanol für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend wurden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für 10 Minuten unter leichtem Schütteln in der Alzarinrot-Färbelösung inkubiert wurden. Anschließend erfolgten dann fünf weitere Waschschritte mit destilliertem Wasser. Für die Auswertung wurden die Zellen mit PBS beschichtet und fotografiert.

Alizarinrot-Färbelösung:

40mM Alizarin Red S pH 4,2 (einstellen mit 0,1% NaOH u. 0,1% HCl)

4.3.6. Alizarinrot-Quantifizierung

Um die Alizarinrot gefärbten Zellen quantitativ auszuwerten, wurde zuerst 800µl 10% ige Essigsäure auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber abgekratzt und in einem Eppendorftube bei 85° C für 10 Minuten inkubiert. Nach abkühlen auf Eis für 5 Minuten, wurde das Zellgemisch 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und 400µl des Überstandes mit 150µl 10% iger Ammoniumhydroxydlösung versetzt. Nach einstellen des pH–Wertes auf 4,1–4,5 mit 10% iger Essigsäure erfolgte die Quantifizierung bei OD 405 nm.

4.3.7. Magnetische Zellauftrennung mit CD11b–Antikörper

Dieses Verfahren ermöglicht die Auftrennung von Zellgemischen über die Bindung von spezifischen Antikörpern auf Zellmembranbestandteilen. Dabei sind die Antikörper mit magnetischen Teilchen, so genannte Microbeats, beladen, die es ermöglichen, die mit Antikörper beladenen Zellen über einen Magneten in einem Säulensystem zu binden und aufzutrennen. Die CD11b-positiven Zellen verbleiben dabei in der Säule, während die CD11b-negativen Zellen die Säule passieren. Nach Entfernung des magnetischen Feldes können die CD11b-positiven Zellen als positiv selektionierte Fraktion aus der Säule eluiert werden.

Für die Aufreinigung der Osteomakrophagen wurden dabei, wie unter 4.6.1 beschrieben, Osteoblastenzellkulturen gewonnen, ausgezählt und danach bei 1500rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500µl MACS-Puffer und 50µl CD11b Microbeats pro 10⁷ Zellen resuspendiert und für 15 Minuten bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Hierauf wurden die Zellen mit 2ml pro 10⁷ Zellen bei 4000rpm für 10 Minuten gewaschen und die Säulen für die Auftrennung vorbereitet. Dazu wurden die Säulen wie in der Gebrauchsanleitung (MACS[®] Seperators user manual; Milteny Biotec) beschrieben in die magnetische Trennvorrichtung eingesetzt und 500µl MACS-Puffer als Vorlauf auf die Säulen gegeben. Im Folgenden wurden die gewaschenen Zellen erneut in 500µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert und auf die Säulen gegeben. Nach drei Waschvorgängen mit 500µl MACS-Puffer, wurde das Auffangröhrchen unter der Säule mit den CD11b-negativen Zellen entfernt. Um nun die gewünschten CD11b-positiven Zellen zu gewinnen wurde die Säule aus der magnetischen Trennvorrichtung genommen, auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt und die CD11b-positiven-Zellen mit 1ml MACS-Puffer aus der Säule eluiert.

4.3.8. Durchflusszytometrie (FACS)

Dieses Verfahren erlaubt die Zellanalyse auf Einzelzellebene und dient der Identifikation von Zellen anhand ihrer Zelloberfläche. Dazu wird ein Zellgemisch durch

<u>1</u>1

eine Kapillare angesaugt. Die Detektion nach Zellgröße und Granularität der Zellen erfolgt dann durch die jeweilige spezifische Lichtstreuung der Zellen, wenn diese den Lichtstrahl eines Argon-Ionen-Lasers durchbrechen. Dabei gibt das vorwärtsgestreute Licht (englisch: forward scatter) Auskunft über die Zellgröße und das seitlich gestreute Licht (englisch: side scatter) ist ein Maß für die Zellgranularität. Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im FACS Floureszenzfarbstoffe messen, was es ermöglicht mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifische Proteine auf der Zelloberfläche und intrazellulär nachzuweisen. Dabei ist die Fluoreszenz direkt proportional mit der Proteinmenge. In dieser Arbeit wurde eine Durchflusszytometrie zur Knochenmarksanalyse durchgeführt. Dazu wurden zuerst die Erythrozyten im gewonnenen Knochemark für 5 Minuten mit 1ml Erylyse-Puffer lysiert und das Zelllysat mit 5ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden für jeden FACS-Ansatz 5x10⁵ Zellen pro FACS-Röhrchen in 250µl FACS-Puffer überführt und anschließend mit 10µl FC-Block (1:100) für 10 Minuten bei 4° C lichtgeschützt inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Danach erfolgte die Zugabe von 10µl Antikörperlösung (1:100) und eine Inkubation von 30 Lichtausschluss bei 4° C. Minuten unter Um zusätzliche unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen erfolgte jeweils eine Isotypenkontrollfärbung mit Ratten-IgG_{2b}. Anschließend wurden die Zellen mit 5ml FACS-Puffer für 5 Minuten gewaschen und das Pellet erneut in 500µl FACS-Puffer überführt. Die Analyse und Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit dem Institut für Gentherapie, UKE Hamburg. Dazu wurde ein FACS-Canto II Flow Cytometer (BD Bioscience) mit dem Programm FACS DIVA (BD Bioscience) verwendet.

Erytrozytenlyse-Puffer:	19mM Tris-HCl			
	140mM NH ₄ Cl			
FACS-Puffer:	20% 5 x PBS			
	10/ DC A			

1% BSA 15,4mM NaN₃

5. Ergebnisse

5.1. Analyse des Knochenphänotyps Ccl5-defizienter Mäuse

Um zu überprüfen, ob das Chemokin Ccl5 eine entscheidende Rolle im Knochen-Remodeling in vivo hat, sollte zuerst der Knochenphänotyp von Ccl5-defizienten Mäuse analysiert werden. Dafür wurden jeweils von 6 weiblichen Wildtyp- und Ccl5defizienten Mäusen im Alter von 6 Monaten Kontaktradiographien der Wirbelsäule angefertigt, um skelettale Veränderungen wie Knochenmasseverluste oder Wachstumsstörungen zu identifizieren. Im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zeigten die Ccl5-defizienten Mäuse dabei eine erniedrigte Knochenmasse (Abbildung 5.1.1 A). dreidimensionalen Diese Beobachtungen ließen sich in μCT-Bilder der Lendenwirbelkörper L6 der gleichen Mäuse durch eine Rarifizierung der Kortikalis weitgehend bestätigen (Abbildung 5.1.1 B). Ein vermindertes Wachstum konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es zeigten sich kein Unterschied in der Lendenwirbelsäulenoder der Femurlänge (Abbildung 5.1.1 C).



Abbildung 5.1.1: Knochenphänotyp 6 Monate alter Wildtyp (WT)- und Ccl5-defizienter (Ccl5^{-/-})-Mäuse. (A) Kontaktradiographien der Lendenwirbelsäule von Wildtypkontrollen und Ccl5-defizienter Mäuse. (B) Dreidimensionale Analyse der Lendenwirbelkörper L6 derselben Mäuse im μCT. (C) Darstellung der Lendenwirbelkörper- und Femurlänge derselben Mäuse.

Um diesen initialen Ergebnissen weiter nachzugehen, wurden undekalzifizierte Histologien der Wirbelkörper L2-L4 der Ccl5-defizienten Mäuse und ihren Wildtypkontrollen im Alter von 6 Monaten angefertigt. Dabei ließ sich schon in den von Kossa/van Giesson-gefärbten Schnitten erkennen, dass die Ccl5-defizienten Mäuse eine erniedrigte Knochenmasse aufwiesen (Abbildung 5.1.2 A). Die quantitative Auswertung statischer histomorpho-metrischer Parameter zeigte, dass die Ccl5defizienten Mäuse gegenüber den Wildtyp-kontrollen ein um fast 50% verringertes trabekuläres Knochenvolumen pro Gewebevolumen (BV/TV) besitzen. Dieser osteopene Phänotyp war zusätzlich durch eine signifikant erniedrigte Trabekelanzahl (Tb.N.) charakterisiert, wobei die Dicke der Trabekel (Tb.Th.) unverändert war. Übereinstimmend mit diesen Daten war auch der trabekuläre Abstand (Tb.Sp.) in den Ccl5-defizienten Mäusen um ungefähr 50% erhöht (Abbildung 5.1.2 B). Zusätzlich zu den strukturellen Analysen wurden zur funktionellen Analyse der Wirbelkörper Mikrokompressionstest durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der biomechanischen Belastbarkeit der Wirbelkörper der Ccl5-defizienten Mäuse gegenüber den Wildtypkontrollen, was sich in einer signifikant reduzierten Steifigkeit und einer signifikant herabgesetzten Kraft (Fmax), die bis zum Versagen aufgebracht werden musste, widerspiegelte (Abbildung 5.1.2 C).



Abbildung 5.1.2: Histologische Aufarbeitung der Lendenwirbelkörper und biomechanische Wirbelkörpertestung von Wildtyp- und Ccl5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten. (A) Unentkalte 4 μm dicke Histologien der Lendenwirbelkörper L3-4, nach von Kossa/van Gieson gefärbt, zeigten im Vergleich zu den Wildtypkontrollen bei den Ccl5-defizienten Mäusen eine verminderte Knochenmasse (mineralisierte Knochenmasse dabei schwarz dargestellt). (B) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter bestätigten diese Ergebnisse: Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th.), Trabekelanzahl (Tb.N.) und Trabekelabstand (Tb.Sp.). (C) Dargestellt sind die Ergebnisse der biomechanischen Testung durch Mikrokompressionstestung. Ausgewertet wurden die aufzuwendende Kraft (Fmax) bis zum Versagen des Knochens und seine Biegesteifigkeit, die bei den Ccl5^{-/-}-Mäusen deutlich vermindert war.

Um zu überprüfen, ob kortikaler Knochen der Ccl5-defizienten Mäuse ebenfalls ein prozentual verringertes Knochenvolumen aufweist, wurden jeweils der rechte Tibiaknochen der Wildtyp und *Ccl5^{-/-}*-Mäuse unentkalkt histologisch aufgearbeitet. Dabei zeigte sich erstaunlicherweise kein Unterschied in der statischen histomorphometrischen Auswertung. Ebenfalls keinen Unterschied lieferten auch die biomechanischen Belastungstest an Femora zwischen Kontrolltieren und *Ccl5^{-/-}*-Mäuse (*Abbildung 5.1.3 A-C*).



Abbildung 5.1.3: Histologische Aufarbeitung und histomorphometrische Auswertung der Tibiae von Wildtyp- und Ccl5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten. (A) Unentkalkte 4 µm dicke Histologie der rechten Tibia nach von Kossa/van Gieson gefärbt sowie µCT-Aufnahmen der Femura derselben Mäuse, welche den Querschnitt durch den Oberschenkelknochen zeigen, weisen keinen Unterschied zwischen Ccl5-defizienten Mäuse und Wildtyptieren auf. (B) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter liefern ebenfalls keinen Unterschied: Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (TbTh), Trabekelanzahl (TbN) und Trabekelabstand (TbSp). (C) Dargestellt sind die Ergebnisse der biomechanischen Testung durch Mikrokompressionstestung. Ausgewertet wurden die aufzuwendende Kraft (Fmax) bis zum Versagen des Knochens und seine Biegesteifigkeit, die bei den Ccl5^{-/-}-Mäusen gegenüber der Kontrolltieren unverändert waren.

Um nunmehr die zellulären Mechanismen für die Osteopenie in den *Ccl5^{-/-}-Mäusen zu* identifizieren, wurde als nächstes die Knochenformation und Knochenresorption untersucht. Für die Quantifizierung der Knochenformation wurde dabei eine dynamische histomorphometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wurde den Wildtypmäusen und den Ccl5^{-/-}-Mäusen im Abstand von sieben Tagen Calcein intraperitoneal injiziert und anhand der Anzahl und des Abstandes der entstandenen Calceindoppelbanden die Knochenforma-tionsrate bestimmt. Die Auswertungen Ccl5^{-/-}-Mäuse ergaben, die um ungefähr dass eine 15% erniedrigte Knochenformationsrate verfügen (BFR/BS) (Abbildung 5.1.4 A). Die histomorphometrische Analyse der zellulären Parameter in Toluidinblau-gefärbten Histologien zeigte zusätzlich, dass die mit Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche in den *Ccl5*^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt war (*Abbildung 5.1.4 B*).

Da hiermit gezeigt werden konnte, dass die Knochenformation in den Ccl5^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ist, wurde als nächstes noch die Knochenresorption untersucht. Dazu wurde anhand von TRAP-Färbungen an entkalkten Tibia-Schnitte der Wildtypkontrollen und Ccl5^{-/-}-Mäuse die Osteoklastenzahl analysiert, wobei die Anzahl der TRAP-positiven Zellen in den Ccl5^{-/-}-Mäusen deutlich erhöht war (Abbildung 5.1.4 C). Dieses Ergebnis konnte quantitativ durch die histomorphometrische Auswertung Toluidinblau-gefärbter Histologien bestätigt werden (Abbildung 5.1.4 D). Zusätzlich lieferte die Erhöhung der Typ-I-Kollagenabbauprodukte (Crosslaps) im Serum der Ccl5 ^{/-}-Mäuse einen weiteren Nachweis für eine verstärkte Knochenresorption (Abbildung 5.1.4 D).



Abbildung 5.1.4: Analyse der Knochenformation und Knochenresorption von Wildtyp- und Ccl5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten. (A) Dynamische Histomorphometrie an Calcein-markierten Schnitten. Dargestellt sind Ausschnitte von 12 μm dicken mit Calcein-markierten Wirbelkörperschnitten, die einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtypkontrollen und Ccl5^{-/-}-Mäusen zeigten. (B) Histomorphometrische Auswertung Toluidinblau-gefärbter Histologien und Bestimmung der Anzahl der Osteoblasten (ObN) sowie der von Osteoblasten besetzten Knochenoberfläche (Ob.S/BS). (C) Analyse der Osteoklastenzahl anhand von TRAP-gefärbten Tibiaparaffinhistologien. (D) Histomorphometrische Bestimmung der Anzahl der Osteoklasten (OcN) sowie der Bestimmung der Abbauprodukte (Crosslaps) im Serum derselben Mäuse zeigten eine erhöhte Knochenresorption der Ccl5-defizienten Mäuse.

5.2. Analyse der zellulären Ursachen des Phänotyps Ccl5-defizienter Mäuse

Um die bereits erhobenen in vivo Daten auf zellulärer Ebene zu bestätigen und einen eventuellen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion von Osteoblasten bzw. Osteoklasten zu identifizieren, wurden Zellkulturexperimente mit Osteoblasten und Osteoklasten von Wildtyp- und *Ccl5^{-/-}*-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden Osteoblasten-Vorläuferzellen aus Schädeldächern 3-5 Tage alter Wildtyp- und *Ccl5^{-/-}-Mäuse durch einen Collagenase-Verdau isoliert und ex vivo zu Osteoblasten* differenziert. Am 10. Tag der Differenzierung wurde eine Alizarinrotfärbung und quantifizierung durchgeführt. Dabei zeigte sich keine geringere *Ccl5^{-/-}-Osteoblasten* Mineralisationsfähigkeit von im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abbildung 5.2.1 A). Zusätzlich wurden aus Wildtypmäusen gewonnene Osteoblasten mit rekombinantem Ccl5 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, gefärbt und quantifiziert. Auch in diesem Versuch konnte kein Unterschied in der Mineralisations- oder Differenzierungsfähigkeit der Osteoblasten festgestellt werden (Abbildung 5.2.1 B).



Abbildung 5.2.1: Mineralisation von Osteoblasten ex vivo und Alizarinrotquantifizierung. (A) Alizarinrotfärbung von Wildtyp- und Ccl5-defizienten-Osteoblastenkulturen an Tag 10 der Differenzierung. (B) Alizarinrotfärbung von Wildtyposteoblasten, die 10 Tage lang in Gegenwart der angegebenen Konzentration von Ccl5 differenziert wurden. In beiden Fällen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass offenbar kein Zell-autonomer Defekt in der Funktion wurden und Differenzierung der Osteoblasten vorlag, als nächstes Zellkulturexperimente mit Osteoklasten durchgeführt. Hierfür wurden Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark von Femora adulter Wildtyp- und Ccl5^{-/-}-Mäuse gewonnen und über 10 Tage in Gegenwart von M-Csf und Rankl sowie von rekombinantem Ccl5 in unterschiedlichen Konzentrationen zu Osteoklasten differenziert. Zudem wurde zusätzlich die Resorptionsleistung der Osteoklasten mit Hilfe von Denti-Stücken analysiert. Auch hier konnte kein Einfluss des genetischen Defektes und auch nicht von rekombinantem Ccl5 auf die Differenzierung und Funktion der Osteoklasten in den Zellkulturen und auf die Resorptionsleistung festgestellt werden (Abbildung 5.2.2 A-C).



Abbildung 5.2.2: Einfluss von Ccl5 auf die Osteoklastenformation und Resorption. (A) Osteoklastenkulturen von Wildtyp- und Ccl5-defizienten Mäusen im Vergleich an Tag 10 der Differenzierung in einer TRAP-Färbung. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Zellkulturen. (B) Resorptionsassays (Dentin-Stücke) von denselben Zellkulturen. (C) TRAP-Färbung von Osteoklastenkulturen von Wildtypmäusen, die 7 Tage lange in Gegenwart der angegebenen Konzentration von Ccl5 differenziert wurden. Hierbei konnte kein Effekt des rekombinanten Ccl5 auf die Zellkulturen nachgewiesen werden.

Da diese Ergebnisse den identifizierten Knochenphänotyp der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse nicht erklären konnten, wurde nach anderen möglichen Ursachen für den Phänotyp gesucht. Dabei fiel vor allem auf, dass in den Toluidinblau-gefärbten Histologien der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse das Knochenmark sternförmige Veränderungen aufwies *(Abbildung 5.2.3 A)*. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Feststellungen und dem Knochenphänotyp der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse zu finden, wurde daraufhin eine umfangreiche Knochenmarksanalyse der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen im Alter von 6 Monaten mit Hilfe von FACS-Analysen durchgeführt. Die FACS-Antikörper wurden dabei gezielt für Monozyten und Makrophagen (CD11b und F4/80) sowie T-Zellen (CD4 und CD8) gewählt, die chemotaktisch auf Ccl5 migrieren [*Wang et al., 1993; Gordon and Taylor, 2005*].

Die Analysen zeigten dabei, dass die Ccl5-defizienten Mäuse eine verminderte Anzahl von F4/80-positiven Zellen und gleichzeitig eine erhöhte Anzahl CD11b-positiver Zellen im Knochenmark besitzen. Die Zahl der CD4- und CD8-positiven T-Zellen war allerdings unverändert (*Abbildung 5.2.3 B*).



Abbildung 5.2.3: Knochenmarksauffälligkeiten in den Ccl5-defizienten Mäusen und FACS-Analyse von Knochenmarkszellen. (A) Knochenmarksauschnitte von Toluidinblau-gefärbten Histologien zeigen auffällige Veränderung im Knochenmark der Ccl5-defizienten Mäuse (mit * markiert). (B) FACS-Analyse von Knochenmarkszellen von Wildtypmäusen und Ccl5-defizienten Mäusen im Vergleich. Quantitative Auswertungen der FACS-Analyse zeigen dabei eine Abnahme der F4/80-positiven Zellen im Knochenmark der Ccl5-defizienten Mäuse und einer gleichzeitigen Zunahme der CD11b-positiven Zellen, bei unveränderter CD4- und CD8-positiven Zellzahl.

Gleichzeitig fiel zusätzlich ein signifikanter Verlust der so genannten Knochendeckzellen in den Tibia-, aber auch in den Wirbelkörperhistologien der *Ccl5*^{-/-}- Mäuse auf (*Abbildung 5.2.4 A*). Dieses konnte durch histomorphometrische Analysen quantitativ bestätigt werden (*Abbildung 5.2.4 B*).



Abbildung 5.2.4: Reduktion der Knochendeckzellen Ccl5-defizienter Mäuse. (A) Toluidinblau-gefärbte Wirbelkörper- und Tibiahistologien von Ccl5-defizienten Mäusen weisen im Vergleich zu Wildtyptieren einen deutlichen Verlust der Knochendeckzellen auf (in den Wildtypkontrollen mit → markiert). (B) Quantitative histomorphometrische Auswertung des Knochendeckzellenverlustes in den Wirbelkörper- und Tibiahistologien (Cell free Bone Surface).

Da Petit et al. so genannte residente Makrophagen, auch Osteomakrophagen genannt, auf der Knochenoberfläche beschrieben haben, die möglicherweise einen Einfluss auf das Knochenremodeling ausüben können [*Pettit et al., 2008*], sollte nun analysiert werden, ob die fehlenden Knochendeckzellen möglicherweise Osteomakrophagen sind bzw. die Verminderung der F4/80-positiven Zellen im Knochenmark der Ccl5defizienten Mäuse erklären können. Dazu wurden Immunhistologien von Tibiae und Wirbelkörpern von *Ccl5*^{-/-}-Mäusen und Wildtypkontrollen im Alter von 6 Monaten mit einem F4/80-spezifischen Antikörper angefertigt. Als Kontrollen dienten Leber- und Milzhistologien derselben Mäuse.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tibia- und Wirbelkörperhistologien der $Ccl5^{-/-}$ -Mäuse weniger Makrophagen auf der Knochenoberfläche besitzen (*Abbildung 5.2.5 a und b*). Zusätzlich wurde ersichtlich, dass die Mäuse außerdem weniger Makrophagen im Knochenmark besitzen (*Abbildung 5.2.5 c und d*).



Abbildung 5.2.5: Immunhistologische F4/80-Färbung von verschiedenen Geweben von 6 Monate alten Wildtypund Ccl5-defizienten Mäusen. (a und b) Tibiahistologien zeigen einen deutlichen Verlust der F4/80-positiven Zellen (mit → markiert) an der Knochenoberfläche. (c und d) Ebenfalls zeigt sich ein Verlust der F4/80-positiven Zellen (mit → markiert) in den Wirbelkörperhistologien der Ccl5-defizienten Mäuse. (e und f) Immunofluoreszensaufnahmen der Knochenoberfläche: Rot ist dabei das Osteocalcin in den Osteoblasten angefärbt. Grün stellen sich die F4/80-positiven Osteomakrophagen dar. (g und h) Deutliche Zunahme von F4/80positiven Zellen in den Disseräumen der Leber von Ccl5-defizienten Mäusen. (i und j) Deutliche Zunahme der F4/80positiven Zellen in der Milz Ccl5-defizienten Mäuse. (k und I) Zusätzlich sieht man ein invasives Eindringen dieser Zellen in die Keimzentren der Milz im Vergleich zu Wildtypkontrollen (mit → markiert).

Dies konnte zusätzlich in Immunofluoreszensaufnahmen bestätigt werden, wobei gleichzeitig der Verlust der Osteoblasten auf der Knochenoberfläche bestätigt wurde, wie schon in Abbildung 5.1.4 gezeigt (*Abbildung 5.2.5 e und f*).

In den Kontrollhistologien von Milz und Leber zeigte sich hingegen ein gegenteiliges Bild; sowohl die Disseräume der Leber, als auch das Milzmark weisen vermehrt F4/80positive Zellen auf (*Abbildung 5.2.5 g-j*). Zusätzlich kommt es in der Milz zum invasiven Eindringen von F4/80 positiven Zellen in die Keimzentren (*Abbildung 5.2.5 k und I*).

5.3. Osteomakrophagen und ihr Einfluss auf das physiologische Knochenremodeling

Da die bisherigen Ergebnisse dafür sprachen, dass die fehlenden Knochendeckzellen bzw. Osteomakrophagen möglicherweise die Ursache für den osteopenen Knochenphänotyp der Ccl5^{-/-}-Mäuse darstellen könnten, sollten im nächsten Schritt diese Zellen genauer analysiert werden. Für die Isolierung der Zellen wurde dabei das Verfahren von Pettit et al. übernommen [Pettit et al., 2008]. Dazu wurden Osteoblasten aus Schädeldächern 3-5 Tage alter Wildtypmäuse isoliert und anschließend mit spezifischen gegen CD11b-gerichteten Antikörpern, die an Kügelchen immobilisiert sind, aufgetrennt. Die aufgereinigten magnetische Osteoblasten- und Makrophagenvorläuferzellen wurden anschließend über 10 Tage zu Osteoblasten bzw. Osteomakrophagen differenziert. Um zu überprüfen, ob wirklich reine Zellkulturen vorlagen, wurden die Zellen an Tag 10 der Differenzierung sowohl immunhistochemisch für F4/80 als auch Alizarinrot gefärbt. Hierbei zeigte sich wie erwartet, dass sich die CD11b-negativen Osteoblasten gegenüber im Gegensatz zu den CD11b-positiven Osteomakrophagen nicht für F4/80 anfärben ließen (Abbildung 5.3.1 A). In der Alizarinrotfärbung ließ sich zudem bei den Osteomakrophagen im Gegensatz zu den Osteoblasten kein Anzeichen für eine Mineralisationsfähigkeit feststellen, was eine durchgeführte Quantifizierung signifikant bestätigte (Abbildung 5.3.1 B). Um diese Ergebnisse noch weiter zu verifizieren, wurde von den CD11b-negativen Osteoblasten und CD11b-positiven Osteomakrophagen an Tag 10 der Differenzierung eine Affymetrix-Genchipanalye durchgeführt, mittels der die Genexpression in beiden Zellpopulationen verglichen wurde. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die CD11b-negativen Osteoblasten charakteristische Differenzierungsmarker wie Ibsp, Dmp1, Bglap und Alpl exprimieren (Abbildung 5.3.1 C). Die CD11b-negativen Osteomakrophagen hingegen wiesen eine starke Expression typischer Makrophagengene wie CD84, CD68, Emr1 und Csf1r auf (Abbildung 5.3.1 C). Zusätzlich exprimierten die Osteomakrophagen aber auch Chemokine wie Ccl3 und Ccl12 sowie die Chemokinrezeptoren Cxcr4 und Ccr5, einen von 4 Rezeptoren für Ccl5 (Abbildung 5.3.2 C).



Abbildung 5.3.1: Charakterisierung von Osteomakrophagen nach Aufreinigung aus Schädeldachkulturen. (A) Darstellung von aufgereingten Osteoblasten und Osteomakrophagen im Vergleich. Die Immunhistochemische Färbung mit F4/80 zeigt reine Kulturen auf Seiten der Osteoblasten und Osteomakrophagen. (B) Analyse der Mineralisationsfähigkeit von aufgereinigten Osteoblasten und Osteomakrophagen an Tag 10 der Differenzierung im Vergleich und Quantifizierung mittels Alizarinrotfärbung. (C) Gezeigt ist die Genexpression an Tag 10 der Differenzierung von CD11b-negativen Osteoblasten und CD11b-positiven Osteomakrophagen. Dabei fällt auf, dass die reinen Osteoblasten spezifische Osteoblastenmarker und die Osteomakrophagen hingegen spezifische Markophagengene wie CD84, CD68 und Csf1r sowie zusätzlich Chemokine und die Chemokinrezeptoren exprimieren. SLR gibt dabei das logarithmische Signalverhältnis wieder. (D) Differenzierung von aufgereinigten Osteoblasten und Osteomakrophagen mit Hilfe von M-Csf und RANKL zu Osteoklasten und Analyse ihrer Resorptionsfähigkeit. Sowohl die Osteoblasten als auch die Osteomakrophagen zeigen dabei allerdings keine Resorptionsfähigkeit.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Osteomakrophagen möglicherweise einen direkten Einfluss im physiologischen Knochenremodeling besitzen und durch ihr Fehlen eventuell der beobachtete Knochenphänotyp der Ccl5 defizienten Mäuse erklärt werden kann. Da gezeigt wurde, dass Makrophagen in der Lage sind unter dem Einfluss von M-Csf und Rankl zu Osteoklasten zu differenzieren [Takeshita et al., 2000; Haynes et al., 2001], und die *Ccl5^{-/-}*-Mäuse eine erhöhte Osteoklastenzahl aufweisen, was durch eine eventuelle Differenzierung der Osteomakrophagen zu Osteoklasten erklärt werden könnte, wurden die CD11b-positiven Osteomakrophagen im Vergleich zu CD11b-negativen Osteoblasten über 10 Tage in Gegenwart von M-Csf und Rankl differenziert. Dabei zeigte sich, dass in der Tat die Osteomakrophagen zu Osteoklasten differenzieren können; die kultivierten

Osteoblasten hingegen nicht (Daten nicht gezeigt). Jedoch erscheinen diese in der TRAP-Färbung deutlich kleiner als normale Osteoklasten und in zusätzlich durchgeführten Resorptionsassays zeigt sich keine Resorptionsaktivität (*Abbildung 5.3.1 D*).

einer durchgeführten **TRAP-Färbung** zeigte sich dass die In zudem, Konzentrationen Osteoklastendifferen-zierung mit gesteigerter sowohl von Osteoblasten- als auch Osteomakrophagenmedium zum Erliegen kam (Abbildung 5.3.2 A und B). Da nicht bekannt war, dass Osteomakrophagen wie Osteoblasten Osteoprotegerin (Opg) bilden können, was zumindest die Osteoklasteninhibition bei den mit Osteoblastenmedium kultivierten Osteoklasten erklären könnte, wurde das konditionierte Medium von Osteoblasten und Osteomakrophagen mit Hilfe eines Opg-ELISA auf die Konzentration von Opg untersucht.



Abbildung 5.3.2: Indirekter Einfluss von Osteomakrophagen auf die Osteoklastendifferenzierung. (A) Wildtyposteoklasten wurden in unterschiedlichen Konzentrationen von Tag 0 der Differenzierung entweder mit Osteoblasten- oder Osteomakrophagenmedium behandelt. Dabei zeigte sich eine Hemmung durch beide Medien schon ab einem 5%-igem Mediumanteil. (B) Die quantitative Auswertung der Osteoklastenkulturen nach TRAP-Färbung zeigt, dass sowohl durch das Osteoblastenmedium, als auch durch das Osteomakrophagenmedium die Osteoklastogenese signifikant zum Erliegen kommt. (C) OPG-Konzentration in konditionierten Medium von Osteoblasten und Ostomakrophagen an Tag 10 der Differenzierung.

Dabei zeigte sich, dass die Osteomakrophagen gegenüber den Osteoblasten nur geringfügige Mengen Opg sezernieren, aber eine gleich starke Inhibition der Osteoklastogenese verursachen (*Abbildung 5.3.2 C*). Dies ließ vermuten, dass die Osteomakrophagen möglicherweise einen Faktor sezerniern, der die Osteoklastogenese unabhängig von Opg regulieren kann. Mit Hilfe dieser Ergebnisse

lässt sich die erhöhte Osteoklastenzahl in den *Ccl5*^{-/-}-Mäusen und damit ein Teil des gestörten Knochenremodelings in diesen Mäusen erklären. Allerdings ließ dies noch keine Erklärung für die gestörte Knochenformation in den *Ccl5*^{-/-}-Mäusen zu, weshalb ein indirekter Einfluss auf die Osteoblastogenese bzw. Mineralisation von Osteoblasten vermutet wurde. Um diesen Einfluss auf Osteoblasten zu untersuchen, wurden Osteoblasten und Osteomakrophagen aus Schädeldächern 3-5 Tage alter Mäuse gewonnen und in einer Cokultur im Verhältnis von 50:50 über 10 Tage mit Ascorbinsäure und β-Glycerophosphat kultiviert und differenziert. Im Folgenden wurde von diesen Zellen erneut eine Affymetrix-Genchipanalyse durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Osteomakrophagen auf Osteoblasten auf Genebene zu analysieren.

Dabei zeigte sich eine Expressionssteigerung der Osteoblasten-spezifischen Gene wie Ptprz1, Dmp1, Bglap, Phex und Sost (*Abbildung 5.3.3 A*) Außerdem fiel in den Analysen auf, dass 3 Osteoblasten-untypische Gene besonders stark reguliert wurden: Adiponectin, Ccl6 und Il1rn (*Abbildung 5.3.3 B*).

۹.	Gene	OBL	OBL/OMacs	SLR	Б	Gene	OBL	OBL/OMacs	SLR
	Ptprz	590,3	742,4	+ 1,1		Adipoq	17,5	2783,4	+7,4
	Dmp1	3103,2	6587,5	+ 1,0		Cc/6	8,2	217,8	+5
	Bglap	6611,7	9755,5	+ 0,7		ll1rn	12,2	111,8	+3,2
	Phex	6,8	55,7	+ 0,7		Tnfrs11b	235,7	82	-1,4
	Sost	3.2	83,5	+ 0,6					

Abbildung 5.3.3: Affymetrix-Genchip-Analysen. (A) Dargestellt ist der Einfluss von Ostemakrophagen-Medium auf Osteoblasten. Dabei wird in der Genchipanalyse ersichtlich, dass die Osteomakrophagen eine Expressionsteigerung von Osteoblastenmarkern wie Ptprz1, Dmp1, Bglap, Phex und Sost an Tag 10 der Differenzierung verursachen. (B) An Tag 10 der Differenzierung von Osteoblasten und Osteomakrophagen fielen zudem spezifische Gene auf, die möglicherweise eine Erklärung für den Knochenphänotyp der Ccl5-defizienten Mäuse liefern könnten. SLR gibt dabei das logarithmische Signalverhältnis wieder.

5.4. Analyse des Knochenphänotyps Ccr5-defizienter Mäuse

Da diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass der prozentuale Verlust der Kochendeckzellen bzw. Osteomakrophagen in den *Ccl5*^{-/-}-Mäusen einen osteopenen Knochenphänotyp verursacht und gleichzeitig in der Affymetrix-Genchipanalyse gezeigt werden konnte, dass diese Zellen den Ccr5-Rezeptor, einen von vier Rezeptoren für Ccl5, besitzen (*Abbildung 5.3.1 C*), über den die gerichtete Chemotaxis funktioniert, sollte untersucht werden, ob Mäuse mit einer Ccr5-Defizienz (Ccr5^{-/-}) denselben Knochenphänotyp mit Verlust der Knochendeckzellen aufweisen.

Dabei wiesen angefertigte undekalzifizierte Wirbelkörperhistologien von 6 Monate alten $Ccr5^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen genauso wie die $Ccl5^{-/-}$ -Mäuse ein signifikant vermindertes trabekuläres Knochenvolumen (BV/TV) auf (*Abbildung 5.4.1 A und B*). Außerdem zeigten histomorphometrische Analysen der statischen Parameter wie bei den $Ccl5^{-/-}$ -Mäusen eine signifikant verminderte Trabekelanzahl (Tb.N.), sowie einen signifikant erhöhten Trabkelabstand (Tb.Sp.). Der einzige Unterschied bestand in der Trabekeldicke, die keinen Unterschied zu den Wildtypkontrollen zeigte, jedoch stark von dem Wert der $Ccl5^{-/-}$ -Mäuse abwich (*Abbildung 5.4.1 B*).



Abbildung 5.4.1: Histologische Aufarbeitung der Lendenwirbelkörper und biomechanische Wirbelkörpertestung von Wildtyp- und Ccr5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten. (A) Unentkalte 4 μm dicke Histologien der Lendenwirbelkörper L3-4, nach von Kossa/van Gieson gefärbt, zeigen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen eine verminderte Knochenmasse (mineralisierte Knochenmasse dabei schwarz dargestellt). (B) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter bestätigen diese Ergebnisse: Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th.), Trabekelanzahl (Tb.N.) und Trabekelabstand (Tb.Sp.). (C) Dargestellt sind die Ergebnisse der biomechanischen Testung durch Mikrokompressionstestung. Ausgewertet wurden die aufzuwendende Kraft (Fmax) bis zum Versagen des Knochens und seine Biegesteifigkeit, die bei den Ccr5-defizienten Mäusen deutlich vermindert war.

Die durchgeführten biomechanischen Analysen der Wirbelkörper im Mikrokompressionstest zeigten ebenfalls eine signifikante Verringerung der biomechanischen Belastbarkeit der Wirbelkörper gegenüber den Wildtypkontrollen (*Abbildung 5.4.1 C*).

Die ebenfalls durchgeführten histomorphometrischen Analysen der Tibiae zeigten wie in den Ccl5-defizienten Mäusen erstaunlicherweise weder einen Unterschied in den statischen histomorphometrischen Analysen (*Abbildung 5.4.2 A und B*) noch in den funktionellen Mikrokompressionstests (*Abbildung 5.4.2.C*) zu den Wildtypkontrollen.



Abbildung 5.4.2: Histologische Aufarbeitung der Tibiae und histomorphometrische Auswertung von Wildtyp- und **Ccr5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten.** (A) Unentkalte 4 μm dicke Histologien der rechten Tibia nach von Kossa/van Gieson gefärbt sowie μCt-Aufnahmen der Femura derselben Mäuse, welche den Querschnitt durch den Oberschenkelknochen zeigen, weisen keinen Unterschied zu den Wildtypkontrollen auf. (B) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter ergab ebenfalls keinen Unterschied: Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th.), Trabekelanzahl (Tb.N.) und Trabekelabstand (Tb.Sp.). (C) Dargestellt sind die Ergebnisse der biomechanischen Testung durch Mikrokompressionstestung. Ausgewertet wurden die aufzuwendende Kraft (Fmax) bis zum Versagen des Knochens und seine Biegesteifigkeit, die bei den Ccr5-defizienten Mäusen und Wildtyptieren gleich war.

Um auch hier zu überprüfen, ob der Knochenphänotyp durch ein gestörtes Knochenremodeling verursacht wird, wurden Knochenformations- und Knochenresorptions-parameter histomorphometrisch untersucht. Dazu wurde den Mäusen im Abstand von 7 Tagen intraperitoneal der Fluoreszenzfarbstoff Calcein injiziert und der Abstand der entstandenen Doppelbanden ausgewertet. Dabei zeigte sich wie in den *Ccl5^{-/-}*-Mäusen eine annähernd gleiche Knochenformationsrate (*Abbildung 5.4.3 A*). Die histomorphometrischen Analysen der *Ccr5^{-/-}*-Mäuse ergaben

gegenüber der Wildtypkontrollen allerdings eine deutliche Zunahme in der Osteoblastenzahl (ObN), bei annähernd gleichbleibend bedeckter Knochenoberfläche (ObS) (*Abbildung 5.4.3 B*). Zusätzlich war die Anzahl der Osteoklasten in den *Ccr5^{-/-}*-Mäusen noch stärker erhöht als in den *Ccl5^{-/-}*-Mäusen, was sich in TRAP-gefärbten Tibiahistologien und dem Anstieg von Typ-I-Kollagenabbauprodukten im Serum zeigte (*Abbildung 5.4.3 C und D*).



Abbildung 5.4.3: Analyse der Knochenformation und Knochenresorption von Wildtyp- und Ccr5-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten. (A) Dynamische Histomorphometrie an Calcein-markierten Schnitten. Dargestellt sind Ausschnitte von 12 µm dicken mit Calcein-markierten Wirbelkörperschnitten. Die Auswertung zwischen Wildtypkontrollen und Ccr5^{-/-}-Mäusen ergab keinen signifikaten Unterschied. (B) Histomorphometrische Auswertung Toluidinblau-gefärbter Histologien und Bestimmung der Anzahl der Osteoblasten (ObN) sowie der von Osteoblasten besetzten Oberfläche (Ob.S/BS). (C) Analyse der Osteoklastenzahl anhand von TRAP-gefärbten Tibiaparaffinhistologien. (D) Histomorphometrische Bestimmung der Anzahl der Osteoklasten (OcN) sowie der Bestimmung der Abbauprodukte (Crosslaps) im Serum derselben Mäuse, zeigte eine erhöhte Knochenresorption in den Ccr5^{-/-}-Mäusen.

Da auch in diesem Fall untersucht werden sollte, ob ein direkter Einfluss des genetischen Defekts auf die Proliferation, Differenzierung oder Funktion der Knochenzellen besteht, wurden Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen von *Ccr5^{-/-}*- und Wildtypmäusen angefertigt und über 10 Tage kultiviert.



Abbildung 5.4.4: Untersuchung primärer Knochenzellen aus Ccr5-defizienten Mäuse. (A) Wildtyp- und Ccr5defiziente Osteoklasten wurden aus Knochenmark generiert und für 10 Tage mit M-Csf und Rankl differenziert. TRAP-Färbungen ergaben keinen Unterschied zwischen beiden Zellkulturen. (B) Bestimmung der Resorptionsfähigkeit von Ccr5-defizienten Osteoklasten anhand von Dentinchips ergab keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtyposteoklasten. (C) Bestimmung der Mineralisationsfähigkeit von Ccr5-defizienten Osteoblasten im Vergleich zu Wildtyposteoblasten an Tag 10 der Differenzierung und quantitative Auswertung nach Alizarinrotfärbung, ergaben keinen Unterschied gegenüber den Wildtypkontrollen.

Anschließend wurden die Zellen TRAP- bzw. Alizarinrot gefärbt und ausgewertet. Auch hier zeigte sich übereinstimmend mit den Daten der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse weder ein Unterschied in den Osteoklastenkulturen und den Resorptionsassays (*Abbildung 5.4.4 A und B*), noch in den Osteoblastenzellkulturen (*Abbildung 5.4.4 C*).

Da vermutet wurde, dass der Knochenphänotyp der *Ccr5^{-/-}*-Mäuse möglicherweise wie bei den *Ccl5^{-/-}*-Mäusen Ursache eines Verlustes der Knochenbelegzellen bzw. Osteomakrophagen sein könnte, wurden Toluidinblau-gefärbte Tibia bzw. Wirbelkörper-histologien histomorphometrisch untersucht.

Dabei zeigte sich nur ein geringfügig prozentualer Verlust der Knochenbelegzellen bzw. Osteomakrophagen gegenüber Kontrolltieren, was sich auch in der quantitativen Histomorphometrie bestätigte (*Abbildung 5.4.5 A und B*).



Abbildung 5.4.5: Reduktion der Knochendeckzellen Ccr5-defizienter Mäuse. (A) Toluidinblau-gefärbte Wirbelkörper- und Tibiahistologien von Ccr5-defizienten Mäusen weisen im Vergleich zu Wildtyptieren keinen Unterschied der Knochendeckzellen auf (in den Wildtypkontrollen und Ccr5-defizienten Mäusen mit → markiert).
(B) Die quantitative histomorphometrische Auswertung des Knochendeckzellenverlustes in den Wirbelkörper- und Tibiahistologien (Cell free Bone Surface) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Wildtypmäusen.

Dieses Ergebnis konnte auch in einer durchgeführten Immunhistologie mit einem F4/80-Antikörper an Tibia- und Wirbelkörperhistologien bestätigt werden. Dabei zeigte sich in den Kontrollhistologien von Leber und Milz ebenfalls kein Unterschied der F4/80-positiven Zellen (*Abbildung 5.4.6*) Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, dass der Knochenphänotyp von *Ccr5^{-/-}*-Mäusen dem der *Ccl5^{-/-}*-Mäusen ähnelt, obwohl man einen schwerwiegerenden Phänotyp hätte erwarten können, da über diesen Rezeptor nicht nur Ccl5, sondern auch Ccl3 und Ccl4 fungieren. Dieser Phänotyp kommt aber wahrscheinlich nicht durch den Verlust der Osteomakrophagen zusammen, sondern möglicherweise durch einen ganz anderen zellulären Mechanismus.



Abbildung 5.4.6: Immunhistologische F4/80-Auswertung von verschiedenen Geweben von 6 Monate alten Wildtyp- und Ccr5-defizienten Mäusen. (a und b) Tibiahistologien der Ccr5-defizienten Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtypkontrollen keinen deutlichen Verlust der F4/80-positiven Zellen an der Knochenoberfläche. (c und d) Ebenfalls zeigt sich kein Verlust der F4/80-positiven Zellen in den Wirbelkörperhistologien der Ccr5-defizienten Mäuse. (e-h) Die Kontrollhistologien von Leber und Milz zeigen auch keinen Unterschied zwischen Wildtypkontrollen und Ccr5-defizienten Mäusen.

6. Disskusion

6.1. Ccl5

Ccl5, nach alter Nomenklatur auch RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) genannt, wurde erstmals in den 1980er Jahren beschrieben [*Schall et al., 1988; Schall et al., 1990*]. Es ist ein proinflammatorisches Chemokin, das zur ständig wachsenden Subfamilie der CC- bzw. β-Chemokine gehört. Obwohl es eigentlich ursprünglich als ein T-Zell-spezifisches Gen identifiziert worden ist, konnte seine Bildung mittlerweile in verschiedenen Geweben und Zelllinien, wie der Milz, dem Thymus, der Niere, den Tonsillen, dem Wilm's Tumor, der Rhabdomyosarkomzelllinie RD und der Osteosarkomzelllinie MG63, nachgewiesen werden [*Schall et al., 1996; Schall, 1991*].

Die Hauptfunktion von RANTES, wie die von anderen Chemokinen, besteht dabei in der Extravasation immunkompetenter Zellen und der Regulation ihres migratorischen Verhaltens durch Stoffkonzentrationsgradienten, die so genannte Chemotaxis über die Bindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Aufgrund eines zahlenmäßigen Liganden-Rezeptor-Missverhältnisses im Chemokinsystem bindet RANTES dabei aber nicht nur an einen Chemokinrezeptor, sondern an gleich vier, Ccr1, Ccr3, Ccr4 und Ccr5 [*Appay and Rowland-Jones, 2001*]. Diese "Promiskuität" dient womöglich einerseits als mehrfache Absicherung des Immunsystems [*Mantovani, 1999*] und gleichzeitig verleiht es den Chemokinen womöglich mehrere Funktionen über die Bindung an unterschiedliche Rezeptoren auf einer Zelle.

Ccl5 vermittelt dabei im Zusammenspiel mit Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen, die Migration von Monozyten, CD4-positiven T-Lymphozyten, NK-Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen sowie dendritischen Zellen [*Schall et al., 190; Alam et al. 1993; Maghazachi et al., 1994; Taub et al., 1995*] zwischen dem Blutkreislauf und den spezifischen Geweben über die Vermittlung der Adhäsion an das Endothel, die transendotheliale Migration sowie die gerichtete Wanderung durch die extrazelluläre Matrix [*Zlotnik and Yoshie, 2000*]. Durch diese Fähigkeit, Leukozyten zu mobilisieren, sie an Ort und Stelle zu dirigieren und dort zu aktivieren, übt Ccl5 normalerweise eine nützliche Rolle in der Abwehr von Infektionen aus [Skwor et al., 2004; Vesosky et al., 2010; Culley et al., 2006]. Ist die Regulation der Chemokinproduktion jedoch gestört oder kommt es zu einer gesteigerten Sekretion durch vorwiegend CD8-positive T-Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten [Appay and Rowland-Jones, 2001] aufgrund von entzündlichen Stimuli, kann es zu einer dauerhaften Aktivierung von Immunzellen und dadurch zu chronischen Entzündungen kommen [Baggiolini, 1998]. Beispiele hierfür sind Arteriosklerose, Asthma, Glomerulonephritis, Multiple Sklerose, Graft-versus-host disease [Keophiphath et al., 2010; Schuh et al., 2003; Segerer et al., 2007; Bartosik-Psujek and Stelmasiak, 2004; Choi et al., 2007, aber auch entzündliche Knochenerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Peridontitis und Osteomyelitis [Wright and Friedland, 2002; Lisignoli et al., 2002; Repeke et al., 2010]. Dabei kommt es zur Infiltration und Aktivierung von monozytären und anderen immunkompetenten Zellen, was zu irreversiblen Knorpel- und Knochendestruktion führt [Blom et al., 2004; Kamekura et al., 2005; Kaneko et al., 2001].

Da bekannt ist, dass das Chemokin Ccl5 einen *in vitro* Effekt auf Osteoblasten hat, sollte nun in dieser Arbeit die *in vivo* Rolle im physiologischen Knochenremodeling von Ccl5 erfolgen.

6.2. Auswirkungen einer Ccl5- bzw. Ccr5-Defizienz auf den Knochen

Bei der Analyse der Wirbelkörper der *Ccl5*^{-/-}-Mäuse durch unentkalkte Histologie zeigte sich eine signifikante Reduktion der Knochenmasse (BV/TV) im Alter von 6 Monaten, wobei es in den Wirbelkörpern zu einem Verlust von fast 50% der Knochenmasse kam. Dieser Phänotyp ging mit einer erniedrigten biomechanischen Belastbarkeit einher und wurde durch eine signifikant erniedrigte Knochenformation und gleichzeitig durch eine signifikant erhöhte Knochenresorption ausgelöst. Im kortikalen Knochen war dieser Phänotyp allerdings nicht zu beobachten, was möglicherweise auf den geringeren kortikalen Knochenumbau (3% pro Jahr) im Gegensatz zu trabekulärem Knochenumbau (28% pro Jahr) zurückzuführen ist [*Rüegsegger, 1991*].

Durch diese ersten Befunde konnte für Ccl5 das erste Mal der Beweis für eine Rolle im physiologischen Knochenremodeling geliefert werden. Da bei bisherigem Kenntnisstand, der sich auf die Chemotaxis von Ccl5 auf Osteoblasten und

Osteoklasten beschränkte [Yano et al. 2005; Yu et al. 2004], der Knochenphänotyp jedoch nicht erklärt werden konnte, wurden zur Erklärung des Phänotypes, nach der histologischen Charakterisierung des Mausmodells, zelluläre und molekulare Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in kultivierten Osteoblasten- und Osteoklasten. Diese Ergebnisse waren übereinstimmend mit denen von Fuller et al., die ebenfalls keinen Effekt von Ccl5 auf die Osteoklastogenese in vitro zeigen konnten [*Fuller et al., 1995*]. Damit stellte sich aber die Frage, wie der schwerwiegende Knochenphänotyp der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse zustande kommt.

In Toluidinblau-gefärbten Schnitten der *Ccl5^{-/-}*-Mäuse zeigte sich im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ein erhöhter Anteil an trabekulärer Knochenoberfläche, die nicht mit F4/80-positiven Makrophagenähnlichen Knochenbelegzellen besetzt ist. Anfangs wurde dieser Befund durch den Verlust eines antiapoptotischen Signals auf diese Zellen versucht zu erklären, da gezeigt werden konnte, dass Gewebemakrophagen über die Ccl5-Ccr5-Interaktion vor Apoptose bewahrt werden [*Tyner et al., 2005; Keophiphath et al., 2010*]. Jedoch konnte dies nicht die gleichzeitig bestehende Zunahme der Makrophagen in Milz und Leber erklären, weshalb von einer gestörten Zellmigration an die Knochenoberfläche ausgegangen wurde. Dabei kommt es möglicherweise durch den Verlust von Ccl5 zu einer fehlenden Durchwanderung durch das Endothel, einem Arrest der Monozyten im Blutkreislauf und damit verbunden zu einem Verlust der Makrophagen im Knochenmark bzw. an der Knochenoberfläche [*Weber et al., 2004*]. Gleichzeitig führt vermutlich der chemotaktische Einfluss anderer Chemokine zu einer Rekrutierung dieser Zellen in Leber und Milz, wo sich diese unter physiologischen Bedingungen zu Makrophagen differenzieren.

Ein anderer Erklärungsmechanismus für den vorliegenden Befund wäre möglicherweise eine gesteigerte Migration der Makrophagen aus dem Knochenmark über die Gefäße in andere Organe wie z.B. Milz und Leber. Dies könnte vermutlich über die Cxcl12-Ccr4-Achse gesteuert werden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Osteomakrophagen neben dem Ccr5-Rezeptor am zweitstärksten den Cxcr4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, der zusammen mit Ccr5 die Migration von Monozyten bzw. Makrophagen reguliert [*Gouwy et al., 2011*]. Außerdem konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass das von Endothelzellen exprimierte Cxcl12 über die Bindung an Cxcr4 zum Zellarrest an der

Endotheloberfläche führt [*Peled et al., 1999*], wodurch es möglicherweise zum Übertreten der Makrophagen in den Blutkreislauf kommt und diese in andere Organe auswandern.

Durch den Verlust der Makrophagen im Knochenmark kommt es womöglich daraufhin entweder als Kompensationsmechanismus des Knochenmarks zu einer vermehrten Bildung von CD11b-positiven Vorläuferzellen oder zu einem Verlust der geregelten, gerichteten Chemotaxis über die Blut-Knochenmark-Schranke. Als Folge davon kommt es vermutlich zur ungerichteten Chemotaxis über die Endothelwand durch den verstärkten Einfluss von Chemokinen wie Ccl2 und Ccl3 [Yu X. et al., 2003; Kim et al., 2006]. Dabei konnten Vaddi und Newton zeigen, dass Ccl2 und Ccl3 eine gesteigerten Expression von CD11b auf der Zelloberfläche bewirken, wodurch es zu einer verstärkten Adhäsion an das Endothel und damit verbundenen einem vermehrten Zellwanddurchtritt kommt [Vaddi and Newton, 1994]. Unter normalem physiologischen Einfluss entwickeln sich die so rekrutierten Vorläuferzellen vermutlich zu multinukleären Osteoklasten, wodurch es zu einer Zunahme der Osteoklasten in den Ccl5-defizienten Mäusen kommen könnte.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch für Ccr5^{-/-}-Mäuse gezeigt werden. Dabei zeigte sich in unentkalkter Histologie der Ccr5^{-/-}-Mäusen im Alter von 24 Wochen eine ebenfalls herabgesetzte Knochenmasse (BV/TV), die allerdings nicht zu einem so dramatischen Knochenphänotyp wie in den Ccl5-defizienten Mäusen führte, obwohl die Zahl der Osteoklasten noch deutlicher erhöht war als in den Ccl5^{-/-}-Mäusen. Auch war die trabekuläre Knochenoberfläche nur teilweise frei von F4/80-positiven makrophagenähnlichen Knochen-belegzellen. Allerdings lag auch hier weder ein Defekt der Osteoblasten noch der Osteoklasten vor, was vermutlich durch einen physiologischen Ausgleich anderere Chemokine zu erklären ist bzw. durch die Tatsache, dass Ccl5 nicht nur an Ccr5, sondern auch an Ccr1, Ccr3 und Ccr4 bindet [Appay and Rowland-Jones, 2001] und daddurch möglicherweise andere Signalwege aktiviert werden.

6.3. Osteomakrophagen, ein neuer Spieler im Knochenremodeling

Da bekannt ist, dass Makrophagen sowohl physiologische als auch pathologische Knochenprozesse beeinflussen und z.B. an mehreren Phasen der Knochenheilung beteiligt sind, wo sie mesenchymale Wachstumsfaktoren an der Frakturstelle bilden und zu einer stabilen Kallusbildung beitragen [*Bourque et al., 1993; Hankemeier et al., 2001*], stellte sich die Frage, ob der Verlust dieser Zellen möglicherweise die Erklärung für den Knochenphänotyp der Ccl5-defizienten Mäuse liefern könnte.

Das Vorliegen dieser F4/80-positiven makrophagenähnlichen Zellen auf der Knochenoberfläche ist schon seit 1984 bekannt [Hume et al., 1984]. Allerdings konnte das Konzept, dass diese Zellen eine definierte Nische im Knochengewebe besetzen, erst kürzlich gezeigt werden [Chang et al., 2008]. Diese Zellen machen dabei ein Sechstel der Knochenzellen aus und bilden ein, die Knochenoberfläche flächendeckendes Netzwerk [Chang et al., 2008]. Neben bekannten Makrophagenfunktionen wie Phagozytose [Heinemann et al., 2000 A; Ruiz et al., 2003], Detektion von bakteriellen Produkten [Kikuchi et al., 2001; Maruyama et al., 2006] und Antigenpräsentation [Reyes-Botella et al., 2000], konnten Chang et al. in ihrer Arbeit das erste Mal zeigen, dass diese so genannten Osteomakrophagen entscheidend für eine effiziente Mineralisation von Osteoblasten in vitro sind [Chang et al., 2008] und möglicherweise über direkten Zellkontakt die Osteoblastenaktivität regulieren [Martin and Sims, 2005]. Dabei kämen mögliche Kopplungsfaktoren wie TGF-β und Ephrin B2, die auch Osteoklasten benutzen [Sandberg et al., 1988; Zhao et al., 2006] in Frage [Assoian et al., 1987; Yu G. et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, welchen möglichen Einfluss Osteomakrophagen auf das physiologische Knochenremodeling ausüben und ob deren Verlust den Knochenphänotyp der Ccl5bzw. Ccr5-defizienten Mäusen erklären könnte.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Osteomakrophagen wie Knochenmarksmakrophagen (bone marrow derived macrophages; BMM) und synoviale Makrophagen die Fähigkeit besitzen unter Rankl- und M-Csf-Stimulation zu Osteoklasten zu differenzieren [*Takeshita et al., 2000; Haynes et al., 2001*]. Allerdings besitzen diese keine Resorptionsfähigkeit, ähneln in ihrer Konformation keinen normalen Osteoklasten und scheinen somit keinen Einfluss auf ein physiologisches Knochenremodeling auszuüben. Jedoch scheinen sie die Fähigkeit zu besitzen, die

Osteoklastogenese Opg-unabhängig zu inhibieren. Dabei konnte jedoch nicht genauer geklärt werden, wie dieser Effekt zustande kommt und welchen Faktor hierbei die entscheidende Rolle spielt. Allerdings konnten in einer genomweiten Expressionsanalyse mehrere Faktoren identifiziert werden, die möglicherweise für diesen inhibitorischen Effekt verantwortlich sein könnten.

Zum einen käme dabei der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1rn) in Betracht. Il-1rn stellt einen natürlichen, kompetitiven Il-1-Antagonisten dar, der über die Bindung an den Il-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche den osteokatabolen Effekt von Il-1 unterdrückt [*Seckinger et al., 1990; Kimble et al., 1995*] und dadurch die Proliferation und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen sowie die Bildung von Resorptionslakunen vermindert [*Kitazawa et al., 1994*]. Allerdings spielt Il-1 vorwiegend bei entzündlichen Knochenerkrankungen wie rheumatoider Athritis eine entscheidende Rolle [*Schiff, 2000*], was den Wegfall eines inhibitorischen Effektes auf die Osteoklastogenese in den *Ccl5^{-/-}*-Mäusen nur schwer erklären würde, da kein Anhalt für ein entzündliches Geschehen vorlag.

Ein weiterer Erklärungsversuch für den inhibitorischen Effekt auf die Osteoklastogenese könnte das von Osteomakrophagen gebildete, Chemokin Ccl6 sein, welches wie Ccl5 zur Subfamilie der CC-Chemokine gehört, vorwiegend von Zellen der Makrophagen-Monozyten-Linie sezerniert wird und chemotaktisch über den auf Osteoklasten am stärksten exprimierten Ccr1-Rezeptor [Lean et al., 2002] auf phagozytierende mononukleäre Zellen wirkt [Kanno et al., 2005; Belperio et al., 2002; Asensio et al., 1999; Hogaboam et al., 1999]. Ccr1 spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Funktion der Osteoklasten, wie in einem Ccr1defizienten Mausmodell gezeigt werden konnte, bei dem es zu einer gestörten Zellfusion Osteoklastenvorläuferzellen und einer von herabgesetzten Resorptionsfähigkeit kam [Hoshino et al., 2010]. Außerdem ist bekannt, dass Ccl6 über c-Myc induziert wird [Yi et al., 2003], welches von ausdifferenzierten Osteoklasten exprimiert wird [Battaglino et al., 2002] und worüber möglicherweise ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen Osteoklast und Osteomakrophage funktionieren könnte.

Ein dritter Faktor, welcher einen inhibitorischen Einfluss im physiologischen Knochenremodling ausüben könnte, wäre Adiponectin. Adiponectin ist ein von Adipozyten gebildetes Adipokinin, das im Plasma gesunder Menschen vorkommt [*Arita et al., 1999*]. Wie von Leptin [*Holloway et al., 2002*], weiß man auch von Adiponectin, dass es die Osteoklastogenese inhibiert [*Oshima et al., 2005*]; möglicherweise über die Inhibition der Expression von Nfatc1 [*Yamaguchi et al., 2008*] oder durch eine verminderte Bildung von Rankl [*Yamaguchi et al., 2006*]. Dieser inhibitorische Effekt auf die Osteoklastogenese durch Adiponectin konnte in einem transgenen Mausmodell bestätigt werden, bei dem es zu einer erhöhten trabekulären Knochenmasse und einer verminderten Osteoklastenzahl und Knochenesorption kam [*Oshima et al. 2005*]. Möglicherweise kommt es aber auch zu einem additiven Effekt aller drei Faktoren, oder der inhibitorische Effekt wird durch einen ganz anderen noch nicht erforschten Mechanismus verursacht.

Zusätzlich konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse von Chang et al. bestätigt werden, die einen positiven Einfluss auf die Mineralisation von Osteoblasten durch Osteomakrophagen zeigen konnten [Chang et al., 2008]. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Osteomakrophagen selbst keine Mineralisationsfähigkeit besitzen und damit wohl keinen direkten Einfluss auf eine geregelte Knochenformation, obwohl sie laut Literatur alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Bonesialoprotein und Typ-I Kollagen bilden können, welche für eine geregelte Mineralisation benötigt werden [Heinemann et al., 2000 B; Zreiqat et al., 2003]. Allerdings konnte ein indirekter Einfluss der Osteomakrophagen auf die Osteoblastogenese mit Hilfe einer genomweiten Genchipanalyse gezeigt werden. Dabei konnte in einer Kokultur von Osteoblasten und Osteomakrophagen eine gesteigerte Expression spezifischer Osteoblastengene wie Ptprz1, Bglap, Dmp1 und Sost gezeigt werden, die an der physiologischen Mineralisation beteiligt sind. Hierdurch kommt es womöglich indirekt durch mitogene Wachstumsstimulation [Huang et al., 2010; Williams et al, 2009] zu einer vermehrten Mineralisation, was bei dem Verlust der Osteomakrophagen in den Ccl5^{-/-}-Mäusen die verminderte Knochenformation erklären würde.

Ursächlich für die Induktion der Osteoblastenmarker könnte möglicherweise auch hier das von Osteomakrophagen gebildete Adiponectin sein, dass über die beiden ubiquitär exprimierten Rezeptoren für Adiponectin, AdipoR1 und AdipoR2, an Osteoblasten, wie auch Osteoklasten bindet [Shinoda et al., 2006; Berner et al., 2004]. Laut Literatur käme es dann möglicherweise entweder über den AMP-Kinase- [Kanazawa et al., 2007] oder den MAPK/c-Jun-Signalweg [Lee et al., 2009] zu einer gesteigerten Proliferation, Differenzierung und Mineralistaion der Osteoblasten [Luo et al., 2005; Berner et al., 2004] durch die Expression von spezifischen Osteoblastengenen. So wurde beschrieben, dass Adiponectin die Expression spezifischer Osteoblasten-Gene wie alkalischer Phosphatase [Oshima et al., 2005], BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin [Huang et al., 2010] und Runx2 [Lee et al., 2009] steigert. Oshima et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen, indem sie Mäuse mit einem Adiponectin-Adenovirus therapierten, was osteokatabol auf den Knochen wirkte [Oshima et al., 2005]. Jedoch zeigten Williams et al. in einer anderen Arbeit gegenteilige Ergebnisse [Williams et al., 2009], wobei sie diese dadurch erklärten, dass Adiponectin zusätzlich einen indirekten Effekt auf die Knochenformation über die Regulierung von Wachstumsfaktoren bzw. über den Einfluss auf die Insulinsensitivität besitzt [Williams et al., 2009].

Osteomakrophagen stellen also vermutlich eine neue spezifische Knochenzelle im Knochenstoffwechsel dar, die möglicherweise regulatorisch im Kopplungsmechanismus des physiologischen Knochenremodelings zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und womöglich auch Osteozyten interagieren.
7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten erstmals mehrere wichtige Beobachtungen für das Chemokin Ccl5 bzw. den Rezeptor Ccr5 im Knochenremodeling gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Defizienz von Ccl5 als auch von Ccr5 einen osteoporotischen Phänotyp in Mäusen hervorruft, der auf einer gesteigerten Knochenresorption und einer verminderten Knochenformation beruht. Dabei fiel auf, dass der Phänotyp jedoch nicht auf einem zellautonomen Defekt von Osteoblasten und Osteoklasten beruht, wie anfangs vermutet wurde, sondern wahrscheinlich durch das Fehlen eines Teiles der Knochenbelegzellen, so genannter Osteomakrophagen verursacht wird.

Über ein spezifisches Zellseparationsverfahren konnten diese Zellen isoliert und kultiviert werden und es konnte gezeigt werden, dass diese Osteomakrophagen sowohl einen indirekten Einfluss auf Osteoblasten, als auch auf Osteoklasten ausüben. Dabei besitzen sie selbst keinen direkten Effekt auf Knochenformation und Knochenresorption, allerdings konnte ein indirekter Effekt auf die Knochenformation über die Expressionssteigerung spezifischer Osteoblastengene wie *Ptprz1*, *Bglap*, *Dmp1* und *Sost* gezeigt werden. Zudem wirken sie inhibitorisch auf die Osteoklastendifferenzierung, allerdings nicht wie Osteoblasten über OPG, sondern über einen bisher unbekannten potenten Faktor. Möglicherweise spielt dabei einer von drei Osteoblasten-unspezifischen Faktoren: Ccl6, Il1ra und Adiponectin eine entscheidende Rolle, wie in einer Genchipanalyse gezeigt werden konnte.

Osteomakrophagen scheinen möglicherweise somit eine entscheidende Rolle im physiologischen Knochenremodeling zu spielen, was möglicherweise einen neuen Angriffspunkt für osteoanabole Medikamente in der Therapie von Knochenerkrankungen wie Osteoporose etc. darstellen könnte, um einerseits die Knochenresorption zu inhibieren und gleichzeitig die Knochenformation zu stimulieren.

8. Ausblick

Durch diese Arbeit werden viele Fragen aufgeworfen, die unbeantwortet bleiben und in Folgearbeiten beantwortet werden sollten. So liefert die vorliegende Arbeit zwar erste Hinweise auf eine mögliche Relevanz der Osteomakrophagen als eine neue regulatorische Zelle im Knochenremodeling, jedoch konnte weder geklärt werden, wie der inhibitorische Effekt auf die Osteoklastogenese, noch wie der stimulatorische Effekt auf die Osteoblastogenese vermittelt wird. Außerdem bleibt offen, welchen Osteoblasten auf Einfluss möglicherweise und Osteoklasten umgekehrt Osteomakrophagen ausüben und ob sich dies im physiologischen Knochenremodeling auswirkt. Um dies genauer zu klären, würde sich am besten anbieten ein Ccl6defizientes-Mausmodell zu entwickeln und den Knochenphänotyp zu analysieren, um zu zeigen, dass die Defizienz von Ccl6 zu einer unkontrollierten Osteoklastogenese mit Entstehung einer Osteopenie führt. Weiterhin bleibt ungeklärt, welche mögliche Funktion die Osteomakrophagen im humanen Remodeling spielen. In dieser Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass Osteomakrophagen auch auf humaner Knochenoberfläche vorkommen (Abbildung 6.1 C), wie schon Chang et al. zeigen konnten [Chang et al., 2008], allerdings bleibt offen, welche Funktion sie im physiologischen Knochenremodeling bzw. welche Funktion sie bei entzündlichen Knochenerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis erfüllen, bei denen bekannt ist, dass Makrophagen durch die gesteigerte Bildung von Ccl5 durch inflammatorische Zellen wie T-Zellen sowie Synoviozyten vermehrt zum Entzündungsherd migrieren [Rathanaswai et al., 1993; Robinson et al., 1995; Volin et al., 1998]. Dazu sollte anhand histologischen Knochenschnitten rheumatoider Patienten mit Hilfe von von Immunhistostologie untersucht werden, ob in diesen eine vermehrte Ansammlung von Osteomakrophagen vorliegt. Sollte dies der Fall sein, würde es sich anbieten, die Osteomakropahgen in einem rheumatoiden Mausmodell genauer zu analysieren. Außerdem stellt sich die Frage, ob dieser Einfluss der Osteomakrophagen wirklich einen so entscheidenden Einfluss für das normale physiologische Knochenremodeling besitzt oder möglicherweise nur in der Wachstumszeit. Denn in dieser Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass Ccl5-defiziente Mäuse im Alter von 52 Wochen einen

annähernd normalen Knochenphänotyp aufweisen; mit Ausnahme einer deutlich erhöhten Osteoklastenanzahl (*Abbildung 6.1 A und B*).



Abbildung 8.1: Weitere Beobachtugen: (A) Unentkalte 4 µm dicke Histologie der Lendenwirbelkörper L3-4 nach von Kossa/van Gieson gefärbt im Alter von 52 Wochen zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtypkontrollen. (B) Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter weisen ebenfalls keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtyptieren auf: Knochenvolumen (BV/TV), Knochenformationsrate (BFR/BS), Osteoblastenzahl (ObN/BPm). Allerdings ist die Anzahl der Osteoklasten wie in den 24 Wochen alten Ccl5-defizienten Mäusen deutlich erhöht. (C) Immunhistologien mit einem Cd68 Antikörper zeigen Osteomakrophagen auf der Knochenoberfläche in humanen Paraffinhistologien.

Desweitern ist zu klären welchen Einfluss monoklonale Antikörper gegen Ccl5 und Ccr5, wie sie z.B. bei HIV ihren Einsatz finden [*Ji et al., 2007*], für einen möglichen Einfluss auf die Osteomakrophagen ausüben bzw. auf das physiologische Remodeling im Knochen. Damit verbunden ist auch zu klären, ob durch die Überexpression von Ccl5 unter dem Col1a1-Promoter in einem Transgenen-Mausmodell ein osteoanaboler Effekt in vivo verursacht werden kann und möglicherweise auch einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte.

9. Literaturverzeichnis

- [1] **Alam R**, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, Grant JA. (1993). RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. J Immunol.; 150:3442-8.
- [2] Albers J, Schulze J, Beil FT, Gebauer M, Baranowsky A, Keller J, Marshall RP, Wintges K, Friedrich FW, Priemel M, Schilling AF, Rueger JM, Cornils K, Fehse B, Streichert T, Sauter G, Jakob F, Insogna KL, Pober B, Knobeloch KP, Francke U, Amling M, Schinke T. (2011). Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. J Cell Biol.
- [3] **Amling M**, Grote HJ, Pösl M, Hahn M, Delling G. (1994). Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and three-dimensional morphology. Bone Miner.; 27:193-208.
- [4] Angers S, Moon RT. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.; 10:468-477 doi:10.1038/nrm2717
- [5] Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK. (2005). Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. Am J Hum Genet.; 77:741-53.
- [6] **Appay V**, Rowland-Jones SL. (2007). RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol.; 22:83-7.
- [7] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun.; 257:79-83.
- [8] Arron JR, Choi Y. (2000). Bone versus immune system. Nature.; 408:535-6.
- [9] Asensio VC, Lassmann S, Pagenstecher A, Steffensen SC, Henriksen SJ, Campbell IL. (1999). C10 is a novel chemokine expressed in experimental inflammatory demyelinating disorders that promotes recruitment of macrophages to the central nervous system. Am J Pathol.; 154:1181-91.
- [10] Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A.; 84:6020-4.
- [11] Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F. (2003). High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. J Bone Miner Res.; 18:960-74.
- [12] **Baggiolini M.** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. Nature.; 392:565-8.
- [13] **Battaglino R**, Kim D, Fu J, Vaage B, Fu XY, Stashenko P. (2002). c-myc is required for osteoclast differentiation. J Bone Miner Res.; 17:763-73.

- [14] **Bar-Shavit Z.** (2007). The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. J Cell Biochem.; 102:1130-9.
- [15] **Bartosik-Psujek H**, Stelmasiak Z. (2004). Steroid therapy altered serum levels of CCL2 and CCL5 chemokines in multiple sclerosis patients during relapse. Eur Neurol.; 52:237-41.
- [16] **Baran D.** (2001) Osteoporosis. Efficacy and safety of a bisphosphonate dosed once weekly. Geriatrics.; 56:28-32.
- [17] Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA, Keane MP. (2002). Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol.; 27:419-27.
- [18] **Berner HS**, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. (2004). Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. Bone.; 35:842-9.
- [19] **Bianco P**, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells.; 19:180-92.
- [20] Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB. (2004). Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage.; 12:627-35.
- [21] **Bourque WT**, Gross M, Hall BK. (1993). Expression of four growth factors during fracture repair. Int J Dev Biol.; 37:573-9.
- [22] Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N. Engl. J. Med.; 346:1513-1521.
- [23] **Burger EH**, Klein-Nulend J. (1999). Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. FASEB J.; 13:S101-12.
- [24] Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. (2003). Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon-a proposal. J Biomech.; 36:1453-9.
- [25] **Camilleri S**, McDonald F. (2006). Runx2 and dental development. Eur J Oral Sci.; 114:361-73.
- [26] **Carbuhn AF**, Fernandez TE, Bragg AF, Green JS, Crouse SF. (2010). Sport and training influence bone and body composition in women collegiate athletes. J Strength Cond Res.; 24:1710-7.
- [27] **Chambers TJ**, Fuller K. (1985). Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. J Cell Sci.; 76:155-65.
- [28] Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoll VM, Hume DA, Pettit AR. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. J Immunol.; 181:1232-44.

- [29] **Chen AE**, Ginty DD, Fan CM. (2005). Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. Nature.; 433:317-22.
- [30] Choi SW, Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Hanauer DA, Chaudhary MN, Silva IA, Rogers CE, Deurloo DT, Fisher JM, Liu C, Adams D, Chensue SW, Cooke KR. (2007). CCR1/CCL5 (RANTES) receptor-ligand interactions modulate allogeneic T-cell responses and graft-versus-host disease following stem-cell transplantation. Blood.; 110:3447-55.
- [31] **Clarke B.** (2008). Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol.; 3:S131-9.
- [32] **Cohen, M.M. Jr**. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. Am. J. Med. Genet. A.; 140:2646-2706.
- [33] **Cohen S.** (2006). Role of RANK ligand in normal and pathologic bone remodeling and the therapeutic potential of novel inhibitory molecules in musculoskeletal diseases. Arthritis Rheum.; 55:15-8.
- [34] **Cong F**, Schweizer L, Varmus H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. Development.; 131:5103-15.
- [35] **Consensus Development Conference on Osteoporosis**. Hong Kong (1993). Am J Med.; 95:1S-78S.
- [36] Culley FJ, Pennycook AM, Tregoning JS, Dodd JS, Walzl G, Wells TN, Hussell T, Openshaw PJ. (2006). Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease. J Virol.; 80:8151-7.
- [37] Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C. (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med.; 361:756-65.
- [38] **Currey JD.** (1984). Effects of differences in mineralization on the mechanical properties of bone. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.; 304:509-18.
- [39] **Daragon A**, Pouplin S. (2004). Potential benefits of intermittent bisphosphonate therapy in osteoporosis. Joint Bone Spine.; 71:2-3.
- [40] Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. Nature.; 438:867-72.
- [41] Davis, WL, Matthews JL, Martin JH, Kennedy III JW, Talmage RV. (1975). The endosteum as a functional membrane. In: Calcium Regulatory Hormones. Talmage RV, Owen M, Parsons JA; eds. Excerptia Medica Amsterdam; pp. 275-283
- [42] **Deldar A**, Lewis H, Weiss L. (1985). Bone lining cells and hematopoiesis: an electron microscopic study of canine bone marrow. Anat Rec.; 213:187-201.
- [43] **Delmas PD**. (2002). Different effects of antiresorptive therapies on vertebral and nonvertebral fractures in postmenopausal osteoporosis. Bone.; 30:14-7.

- [44] **Ducy P**, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell.; 89:747-54.
- [45] Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. Nat Genet.; 38:1310-5.
- [46] **Ferrari SL**, Deutsch S, Baudoin C, Cohen-Solal M, Ostertag A, Antonarakis SE, Rizzoli R, de Vernejoul MC. (2005). LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. Bone.; 37:770-5.
- [47] Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. Connect Tissue Res.; 44 Suppl 1:109-16.
- [48] **Franz-Odendaal TA**, Hall BK, Witten PE. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Dev Dyn.; 235:176-90.
- [49] **Frost HM.** (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calcif Tissue Res.; 3:211-37.
- [50] **Fuller K**, Owens JM, Chambers TJ. (1995). Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts. J Immunol.; 154:6065-72.
- [51] Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell; 107:513-23.
- [52] **Gordon MD**, Nusse R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. J Biol Chem.; 281:22429-33.
- [53] **Gordon S**, Taylor PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol.; 5:953-64
- [54] Gouwy M, Struyf S, Berghmans N, Vanormelingen C, Schols D, Van Damme J. (2011). CXCR4 and CCR5 ligands cooperate in monocyte and lymphocyte migration and in inhibition of dual-tropic (R5/X4) HIV-1 infection. Eur J Immunol. 2011;41:963-73.
- [55] Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaria M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. (1999). Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. J Bone Miner Res.; 14:1654-63.

- [56] Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. Arthritis Rheum.; 43:250-8.
- [57] **Green J.** (1994). The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. Department of Medicine, Cedars-Sinai Medical Center, UCLA School of Medicine 90048.
- [58] **Habas R**, Dawid IB, He X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. Genes Dev.; 17:295-309.
- [59] **Habas R**, Dawid IB. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? J Biol.; 4:2.
- [60] **Haller AC**, Zimny ML. (1977). Effects of hibernation on interradicular alveolar bone. J Dent Res.; 56:1552-7.
- [61] Hankemeier S, Grässel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P, Probst A. (2001). Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. J Orthop Res.; 19:531-8.
- [62] Harris ST. (2001). Bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis: clinical studies of etidronate and alendronate. Osteoporos Int.; 12 Suppl 3:S11-6.
- [63] **Hartmann C**, Tabin CJ. (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. Cell.; 104:341-51.
- [64] **Hauge EM**, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. J Bone Miner Res.; 16:1575-82.
- [65] **Häussler B**, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. (2007). Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. Osteoporos. Int.; 18:77-84.
- [66] Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. (2001). Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. Rheumatology (Oxford).; 40:623-30.
- [67] Heaney RP, McCarron DA, Dawson-Hughes B, Oparil S, Berga SL, Stern JS, Barr SI, Rosen CJ. (1999). Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. J Am Diet Assoc. 1999 Oct;99:1228-33.
- [68] **Heinemann DE**, Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, Köster G. (2000 A). Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. J Bone Joint Surg Br.; 82:283-9.
- [69] Heinemann DE, Siggelkow H, Ponce LM, Viereck V, Wiese KG, Peters JH. (2000 B). Alkaline phosphatase expression during monocyte differentiation. Overlapping markers as a link between monocytic cells, dendritic cells, osteoclasts and osteoblasts. Immunobiology.; 202:68-81.

- [70] **Henriksen K**, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. Bone.; 44:1026-33.
- [71] Hogaboam CM, Gallinat CS, Taub DD, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW. (1999). Immunomodulatory role of C10 chemokine in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Immunol.; 162:6071-9.
- [72] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. (2002). Leptin inhibits osteoclast generation. J Bone Miner Res.; 17:200-9.
- [73] Hoshino A, limura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K. (2010). Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. J Biol Chem.; 285:28826-37.
- [74] **Huang CY**, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang CH. (2010). Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway. J Cell Physiol.; 224:475-83.
- [75] **Huelsken J**, Behrens J. (2002). The Wnt signalling pathway. J Cell Sci.; 115:3977-8.
- [76] Hume DA, Perry VH, Gordon S. (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. Anat Rec. 1984; 210:503-12.
- [77] Jakob F. (2007). [Metabolic bone diseases]. Internist (Berl).; 48:1101-17.
- [78] Ji C, Brandt M, Dioszegi M, Jekle A, Schwoerer S, Challand S, Zhang J, Chen Y, Zautke L, Achhammer G, Baehner M, Kroetz S, Heilek-Snyder G, Schumacher R, Cammack N, Sankuratri S. (2007). Novel CCR5 monoclonal antibodies with potent and broad-spectrum anti-HIV activities. Antiviral Res. 2007;74:125-37.
- [79] Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. (2005). Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. Osteoarthritis Cartilage.; 13:632-41.
- [80] **Kamioka H**, Miki Y, Sumitani K, Tagami K, Terai K, Hosoi K, Kawata T. (1995). Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocytes. Biochem Biophys Res Commun.; 212:692-6.
- [81] **Kamioka H**, Honjo T, Takano-Yamamoto T. (2001). A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. Bone.; 28:145-9.
- [82] Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. (2007). Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. BMC Cell Biol.; 8:51.

- [83] Kaneko M, Tomita T, Nakase T, Ohsawa Y, Seki H, Takeuchi E, Takano H, Shi K, Takahi K, Kominami E, Uchiyama Y, Yoshikawa H, Ochi T. (2001). Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford).; 40:247-55.
- [84] **Kanno M**, Suzuki S, Fujiwara T, Yokoyama A, Sakamoto A, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. (2005). Functional expression of CCL6 by rat microglia: a possible role of CCL6 in cell-cell communication. J Neuroimmunol.; 167:72-80.
- [85] Karsdal MA, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K. (2008). Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. Biochem Biophys Res Commun.; 366:483-8.
- [86] Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L.(2002). Cbfa1independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J. Cell Biol.; 157:303-314.
- [87] **Keophiphath M**, Rouault C, Divoux A, Clément K, Lacasa D. (2010). CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 30:39-45.
- [88] Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T, Yoshikai Y. (2001). Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. J Immunol.; 166:3574-9.
- [89] Kim MS, Magno CL, Day CJ, Morrison NA. (2006). Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. J Cell Biochem.; 97:512-8.
- [90] Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R. (1995). Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. Endocrinology.; 136:3054-61.
- [91] **Kitazawa R**, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. J Clin Invest.; 94:2397-406.
- [92] Koh JM, Jung MH, Hong JS, Park HJ, Chang JS, Shin HD, Kim SY, Kim GS. (2004). Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. J Korean Med Sci.; 19:407-12.
- [93] **Kohn AD**, Moon RT. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-cateninindependent pathways. Cell Calcium.; 38:439-46.
- [94] **Kong YY**, Boyle WJ, Penninger JM. (1999). Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. Immunol Cell Biol.; 77:188-93.

- [95] **Kühl M.** (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. Front Biosci.; 9:967-74.
- [96] **Kwiecinski GG**, Krook L, Wimsatt WA. (1987). Annual skeletal changes in the little brown bat, Myotis lucifugus lucifugus, with particular reference to pregnancy and lactation. Am J Anat.; 178:410-20.
- [97] Lean JM, Murphy C, Fuller K, Chambers TJ. (2002). CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. J Cell Biochem.; 87:386-93.
- [98] Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim JB. (2009). Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. Stem Cells.; 27:2254-62.
- [99] Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. (2007). Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. J Biol Chem.; 282:33098-106.
- [100] Lisignoli G, Toneguzzi S, Grassi F, Piacentini A, Tschon M, Cristino S, Gualtieri G, Facchini A. (2002). Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts. Cytokine.; 20:231-8.
- [101] Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A, Cattini L, Lenti A, Tschon M, Cristino S, Grassi F, Facchini A. (2003). Human osteoblasts express functional CXC chemokine receptors 3 and 5: activation by their ligands, CXCL10 and CXCL13, significantly induces alkaline phosphatase and beta-N-acetylhexosaminidase release. J Cell Physiol.; 194:71-9.
- [102] Lisignoli G, Piacentini A, Cristino S, Grassi F, Cavallo C, Cattini L, Tonnarelli B, Manferdini C, Facchini A. (2007). CCL20 chemokine induces both osteoblast proliferation and osteoclast differentiation: Increased levels of CCL20 are expressed in subchondral bone tissue of rheumatoid arthritis patients. J Cell Physiol.; 210:798-806.
- [103] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. (2002). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. Am J Hum Genet.; 70:11-9.
- [104] **Lo Celso C**, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Côté D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. Nature; 457:92-6.
- [105] Logan CY, Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol.; 20:781-810.

- [106] **Luo XH**, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. (2005). Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. Exp Cell Res.; 309:99-109.
- [107] Maghazachi AA, al-Aoukaty A, Schall TJ. (1994). C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. J Immunol.; 153:4969-77.
- [108] Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M. (2001). Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. J Immunol.; 167:2625-31.
- [109] **Mantovani A.** (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today.; 20:254-7.
- [110] **Marotti G.** (1996). The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. Ital J Anat Embryol.; 101:25-79.
- [111] **Martin TJ**, Sims NA. (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends Mol Med.; 11:76-81.
- [112] **Maruyama K**, Sano G, Matsuo K. (2006). Murine osteoblasts respond to LPS and IFN-gamma similarly to macrophages. J Bone Miner Metab.; 24:454-60.
- [113] **Matsuo K**, Irie N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. Arch Biochem Biophys.; 473:201-9.
- [114] **Matthews JL**, Wiel CV, Talmage RV. (1978). Bone lining cells and the bone fluid compartment, an ultrastructural study. Adv Exp Med Biol.; 103:451-8.
- [115] **McLean FC**, Urist MR. (1968). Bone: Fundamentals oft he Physiologiy of Skeletal Tissue, 3rd. Edition. University of Chicago Press, Chicago; pp. 3-17.
- [116] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. (2004). The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med.; 350:459-68.
- [117] Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, Saito S. (1995). Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. J Bone Miner Res.; 10:231-42.Miranda-Carús ME, Benito-Miguel M, Balsa A, Cobo-Ibáñez T, Pérez de Ayala C, Pascual-Salcedo D, Martín-Mola E. (2006). Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. Arthritis Rheum.; 54:1151-64.
- [118] Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egashira K, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T. (2009). MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. Biochem Biophys Res Commun.; 383:373-7.

- [119] Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, Tsukamoto K, Tomita H, Tsujihata M, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Minakami H, Niikawa N, Yoshiura K. (2004). LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density. J Hum Genet.; 49:80-6.
- [120] **Moon RT**, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. Science.; 296:1644-6.
- [121] **Mosimann C**, Hausmann G, Basler K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. Nat Rev Mol Cell Biol.; 10:276-86.
- [122] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. (2001). Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med.; 344:1434-41.
- [123] **Nefussi JR**, Sautier JM, Nicolas V, Forest N. (1991). How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. J Biol Buccale.; 19:75-82.
- [124] **Nelson WJ**, Nusse R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science.; 303:1483-7.
- [125] **Nusse R**, Varmus H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell, 31:99-109.
- [126] **Nüsslein-Volhard C**, Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature, 287:795-801.
- [127] Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I. (2005). Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. Biochem Biophys Res Commun.; 331:520-6.
- [128] Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell.; 89:765-71.
- [129] **Otto F**, Kanegane H, Mundlos S. (2002). Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. Hum Mutat.; 19:209-16.
- [130] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res.; 2:595-610.
- [131] **Parfitt AM**. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone.; 30:5-7.
- [132] **Patel DR.** (2010). Stress fractures: diagnosis and management in the primary care setting. Pediatr Clin North Am.; 57:819-27.

- [133] Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. J Clin Invest. 1999;104:1199-211.
- [134] **Pettit AR**, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ. (2008). Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. Bone.; 43:976-82.
- [135] Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Püschel K, Amling M. (2010). Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. J Bone Miner Res.; 25:305-12.
- [136] Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ, McColl SR. (1993). Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. J Biol Chem.; 268:5834-9.
- [137] Repeke CE, Ferreira SB Jr, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, Garlet GP. (2010). Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. Bone.; 46:1122-30.
- [138] Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. (2000). Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblasts. J Periodontol.; 71:614-7.
- [139] **Riggs BL**, Khosla S, Melton LJ 3rd. (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev.; 23:279-302.
- [140] **Ripoll VM**, Kadioglu A, Cox R, Hume DA, Denny P. (2010). Macrophages from BALB/c and CBA/Ca mice differ in their cellular responses to Streptococcus pneumoniae. J Leukoc Biol.; 87:735-41.
- [141] **Robinson E**, Keystone EC, Schall TJ, Gillett N, Fish EN. (1995). Chemokine expression in rheumatoid arthritis (RA): evidence of RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta production by synovial T cells. Clin Exp Immunol.; 101:398-407.
- [142] **Rochefort GY**, Pallu S, Benhamou CL. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. Osteoporos Int.; 21:1457-69.
- [143] **Rodan GA.** (1997). Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. Bone.; 20:1-4.
- [144] **Rodan GA**, Martin TJ. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. Science.; 289:1508-14.
- [145] **Ross FP**, Teitelbaum SL. (2005). alphavbeta3 and macrophage colonystimulating factor: partners in osteoclast biology. Immunol Rev.; 208:88-105.

- [146] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA.; 288:321-33.
- [147] **Rüegsegger P**, Durand EP, Dambacher MA. (1991). Differential effects of aging and disease on trabecular and compact bone density of the radius. Bone.; 12:99-105.
- [148] **Ruiz C**, Pérez E, Vallecillo-Capilla M, Reyes-Botella C. (2003). Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. Cell Physiol Biochem.; 13:309-14.
- [149] Saitoh Y, Koizumi K, Sakurai H, Minami T, Saiki I. (2007). RANKL-induced down-regulation of CX3CR1 via PI3K/Akt signaling pathway suppresses Fractalkine/CX3CL1-induced cellular responses in RAW264.7 cells. Biochem Biophys Res Commun.; 364:417-22.
- [150] **Sandberg M**, Vuorio T, Hirvonen H, Alitalo K, Vuorio E. (1988). Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones. Development.; 102:461-70.
- [151] Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. J Immunol.; 141:1018-25.
- [152] Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature.; 347(6294):669-71.
- [153] Schall TJ. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine.; 3:165-83.
- [154] **Schiff MH.** (2000). Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis.; 59 Suppl 1:i103-8.
- [155] Schuh JM, Blease K, Brühl H, Mack M, Hogaboam CM. (2003). Intrapulmonary targeting of RANTES/CCL5-responsive cells prevents chronic fungal asthma. Eur J Immunol.; 33:3080-90.
- [156] Seckinger P, Klein-Nulend J, Alander C, Thompson RC, Dayer JM, Raisz LG. (1990). Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production.J Immunol.; 145:4181-4.
- [157] **Seeman E**, Delmas PD. (2001). Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. Trends Endocrinol Metab.; 12:281-3.
- [158] **Seeman E.** (2008). Bone quality: the material and structural basis of bone strength. J Bone Miner Metab.; 26:1-8.

- [159] Segerer S, Djafarzadeh R, Gröne HJ, Weingart C, Kerjaschki D, Weber C, Kungl AJ, Regele H, Proudfoot AE, Nelson PJ. (2007). Selective binding and presentation of CCL5 by discrete tissue microenvironments during renal inflammation. J Am Soc Nephrol.; 18:1835-44.
- [160] **Seto ES**, Bellen HJ. (2004). The ins and outs of Wingless signaling. Trends Cell Biol.; 14(1):45-53.
- [161] Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. (2006). Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. J Cell Biochem.; 99:196-208.
- [162] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell.; 89:309-19.
- [163] Sims NA, Gooi JH. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Semin Cell Dev Biol.; 19:444-51.
- [164] Skwor TA, Cho H, Cassidy C, Yoshimura T, McMurray DN. (2004). Recombinant guinea pig CCL5 (RANTES) differentially modulates cytokine production in alveolar and peritoneal macrophages. J Leukoc Biol.; 76:1229-39.
- [165] **Soltanoff CS**, Yang S, Chen W, Li YP. (2009). Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. Crit Rev Eukaryot Gene Expr.; 19:1-46. Review.
- [166] **Steinberg B**, Singh IJ, Mitchell OG. (1981). The effects of cold-stress. Hibernation, and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster, Mesocricetus auratus. J Morphol.; 167:43-51.
- [167] **Taichman RS.** (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. Blood.; 105:2631-9.
- [168] **Takeda S**, Karsenty G. (2001). Central control of bone formation. J Bone Miner Metab.; 19:195-8.
- [169] **Takeshita S**, Kaji K, Kudo A. (2000). Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. J Bone Miner Res.; 15:1477-88.
- [170] **Tatsumi S**, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K. (2007). Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab.; 5:464-75.
- [171] Taub D, Dastych J, Inamura N, Upton J, Kelvin D, Metcalfe D, Oppenheim J. (1995). Bone marrow-derived murine mast cells migrate, but do not degranulate, in response to chemokines. J Immunol.; 154:2393-402.

- [172] **Teitelbaum SL**, Ross FP. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet.; 4:638-49.
- [173] **Topol L**, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. J Cell Biol.; 162:899-908.
- [174] Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. (2005). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development. J Cell Biol.; 133:1123-37.
- [175] Tyner JW, Uchida O, Kajiwara N, Kim EY, Patel AC, O'Sullivan MP, Walter MJ, Schwendener RA, Cook DN, Danoff TM, Holtzman MJ. (2005). CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. Nat Med.; 11:1180-7.
- [176] Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. (2000). The cell biology of osteoclast function. J Cell Sci.; 113 (Pt 3):377-81.
- [177] **Vaddi K**, Newton RC. (1994). Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. J Immunol.; 153:4721-32.
- [178] **van Amerongen R**, Nusse R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development.; 136:3205-14.
- [179] van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Bénichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. (2003). Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. Am J Hum Genet.; 72:763-71.
- [180] **Vesosky B**, Rottinghaus EK, Stromberg P, Turner J, Beamer G. (2010). CCL5 participates in early protection against Mycobacterium tuberculosis. J Leukoc Biol.; 87:1153-65.
- [181] **Volin MV**, Shah MR, Tokuhira M, Haines GK, Woods JM, Koch AE. (1998). RANTES expression and contribution to monocyte chemotaxis in arthritis. Clin Immunol Immunopathol.; 89:44-53.
- [182] **von Luettichau I**, Nelson PJ, Pattison JM, van de Rijn M, Huie P, Warnke R, Wiedermann CJ, Stahl RA, Sibley RK, Krensky AM. (1996). RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. Cytokine.; 8:89-98.
- [183] Vrotsos Y, Miller SC, Marks SC Jr. (2002). Prostaglandin E--a powerful anabolic agent for generalized or site-specific bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr.; 13:255-63.
- [184] Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. (2006). Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. Annu Rev Immunol.; 24:33-63.

- [185] Wang JM, McVicar DW, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. (1993). Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. J Exp Med.; 177:699-705.
- [186] **Wang HY**, Malbon CC. (2003). Wnt signaling, Ca2+, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. Science.; 300:1529-30.
- [187] Weber C, Schober A, Zernecke A. (2004). Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 24:1997-2008.
- [188] **Westendorf JJ**, Kahler RA, Schroeder TM. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene.; 341:19-39.
- [189] Wick D. (2005), Biomechanische Grundlagen sportlicher Bewegung: Lehrbuch der Biomechanik. Spitta Verlag GmbH & Co. KG, S.70. ISBN: 3-934211-74-7
- [190] Williams GA, Wang Y, Callon KE, Watson M, Lin JM, Lam JB, Costa JL, Orpe A, Broom N, Naot D, Reid IR, Cornish J. (2009). In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. Endocrinology.; 150:3603-10.
- [191] **Wong GT**, Gavin BJ, McMahon AP. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. Mol Cell Biol.; 14:6278-86.
- [192] Wright KM, Friedland JS. (2002). Differential regulation of chemokine secretion in tuberculous and staphylococcal osteomyelitis. J Bone Miner Res.; 17:1680-90.
- [193] Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. (2008). CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. J Immunol.; 181:6384-93.
- [194] Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. Cell. 2008; 135:825-37.
- [195] Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Martinez Argueta JG, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. (2006). Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans. FEMS Immunol Med Microbiol.; 49:28-34.
- [196] Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Kamio N, Fukumoto S, Nonaka K, Ninomiya Y, Hanazawa S, Yamashita Y. (2008). Adiponectin inhibits induction of TNFalpha/RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. FEBS Lett.; 582:451-6.
- [197] Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Rivera A, Brown EM, Chattopadhyay N. (2005). Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. Endocrinology.; 146:2324-35.

- [198] **Yi F**, Jaffe R, Prochownik EV. (2003). The CCL6 chemokine is differentially regulated by c-Myc and L-Myc, and promotes tumorigenesis and metastasis. Cancer Res.; 63:2923-32.
- [199] Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S. (2002). Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. Proc Natl Acad Sci U S A.; 99:4580-5.
- [200] Yu G, Luo H, Wu Y, Wu J. (2003). Ephrin B2 induces T cell costimulation. J Immunol.; 171:106-14.
- [201] Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. (2003). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. J Bone Miner Res.; 18:1404-18.
- [202] Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. (2004). CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. J Bone Miner Res.; 19:2065-77.
- [203] Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature.; 438:873-7.
- [204] Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S, Wu D. (2004). The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. Mol Cell Biol.; 24:4677-84.
- [205] Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. Cell Metab.; 4:111-21.
- [206] Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. (2002). MLO-Y4 osteocytelike cells support osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res.; 17:2068-79
- [207] **Zlotnik A**, Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity.; 12:121-7.
- [208] **Zlotnik A.** (2006). Chemokines and cancer. Int J Cancer.; 119:2026-9.
- [209] **Zreiqat H**, Kumar RK, Markovic B, Zicat B, Howlett CR. (2003). Macrophages at the skeletal tissue-device interface of loosened prosthetic devices express bone-related genes and their products. J Biomed Mater Res A.; 65:109-17.

10. Abkürzungsverzeichnis

AMP:	Adenosinmonophosphat	Ccr:	Rezeptor für die CC-	
<u>Adipoq :</u>	Adiponectin		Chemokinesubfamilie	
AdipoR :	Rezeptor für Adiponectin	Cxcr:	Rezeptor für die CXC-	
<u>Apc</u>	Adenomatous polyposis		Chemokinesubfamilie	
	coli	<u>cDNA:</u>	copy DNA	
BFR/BS:	bone formation rate per	<u>cRNA:</u>	copy RNA	
	bone surface	<u>CK1α:</u>	Casein Kinase 1a	
	(Knochenforma-tionsrate	<u>Clcn7:</u>	Chlorid channel 7	
	pro		(Chloridkanal 7)	
	Knochenoberfläche)	<u>c-Myc:</u>	Protoonkogen	
<u>Bglap:</u>	Bone gla protein	<u>Col1a1:</u>	collagen, type I (Typ-I-	
	(Osteocalcin)		Kollagen)	
BGP:	Osteocalcin	CREB:	cAMP responce element	
BMD	bone mineral density		binding proteins	
	(Knochendichte)	<u>Csf1r</u>	Colony stimulating factor	
<u>BMPs</u>	bone morphogenetic		receptor 1	
	proteins	<u>Cxcl:</u>	Ligand der Chemokinsub-	
BMU:	Bone Multicellular Unit		familie Cxc	
bp:	Basenpaare	DEPC:	Diethylpyrocarbonat	
BrdU :	5'-bromo-2'-deoxyuridin	<u>Dmp1:</u>	Dentin matrix protein 1	
BSA:	bovines Serumalbumin	DMSO:	Dimethylsulfoxid	
BSP:	Bone sialoprotein	DNA:	Desoxyribonukleinsäure	
BV/TV:	bone volume per tissue	<u>dNTP:</u>	Desoxynukleotid-	
	volume (Knochenvolumen	triphosphat		
	pro Gewebevolumen)	<u>DV1:</u>	Dishevelled protein	
<u>CamkII</u> :	Calcium-calmodulin	EDTA:	Ethylendiamintetraazetat	
	dependent kinase II	ELISA:	Enzyme-Linked	
<u>CCD</u>	Cleidokraniale Dysplasie		Immunosorbent Assay	
<u>Ccl:</u>	Ligand der		(enzymgekoppelter	
	Chemokinsubfamilie CC		Immunadsorptionstest)	

F4/80:	CD68 (Cluster of	MAPK:	mitogen-activated protein		
	differentiation) bei der		kinase		
	Maus	M-csf:	macrophage colony		
FACS:	fluorescence activated		stimulating factor		
	cell sorting	MEM:	Minimum-Essential-		
	(Durchflusszytometrie)		Medium		
FGFs:	fibroblast growth factors	<u>μCT:</u>	μ -Computertomographie		
FKS:	fötales Kälberserum	μg:	μ-Gramm		
Fmax:	Maximalkraft	<u>μl:</u>	μ-Liter		
<u>for:</u>	forward	min:	Minute		
Fzd:	Frizzled	<u>ml:</u>	Milliliter		
<u>GSK3β:</u>	Glykogen Synthase Kinase	<u>mM:</u>	Millimol		
	3β	NaCl:	Natriumchlorid		
<u>H⁺-ATPase</u>	Protonenpumpe	NaOH:	Natriumhydroxid		
<u>H₂O:</u>	Wasser	Nfatc1:	nuclear factor of		
<u>H₂O₂:</u>	Wasserstoffperoxid		activated T-cells,		
HCI	Salzsäure		cytoplasmatic 1		
<u>Ibsp:</u>	Integrin binding	<u>NLK:</u>	Nemo-like-Kinase		
	sialoprotein	<u>nm:</u>	Nanometer		
<u>II</u>	Interleukin	<u>Obl:</u>	Osteoblasten		
<u>ll-1ra:</u>	Interleukin-1 Rezeptor	ObN/BS:	number of osteoblast per		
	Antagonist		bone perimeter (Anzahl		
<u>Il-1rn:</u>	Gen, das für Il-1ra codiert		der Osteoblasten pro		
<u>Inf-γ</u>	Interferon-y		Knochenoberfläche)		
<u>JNK :</u>	c-Jun N-terminale Kinase	Ob.S/BS:	osteoblast surface per		
<u>kb:</u>	Kilobasen		bone surface		
<u>kV:</u>	Kilo-Volt		(Osteoblasten-oberfläche		
LEF:	Lymphoid Enhancer	pro Knochenoberfläche)			
	binding protein factor	<u>Ocl:</u>	Osteoklasten		
LRP 5/6:	Low-density lipoprotein	OcN/BS:	number of osteoclasts per		
	receptor-related protein	bone perimeter (Anzahl			
	5/6	der Osteoklasten per			
MACS:	magnetic cell seperation		Knochenoberfläche)		

OcS/BS:	osteoclast surface per	<u>SDS:</u>	Sodium dodecyl sulfate		
	bone surface		(Natriumdodecylsulfat)		
	(Osteoklasten-oberfläche	sec:	Sekunde		
	pro Knochenoberfläche)	TAE:	Tris-Azetat-EDTA		
Opg:	Osteoprotegerin	<u>Tb.N.:</u>	trabecular number		
<u>OSE2:</u>	osteoblast-specific cis-		(Anzahl der Trabekel)		
	acting element 2	<u>Tb.Sp.:</u>	trabecular spacing		
PBS:	Phosphate buffered saline		(Abstand der Trabekel)		
	(Phosphat-gepufferte	<u>Tb.Th.:</u>	trabecular thickness		
	Salzlösung)	(Trabekeldicke)			
<u>PCP</u> :	Planar Cell Polarity	<u>Tcf:</u>	T-Cell-Factor		
PCR:	polymerase chain	<u>TE:</u>	Tris-EDTA		
	reaction	<u>TNF-α</u>	tumor necrosis factor α		
	(Polymerasekettenreaktio	<u>Tnfrsf11b:</u>	tumor nerosis factor		
	n)		receptor superfamily		
<u>PKA:</u>	Protein Kinase A		member 11b (= OPG)		
<u>PKC</u> :	Protein Kinase C	Trance	tumor necrosis factor-		
PTH:	Parathormon		related activation-induced		
Rank:	receptor activator of NF-		cytokine		
	кВ (Rezeptor Aktivator	TRAP:	Tartrat resistant acid		
	vom NF-κB)		phosphatase		
RANKL:	RANK (Receptor Activator	<u>Tris:</u>	Tris(hydroxymethyl)-		
	of NF-кВ) Ligand		aminomethan		
RANTES:	regulated on activation,	<u>UKE:</u>	Universitätsklinikum		
	normal T-cell expressed		Eppendorf		
	and secreted	<u>UV:</u>	Ultraviolett		
RNA:	Ribonukleinsäure	<u>V:</u>	Volt		
<u>rpm:</u>	rounds per minute, Upm;	WHO	World Health		
	Umdrehungen pro Minute	Umdrehungen pro Minute			
RT-PCR:	Reverse-Transkriptase		(Weltgesundheits-		
PCR			organisation)		
Runx2:	Runt-related transcription	WT:	Wildtyp		
	factor 2				

11. Anhang

11.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Professor Michael Amling für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Thorsten Schinke bedanken, durch dessen exzellente Betreuung und Anleitung das Arbeiten an diesem Thema zu einem intellektuellen Genuss wurde.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt dabei Anke Jeschke für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und die fachlichen Diskussionen.

Ich danke Olga Winter für die Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung der Knochenpräparate, sowie Timo Beil für die Hilfe bei den histomorphometrischen Analysen.

Und natürlich danke ich meiner Familie für ihre bedingungslose Liebe, Anleitung zu freiem Denken und grammatischen Feinschliff, sowie meinen Freunden für den moralische Rückhalt und die kritischen Fachdisskusionen.

11.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kristofer Folker Ernst Wintges
Anschrift	Kegelhofstraße 36, 20251 Hamburg
geboren am	24.08.1985 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1990 - 1994	Grundschule Puchheim, München
1994 - 2005	Nymphenburger Gymnasium, München
2005	Abitur

<u>Studium</u>

Seit 10/2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2007	1. Ärztliche Prüfung
08/2010 - 05/2011	Praktisches Jahr in Hamburg und Kapstadt
11/2011	2. Ärztliche Prüfung

Promotion

04/2009 - 04/2011	Promotion	bei H	lerrn	Prof.	Dr.	med.	Michael	Amling,	Institut	für
	Osteologie	und B	Biome	chanil	k, Ze	entrum	ı für Expe	rimentel	le Medi	zin

11.3. Publikationen

1. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. J Bone Miner Res., 2011

Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, **Wintges K**, Streichert T, Klaetschke K, Keller J, Hissnauer TN, Spiro AS, Gessner A, Schett G, Amling M, McKenzie AN, Horst AK, Schinke T.

Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol., 2011* Albers J, Schulze J, Beil FT, Gebauer M, Baranowsky A, Keller J, Marshall RP, Wintges K,
Friedrich FW, Priemel M, Schilling AF, Rueger JM, Cornils K, Fehse B, Streichert T,
Sauter G, Jakob F, Insogna KL, Pober B, Knobeloch KP, Francke U, Amling M, Schinke T.

3. Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011

Keller J, Catala-Lehnen P, **Wintges K**, Schulze J, Bickert T, Ito W, Horst AK, Amling M, Schinke T.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: