

Aus dem
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Professor Dr. med. J. M. Rueger

**Untersuchungen zur osteoklastären
Knochenresorption im Rahmen der Skeletthomöostase**

Beginn des Verständnisses einer zentralen Regulation des Knochens

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Friedrich Arndt Schilling
aus Georgsmarienhütte

Hamburg, 2002

Don't dream it.

Be it!

Frank N. Further

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 04.06.03

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel

Referent: Prof. Dr. J.M. Rueger

Koreferent: Prof. Dr. C. Wagener

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abbildungen	
III	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	
1	Einleitung.....	1
1.1	Das Skelett.....	1
1.2	Knochenzellen	1
1.3	Klinische Bedeutung der Knochenresorption.....	3
1.4	Therapieansätze zur Beeinflussung der Knochenresorption	6
1.5	Untersuchung der Osteoklastenfunktion im Mausmodell.....	7
1.6	Coupling von Knochenformation und Knochenresorption.....	10
2	Fragestellung und Zielsetzung	13
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Geräte und Laborbedarf	16
3.1.2	Chemikalien und Antikörper.....	16
3.1.3	Primer und PCR-Chemikalien.....	17
3.1.4	Medien, Lösungen und Puffer.....	17
3.1.5	Tiere.....	19
3.2	Methoden.....	20
3.2.1	Genotypisierung.....	20
3.2.2	Kontaktradiographie.....	20
3.2.3	Histologie	21
3.2.4	Histomorphometrie.....	21
3.2.5	Humane Knochenmarkgewinnung.....	22
3.2.6	Gewinnung peripheren Blutes	22
3.2.7	Isolierung hämatopoetischer Stammzellen	22
3.2.8	Gewinnung von murinen hämatopoetischen Zellen.....	23
3.2.9	Kultivierung humaner Zellen	24
3.2.10	Kultivierung muriner Zellen	24
3.2.11	TRAP-Färbung.....	24

Inhaltsverzeichnis

3.2.12 Immunfluoreszenz und confokale Lasermikroskopie	25
3.2.13 Resorptionsnachweis auf Dentin	25
3.2.14 Intracerebroventrikuläre Injektion.....	26
3.2.15 Deoxypyridinolin Crosslinks / Leptin RIA	26
3.2.16 Ovariectomie und subcutane Östrogenbehandlung	26
3.2.17 Statistik	27
3.2.18 Sicherheit und Entsorgung.....	27
4 Resultate	28
4.1 Osteoklastendifferenzierung ohne Osteoblasten	28
4.2 Progressive Osteopetrose bei Fehlen von c-Src.....	33
4.3 Osteoklasten und Leptin-Defizienz	37
5 Diskussion	47
5.1 Lokale Kontrolle der Osteoklastendifferenzierung und Funktion.....	47
5.2 Osteoklastendifferenzierung ohne Osteoblasten <i>in vitro</i>	48
5.3 Kein Einfluß der Resorption auf die Formation <i>in vivo</i>	49
5.4 Zentrale Kontrolle der Knochenmasse.....	50
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis.....	56
8 Danksagung.....	69
9 Curriculum Vitae	71
10 Anlagen	72

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Schema: Aufbau des Osteoklasten	2
Abb. 2	Knochenbefund bei Osteopetrose	4
Abb. 3	Kontaktradiographie einer osteoporotischen Wirbelsäule	5
Abb. 4	Periprothetische Lyse durch osteoklastäre Resorption	5
Abb. 5	Kontaktradiographie einer Tumorosteolyse im coxalen Femur	6
Abb. 6	Mauswirbelkörper bei genetisch veränderter Osteoklastenfunktion	8
Abb. 7	Humane Knochenmarkkultur, Tag 14, TRAP-Färbung	28
Abb. 8	Humane Knochenmarkkultur, Tag 14, confokale Lasermikroskopie	29
Abb. 9	Humane Knochenmarkkultur, Tag 21, Pit-Assay auf Dentin	30
Abb. 10	Kultur humanen peripheren Blutes, Tag 14, TRAP-Färbung	32
Abb. 11	Kultur humanen peripheren Blutes, Tag 14, confokale Lasermikroskopie	32
Abb. 12	Kultur humanen peripheren Blutes, Tag 21 Pit-Assay	33
Abb. 13	Progressive Osteopetrose bei <i>c-src</i> ^{-/-} Mäusen, Kontaktradiographie	34
Abb. 14	Progressive Osteopetrose bei <i>c-src</i> ^{-/-} Mäusen, Histomorphometrie	35
Abb. 15	Keine osteoklastäre Differenzierungsstörung bei Fehlen von c-Src	36
Abb. 16	Knochenphänotyp bei Leptindefizienz, Histologie / Kontaktradiographie	37
Abb. 17	Erhöhte Knochenmasse bei Fehlen von Leptin, Histomorphometrie	38
Abb. 18	Erhöhte Osteoklastenzahl bei Leptinsignaldefizienz	39
Abb. 19	Osteoklastendifferenzierung und Funktion <i>in vitro</i>	40
Abb. 20	Osteoklastendifferenzierung <i>in vitro</i> , Histomorphometrie	41
Abb. 21	Osteoklastenfunktion <i>in vitro</i> , Histomorphometrie	41
Abb. 22	Östrogen-Behandlung: Gonaden von Wildtyp- und <i>ob/ob</i> -Mäusen	42
Abb. 23	Östrogen-Behandlung: Normalisierung der Osteoklastenzahl	43
Abb. 24	Östrogen-Behandlung: Verstärkung des Knochenmasse-Phänotyps	43
Abb. 25	Östrogen-Behandlung: Histomorphometrie	44
Abb. 26	Knochenmasseabnahme durch ICV-Infusion von Leptin, Histologie	45
Abb. 27	ICV-Infusion von Leptin, Histomorphometrie	45
Abb. 28	Hypothese des direkten funktionalen Couplings	47
Abb. 29	Hypothese der zentralen Regulation des Knochenstoffwechsels	52

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
BSA	Bovines Serumalbumin
BV/TV	Knochen- /Gewebevolumen (Bone Volume/Tissue Volume)
Ca ²⁺	Kalzium
Cbl	zytosolisches Protein, Produkt des Protoonkogens <i>cbl</i>
CD	Zelloberflächenantigen (Cluster of differentiation)
C	Cytosin
c-	zellspezifisch (cellular)
<i>db</i>	Diabetes-Gen
DNA	Deoxy-Ribonuklein-säure (Deoxy ribonucleic acid)
dNTP	Mix aus den Nucleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Dpd	Deoxypyridinolin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FBS	Fötales Kälberserum (Fetal bovine serum)
G	Guanin
HSV	Herpes Simlex Virus
ICV	Intracerebroventrikulär
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
M	Molar
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
M-CSF	Wachstumsfaktor (Macrophage-colony stimulating factor)
MEM	Minimal essentielles Medium
<i>ob</i>	Fettsucht-Gen (obesity)
ObRb	Signalübertragender Leptinrezeptor
Na	Natrium

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

NOc/BPm	Osteoklasten / Knochenoberfläche (Number of osteoclasts / bone perimeter)
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerinligand (=RANKL=ODF=TRANCE)
<i>op</i>	Osteopetrose-Gen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PGE	Prostaglandin E
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormonverwandtes Peptid (Parathormone related peptide)
RANKL	Ligand von RANK (Receptor activator for NFkappaB ligand)
Src	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
Tcrd	Delta-Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (T-cell receptor delta chain)
TGA	Stopcodon
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase (Tartratresistent acid phosphatase)
T	Thymin
+/-	Heterozygot; Gen fehlt auf einem Allel
-/-	Knockout; fehlendes Gen auf beiden Allelen

Gene werden klein und kursiv geschrieben, bei Proteinen wird der erste Buchstabe kapitalisiert (z.B.: *src*: Gen; Src: Protein).

1 Einleitung

1.1 Das Skelett

Παντα ρει– alles fließt;¹⁹ so auch das Skelettsystem. Scheint es auf den ersten Blick auch der stabilste, am wenigsten flüssige Teil des Körpers zu sein, so wird bei genauerer Betrachtung deutlich, daß sich das Skelettsystem in einem ständigen Wandel befindet, der sich aber so langsam vollzieht, daß er dem Auge normalerweise verborgen bleibt. Dieser ständige Umbau ist die Grundlage dafür, daß sich der Knochen optimal an die Anforderungen anpassen kann, die an ihn gestellt werden. Stark belastete Strukturen werden verstärkt, an wenig belasteten Elementen kommt es zur Knochenresorption, und defekte Stellen werden repariert. Dieser Prozeß wird Remodeling genannt.⁴⁴

Neben seiner Stützfunktion hat der Knochen noch verschiedene weitere Aufgaben zu erfüllen. So dient er als das größte Kalzium-Reservoir des Körpers, und das Knochenmark ist unter physiologischen Bedingungen postnatal der primäre Ort der Blutbildung.³⁰ Für diese beiden Prozesse ist insbesondere die Resorptionsseite des Remodelings von essentieller Bedeutung. Knochenresorption ermöglicht bei erhöhtem Kalziumbedarf (beispielsweise in der Schwangerschaft) eine Aufrechterhaltung des Kalziumhaushaltes, indem Kalzium aus dem Knochen mobilisiert wird.¹ Für die Funktion des Knochens als Sitz des blutbildenden Systems hält die fortwährende Knochenresorption den Markraum für das hämatopoetische Gewebe offen.²⁵

1.2 Knochenzellen

Die Aufgabe, den ausgewachsenen Knochen an alle diese Anforderungen anzupassen, wird im Wesentlichen von zwei hochspezialisierten Zelltypen übernommen: Osteoblasten und Osteoklasten. Diese beiden Zelltypen fungieren als Antagonisten im Wechselspiel von Knochenbildung und Knochenresorption.

Auf der Seite der Knochenbildung steht der Osteoblast. Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, die sich aus mesodermalen Keimbahnzellen entwickeln.⁷ Terminal differenzierte Osteoblasten synthetisieren Osteoid, die Knochenmatrix, die zum größten Teil aus Kollagen Typ I besteht. Durch Anlagerung von Hydroxylapatitkristallen an diese organische Matrix bildet sich die mineralisierte Knochensubstanz.^{38;53}

Auf der Seite des Knochenabbaus steht der Osteoklast. Diese Zelle besitzt als einzige die besondere Fähigkeit der Knochenresorption. Der Osteoklast ist multinukleär mit 2 bis 10 Zellkernen und hat eine Größe von 50 bis 100 μm . Er hat einen polaren Aufbau mit funktionell bedingten Unterschieden zwischen dem apikalen (knochennahen) und dem baso-lateralen (markraumnahen) Pol der Zelle. Der apikale, dem Knochen zugewandte Pol, zeigt eine intensive Anfärbung in der Peripherie, die durch die dicht gelagerten Filamente des Adhäsionsapparates („sealing zone“)⁵² entsteht. Hier besteht eine inhomogene, dreidimensionale Zell-Substrat-Interaktion,³⁹ die mit einem Abstand von 0,2 bis 0,5 nm den engsten Kontakt zwischen Osteoklast und Knochenmatrix bildet (Abb.1).

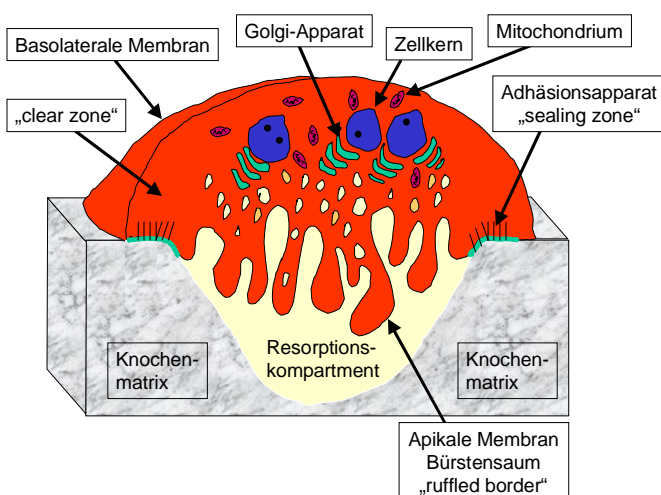


Abb.1: Schema eines aktiv resorbierenden Osteoklasten. Wasserstoffionen und proteolytische Enzyme werden auf der knochenzugewandten Seite des Osteoklasten sezerniert. Das entstehende saure Milieu im Resorptionskompartiment führt zu einer Lösung der anorganischen Bestandteile des Knochens, so daß die freigelegten organischen Bestandteile von den Enzymen degradiert werden können

Das äußere, den Adhäsionsapparat umgebende Zytoplasma, wird deskriptiv als „klare Zone“ („clear zone“) bezeichnet, da es weitgehend frei von Zellorganellen ist (Abb.1). Hier befinden sich kontraktile Proteine in hoher

Konzentration.³⁵ Im Zentrum des apikalen Pols ist die Zellmembran bei aktiv resorbierenden Osteoklasten stark gefaltet und entspricht damit einem Bürstensaum ("ruffled border") (Abb.1). An dieser Stelle werden Wasserstoffionen und Enzyme sezerniert, die zur Auflösung der Knochensubstanz führen, so daß sich unter dem Osteoklasten das Resorptionskompartiment ausbildet. Der Osteoklast besitzt ein stark basophiles, granuliertes Zytoplasma mit unterschiedlich großen Vakuolen, die hauptsächlich zwischen den Zellkernen und dem Bürstensaum angeordnet sind. Die Zellkerne zeigen ein heterogenes Muster in Größe, Form und Basophilie. Dieses ist möglicherweise ein Ausdruck der asynchronen Fusion von mononukleären Vorläuferzellen.⁴⁰ Im Gegensatz zur apikalen Membran ist die baso-laterale Zellmembran des Osteoklasten als Abgrenzung gegen die umgebenden Knochenmarks- oder Bindegewebszellen glatt begrenzt (Abb.1). Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenformation durch Osteoblasten führen im Rahmen des Remodelings zu einem ständigen Umbau des Knochens. Erst durch diese permanente Erneuerung des Knochens erhält das Skelett die Flexibilität, sich an veränderte Belastungssituationen anzupassen und jederzeit die Knochenstruktur optimieren zu können. Resorption und Formation sind unter physiologischen Bedingungen dabei so balanciert, daß am Ende ein stabiler, allen Anforderungen genügender Knochenbau steht. Die zielgerichtete Aktivität von Osteoklasten, die durch Resorption der von Osteoblasten gebildeten Knochensubstanz die biomechanisch optimierte dreidimensionale Struktur geben, ist für diesen Prozeß essentiell. Folglich ist eine uneingeschränkte physiologische Funktion des Osteoklasten unbedingte Voraussetzung für einen gesunden Knochen, und Beeinträchtigungen dieser Funktion führen unweigerlich zu pathologischen Veränderungen des Skelettsystems.

1.3 Klinische Bedeutung der Knochenresorption

Eine Unterfunktion von Osteoklasten bei gleichzeitig unbeeinträchtigter Osteoblastenfunktion führt zur Osteopetrose.²⁵ Diese relativ seltene Krankheit (Inzidenz zwischen 1:20.000 und 1:100.000⁵⁶) wurde 1903 zum ersten Mal von dem Hamburger Professor Heinrich Ernst Albers-Schönberg beschrieben.²

Besonders die maligne, autosomal rezessive Form der Osteopetrose verursacht bei Patienten massive Beeinträchtigungen (Abb.2). Durch die knöcherne Durchbauung des Markraumes mit Verdrängung der Blutbildung kommt es zu Anämie, Infektionsneigung und, durch die kompensatorische



extramedulläre Blutbildung, zu Hepatosplenomegalie. Die Einengung der craniellen Foramina führt zu Druck auf die Hirnnerven. Daraus ergeben sich neurologische Komplikationen, die von einer Beeinträchtigung des Visus mit Nystagmus bis zu vollständiger Blindheit, Taubheit und Lähmung der Gesichtsmuskulatur führen.⁵⁶

Abb.2: Knochenbefund bei Osteopetrose. Das Röntgenbild zeigt in der seitlichen Projektion die Veränderungen am Schädel, die in diesem Fall zur vollständigen Erblindung der Patientin führten. Aufgrund ausbleibenden Zahndurchbruchs mußten die Zähne kieferchirurgisch entfernt werden. Die Markhöhle der Tibia ist vollständig mit Knochen ausgefüllt. Aufgrund der veränderten Knochenstruktur hatte die Patientin bereits mehrere Frakturen erlitten. Der Pfeil zeigt auf einen frischen Frakturspalt (Schädel und Unterschenkel; weiblich; 5 Jahre).

Eine Einengung der Hypophyse kann zu Hypopituitarismus mit multiplen endokrinen Störungen führen. Weiterhin resultiert eine Beeinträchtigung der Knochenresorption in verzögertem Skelettwachstum, Kleinwuchs, verspätetem oder ausbleibendem Zahndurchbruch und einer erhöhten Frakturneigung der Knochen aufgrund ihrer verminderten Elastizität.

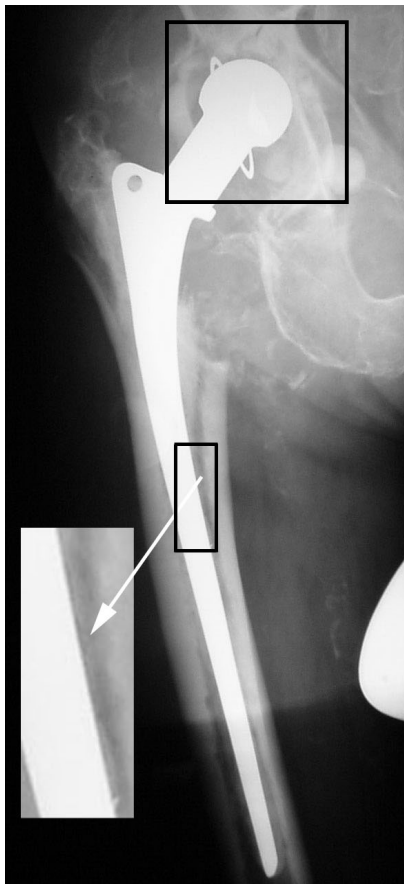
Ebenfalls zu Stabilitätsverlust, und zwar durch Abbau von Knochen, führt eine Überfunktion der Osteoklasten. Wichtigstes Beispiel hierfür ist die Osteoporose, bei der es zu einer Stimulation der osteoklastären Resorption nach Ausfall der Gonadenfunktion kommt. Die Osteoporose ist die häufigste Krankheit der westlichen Welt. 30-40% der Frauen erleiden eine osteoporotische Fraktur im Laufe ihres Lebens. Bei den über 50jährigen sind es schon 54%. Dazu kommen noch, wenn auch in sehr viel geringerem

Prozentsatz, osteoporotische Frakturen bei Männern.¹¹ Die Wahrscheinlichkeit, eine Wirbelkörperfraktur zu erleiden (Abb.3) steigt ab dem 60. Lebensjahr um das 20fache, das Risiko eine Schenkelhalsfraktur zu erleiden sogar um das 50fache.⁷⁰ Eine Störung der Osteoklastenphysiologie erhöht nicht nur die Wahrscheinlichkeit, daß ein Knochen bricht, sondern beeinträchtigt auch den anschließenden Heilungsprozeß.
36;54



Abb.3: Kontaktradiographie einer osteoporotischen Wirbelsäule. Deutlich zu erkennen sind die rarefizierte Spongiosastruktur, die fast nur noch aus cranial-caudal gerichteten Elementen besteht und die multiplen Wirbelkörperfrakturen (BWK 7-12; weiblich; 78 Jahre).

Da Osteoklasten die einzigen Zellen sind, die Knochen resorbieren können, sind sie für jede Knochenumstrukturierung, wie sie auch im Rahmen der



Frakturheilung auftritt, von besonderer Bedeutung. Eine Frakturheilungsstörung bei gesteigerter Resorption und/oder verminderter Knochenneubildung ist unmittelbar nachvollziehbar. Aber auch eine zu geringe Resorptionsfähigkeit verhindert die nötige Dynamik eines ideal an die, nach einer Fraktur veränderten biomechanischen Verhältnisse, angepaßten Knochenremodelings.³⁶ Eine wesentliche Rolle spielen Osteoklasten auch bei der Lockerung von Implantaten (Abb.4).

Abb.4: Radiologische Dokumentation der katastrophalen Folgen osteoklastenassoziierter periprothetischer Lyse bei der Hüft-Totalendoprothese. Die künstliche Hüftpfanne ist vollständig disloziert und der Schaft der Prothese wird kaum noch von der umliegenden Kortikalis eingefasst. In der Ausschnittsvergrößerung stellt sich der periprothetische Lysesaum um den Prothesenschaft deutlich als Aufhellung dar (weiblich; 76 Jahre).

Dies geschieht durch Resorption von Knochen an vom Chirurgen unerwünschten Stellen – zum Teil vermutlich stimuliert durch osteoklastogene Abriebpartikel,⁴² insbesondere in Verbindung mit einer Stimulation über Endotoxine,¹⁰ zum Teil wahrscheinlich gesteuert über die veränderte Biomechanik im mit Implantaten versorgten Knochen.³³

Außerdem ebnen Osteoklasten Tumorzellen den Weg zu invasivem Wachstum, ermöglichen eine Metastasierung im Knochen und schwächen dadurch an dieser Stelle die Struktur, was wieder zu einer erhöhten Frakturneigung mit allen Komplikationen führt (Abb.5).¹⁶



Abb.5: Kontakttradiographie einer Tumorosteolyse im coxalen Femur, entstanden durch osteoklastäre Resorption (Aus Amling und Dellling³).

Die hohe Morbidität, die aus osteoklastenassoziierten Erkrankungen erwächst, stellt nicht nur eine starke Belastung der betroffenen Individuen und ihrer direkten Umwelt dar, sondern verursacht auch einen enormen volkswirtschaftlichen Schaden. In Europa kostet die Behandlung von Krankheiten, die durch Fehlfunktion von Osteoklasten mitbedingt sind, insbesondere der Osteoporose, mehr als € 8 Milliarden /Jahr.²³

1.4 Therapieansätze zur Beeinflussung der Knochenresorption

Der erhebliche Forschungsaufwand, der in den letzten Jahren getrieben wurde um Therapiestrategien gegen diese Krankheiten zu erarbeiten, hat unter anderem zur Entdeckung der pharmakologischen Wirkung von Bisphosphonaten als Resorptionshemmer geführt.²⁷ Diese Wirkung beruht auf einer Hemmung des Mevalonsäurestoffwechsels im Osteoklasten.⁹ Bisphosphonate sind sehr gut wirksam gegen pathologische, hochaktive Knochenresorptionsprozesse, wie sie im Rahmen von osteolytischen Knochenmetastasen und der „High-Turnover-Osteoporose“ auftreten.^{17;37} Außerdem helfen sie gegen die Schmerzen, die bei der

Knochenmetastasierung entstehen.¹⁷ Weniger effektiv sind die Bisphosphonate bei langsamen Resorptionsprozessen, wie der „Low-Turnover-Osteoporose“.

Auch durch die Bisphosphonate ist es jedoch immer noch nicht möglich, einmal verlorenen Knochen wiederzugewinnen. Im günstigsten Fall gelingt es, die Knochenmasse in dem Stadium einzufrieren, das zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Knochenmasseverlustsyndroms besteht. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß die zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Ausbildung dieser Krankheitsbilder führen, noch nicht genau genug verstanden sind, um effektive Therapien erarbeiten zu können. Dies verdeutlicht, daß ein tieferes Verständnis der Steuermechanismen der osteoklastären Resorption von unmittelbarer Bedeutung für die Einführung suffizienter Präventionsmaßnahmen, sowie ursachenorientierter Therapiekonzepte osteoklastenassoziierter Erkrankungen ist.

Die Untersuchung dieser Steuermechanismen, die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten regulieren, muß dabei entsprechend den Krankheitsmechanismen auf zwei verschiedenen Ebenen erfolgen. Um Krankheiten, wie die Osteopetrose, besser verstehen zu lernen, die auf einem lokalen, zellulären Defekt des Osteoklasten beruhen, ist es notwendig, lokal die zelluläre und interzelluläre Steuerung des Osteoklasten zu studieren. Zum Verständnis von globalen Krankheitsgeschehen, wie der Osteoporose, muß diese Untersuchung auch unter Berücksichtigung der systemischen, den ganzen Organismus betreffenden Pathophysiologie erfolgen.

1.5 Untersuchung der Osteoklastenfunktion im Mausmodell

In den letzten Jahren hat sich für die Untersuchung von Osteoklasten *in vivo* das Mausmodell als besonders günstig erwiesen. So kamen zum Beispiel die Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Osteopetrose im Wesentlichen aus Studien an Mäusen mit spontanen Störungen der Osteoklastendifferenzierung oder Funktion.⁶⁶⁻⁶⁸ Ein Beispiel hierfür ist die op/op-Maus, ein Mausstamm mit angeborener Osteopetrose aufgrund einer Störung der Osteoklastendifferenzierung.⁶⁹ Bei diesen Tieren konnte eine Punkt-Mutation gefunden werden, die zu einem Transkriptionsabbruch in dem Gen führt das für M-CSF codiert.⁷² Die Behandlung dieser Mäuse mit rekombinantem M-CSF

führt zu vollständiger Heilung der Osteopetrose.²⁴ Damit wurde M-CSF als wichtiger Faktor für die Osteoklastendifferenzierung identifiziert.

Die neueren Entwicklungen in der Molekularbiologie erlauben es heute, gezielt die Bedeutung einzelner Gene für die Osteoklastendifferenzierung und -funktion zu untersuchen.⁶ Dabei kann die Funktion dieser Gene sowohl verstärkt werden (Überexpression), vermindert werden (dominant negativer Ansatz, Untersuchung von heterozygoten Tieren) oder ganz ausgeschaltet werden (Gen-Knockout). An zwei Beispielen lassen sich die Möglichkeiten, die sich durch die Mausgenetik für Untersuchungen zur Knochenresorption ergeben besonders anschaulich verdeutlichen: Den *opg*^{-/-} (Abb.6 A/B) und *c-src*^{-/-} Mäusen (Abb.6 C/F), die eine Osteopenie, bzw. eine Osteopetrose aufweisen.

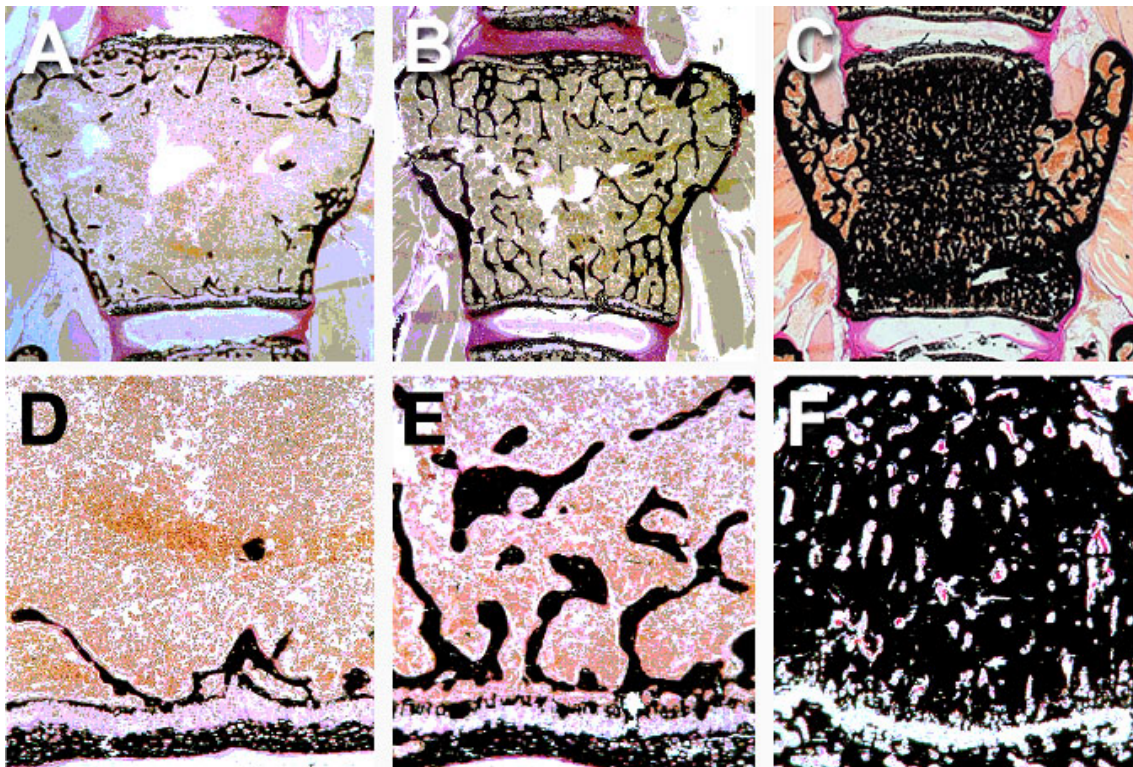


Abb.6: Auswirkung einer Osteoklastenüberfunktion (A,D *opg*^{-/-} Maus) bzw. einer Osteoklastenunterfunktion (C,F *c-src*^{-/-} Maus) auf die Knochenstruktur (B,E normale Knochenstruktur bei Kontrollmäusen) (unentkalkte Histologie, lumbale Wirbelkörper, Färbung: Von Kossa, Vergrößerung: A-C: 10x; D-E: 30x).

Die starke Osteopenie, die sich bei Defizienz von *opg* zeigte, führte zur Identifizierung der hemmenden Wirkung seines Genproduktes Osteoprotegerin

(OPG) auf die osteoklastäre Differenzierung und Funktion.⁵⁵ OPG ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, das in der Lage ist, die späte Phase der Differenzierung von der mononukleären hämatopoetischen Vorläuferzelle zum Osteoklasten zu inhibieren. Es ist ein lösliches Mitglied der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR). Als einzigem Mitglied der TNFR-Familie fehlt OPG eine transmembranäre Domäne, was darauf schließen läßt, daß es ein löslicher Zytokinrezeptor ist. Im Gegensatz zu Osteopenie bei OPG-Defizienz,¹³ führt die Überexpression von OPG bei transgenen Mäusen zu einer schweren Osteopetrose.⁵⁵ Im Jahr nach der Entdeckung von OPG wurde gleichzeitig von zwei unabhängigen Gruppen ein Ligand für OPG (OPGL) gefunden.^{32;71} OPGL ist ein aus 137 Aminosäuren bestehendes Typ II-Transmembranprotein. Es kommt membrangebunden und als lösliche C-terminale Form vor. Ein Vergleich mit bekannten Sequenzen ergab eine Identität mit RANKL (Receptor Activator for NFkappaB Ligand),⁷¹ welcher essentiell für die Aktivierung von T-Zellen und dendritischen Zellen ist. RANKL wurde als endgültiger Name für das Molekül festgelegt.

Die ausgeprägte Osteopetrose, bei Fehlen von *c-src* führte zur Charakterisierung vom *c-Src* als essentiellen Faktor bei der zytoskelettalen Organisation des resorbierenden Osteoklasten. *c-src* codiert für die 60 kDa Tyrosinkinase *c-Src*. *c-src*^{-/-} Mäuse sind durch eine Osteopetrose mit einem fehlenden Zahndurchbruch, langsamerem Wachstum, kürzeren und deformierten Röhrenknochen mit Einengung der Markhöhle und durch eine hohe trabekuläre Knochendichte gekennzeichnet. Diese Befunde sind Folge einer fehlenden osteoklastären Resorption. Ultrastrukturell fehlt *c-src*^{-/-} Osteoklasten der Bürstensaum („ruffled border“), so daß es nahe liegt, daß *c-Src* eine Funktion im vesikulären intrazellulären Transport zukommt. *c-Cbl* konnte als Substrat von *c-Src* nachgewiesen werden.⁶² *c-Cbl* ist ein 120 kDa Protein zu dessen strukturellen Besonderheiten ein hoher Anteil basischer Aminosäuren, ein C-terminaler möglicher Leucin-Zipper und ein zinkfingerartiges Motiv (beides Struktur motive von einigen DNA bindenden Proteinen) gehören. Im Osteoklasten konnte gezeigt werden, daß *c-Src* und

c-Cbl nicht nur Voraussetzung für die osteoklastäre Resorption sind, sondern daß c-Cbl in einer für die Knochenresorption notwendigen Signalkaskade unterhalb ("downstream") von c-Src positioniert ist.⁶²

1.6 Coupling von Knochenformation und Knochenresorption

Anhand dieser Mausmodelle ist die Rolle einzelner Gene für die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten gut untersucht worden, hingegen ist relativ wenig über die übergeordneten Prozesse bekannt, die die Knochenresorption regulieren. Die bisher gültige Theorie des funktionellen Couplings von Rodan und Martin aus dem Jahr 1981⁴⁸ besagt, daß die Osteoklastenfunktion direkt von der Osteoblastenfunktion abhängt und vice versa. Nach dieser Theorie führt also eine Steigerung der Knochenformation direkt zu einer Steigerung der Knochenresorption, wohingegen eine Verminderung der Formation durch Osteoblasten zu einer Herabregulierung der Resorptionsleistung durch Osteoklasten führt. Auf diese Weise bleibt die Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau erhalten und die Knochenmasse wird auf einem konstanten Niveau gehalten. Lange Zeit bestand das Postulat, daß sich Osteoklasten und Osteoblasten im Rahmen des Remodelings in einer Feedback-Schleife gegenseitig steuern. In der Tat konnten *in vitro* Experimente zur Osteoklastendifferenzierung zeigen, daß sich Maus-Osteoklasten nur bei direktem Kontakt mit Osteoblasten entwickeln.⁶⁰ Die Arbeitsgruppe um Suda konnte *in vitro* zeigen, daß die Effekte mehrerer Faktoren, wie zum Beispiel 1,25(OH)₂ Vitamin D₃, PTH, PTHrP, PGE₂, Oncostatin M und Il-6,⁵⁹ über Osteoblasten vermittelt werden. Diese Experimente schienen die Hypothese des direkten Couplings zu untermauern. Die Arbeitsgruppe um Karsenty konnte allerdings durch einen eleganten Versuch *in vivo* zeigen, daß es zumindest für die Funktion der Osteoklasten keiner direkten Mithilfe terminal differenzierter Osteoblasten bedarf.¹⁸ Sie nutzten dafür ein genetisches Modell, bei dem die Thymidinkinase aus dem Herpes Simplex Virus (HSV-TK) unter die Kontrolle des Osteocalcin-Promoters gestellt wurde. Da Osteocalcin selektiv von terminal differenzierten

Osteoblasten exprimiert wird, bilden entsprechend in diesem Modell auch nur terminal differenzierte Osteoblasten die HSV-TK. Die HSV-TK wandelt Ganciclovir in seinen toxischen Metaboliten um, so daß es möglich wird durch Gabe von Ganciclovir gezielt terminal differenzierte Osteoblasten auszuschalten. Es zeigte sich, daß in diesem Modell die osteoklastäre Resorption auch nach selektiver Ablation terminal differenzierter Osteoblasten unverändert bleibt. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zur Hypothese, daß die Osteoklastenfunktion durch die Osteoblastenfunktion reguliert wird und warf damit zum ersten Mal Zweifel an dem Konzept des direkten funktionellen Couplings zwischen Osteoblasten und Osteoklasten auf.

Wenn die Regulation zwischen Knochenresorption und Knochenformation nicht, wie von Martin und Rodan postuliert, allein auf lokaler, zellulärer Ebene erfolgt, muß es ein anderes, übergeordnetes Regulationszentrum geben, das die Konstanz der Knochenmasse gewährleistet. Den Ansatz für die Suche nach einem solchen Regulationszentrum lieferte die Kombination von zwei klinischen Beobachtungen:

1. Frauen in der Postmenopause entwickeln Osteoporose mit einer Erhöhung des Frakturrisikos.^{46;47}
2. Frauen mit Übergewicht sind wesentlich seltener von Frakturen betroffen, als normalgewichtige Frauen.^{26;45;65}

Auf diesen beiden Beobachtungen und der Tatsache aufbauend, daß Gonadenfunktion und Fettstoffwechsel über den Hypothalamus reguliert werden,^{28;58} konnte gezeigt werden, daß auch die osteoblastäre Knochenformation zum Teil über den Hypothalamus gesteuert wird.²⁰ Eine besondere Rolle bei dieser Untersuchung spielte das Hormon Leptin. Leptin ist ein Polypeptidhormon das aus 167 Aminosäuren besteht.⁷³ Es gibt zwei natürlich auftretende Mausmutationen, mit Fehlen der Leptin-Signalübertragung: Die *ob/ob*-Maus und die *db/db*-Maus. *ob/ob*-Mäuse haben eine Mutation in dem Gen, das Leptin codiert und *db/db*-Mäusen fehlt ObRb, der funktionelle Rezeptor für Leptin. Die Tiere entwickeln den gleichen Phänotyp: Sie sind hypogonad, stark übergewichtig und haben eine erhöhte

Knochenmasse bei erhöhter Knochenformation. Diese erhöhte Knochenformation beruht auf einem über den Hypothalamus vermittelten Effekt von Leptin. Damit wurde für die Steuerung der Knochenmasse ein Mechanismus entdeckt, der unabhängig von Knochenzellen auf zentraler Ebene in die Regulation der Skeletthomöostase eingreifen kann. Aus diesen Experimenten ergibt unter anderem die Frage, welche Rolle die Resorption für diese zentrale Regulation der Knochenmasse spielt.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Fragen zur osteoklastären Knochenresorption zu klären. Dabei sollte sowohl *in vitro*, auf zellulärer Ebene, als auch *in vivo*, im Organverbund untersucht werden, wie die Knochenresorption gesteuert wird und ob ein Coupling zwischen Osteoblasten und Osteoklasten besteht. Vor allem sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

- a) Können Osteoklasten ohne Anwesenheit von Osteoblasten entstehen?
- b) Beeinflußt umgekehrt ein Fehlen osteoklastärer Knochenresorption die osteoblastäre Knochenformation?
- c) Gibt es analog der hypothalamischen Steuerung der Knochenformation eine übergeordnete Steuerung der Osteoklastenfunktion, die die Balance zwischen Knochenresorption und Knochenformation gewährleistet?

- a) Können Osteoklasten ohne Anwesenheit von Osteoblasten entstehen?

Während die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Karsenty ein Coupling auf Funktionsebene zu widerlegen scheinen,¹⁸ wäre eine Steuerung von osteoklastärer Differenzierung über Osteoblasten weiterhin denkbar. Die von Osteoblasten unabhängige Hemmung der Knochenresorption über OPG, legt aber die Hypothese nah, daß es bei geeigneter Wahl der Kulturbedingungen mit einer Ausschaltung der inhibierenden Wirkung von OPG, möglich sein müßte, Osteoklasten ohne die Anwesenheit von Osteoblasten *in vitro* zu generieren. Wenn dies gelänge, wäre es ein weiterer Hinweis darauf, daß kein direktes funktionelles Coupling zwischen Osteoblasten und Osteoklasten besteht. Deshalb sollte aus humanen Blutstammzellen ein *in vitro*-Modell der Osteoklastendifferenzierung ohne Verwendung von supportiven osteoblastären Zellen entwickelt werden. Mit diesem Experiment sollte geklärt werden, ob für die osteoklastäre Differenzierung eine direkte Steuerung durch Osteoblasten unbedingt notwendig ist, oder ob sie auch unabhängig vom Verbund mit anderen Knochenzellen ablaufen kann. Ein weiterer Vorteil eines solchen

Modells wäre, daß es dadurch möglich würde, humane Osteoklasten direkt, ohne Umweg über das Tiermodell, *in vitro* zu untersuchen.

b) Beeinflußt ein Fehlen osteoklastärer Knochenresorption die osteoblastäre Knochenformation?

Da es bisher nicht möglich ist, Knochen *in vitro* zu generieren, kann diese Frage nur unter *in vivo* Bedingungen sinnvoll untersucht werden. Eine Möglichkeit wäre, die osteoklastäre Resorption durch medikamentöse Behandlung zu modulieren, um den Effekt auf die Knochenformation zu untersuchen. Diese Möglichkeit birgt aber die Gefahr möglicher Nebenwirkungen der medikamentösen Behandlung auf Formationsebene, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren würde. Um eine Aussage über die Steuerung der Knochenformation durch die Osteoklasten treffen zu können, wurde deshalb ein Modell verwendet, bei dem die osteoklastäre Resorption auf genetischer Ebene direkt im Osteoklasten blockiert ist, so daß eine normale osteoblastäre Funktion gewährleistet ist. Ein geeignetes Modell für diese Untersuchung ist die *c-src*^{-/-} Maus. In *c-src*^{-/-} Mäusen ist selektiv ein Gen inaktiviert, das für die resorptive Funktion von Osteoklasten notwendig ist. Diese Tiere haben dementsprechend voll differenzierte Osteoklasten, die aber durch eine zellautonome Störung nicht in der Lage sind, Knochen zu resorbieren. Sollte die Theorie des direkten funktionellen Couplings von Rodan und Martin korrekt sein, müßte aus der herabgesetzten Resorption eine Verminderung der Knochenformation resultieren, so daß die Knochenmasse bei diesen Tieren gleichbleiben, oder sich im Laufe des Wachstums sogar vermindern müßte. Falls hingegen die Knochenmasse bei diesen Tieren im Laufe des Lebens steigt, wäre damit auch der zweite Teil der Hypothese des direkten funktionellen Couplings widerlegt.

c) Gibt es eine zentrale Steuerung der Knochenresorption analog der hypothalamischen Steuerung der Knochenformation?

Die Tatsache, daß die Knochenformation zum Teil Leptin-abhängig über den Hypothalamus gesteuert wird, legt die Vermutung nahe, daß eine analoge zentrale Regulation auch für die Knochenresorption existiert. Um dies zu

untersuchen, sollte der Knochenphänotyp Leptin-defizienter (*ob/ob*) und Leptinrezeptor-defizienter (*db/db*) Mäuse hinsichtlich osteoklastärer Differenzierung und Funktion sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* untersucht werden. Dazu sollte als erster Schritt *in vivo* die Osteoklastendifferenzierung und -funktion bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen studiert werden. In einem zweiten Schritt sollten aus hämatopoetischen Stammzellen von *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen *in vitro* Osteoklasten differenziert und auf ihre Fähigkeit zur Knochenresorption untersucht werden. Der Einfluß, den der Hypogonadismus bei Fehlen von Leptin auf die Knochenresorption hat, sollte in einem dritten Schritt durch subkutane Gabe von Östrogen überprüft werden. Schließlich sollte überprüft werden, ob ein von dem Effekt auf die Knochenformation unabhängiger zentraler Regulationsmechanismus der Knochenresorption durch Leptin besteht, indem *ob/ob*-Mäusen Leptin zentral in den dritten Ventrikel appliziert wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Laborbedarf

Autoklav:	Blitz, KSG-Sterilisatoren (Olching)
Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus (Hanau)
Confokales Mikroskop:	Fluoview, Olympus (Hamburg)
Durchlichtmikroskop:	Axioskop II, Zeiss (Jena)
Gelkammern:	Sub Cell GT mit Powerpack 3000, Biorad (München)
Geldokumentation:	ChemiDoc, Biorad (München)
Inverses Mikroskop:	IX50/IX70, Olympus (Hamburg)
Kolbenhubpipetten:	Gilson (Villiers Le Bel, Frankreich) Eppendorf (Hamburg)
Kontaktradiograph:	Faxitron Cabinet System, Faxitron (Wheeling, USA)
Kühltruhen:	Economy, Liebherr (Biberach an der Riß) GFL 6648, GFL (Burgwedel)
Laminar-Flow Werkbank:	Herasafe, Heraeus (Hanau)
Mikrotom:	CUT 4060/E Microtec (München)
PH-Meßgerät:	pH 535, WTW (Ft. Myers, USA)
Thermocycler	iCycler, Biorad (München)
Zentrifuge:	CS-6, Beckmann (München)

Artikel für Zellkultur stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Falcon (Becton-Dickinson, New Jersey, USA), Sterifilter-Minisart von Sartorius (Göttingen). Kanülen und Zubehör für die peripherenvenöse Blutentnahme kamen von Sarstedt (Nümbrecht). Parafilm für Immunhistochemie wurde von American National Can (Chicago, USA) geliefert. Das notwendige Dentin wurde auf unseren Antrag vom Zoll/Bundesgrenzschutz zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Chemikalien und Antikörper

Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Na-Heparin kam von Roche (Mannheim). Ficoll-Paque wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) geliefert.

Alpha-modifiziertes minimal essentielles Medium (alpha-MEM), Fötale Kälberserum (Fetal Bovine Serum: (FBS)), Penicillin-Streptomycin-Lösung, rekombinanter humaner Makrophagenkolonie stimulierender Faktor (M-CSF) und Trypsin (10x) wurden bei Sigma (Deisenhofen) erworben. Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline (PBS)) war von GIBCO BRL, Life Technologies Inc. (Rockville, MD, U.S.A.). Rekombinanter humaner löslicher Rezeptor-Aktivator für NFkappaB Ligand (RANKL) kam von Peprotech Ltd. (London, U.K.). Rhodamin-Phalloidin wurde bei Molecular Probes (Leiden, Niederlande) gekauft. Fluoreszierende anti-Maus Sekundärantikörper lieferte Boehringer Mannheim (Mannheim). Fluorsafe wurde bei Dako Diagnostika (Hamburg) bestellt.

Placebo und 17beta-Östradiol Tabletten mit kontinuierlicher Wirkstoffabgabe zur subcutanen Implantation wurden bei Innovative Research of America (Sarasota, USA) gekauft. Der 23C6-Antikörper gegen die alpha_vbeta₃-Untereinheit des Vitronectin-Rezeptors wurde großzügigerweise von Dr. Michael Horton (London, U.K.) zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Primer und PCR-Chemikalien

Neo1 (5'-CTT ggg Tgg AgA ggC TAT TC-3'), Neo2 (5'-Agg TgA gAT gAC Agg AgA TC-3'), Tcrd1 (5'-CAA Atg TTg CTT gTC Tgg Tg-3'), und Tcrd2 (5'gTC AgT CgA gTg CAC AgT TT-3') Primer wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) bestellt.

Small DNA Low Melt Agarose kam von Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf). Rekombinante Taq DNA Polymerase einschließlich 10x PCR Puffer und 50 mM Magnesium-Chloridlösung kam von Invitrogen (Karlsruhe). DNeasy Tissue Kit wurde bei Qiagen (Hilden) bezogen. Die 20 bp und 100 bp DNA-Leitern kamen von Biowhittaker Molecular Applications (Vallensbaek Strand, Dänemark). Die 25mM dNTP-Lösung wurde von Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf) geliefert.

3.1.4 Medien, Lösungen und Puffer

Das Wasser für das Ansetzen sämtlicher Medien, Lösungen und Puffer stammte von einer sechsstufigen Membrapure-Filtrationsanlage (Membrapure, Bodenheim). Die Qualität dieses Wassers entspricht der von zweifach

destilliertem Wasser. Die angesetzten Lösungen, Medien und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert. Wenn keine dieser beiden Methoden anwendbar war, (z.B. bei hitzesensiblen oder leicht schäumenden Stoffen), wurde die Lösung mit sterilem Wasser unter sterilen Bedingungen angesetzt.

PCR-Gemisch

1 x		PCR-Puffer
2	mM	MgCl ₂
0.75	µM	Neo1-Primer
0.75	µM	Neo2-Primer
0.5	µM	Tcrd1-Primer
0.5	µM	Tcrd2-Primer
0.2	mM	dNTPMix (je dNTP)
12,5	U/nl	Taq Polymerase
0.125	µg/µl	Genomische DNA

Medium für Osteoklastenkultur

1000	ml	alpha minimal essentielles Medium
2,2	g	Natriumbikarbonat
10	%	FBS
1	%	Penicillin/Streptomycin
		pH 7.3

Fixierlösung

3.7	%	Formalin in PBS
-----	---	-----------------

Medium für Trypsinierung

100	ml	alpha minimal essentielles Medium
0,22	g	Natriumbikarbonat
10	%	Trypsin-EDTA (10x)
1	%	Penicillin/Streptomycin

Immunhisto-Lösung

100	ml	PBS
0,1	g	BSA
0,05	g	Saponin

Blocklösung = Antikörperverdünnungslösung

2,85	ml	Immunhisto-Lösung
150	µl	Serum des Wirts des sekundären Antikörpers (z.B. Normales Ziegen-Serum, wenn der sekundäre Antikörper aus Ziegen gewonnen wird)

TRAP-Puffer

40	mM	Na-Acetat (pH 5)
10	mM	Na-Tartrat

TRAP-Färbelösung

5	mg	Naphtol AS-MX Phosphat
500	µl	N-N-Dimethylformamid
50	ml	TRAP-Puffer
30	mg	Fast Red Violett LB Salt

3.1.5 Tiere

ob/ob- und *db/db*-Zuchtpaare und mutante Mäuse (C57BL/6J Lep^{ob}, C57BL/6J Lep^{db}) wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) geliefert. Sie erhielten eine standardisierte Diät (Purina #5001, PMI Nutrition International, Richmond, Indiana, USA). Die Untersuchungen an diesen Tieren fanden in Kooperation mit dem Labor von Dr. Karsenty, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA statt. Die *c-src*^{-/-} Mäuse B6.129S7-*Src*^{tm1Sor} wurden von Dr. Soriano im Labor von Dr. Bradley (Baylor College of Medicine, Houston, Texas) generiert und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Sie erhielten eine flüssige Diät (LD 82, Bioserv, Holton Industries Co., Frenchtown, NJ, USA) und per Hand zerkleinerte Nahrung.

Die Organentnahme war in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz beim Tierschutzbeauftragten des UKE, Dr. Dimigen, angemeldet.

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung von *c-src*^{-/-} Mäusen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien mit einem DNAeasy Kit isoliert. Die PCR erfolgte nach dem NEOTD-PCR-Protokoll (JAXMice, www.jax.org). Die Neo-Primer (Neo1, Neo2) liegen innerhalb der eingefügten Neo-Kassette und geben daher nur bei heterozygoten oder Knockout-Tieren ein Signal. Die Tcrd-Primer (Tcrd1, Tcrd2), die eine Untereinheit des T-Zell-Rezeptors amplifizieren, dienten als interne Kontrolle. Da homozygot *c-src*-defiziente Mäuse keinen Zahndurchbruch der Inzisoren haben, wurden heterozygote Tiere (*c-src*^{+/-} und homozygot *c-src*-defiziente Tiere (*c-src*^{-/-}) anhand des Zahnstatus unterschieden. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

1.	94° C	3'
2. 13x	94° C	20"
	64° C	30"
	72° C	35"
3. 26x	94° C	20"
	58° C	30"
	72° C	2'
4.	10° C	∞

Die PCR-Produkte wurde auf einem 2,5%igen Agarose-Gel durch Gelelektrophorese bei 40 V pro 10 cm Gel 3 Stunden separiert. Dabei läuft die Neo-Bande bei 280 bp, die Tcrd-Bande bei 200 bp.

3.2.2 Kontaktradiographie

Zu Dokumentationszwecken wurde von jeder Maus eine Kontaktradiographie erstellt (Röntgenfilme: x-omat MA Film, KODAK, Frankreich; x-ray cabinet,

Faxitron, USA). Die Radiographie wurde bei 30 kV und einer Dauer von einer Minute durchgeführt. Die Röntgenbilder wurden mit einem Lupenmikroskop (Olympus SZH10, Olympus, Tokio, Japan) photographisch dokumentiert und analysiert.

3.2.3 Histologie

Die quantitativen histomorphometrischen Untersuchungen sind an unentkalkten, Toluidin-blau- und von Kossa-gefärbten Schnitten der Lendenwirbelkörper und der proximalen Tibia durchgeführt worden. Nach der Präparation der Knochen wurden diese in 3,7% PBS-gepuffertem Formaldehyd für achtzehn Stunden bei 4° C fixiert.

Nach der Entwässerung der Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 80% Ethanol (2 Stunden), 90% Ethanol (2 Stunden), 96% Ethanol (2 Stunden), 100% Ethanol (3 Stunden), 100% Ethanol+Aceton (3 Stunden) und 100% Ethanol (3-8 Stunden) wurden die Tibiae und die Lendenwirbelsäule nach Infiltration in Methylmetacrylat (Merck, Darmstadt) unentkalkt in ein LPG-BPO-Methylmetacrylat-Gemisch (Merck, Darmstadt) eingebettet.

Nach der Aushärtung und dem Anschleifen wurden 5 µm Sagittalschnitte der Präparate an einem Rotationsmikrotom (Cut 4060E, MicroTech, München) angefertigt.

Die Schnitte wurden mit Toluidin-blau (1% Toluidin-blau bei pH 4,5 für 30 Minuten) und mit der modifizierten von Kossa-/van Gieson-Gegenfärbung gefärbt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Axioskop II (Carl Zeiss, Jena).

3.2.4 Histomorphometrie

Die quantitativen histomorphometrischen Untersuchungen sind an mit Toluidin-blau gefärbten Schnitten der Lendenwirbelkörper und der proximalen Tibia durchgeführt worden. Im Bereich der proximalen Tibia wurde der Bereich der Metaphyse 0,25 mm distal der Wachstumsfuge vermessen.

Unter Verwendung des Osteomeasure-Histomorphometrie-Systems (Osteometrix, Atlanta, GA) wurden analysiert: Das trabekuläre

Knochenvolumen (bone volume per tissue volume, BV/TV in %) und die Anzahl der Osteoklasten (Osteoclast number per bone perimeter, NOc/BPm in /mm). Die Untersuchung erfolgte nach standardisierten Protokollen^{5,43}.

3.2.5 Humane Knochenmarkgewinnung

Das Knochenmark wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. R. Zander zur Verfügung gestellt. Es wurde freiwilligen, gesunden Spendern in Intubationsnarkose oder unter Spinalanästhesie steril aus dem Beckenkamm entnommen. Für wissenschaftliche Zwecke konnten 50 ml des Knochenmarks benutzt werden, nachdem die Spender im Rahmen des Aufklärungsgespräches ihre Zustimmung dazu gegeben hatten. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde sofort nach Gewinnung 1% Heparin zum Knochenmark hinzugefügt. Das Knochenmark wurde vor der Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

3.2.6 Gewinnung periphervenösen Blutes

Peripheres Blut wurde aus der Vena cubitalis freiwilliger Probanden entnommen, unter sterilen Bedingungen in 50 ml Plastikröhrchen zur Verhinderung der Blutgerinnung mit 1% Na-Heparin versetzt und sofort auf Eis gekühlt.

3.2.7 Isolierung hämatopoetischer Stammzellen

Sowohl humanes Knochenmark als auch humanes periphervenöses Blut wurden zur Isolierung hämatopoetischer Stammzellen dem gleichen Protokoll unterzogen. Dafür wurde die Tatsache ausgenutzt, daß die mononukleäre Zellfraktion, die auch die Osteoklastenvorläufer enthält, eine geringere Dichte hat als Erythrozyten, Thrombozyten und reife Granulozyten, so daß es möglich ist, über einen Dichte-Gradienten diese Zellfraktionen zu trennen. Zur Auftrennung diente dabei Ficoll-Paque, das mit seiner Dichte von $1,0647 \pm 0,001$ g/ml unterhalb der Dichte der mononukleären Zellen, aber oberhalb der aus dem Versuchsansatz zu entfernenden Zellen liegt. So gelingt eine Trennung in drei Phasen, wobei die Ficoll-Paque-Phase zwischen mononukleärer Zellfraktion und unerwünschten Zellen liegt.

PBS und Ficoll-Paque wurden im Wasserbad auf 37° C erwärmt. 50 ml Knochenmark/Blut wurden mit PBS auf 200 ml verdünnt und in 4x50 ml Plastikröhrchen überführt. 8x50 ml Plastikröhrchen wurden mit je 25 ml Ficoll-Paque gefüllt. Die 200 ml mit PBS verdünntes Knochenmark/Blut wurden vorsichtig auf das Ficoll-Paque geschichtet, so daß sich zwei getrennte Phasen ergaben. Die Plastikröhrchen mit dem zweiphasigen Gemisch wurden mit 350xg bei einer Temperatur von 20° C 30 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurde die Einstellung eines Dichtegradienten erreicht, bei dem sich die mononukleären hämatopoetischen Vorläuferzellen auf der Grenze zwischen Ficoll-Phase und PBS-Phase befanden. Die Zentrifuge lief danach ohne Bremse aus, um die Phasen nicht durch die Bremsbeschleunigung wieder zu vermischen. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden vorsichtig aus je zwei Plastikröhrchen in ein neues überführt, so daß sich 4 Plastikröhrchen mit ca. 30-40 ml mononukleärer Zellen ergaben. Diese wurden ad 50 ml mit PBS aufgefüllt und mit 350xg bei 20° C 10 Minuten zentrifugiert. In allen weiteren Zentrifugationsschritten war die Bremse wieder aktiviert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Zur Reinigung der Zellen von Rückständen von Ficoll-Paque wurden die Zellpellets aus den 4 Plastikröhrchen in ein neues überführt. Nach Auffüllen ad 50 ml mit PBS wurde mit 350xg bei 20° C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen im Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. 10 µl dieser Zellösung wurden mit 990 µl Trypan-blau gefärbt, um in einer Neubauer-Zählkammer die Fraktion vitaler Zellen zu bestimmen.

3.2.8 Gewinnung von murinen hämatopoetischen Zellen

Zur Gewinnung von hämatopoetischem Gewebe wurden 3 Monate alte Mäuse getötet. Nach Desinfektion des Fells mit Alkohol konnten unter sterilen Bedingungen die langen Röhrenknochen und die Milz freipräpariert und entnommen werden. Die Markhöhle von Femur und Tibia wurde kurz oberhalb der Gelenke eröffnet und das hämatopoetische Gewebe durch mehrfaches Spülen mit serumfreiem Medium herausgewaschen. Die Milz wurde zuerst in einem Sieb zerkleinert, und dann ebenfalls mit serumfreiem Medium gespült, um die hämatopoetischen Vorläuferzellen zu gewinnen.

3.2.9 Kultivierung humaner Zellen

Die mononukleäre Zellfraktion aus humanem Knochenmark und humanem peripheren Blut wurde für die Zellkultur in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen wurden für 14 oder 21 Tage in Osteoklastenkulturmedium unter Anwesenheit von 20 ng/ml RANKL und 50 ng/ml M-CSF kultiviert. Die Hälfte des Mediums wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Kultur erfolgte für die TRAP-Färbung auf Plastikzellkulturschalen (24-well-plates), für Immunhistochemie auf mikroskopischen Deckgläsern und für die Untersuchung der Resorptionskapazität im Pit-Assay auf Dentin. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen auf den Plastikzellkulturschalen und auf den mikroskopischen Deckgläsern nach Entfernung der nichtadhärenten Zellen fixiert und gefärbt. Die Kulturen auf Dentin wurden für den Pit-Assay nach 14 oder 21 Tagen fixiert.

3.2.10 Kultivierung muriner Zellen

Murine hämatopoetische Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml unter Anwesenheit von 25 ng/ml RANKL, 40 ng/ml M-CSF und 10^{-8} M 1,25 Vitamin D₃ kultiviert. Die Hälfte des Mediums wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Kultur erfolgte für die TRAP-Färbung auf Plastikzellkulturschalen (24-well-plates) und für die Untersuchung der Resorptionskapazität im Pit-Assay auf Dentin. Nach 6 Tagen wurden die nichtadhärenten Zellen entfernt und alle Kulturen fixiert.

3.2.11 TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung erfolgte in humanen Kulturen nach 14 Tagen und in murinen nach 6 Tagen. Nach Absaugen des Mediums wurden die auf Plastikzellkulturschalen kultivierten Zellen für 5 Minuten in 3,7% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Danach wurde das Formaldehyd wieder abgenommen und die Zellen trockneten für 2 Minuten an der Luft. Zur Färbung wurde für 10 Minuten TRAP-Färbelösung auf die Kulturen gegeben. Das Ergebnis wurde unter Ausnutzung der Eigenfluoreszenz der Färbung im inversen Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 fotografiert und die Zahl der

multinukleären TRAP-positiven Zellen im inversen Labormikroskop IX50 gezählt. Dabei wurden Zellen mit drei und mehr Zellkernen und gleichzeitiger positiver TRAP-Färbung als Osteoklasten gewertet.

3.2.12 Immunfluoreszenz und confokale Lasermikroskopie

Zuerst wurden die mikroskopischen Deckgläser mit den Zellen auf einer Glas-Kulturschale in -20° C kaltem Azeton für 5 Minuten entwässert und auf Parafilm an der Luft getrocknet. Dann wurde 1:40 in PBS verdünntes Rhodamin-Phalloidin auf die Deckgläser gegeben und im Dunklen für 20 Minuten inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls im Dunklen durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurde zur Verminderung unspezifischer Färbung für 20 Minuten mit Blocklösung inkubiert. Vom primären Antikörper (Maus-anti-23C6) wurde eine Verdünnung von 1:40 in Antikörperverdünnungslösung hergestellt und die Zellen darin 120 Minuten inkubiert. Danach wurde drei mal fünf Minuten in Immunhistolösung gespült. Der sekundäre Antikörper (Anti-Maus-Fluorescein) wurde 1:100 verdünnt und blieb für 60 Minuten auf den Zellen. Danach erfolgten drei Waschschrte à 5 Minuten in PBS, wonach die mikroskopischen Deckgläser mit Fluosave auf Objektträgern im Kühlschrank über Nacht eingedeckelt wurden. Die Analyse erfolgte mit einem confokalen Lasermikroskop der Firma Olympus. Angeregt wurde mit einem kombinierten Argon-Krypton-Ionen-Laser mit zwei Wellenlänge 488 nm und 568 nm.

3.2.13 Resorptionsnachweis auf Dentin

Zum Nachweis der Resorptionsfähigkeit der Zellen blieben humane Zellen für 14 und 21 Tage auf Dentin, murine Zellen für 6 Tage. Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärenenten Zellen mit Natriumhypochlorit vom Dentin entfernt. Zur Visualisierung der Resorptionslakunen wurde das Dentin mit einer einprozentigen Toluidin-blau-Lösung gefärbt. Die Resorptionslakunen wurden fotografiert und histomorphometrisch vermessen.

3.2.14 Intracerebroventrikuläre Injektion

Die Einbringung der intracerebroventrikulären Pumpen in den 3. Ventrikel der Maus wurde im Labor von Dr. Karsenty (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) von Dr. Takeda durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit Avertin narkotisiert. Das Calvarium wurde unter sterilen Bedingungen in Höhe des Bregmas freigelegt und ein 0,7 mm Loch in das Calvarium gebohrt. Durch diesen Zugang wurde eine 28 Gauge-Kanüle (Brain Infusion Kit II, Alzet) in den dritten Ventrikel implantiert. Die Kanüle wurde am Schädel mit Cyanoacrylat befestigt und mit einem Tygon-Schlauch an eine osmotische Pumpe angeschlossen, die in eine dorsale subcutane Tasche der Tiere implantiert wurde. Die osmotische Pumpe lieferte 8 ng Leptin/h bzw. PBS als Kontrolle über 28 Tage.

3.2.15 Deoxypyridinolin Crosslinks / Leptin RIA

Deoxypyridinolin Crosslinks wurden im Labor von Dr. Karsenty im Morgenurin bestimmt. Dazu wurde ein Pyrilinks-D Immunoassay Kit (Metra Biosystems/Quidel Corporation, San Diego, USA) verwendet, bei dem die Standardisierung nach dem Kreatiningehalt des Urins erfolgt (Creatinine Kit, Metra Biosystems/Quidel Corporation, San Diego, USA). Leptin wurde im Labor von Dr. Karsenty mit einem Radioimmunoassay (Linco, St.Charles, USA) bestimmt.

3.2.16 Ovariectomie und subcutane Östrogenbehandlung

Für die Untersuchungen zur zentralen Regulation der Knochenmasse wurde von Dr. Takeda im Labor von Dr. Karsenty an 6 Wochen alten Weibchen eine Ovariectomie durchgeführt. Um für mögliche Operationsfolgen eine geeignete Kontrollgruppe zu erhalten, wurde eine Operation mit explorativem Charakter ohne Ovariectomie (Sham-Operation) durchgeführt.

Placebo und 17beta-Östradiol Tabletten mit kontinuierlicher Wirkstoffabgabe wurden subcutan in 6 Wochen alte weibliche Wildtyp- und ob/ob-Mäuse implantiert, um eine Östrogen-Serumkonzentration von 250 pg/ml zu erreichen. Die Tiere wurden nach 3 Monaten getötet.

3.2.17 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des „student's t-test“ (StatView®, Abacus Concepts Inc.1993).

Als signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen (SD).

3.2.18 Sicherheit und Entsorgung

Alle Chemikalien wurden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt. Ebenfalls diesen Bestimmungen entsprechend erfolgte auch die jeweilige Entsorgung. Abfälle, die Reste humaner Zellen enthielten, wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

4 Resultate

4.1 Osteoklastendifferenzierung ohne Osteoblasten

Humane Knochenmarkkulturen zeigen Osteoklastenmerkmale

In einem ersten Schritt der Arbeit sollte aus humanen Blutstammzellen ohne Verwendung supportiver Osteoblasten ein *in vitro* Modell der Osteoklastendifferenzierung entwickelt werden. Hierzu wurde zunächst aus humanem Knochenmark die mononukleäre Zellfraktion isoliert, und unter permissiven Bedingungen (alpha-MEM mit 10% FBS, 50 ng/ml M-CSF, 20 ng/ml RANKL, 37° C) kultiviert. Die Kultur zeigte nach zwei Wochen eine hohe Dichte multinukleärer Zellen. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zellen mit Formalin fixiert und gegen tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) gefärbt (Abb.7).

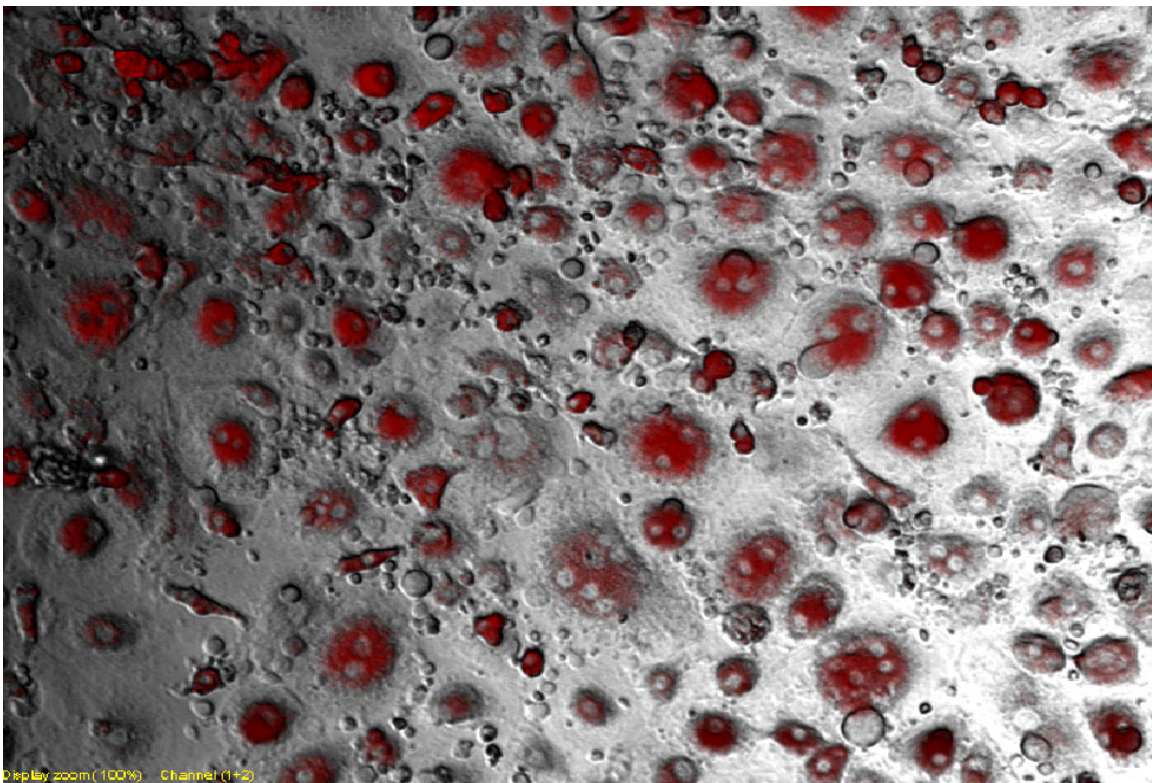


Abb.7: Humane Knochenmarkkultur, Tag 14, TRAP-Färbung, Laser-Scan-Mikroskopie, Vergrößerung 500x. Das Bild zeigt zwei typische Charakteristika von humanen Osteoklasten *in vitro*: Multinuklearität und Expression von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP, rot). Es verdeutlicht die hohe Potenz des Kultursystems hinsichtlich der Osteoklasteninduktion.

Dieses Enzym ist zwar nicht ausschließlich in Osteoklasten exprimiert, aber bei Färbung von Knochenmark wird es allgemein als Marker für Osteoklasten verwendet.⁶⁴ Hierbei zeigte sich in den Kulturen eine starke Expression von TRAP. Sowohl die gute Spezifität der Färbung als auch die hohe relative Ausbeute an Osteoklasten kann deutlich an den nur vereinzelt zu beobachtenden TRAP-negativen mononukleären Zellen abgelesen werden. Da TRAP aber ein Enzym ist, das auch in anderen Zellen gebildet wird, wurde zur weiteren Charakterisierung der Kultur, an den im gleichen Zeitraum auf mikroskopischen Deckgläsern kultivierten Zellen, eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen Aktin und den Vitronectin-Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ durchgeführt (Abb.8).

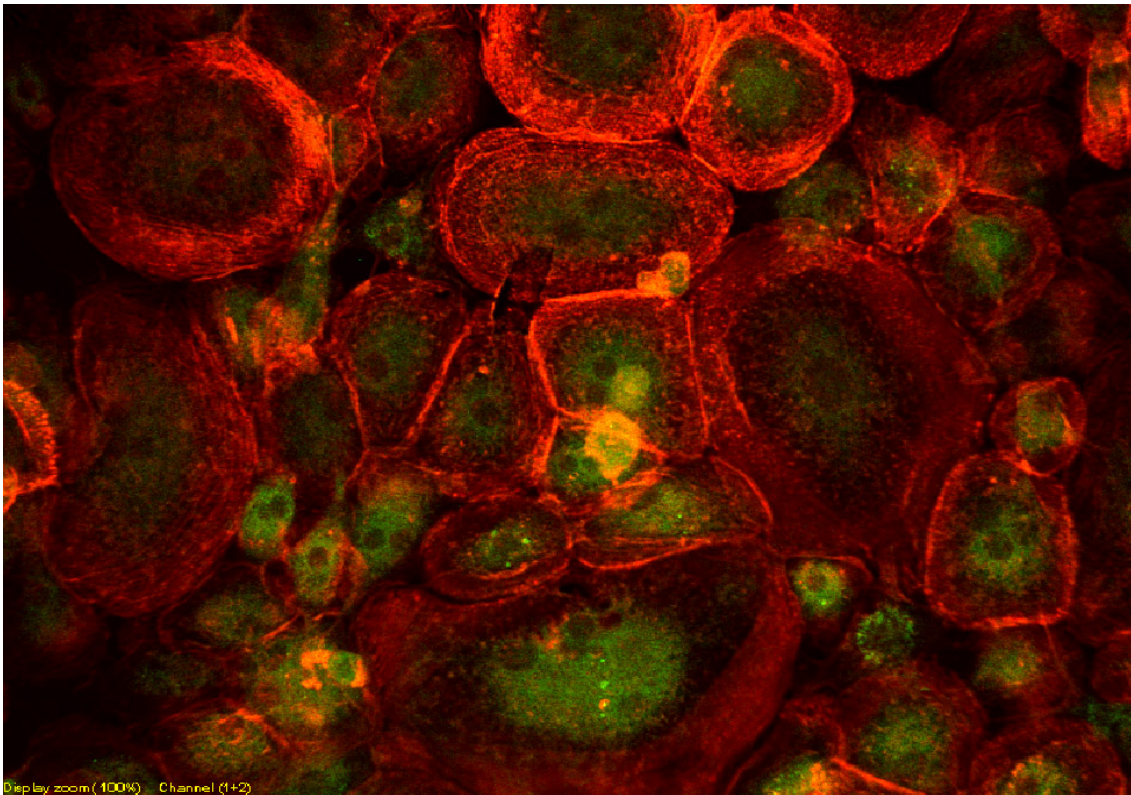


Abb.8: Humane Knochenmarkkultur, Tag 14, Immunfluoreszenzdoppelmarkierung (grün: Vitronectinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$), rot: Aktin-Zytoskelett), confokale Lasermikroskopie, Vergrößerung 1000x; die Kultur zeigt eine hohe Reinheit und sehr gute Ausbeute an osteoklastären Zellen. Die Lokalisation des Vitronectinrezeptors im Zytoplasma deutet auf eine niedrige Aktivität der Zellen hin.

Der Vitronectinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ ist sehr spezifisch in Osteoklasten exprimiert. Im confokalen Lasermikroskop zeigte die für Osteoklasten typische

ringförmige Anordnung der Aktinfilamente in der Peripherie, sowie eine hohe Expression des Vitronectinrezeptors im Zytoplasma. Die Lokalisation im Zytoplasma läßt auf einen relativ inaktiven Status der osteoklastären Zellen schließen. Ebenfalls sichtbar ist die große Ausbeute und hohe Reinheit an osteoklastären Zellen, die durch die hier vorgestellte Kulturmethode erreicht werden kann.

Resorbierende Osteoklasten entstehen in vitro in Knochenmarkkulturen

Wenngleich diese spezifische Färbung schon ein sicheres Indiz dafür darstellt, daß es sich in der Kultur um Osteoklasten handelt, so gilt als Beweis nur der Nachweis der Resorptionsfähigkeit. Zu diesem Zweck wurde die gleiche Kultur für 14 und 21 Tage auf Dentin durchgeführt (Abb.9).

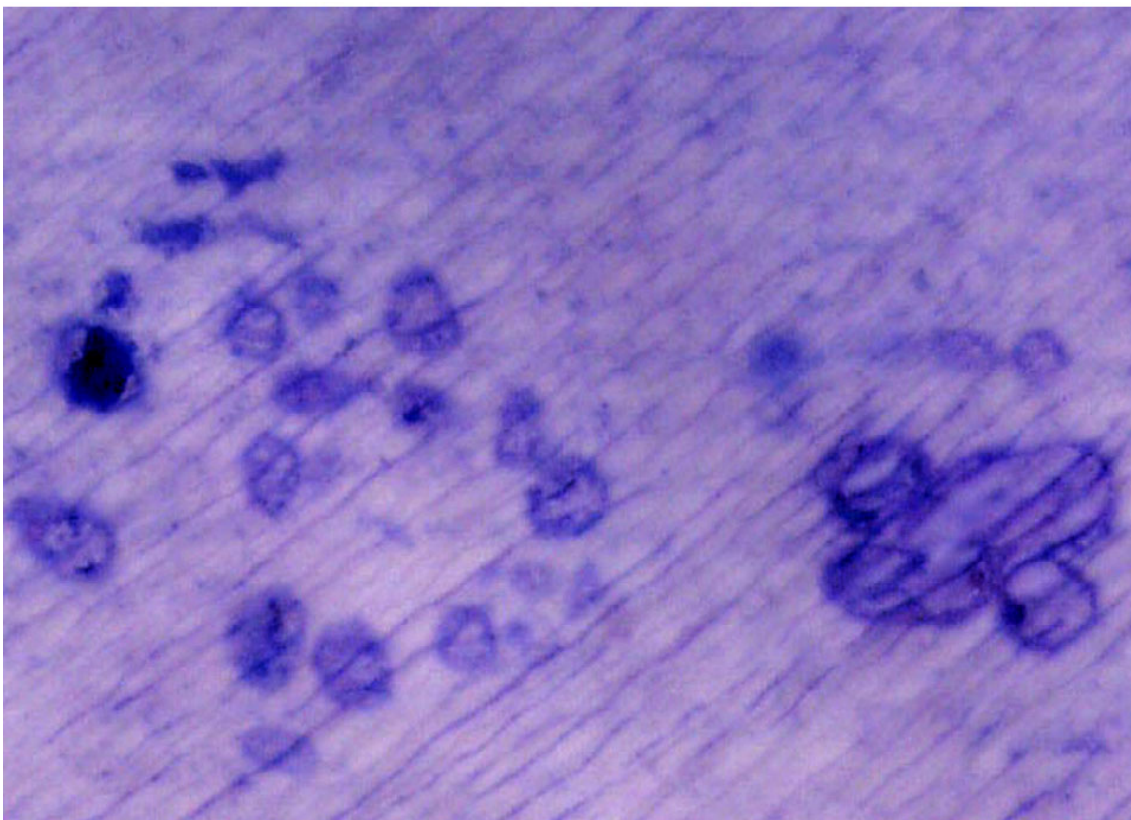


Abb.9: Humane Knochenmarkkultur, Tag 21, Pit Assay auf Dentin, Toluidin-blau Färbung, Vergrößerung 1000x. Das Vorhandensein der Resorptionslakunen auf Dentin beweist, daß die kultivierten Zellen in der Lage sind Knochen zu resorbieren.

Während nach 14 Tagen die Färbung mit Toluidin-blau keine Resorptionslakunen zeigt, sind diese nach 21 Tagen deutlich zu erkennen. Da

Osteoklasten die einzigen Zellen mit der Fähigkeit zur Knochenresorption sind, ist damit eindeutig bewiesen, daß es sich bei den beobachteten Zellen um Osteoklasten handelt. Diese Osteoklasten sind aus Knochenmarksstammzellen entstanden ohne daß supportive Osteoblasten zur Kultur hinzugesetzt worden wären.

Generierung von humanen Osteoklasten in vitro ohne Osteoblasten

Aufgrund der Technik der Knochenmarkstanze kann trotz der Isolierungsschritte zur Aufreinigung der mononukleären Osteoklastenvorläufer nicht völlig ausgeschlossen werden, daß Osteoblasten und/oder Osteoblastenstammzellen im verwendeten Knochenmark vorhanden sind. Zur weiteren Charakterisierung des Modells mit Ausschluß jeder osteoblastären Verunreinigung wurde daher die mononukleäre Zellfraktion aus dem peripheren venösen Blut freiwilliger Probanden isoliert. Aus der hämatologischen Transplantationsmedizin ist bekannt, daß auch im peripheren Blut hämatopoetische Stammzellen zirkulieren. Es wurde die in der Transplantation angewendete Technik zur Isolierung dieser Stammzellen adaptiert. Diese Technik beruht auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutbestandteile. Durch Verwendung einer Lösung, deren Dichte genau zwischen Erythrozyten und mononukleären Zellen liegt, können diese beiden Zellfraktionen über einen Zentrifugationsschritt getrennt werden. Die gewonnenen Zellen wurden im gleichen Kulturansatz kultiviert wie die Stammzellen aus dem Knochenmark.

Nach 14 Tagen zeigte sich auch hier eine homogene Kultur mit überwiegend multinukleären Zellen, die eine positive Färbung für TRAP aufwiesen (Abb.10). Das confokale lasermikroskopische Bild zeigte auch in diesem Kulturansatz die typischen Charakteristika osteoklastärer Zellen. In der Peripherie der Zellen bildete sich ein Aktinring aus und es fand sich eine kräftige Färbung für den Vitronectinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$) (Abb.11).

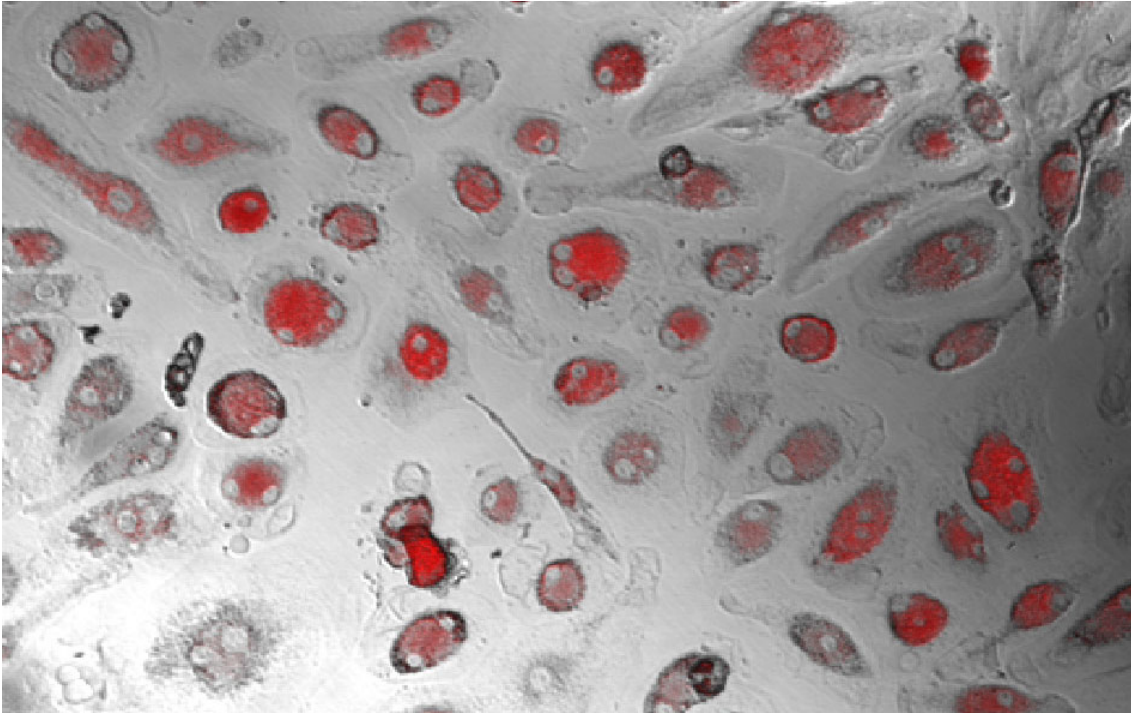


Abb.10: Kultur humanen, peripheren Blutes, Tag 14, TRAP-Färbung, Laser-Scan-Mikroskopie, Vergrößerung 500x. Es zeigt sich ein ähnlich gutes Ergebnis in der Kultur peripheren Blutes, wie in der Knochenmarkkultur. Sowohl Multinuklearität, als auch Expression von TRAP (rot) sind stark ausgeprägt.

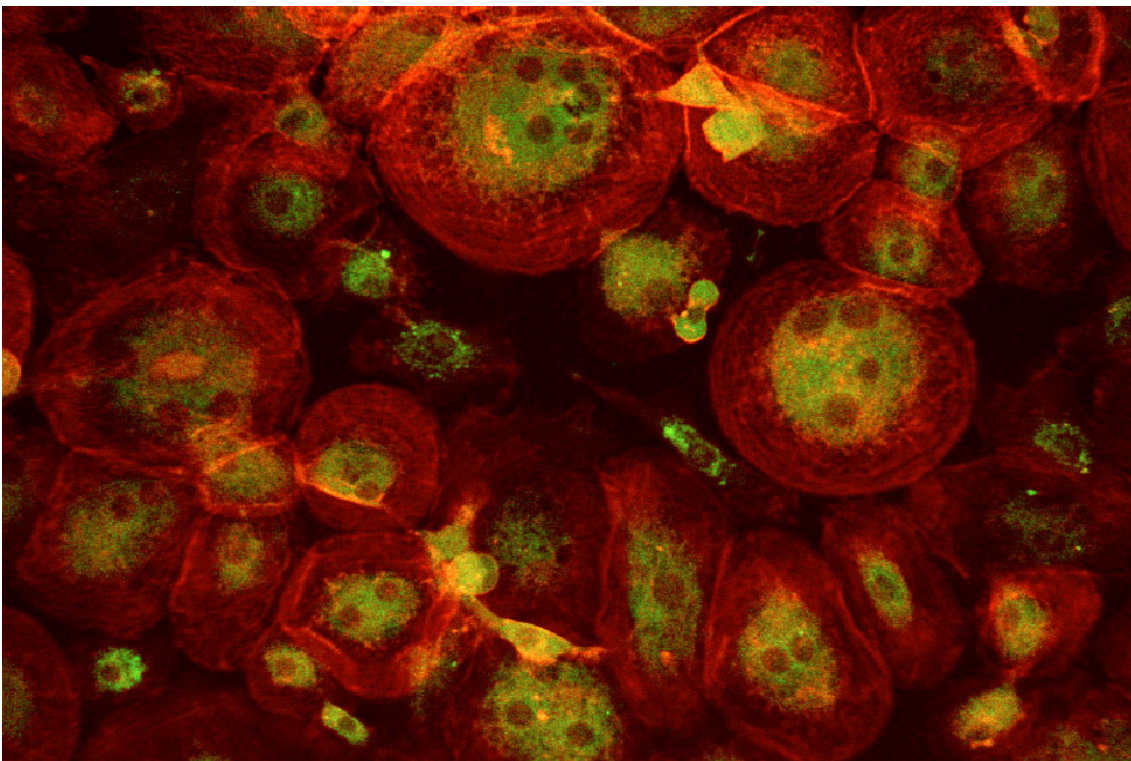


Abb.11: Kultur humanen peripheren Blutes, Tag 14, Immunfluoreszenzdoppelmarkierung (grün: Vitronectinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$), rot: Aktin-Zytoskelett), confokale Lasermikroskopie Vergrößerung: 1000x).

Diese Zellen waren ebenfalls nach 21 Tagen in Kultur in der Lage, Dentin zu resorbieren, wie der Resorptionsversuch auf Dentin zeigte (Abb.12). Aufgrund der ausschließlichen Verwendung von aus peripherem Blut isolierten Zellen für diesen Kulturansatz kann sicher davon ausgegangen werden, daß sich in der Kultur keine Osteoblasten befanden. Die Entwicklung von voll differenzierten, resorbierenden Osteoklasten in diesem Modell zeigt, daß für die Differenzierung von Osteoklasten *in vitro* keine Osteoblasten notwendig sind. Im Zusammenhang mit den Daten der Arbeitsgruppe um Karsenty,¹⁸ die zeigen, daß auch die Funktion von Osteoklasten unabhängig von der Osteoblastenfunktion ist, wird damit eine ausschließliche direkte Steuerung der Knochenresorption über Osteoblastenfunktion ausgeschlossen.

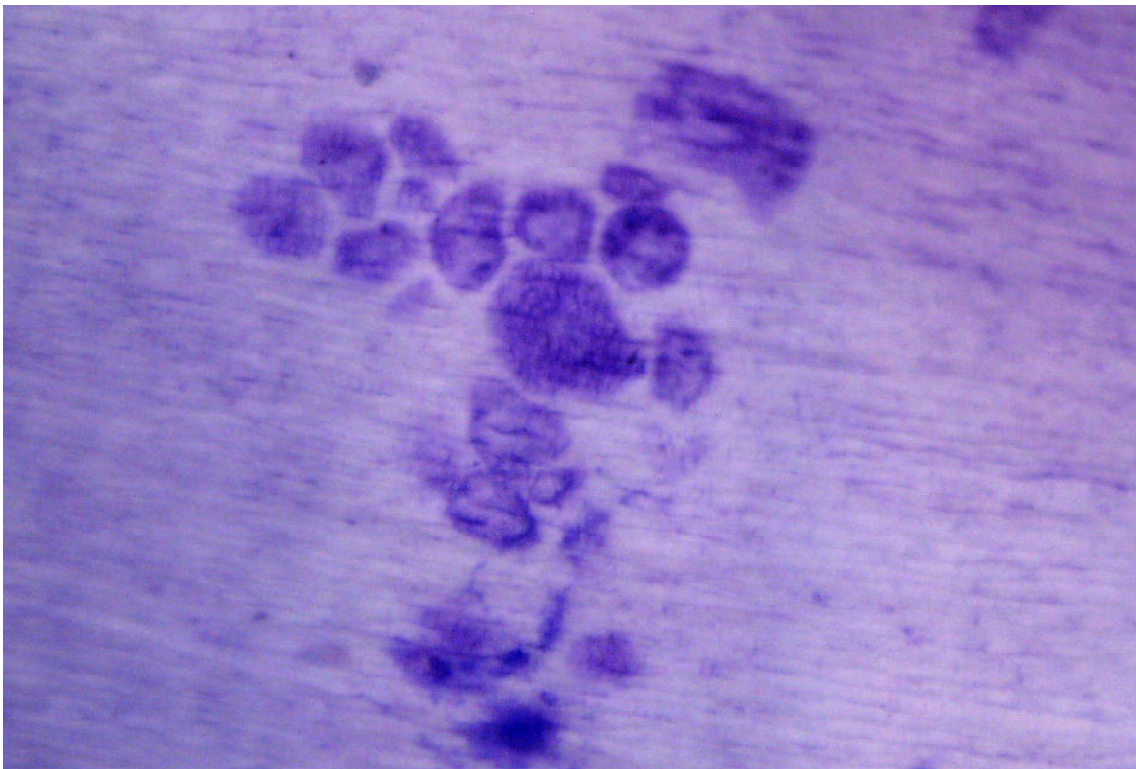


Abb.12: Kultur peripheren Blutes, Pit-Assay: Resorptionslakunen auf Dentin, Färbung: Toluidinblau, Vergrößerung: 1000x.

4.2 Progressive Osteopetrose bei Fehlen von c-Src

Steuert nun umgekehrt die osteoklastäre Resorption die Knochenformation? Diese Frage sollte in einem zweiten Schritt anhand eines Modells mit fehlender Knochenresorption bei intakter Differenzierung von Osteoklasten untersucht werden. Als solches Modell wurde die *c-src*-defiziente Maus gewählt, der eine

Tyrosinkinase fehlt (c-*Src*), welche für den Aufbau des Bürstensaums essentiell ist. So sind Osteoklasten in diesen Tieren zwar vorhanden, aber nicht in der Lage, Knochen zu resorbieren. Wenn es eine direkte Steuerung der Knochenformation über die Knochenresorption gibt, müßte es in diesem Modell zu einer Herabregulation der Knochenformation mit Stillstand oder sogar Regression der Osteopetrose kommen.

Es wurden von 3, 16 und 24 Wochen alten *c-src*-defizienten Mäusen Röntgenbilder angefertigt und die Wirbelsäulen der Mäuse histologisch aufgearbeitet und histomorphometrisch vermessen. Bereits die radiologische Diagnostik vermittelt den Eindruck, daß die Osteopetrose von *c-src*-defizienten Mäusen progressiv verläuft und gibt damit einen ersten Hinweis darauf, daß auch bei fehlender Knochenresorption weiterhin neuer Knochen gebildet wird (Abb.13).

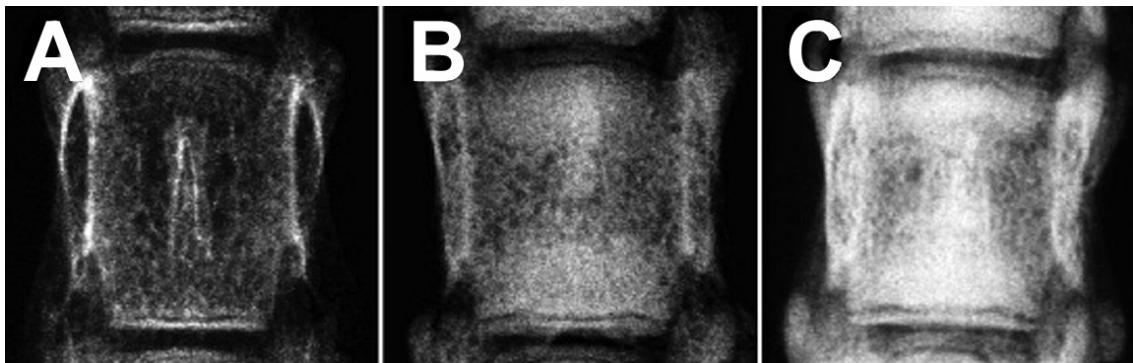


Abb.13: Progressive Osteopetrose bei *c-src*^{-/-} Mäusen (lumbale Wirbelsäule (LWK 3) a-p-Strahlengang, Kontaktradiographie, Vergrößerung: 10x) A. Wildtyp 16 Wochen; B. *c-src*^{-/-} 16 Wochen; C. *c-src*^{-/-} 24 Wochen.

Die histomorphometrische Quantifizierung der histologischen Schnitte bestätigt diesen Eindruck: In Übereinstimmung mit den Daten von Soriano et al.,⁵⁷ weisen schon 3 Wochen alte *c-src*-defiziente Mäuse aufgrund fehlender Resorptionskapazität der Osteoklasten eine Osteopetrose auf. Da bei *c-src*-defizienten Mäusen aufgrund der fehlenden Knochenresorption im Kiefer kein Zahndurchbruch erfolgt, verhungern sie normalerweise kurz nach dem Abstillen von der Amme. Aus diesem Grund konnte bisher der Knochen nur im Rahmen des frühen Wachstums untersucht werden. Die Verhältnisse im Knochen nach Abschluß des Wachstums, wenn das Remodeling die Hauptrolle im

Knochenstoffwechsel übernimmt, entzogen sich somit der Betrachtung. Um dieses Problem zu umgehen, wurden für die hier vorgestellte Untersuchung die Mäuse nach dem Abstillen mit Flüssignahrung am Leben erhalten. Hierdurch wurde es erstmalig möglich, die Entwicklung der Osteopetrose in alternden *c-src*-defizienten Mäusen zu verfolgen und damit die Bedeutung intakter Osteoklastenfunktion für das Remodeling zu untersuchen. Die statische Histomorphometrie bestätigte den im Röntgenbild angedeuteten progressiven Verlauf der Osteopetrose bei alternden *c-src*-defizienten Mäusen (Abb.14).

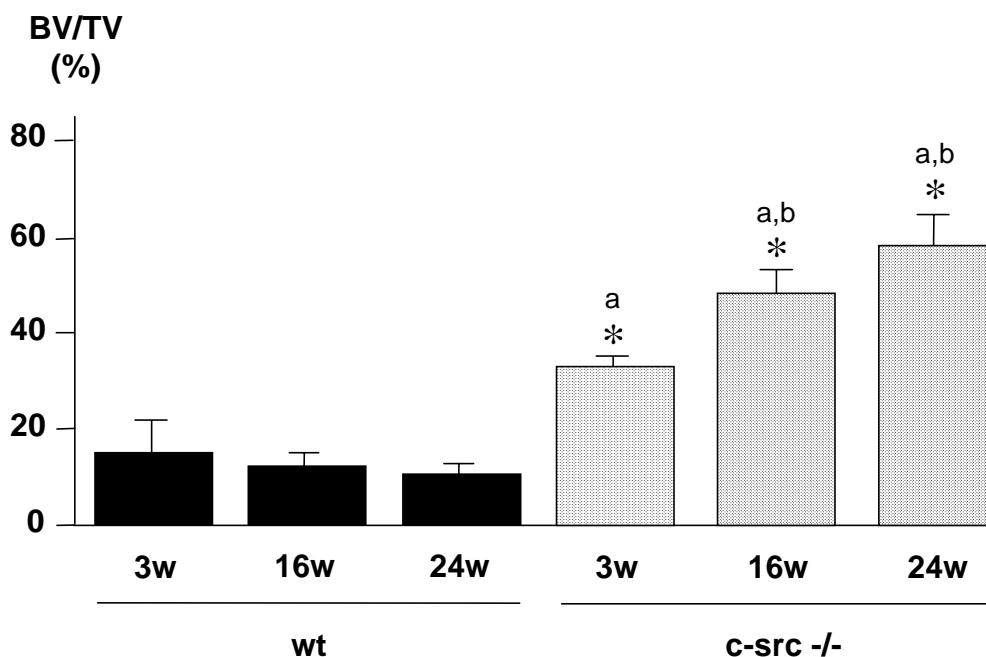


Abb.14: Progressive Osteopetrose bei *c-src*^{-/-} Mäusen als Ausdruck der kontinuierlichen osteoblastären Knochenneubildung bei fehlender osteoklastärer Knochenresorption ($n=5$ bei 3 und 16 Wochen alten Tieren; $n=3$ bei 24 Wochen alten Tieren; $*p<0,05$ a: gegen Wildtyp, b: gegen 3w *c-src*^{-/-}).

Es besteht also bei *c-src*-defizienten Mäusen kein Coupling auf funktioneller Ebene. Die osteoblastäre Knochenformation ist nicht auf eine vorausgehende Knochenresorption angewiesen. Die Src-Defizienz scheint sich in diesem Modell, eher als auf die Knochenformation, auf die Differenzierung von Osteoklasten auszuwirken.

Die histomorphometrische Quantifizierung der Osteoklastenzahl zeigt, daß die Zahl von Osteoklasten durch das Fehlen von Src altersunabhängig erhöht ist (Abb.15).

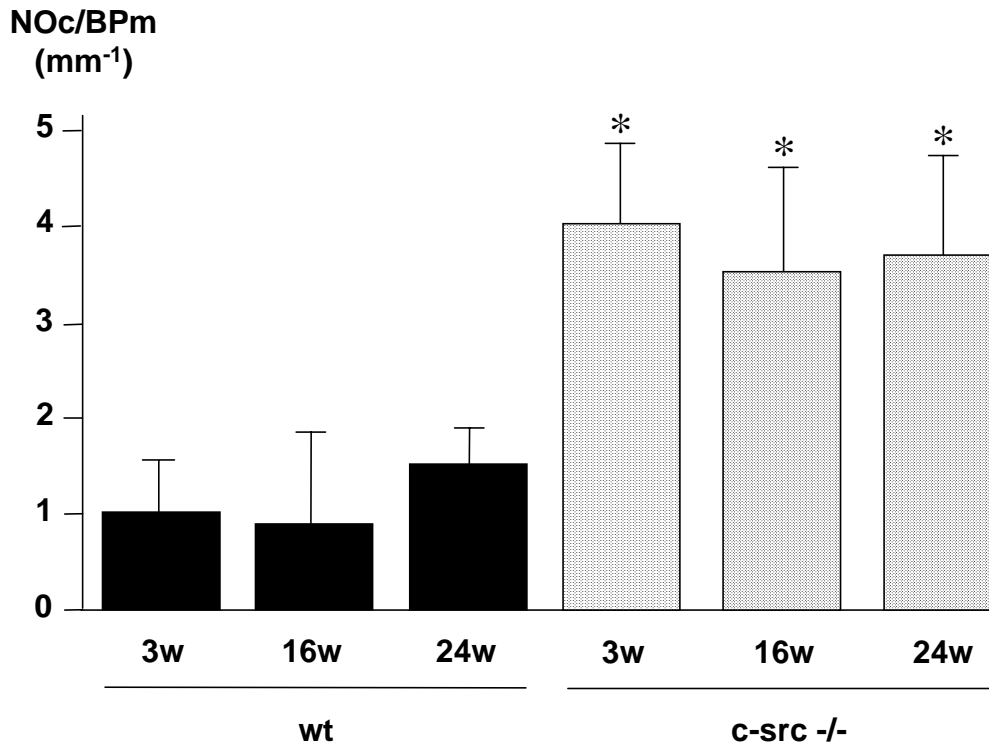


Abb.15: Erhöhte Anzahl von Osteoklasten bei *c-src*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren. Die *c-src*-Defizienz wirkt sich nicht negativ auf die Osteoklastendifferenzierung aus ($n=5$ bei 3 und 16 Wochen alten Tieren; $n=3$ bei 24 Wochen alten Tieren; $*p<0,05$ gegen Wildtyp).

Die bisherigen Ergebnisse zusammenfassend wurde im humanen System gezeigt, daß weder für die Differenzierung, noch für die Funktion von Osteoklasten eine Steuerung über die Osteoblastenfunktion notwendig ist und bei *c-src*-defizienten Mäusen konnte herausgearbeitet werden, daß die Knochenformation nicht über die Knochenresorption reguliert wird.

Wenn es lokal, auf Ebene der Knochenzellen keine Steuerung gibt, die die Balance zwischen Formation und Resorption im Rahmen des Remodelings aufrecht erhalten kann, muß es einen übergeordneten Regelkreis geben. Für die Suche nach einem solchen Mechanismus wurden zwei Mausmodelle gewählt, für die eine zentrale Steuerung der Knochenformation über ein hypothalamisches Relais bekannt ist: die *ob/ob*- und die *db/db*-Maus.

4.3 Osteoklasten und Leptin-Defizienz

Hohe Knochenmasse bei erhöhter Knochenresorption

Von Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen und Leptinrezeptor-defizienten *db/db*-Mäusen ist bekannt, daß sie eine erhöhte Knochenmasse bei einer Steigerung der Knochenformation haben.²⁰ Zur Untersuchung, ob zum Knochenphänotyp von *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen auch eine Veränderung in der Knochenresorption beiträgt, wurden *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse histologisch, radiologisch und histomorphometrisch studiert. Sowohl die Histologie, als auch die Kontaktradiographie von *ob/ob*-Mäusen zeigte erwartungsgemäß gegenüber den Wildtypkontrollen eine deutliche Verdichtung der Trabekelstruktur (Abb.16).

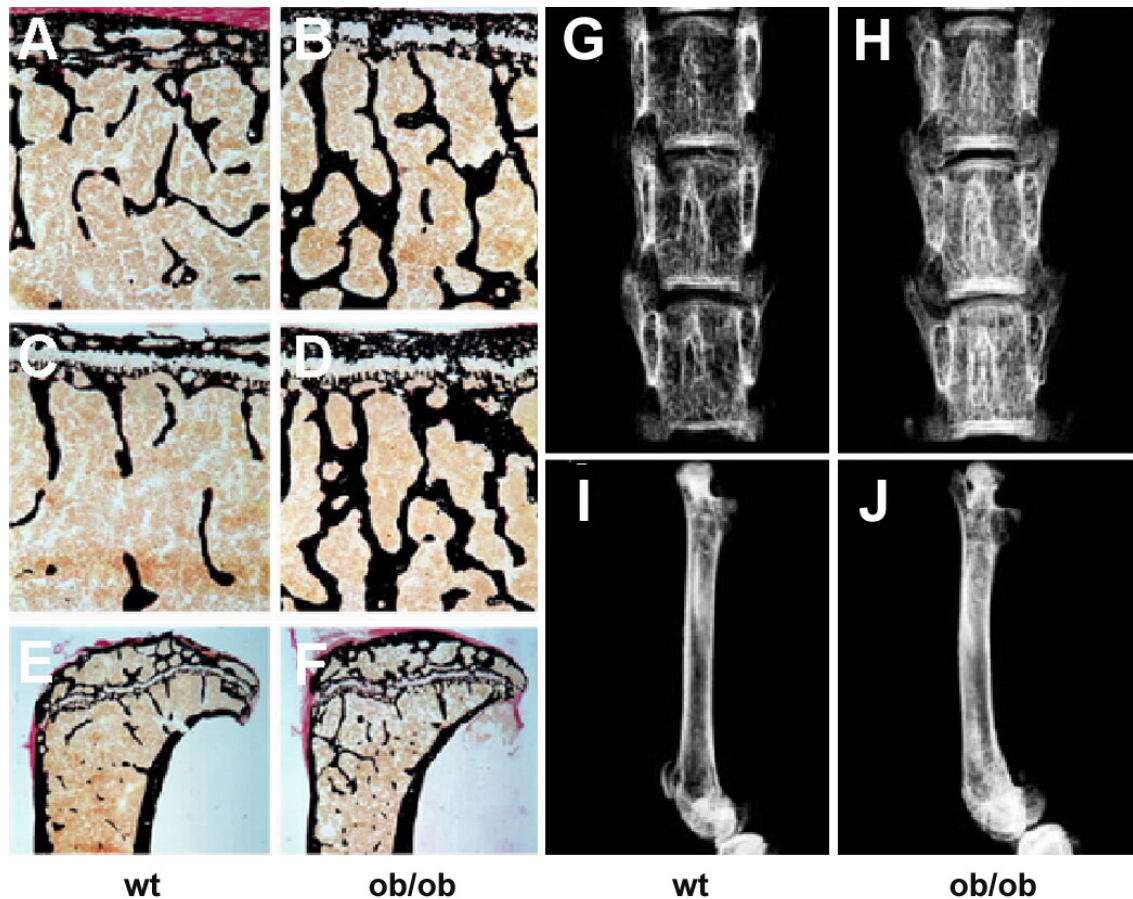


Abb.16: Leptin-Defizienz (*ob/ob*) führt zu einer im Vergleich zu Kontrolltieren (*wt*) erhöhten Knochenmasse. Dieser Phänotyp zeigt sich sowohl in der Histologie (A-F), als auch in Kontaktradiographie (G-J) (A/B lumbaler Wirbelkörper, 3 Monate, C/D lumbaler Wirbelkörper, 6 Monate, E/F Tibia, 6 Monate, G/H LWK 3-5, 3 Monate, I/J Tibia, 3 Monate; A-F unentkalkte Histologie, Färbung: von Kossa, G-J; Vergrößerung: A-D: 30x, E-F: 10x; G-J: 5x).

Die histomorphometrische Analyse der lumbalen Wirbelsäule bei 6 Monate alten Tieren zeigte sowohl bei *ob/ob*-, als auch bei *db/db*-Mäusen eine mehr als verdoppelte Knochenmasse im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb.17).

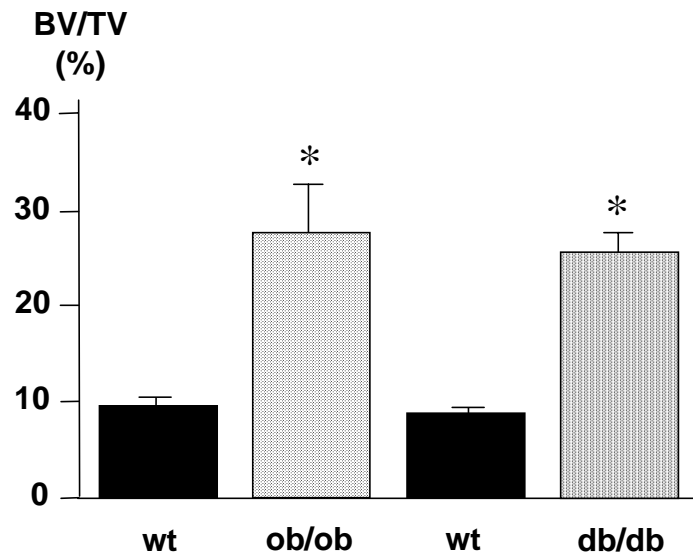


Abb.17: Erhöhte Knochenmasse bei Fehlen von Leptin (*ob/ob*) oder dem Leptinrezeptor (*db/db*) (Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule; *ob/ob*: 6 Monate, *n*=4, *db/db*: 6 Monate *n*=6; **p*<0,05 gegen *wt*)

Eine erhöhte Knochenmasse kann außer durch eine Steigerung der Knochenformation auch durch eine Verminderung der osteoklastären Differenzierung oder Funktion entstehen. Um die Rolle der Knochenresorption für den Knochenphänotyp von *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt mittels statischer Histomorphometrie die Anzahl der Osteoklasten bei diesen Mäusen bestimmt. Die Differenzierung zu Osteoklasten wird durch Fehlen von Leptin oder den Leptinrezeptor nicht vermindert, sondern sogar gesteigert (Abb.18). Für die Beobachtung einer erhöhten Anzahl von Osteoklasten bei gleichzeitig erhöhter Knochenmasse liegt als Erklärung nahe, daß Osteoklasten in Abwesenheit von Leptin nicht oder nur stark vermindert in der Lage sind, Knochen zu resorbieren. Deshalb wurde zur Bestimmung der Knochenresorptionsleistung *in vivo* die renale Exkretion von Deoxypyridinolin Crosslinks bestimmt. Dabei handelt es sich um nierengängige Kollagen-Abbauprodukte, die bei Knochendegradation entstehen und so eine indirekte Aussage über Knochenresorption zulassen.

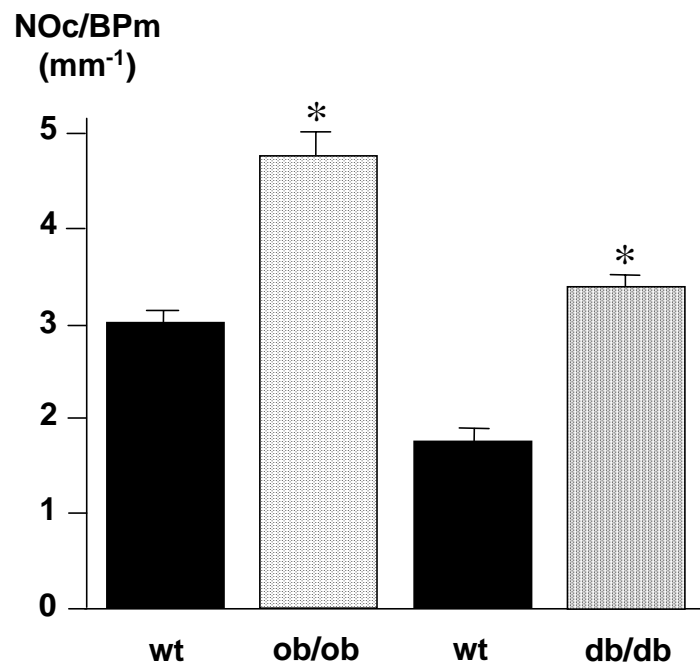


Abb.18: Der Knochenmasse-Phänotyp besteht trotz einer erhöhten Osteoklastenzahl (Noc/BPm) sowohl bei Leptin-Defizienz (*ob/ob*), als auch bei Fehlen des Leptinrezeptors (*db/db*) (Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule; *ob/ob*: 6 Monate, *n*=4, *db/db*: 6 Monate *n*=6; **p*<0,05 gegen wt).

Die Exkretion von Deoxypyridinolin Crosslinks war bei Tieren mit fehlender Leptin-Signalübertragung nicht vermindert, sondern erhöht (wt: 10.5 ± 2.5 nM Dpd/mM Kreatinin; *ob/ob*: 24.0 ± 4.0 nM Dpd/mM Kreatinin). Es besteht bei Leptin-Defizienz also eine erhöhte Knochenmasse trotz einer gesteigerten Knochenresorption.

Normale Osteoklastendifferenzierung und Funktion in vitro

Zur Überprüfung, ob diese Steigerung der Knochenresorption auf einer direkten, zellulären Wirkung des Fehlens von Leptin auf Osteoklasten beruht, wurden Differenzierung und Funktion von Osteoklasten *in vitro* untersucht. Um indirekte Effekte über Osteoblasten auszuschließen, wurde für diesen Zweck nicht die Osteoklasten/Osteoblasten-Cokultur verwendet, die den Standard für Osteoklastenexperimente im Mausmodell darstellt. Stattdessen wurde die oben beschriebene Methode, Osteoklasten unter Anwesenheit von optimalen Konzentrationen von RANKL und M-CSF ohne Osteoblasten zu kultivieren, für das murine System modifiziert und angewendet. Nach 6 Tagen in Kultur

zeigten sowohl die als Kontrolle kultivierten hämatopoetischen Zellen von Wildtypmäusen als auch die Zellen von *ob/ob*-Mäusen eine hohe Anzahl TRAP-positiver Zellen (Abb.19 A,B).

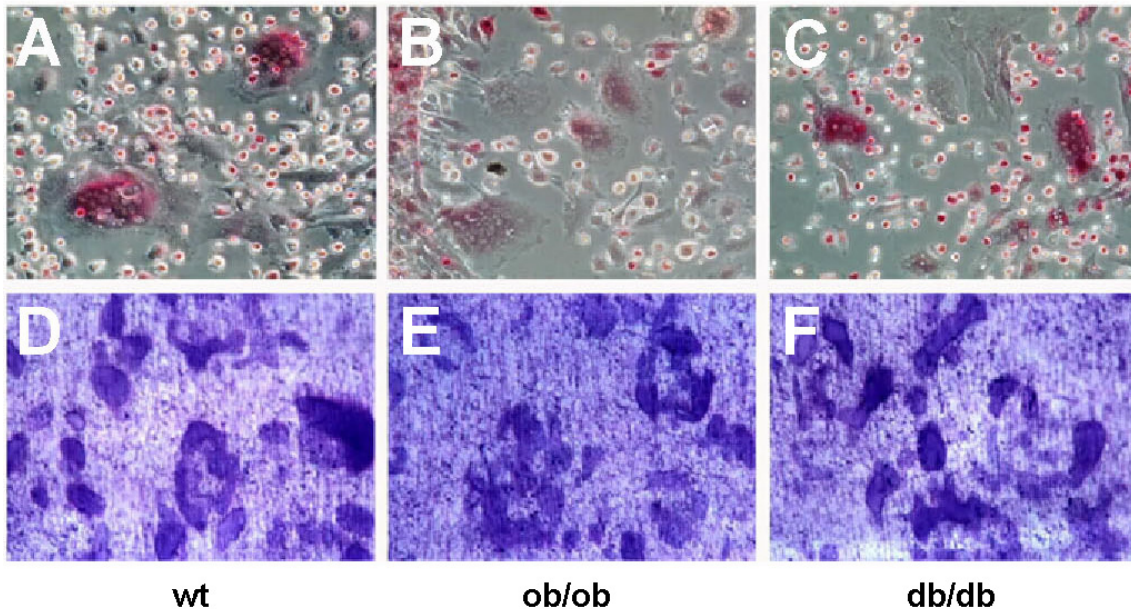


Abb.19: Osteoklastendifferenzierung und Funktion *in vitro* sind unbeeinflusst vom Fehlen des Leptin-Signals. Weder das Fehlen von Leptin (B/E), noch das Fehlen des Leptinrezeptors (C/F) beeinflussen die Differenzierung zu Osteoklasten (A-C), oder die Funktion (D-E) im Verhältnis zur Wildtypkontrolle (A/D) (A/B/C: Kultur hämatopoetischer Zellen, Tag 6, TRAP-Färbung; D/E/F: Resorption im Pit Assay auf Dentin, Färbung: Toluidin blau, Vergrößerung: 300x).

Die osteoklastären Zellen sowohl aus der Kultur der Kontrollmäuse als auch aus der Kultur der Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäuse waren im Resorptionsversuch in der Lage, Dentin zu resorbieren (Abb.19 D,E).

Die statistische Analyse von 6 voneinander unabhängigen Kulturen ergab keinen signifikanten Unterschied in Zellzahl oder resorbierter Fläche (Abb.20,21). Da in dem für das Zellkulturmedium verwendeten Serum bovines Leptin enthalten ist und nicht ausgeschlossen werden kann, daß dieses auch in der Lage ist, murine Leptinrezeptoren zu aktivieren, wurde die gleiche Kultur mit Zellen aus *db/db*-Mäusen wiederholt. Da Zellen aus diesen Tieren der Rezeptor für Leptin fehlt, so daß das Leptin-Signal nicht fortgeleitet werden kann, spielt der Gehalt an bovinem Leptin für diese Zellen keine Rolle. Auch in diesen Kulturen entwickelten sich funktionsfähige Osteoklasten, die in der Lage sind, Dentin zu resorbieren (Abb.19 C,F).

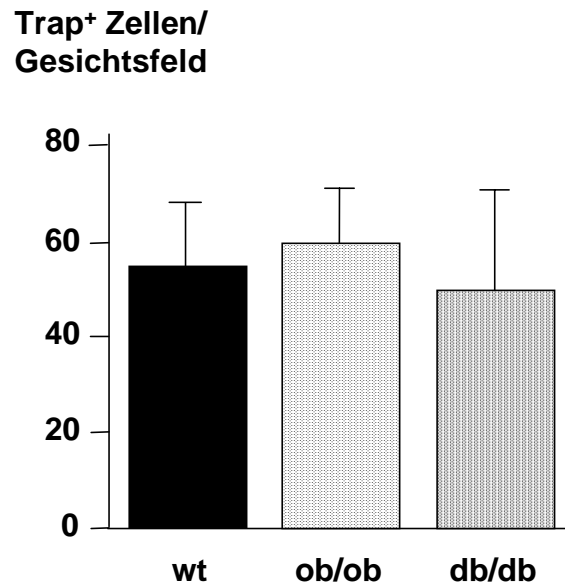


Abb.20: Kein Unterschied in der Differenzierung von Osteoklasten mit und ohne Leptin-Signal. Die Zahl TRAP-positiver multinukleärer Zellen differiert nicht zwischen Kontrollen (wt) und Zellen ohne Leptin (ob/ob), oder den Leptinrezeptor (db/db). (Zellkultur, Tag 6, n=6).

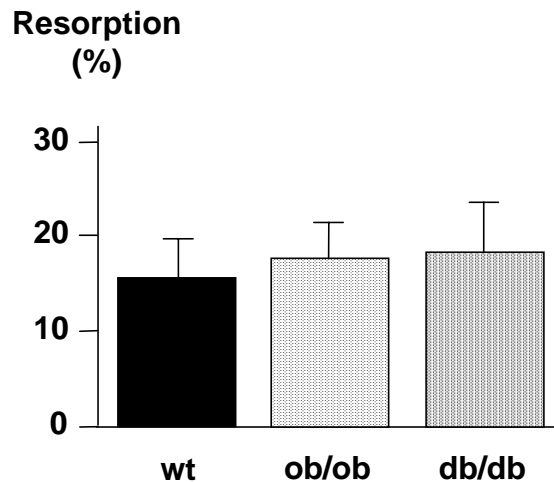


Abb.21: Kein Funktionsunterschied zwischen Osteoklasten mit und ohne Leptin-Signal in vitro. Die Resorption von Dentin zeigt keinen Unterschied bei Fehlen von Leptin (ob/ob) oder dem Leptinrezeptor (db/db) im Verhältnis zu Kontrollkulturen (wt) (Zellkultur auf Dentin, Tag 6, histomorphometrische Analyse der Resorptionslakunen, n=6).

Die statistische Analyse ergab keinen Unterschied zwischen Kontrolltieren mit normalem Leptin-Signal und db/db-Mäusen (Abb.20,21). Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß sowohl die Differenzierung, als auch die Funktion von Osteoklasten unabhängig von der Weiterleitung des Leptin-Signals im Osteoklasten oder seinen Vorläufern sind. Die beobachtete Steigerung der

Osteoklastendifferenzierung bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen ist also kein direkter Effekt des Fehlens von Leptin auf Osteoklasten.

Weitere Erhöhung der Knochenmasse durch Östrogenbehandlung

Wenn das Fehlen von Leptin nicht direkt für die *in vivo* beobachtete Erhöhung der Osteoklastenzahl und –resorption verantwortlich ist, liegt es nahe, daß es sich um eine indirekte Wirkung des bei fehlendem Leptin-Signal auftretenden Hypogonadismus handelt.^{63;73} Bei Menschen führt der Verlust der Gonadenfunktion, wie zum Beispiel bei Frauen in der Postmenopause, durch Abfall des Östrogenspiegels zu einer Erhöhung der Osteoklastenzahl und Aktivität. Zur Überprüfung, ob die gesteigerte Osteoklastenzahl bei den untersuchten Mäusen auch ein Effekt des Hypogonadismus ist, wurden die Tiere mittels subcutan implantierter Tabletten, aus denen kontinuierlich Östrogen freigesetzt wird, einer Östrogentherapie unterzogen. Damit wurden die Mäuse von einem hypogonaden in einen medikamentös eugonaden Zustand überführt (Abb.22).

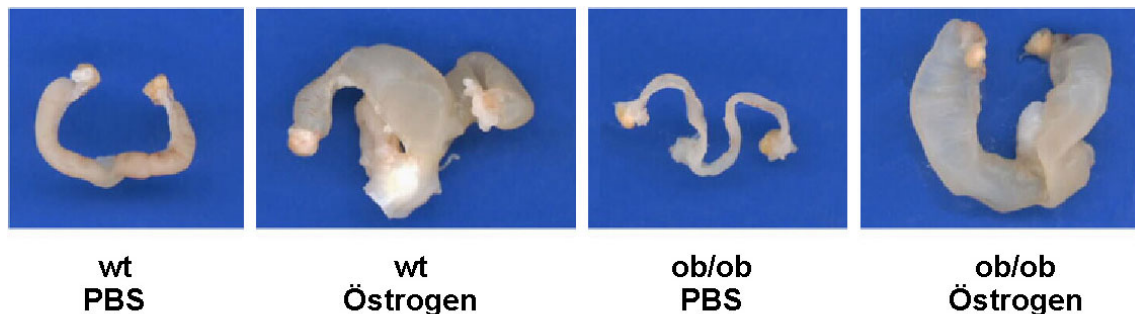


Abb.22: Gonaden von Wildtyp- und *ob/ob*-Mäusen nach 4 Wochen Behandlung mit Östrogen oder Placebo (PBS). Bei den initial hypogonaden *ob/ob*-Mäuse kann durch diese Therapie ein mit gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen vergleichbarer Gonadenstatus erzeugt werden (Vergrößerung: 3x).

Wenn die beobachteten Veränderungen bei der Knochenresorption auf die zentrale Störung der Östrogenproduktion zurückzuführen ist, müßte sich durch diese Behandlung eine Normalisierung erreichen lassen.

In der Tat zeigte sich nach 4 Wochen Östrogentherapie ein Rückgang der Osteoklastenzahl auf Normwerte ohne statistischen Unterschied zu den Kontrolltieren (Abb.23).

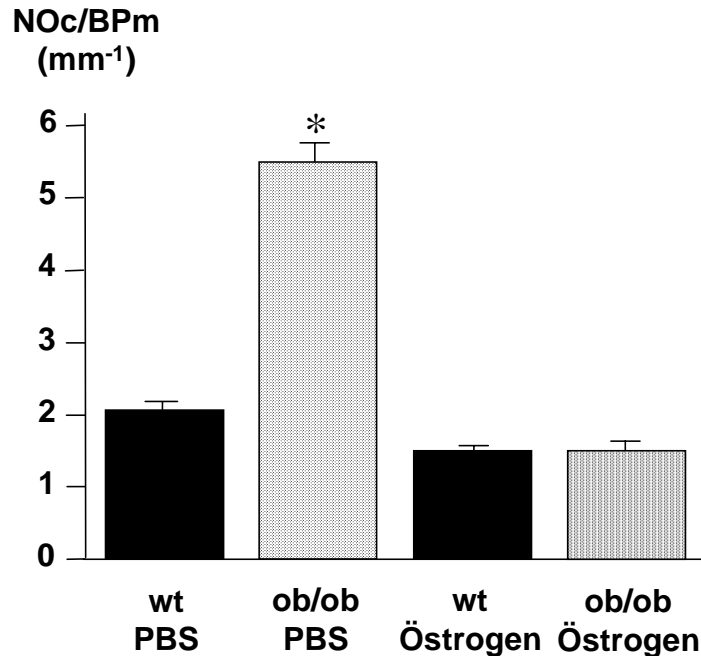


Abb.23: Die erhöhte Osteoklastenzahl der hypogonaden ob/ob-Mäuse wird durch Behandlung mit Östrogen normalisiert (Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule, * $p < 0,05$ gegen wt und ob/ob-Östrogen).

Konsekutiv entwickelten die Tiere im Verhältnis zu unbehandelten ob/ob-Mäusen, durch die Normalisierung der pathologischen Knochenresorption, eine weitere Erhöhung der Knochenmasse (Abb.24,25).

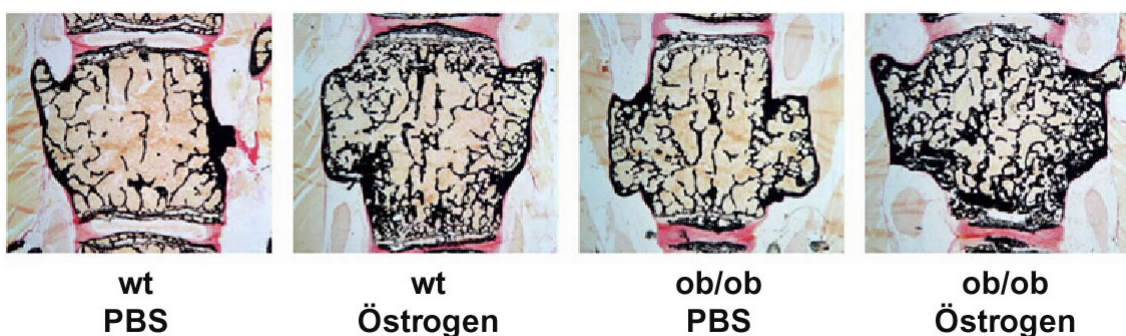


Abb.24: Verstärkung des Knochenmasse-Phänotyps durch Ausgleich des Hypogonadismus der ob/ob-Maus mittels subcutaner Applikation von Östrogen (Lumbale Wirbelkörper, unentkalkte Histologie, Färbung: von Kossa, Vergrößerung: 5x).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die beobachtete hohe Knochenmasse in Leptindefizienten Mäusen trotz einer durch Östrogenmangel gesteigerten Knochenresorption besteht, welche normalerweise zu Osteopenie führen würde. Damit ist der Leptin-Signalweg der erste identifizierte Mechanismus, der in der Lage ist, die bei der Östrogenmangelosteopenie erhöhte Knochenresorption *in vivo* zu kompensieren.

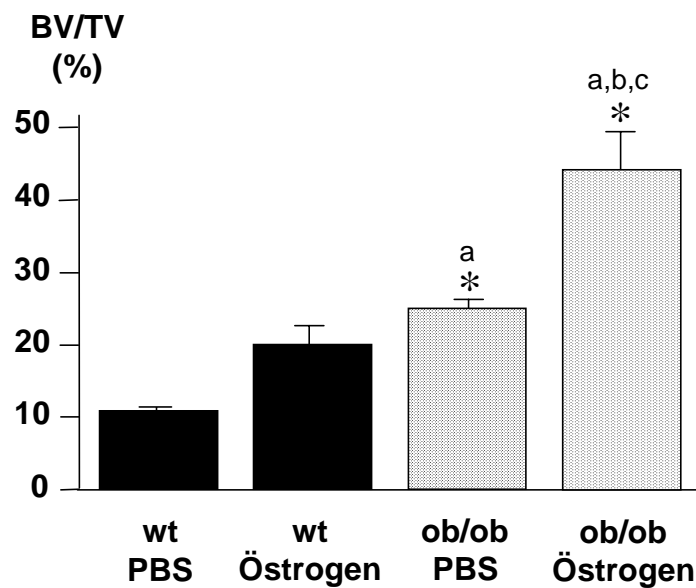


Abb.25: Verstärkung des Knochenmasse-Phänotyps durch Behandlung des Hypogonadismus für 4 Wochen mit Östrogen. Durch Normalisierung der Osteoklastenzahlen verstärkt sich die Wirkung des fehlenden Leptinsignals (Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule; wt n=6, ob/ob n=4; *p<0,05 a: gegen wt/PBS; b gegen wt/Östrogen; c: gegen ob/ob/PBS).

Intracerebroventrikuläre Infusion

Als nächstes sollte überprüft werden, ob neben der Stimulation der Knochenresorption durch den Hypogonadismus eine zusätzliche zentrale Regulation von Osteoklasten über Leptin besteht, die analog der zentralen Steuerung der Knochenformation über den Hypothalamus vermittelt wird. Der Leptin-Rezeptor ist im Hypothalamus in enger Nachbarschaft zum Ventrikelsystem lokalisiert. Es wurden ob/ob-Mäusen intracerebroventrikulär (ICV) in den dritten Ventrikel osmotische Pumpen implantiert, die minimale Dosen Leptin freisetzen. Das ICV applizierte Leptin war peripher nicht

nachweisbar. Zum Ausschluß, daß sich ein etwaiger Unterschied aus einer Beeinflussung der Gonadenfunktion durch Leptin-Substitution ergibt, wurden die Tiere zuvor ovariectomiert. Es fand sich eine deutliche Abnahme der Knochenmasse durch Leptin-Infusion in den dritten Ventrikel (Abb.26,27).

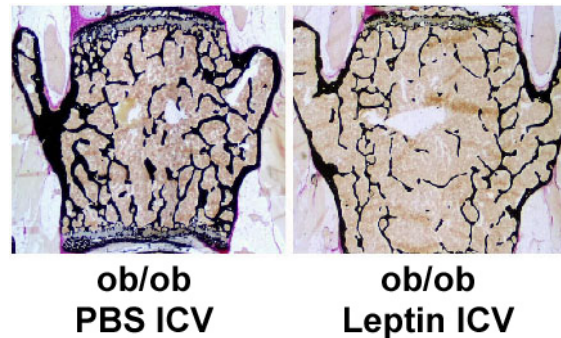


Abb.26: Abnahme der Knochenmasse durch intracerebroventrikuläre Infusion von Leptin (Lumbale Wirbelkörper, unentkalkte Histologie, Färbung von Kossa, Vergrößerung: 5x).

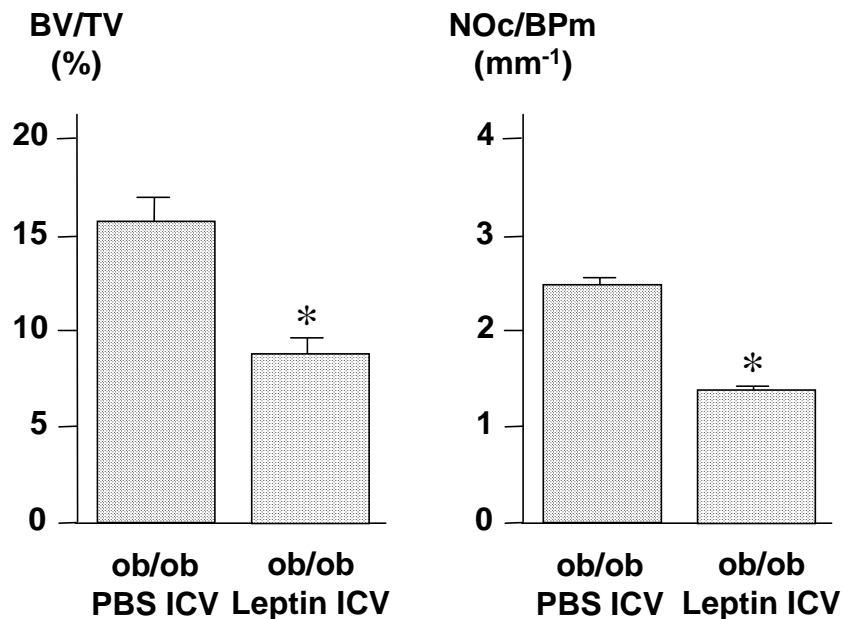


Abb.27: Abnahme der Knochenmasse durch intracerebroventrikuläre Infusion von Leptin bei Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen. Die gleichzeitige Abnahme der Osteoklastenzahl unterstreicht die Bedeutung der Knochenformation für diesen Knochenphänotyp (Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule, n=4, *p<0,05 gegen PBS-Kontrollen).

Die histomorphometrische Quantifizierung der Osteoklastenzahl ergab, daß die intracerebroventrikuläre Applikation von Leptin zu einer Verminderung von Osteoklasten führt (Abb.27). Dieser Effekt auf Osteoklasten fällt zwar, aufgrund

des übermächtigen Effekts von Leptin auf die Knochenformation in diesem Modell, für die Regulation der Knochenmasse nicht ins Gewicht, es scheint aber zumindest bei Leptin-Defizienz eine indirekte Steuerung auch der Osteoklastendifferenzierung über den Hypothalamus zu geben.

5 Diskussion

5.1 Lokale Kontrolle der Osteoklastendifferenzierung und Funktion

Der Osteoklast ist die einzige Zelle mit der besonderen Fähigkeit zur Knochenresorption.^{8;59;64} Damit ist er der direkte Gegenspieler zum Osteoblasten, der Knochen aufbaut.²¹ Um die Knochenmasse konstant zu halten, ist es nötig, Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenformation durch Osteoblasten in engen Grenzen zu balancieren. Rodan und Martin waren im Jahr 1981 die ersten, die eine Hypothese aufstellten, wie die Steuerung dieser Balance funktionieren könnte.⁴⁸ Sie gehen dabei von einer lokalen Kontrolle der Knochenresorption auf Funktionsebene aus, dem „funktionellen Coupling“.

Im Rahmen des Remodelings folgt in diesem Modell der Knochenresorption durch Osteoklasten die osteoblastäre Knochenformation. So wird zuerst von Osteoklasten eine 60-70 µm tiefe Lakune in den Knochen resorbiert. Durch dieses Resorptionsereignis werden Osteoblasten aktiviert, die die Resorptionslakune mit neuem Knochen auffüllen. Diese aktivieren wieder die Resorption und der Zyklus startet von neuem (Abb.28).¹²

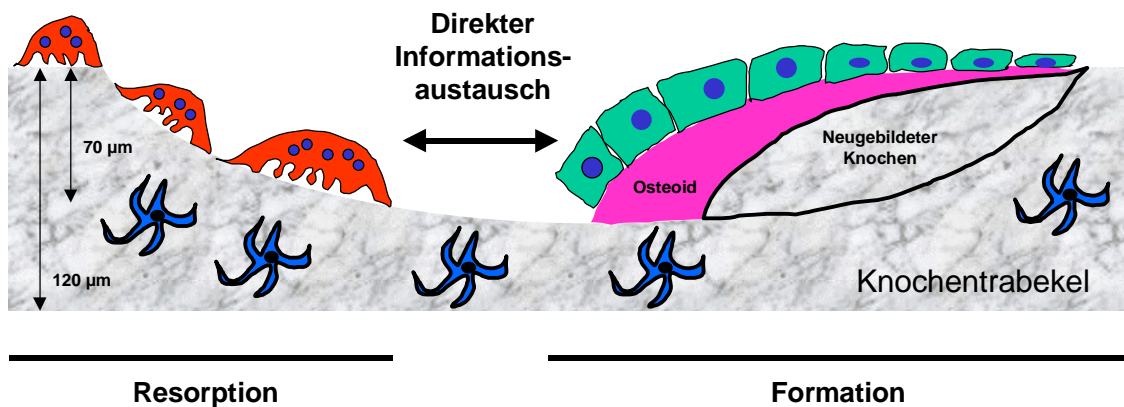


Abb.28: Hypothese des direkten funktionellen Couplings von Resorption und Formation.⁴⁸ Nach der Knochenresorption durch Osteoklasten (rot) füllen die Osteoblasten (grün) die Lakune mit neuem Knochen auf (blau: Osteozyten). Der Informationsaustausch erfolgt direkt auf Funktionsebene.

Diese Hypothese des funktionellen Couplings wurde durch die Entwicklung der Osteoklasten/Osteoblasten-Cokultur unterstützt, bei der gezeigt wurde, daß

Osteoklasten *in vitro* nur in Anwesenheit von Osteoblasten nach Stimulation durch 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ entstehen können¹⁴ und daß ein direkter Zellkontakt zwischen Osteoblasten und Osteoklasten hierfür notwendig ist.²⁹ Die ersten Zweifel an dieser Hypothese kamen erst 17 Jahre später auf, als die Arbeitsgruppe um Karsenty zeigen konnte, daß für die Funktion von Osteoklasten die Anwesenheit differenzierter Osteoblasten *in vivo* nicht unbedingte Voraussetzung ist.¹⁸

5.2 Osteoklastendifferenzierung ohne Osteoblasten *in vitro*

In einem ersten Schritt wurde in der hier vorgestellten Arbeit untersucht, ob neben der Funktion auch die Differenzierung von Osteoklasten unabhängig von der Anwesenheit von Osteoblasten ist. Das zu diesem Zweck etablierte Kultursystem zur *in vitro* Differenzierung humaner Osteoklasten baut zum einen auf der aus Experimenten im Mausmodell gewonnenen Erkenntnis auf, daß Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen.⁶⁶ Zum anderen, macht es sich das von Simonet und Lacey charakterisierte OPG/RANKL-System zu nutze,⁵⁵ das OPG als einen starken Hemmfaktor der Osteoklastendifferenzierung und RANKL als Liganden von OPG charakterisiert. Die hier vorgestellten Versuche zeigen, daß funktionelle, resorbierende humane Osteoklasten ohne Anwesenheit von Osteoblasten sowohl aus Knochenmarkstammzellen, als auch aus der mononukleären Zellfraktion des peripheren venösen Blutes generiert werden können. Somit kann, zumindest *in vitro*, sowohl die Differenzierung, als auch die Funktion von Osteoklasten ohne Osteoblasten ablaufen. Dieses Ergebnis widerspricht dem ersten Teil der Hypothese des direkten funktionellen Couplings zwischen Osteoblasten und Osteoklasten von Rodan und Martin.

Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, daß humane Osteoklasten sich *in vitro* von murinen Osteoklasten deutlich durch die Zeit unterscheiden, die zur Differenzierung zu funktionellen Zellen notwendig ist (murin 6 Tage / human 21 Tage). Daraus ergeben sich mindestens zwei Schlußfolgerungen: Zum einen scheint es wahrscheinlich, daß zwischen humanen und murinen Osteoklasten

noch weitere Unterschiede bestehen. Entsprechend wäre es wünschenswert, alle bisher im murinen Modell gewonnenen Erkenntnisse über Osteoklasten im humanen Modell zu überprüfen. Zum anderen limitiert die relativ lange Kulturdauer für humane Osteoklasten die Möglichkeit, dieses Kultursystem zur Routineuntersuchung von Patientenosteoklasten einzusetzen. Bei einer dreiwöchigen Kulturzeit und dem damit verbundenen Aufwand und den entstehenden Kosten wird die Osteoklastencharakterisierung *in vitro* vorerst wohl ausgewählten Patienten mit besonderen Krankheitsbildern, wie der Osteopetrose, vorbehalten bleiben.

Eine denkbare Anwendung des hier vorgestellten Kultursystems wäre hingegen die Überprüfung der Resorbierbarkeit von putativ resorbierbaren Knochenersatzmaterialien.⁵¹ Im Hinblick auf die Unterschiedlichkeit von humanen und murinen Osteoklasten ist die bisherige Praxis, die Resorbierbarkeit von Knochenersatzmaterialien nur im Tierversuch zu testen,^{34;74} mindestens diskussionswürdig. Außerdem könnte eine dem Tierversuch vorangestellte Austestung solcher Knochenersatzmaterialien im humanen *in vitro* Modell einen Teil der zu testenden Substanzen von vornherein disqualifizieren und so die Anzahl notwendiger Tierversuche im Rahmen der Zulassung als Medizinprodukt vermindern. Um einen solchen Ansatz effektiv durchführen zu können, ist noch eine Optimierung der Kultur auf Resorptionsleistung der Osteoklasten nötig. Da bekannt ist, daß die überschießende Resorption von Osteoklasten im Rahmen von Knochenmetastasen zum Teil über Il-1 und TNF-alpha vermittelt ist,^{31;49} kann eine Verbesserung der Resorptionskapazität möglicherweise durch Zusatz dieser Zytokine zum Kulturansatz erreicht werden.

5.3 Kein Einfluß der Resorption auf die Formation *in vivo*

Im zweiten Schritt dieser Studie wurde untersucht, ob eine direkte Steuerung der Knochenformation durch die Knochenresorption existiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen an *c-src*-defizienten Tieren zeigen, daß eine verminderte Knochenresorption nicht zwangsläufig eine verminderte Knochenformation

nach sich zieht, wie bisher im Rahmen der Hypothese des funktionellen Couplings angenommen wurde.^{4;48} Ein direktes funktionelles Coupling zwischen Resorption und Formation besteht also nicht.

5.4 Zentrale Kontrolle der Knochenmasse

Wenn es weder eine direkte lokale Kontrolle der Knochenresorption über die Knochenformation, noch der Knochenformation über die Resorption gibt, wie wird die Knochenmasse dann balanciert?

Ein gebräuchlicher Ansatz zum Verständnis physiologischer Prozesse ist es, pathologische Veränderungen dieser Systeme zu betrachten. Die bekannteste Pathologie der Knochenmassehomöostase ist die Hormonmangelosteoporose, bei der es durch Ausfall der Gonadenfunktion zu einem Überwiegen der Knochenresorption über die Knochenformation kommt.⁴⁷ Es wird bisher davon ausgegangen, daß sich diese Krankheit auf der Ebene der Knochenzellen abspielt, wobei die Erhöhung der osteoklastären Resorption eine besonders starke Rolle spielt.⁴¹ Entsprechend basieren auch alle bisher etablierten Therapiekonzepte für die Hormonmangelosteoporose (Calcitonin, Östrogene, SERMs und Bisphosphonate)⁵⁰ und in klinischen und präklinischen Studien befindliche Therapieansätze (Osteoprotegerin,²² c-Src-Antagonisten⁶¹) hauptsächlich auf einer Hemmung der osteoklastären Resorption. Keine dieser Therapien ist allerdings in der Lage, bereits verlorenen Knochen wiederaufzubauen und das physiologische Gleichgewicht zwischen Knochenformation und Knochenresorption wiederherzustellen. Im günstigsten Fall gelingt es, den Verlust der Knochenmasse auf einem niedrigen Niveau zu verlangsamen oder zu stoppen.

Die Arbeitsgruppe um Karsenty konnte in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe in Hamburg das Leptin-Defizienz-Modell beschreiben, bei dem zum ersten Mal der deletäre Effekt des Hormonmangels auf die Knochenmasse *in vivo* kompensiert wird.²⁰ Dieses geschieht nicht direkt auf zellulärer Ebene, sondern zentral über den Hypothalamus vermittelt. Die Hauptrolle spielt dabei die Wirkung von Leptin auf die Knochenformation.

Die hier vorgestellte Arbeit, von der ein Teil im Rahmen einer Kooperation in diese Untersuchungen einfloß, ergänzt das Bild um mehrere Aspekte:

ob/ob- und *db/db*-Mäuse haben eine gesteigerte Knochenresorption die sich durch Gabe von Östrogen normalisieren läßt, also wahrscheinlich vor allem auf dem Hypogonadismus dieser Tiere beruht. Die osteoklastäre Differenzierung wird aber, durch intracerebroventrikuläre Applikation von Leptin bei ovariectomierten Tieren, auch unabhängig von der Gonadenfunktion noch zusätzlich beeinflusst. Da Leptin keine direkte zelluläre Wirkung auf Osteoklasten hat, wie hier *in vitro* gezeigt werden konnte, und der funktionelle Rezeptor für Leptin vor allem im Hypothalamus exprimiert wird,^{28;58} scheint es sich um einen indirekten, über den Hypothalamus vermittelten Effekt auf die Knochenresorption zu handeln. Da sich die Knochenmasse in der gleichen Richtung verändert, wie die Zahl der Osteoklasten, könnte vermutet werden, daß hier möglicherweise ein Regulationsmechanismus besteht, der die Knochenresorption an die Knochenformation anpaßt, ähnlich dem von Rodan und Martin beschriebenen direkten funktionellen Coupling. Diese Steuerung der Knochenresorption liefere aber im Gegensatz zum direkten funktionellen Coupling nicht direkt auf zellulärer Ebene ab, sondern würde über ein zentrales Relais vermittelt. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die erhöhte Osteoklastenzahl bei *c-src*^{-/-} Mäusen erklären.

Die meisten biologischen Systeme sind multifaktoriell gesteuert. Warum sollte dies nicht auch für den Knochen gelten? Die Experimente zur humanen Osteoklastendifferenzierung *in vitro* und Knochenformation bei *c-src*^{-/-} Mäusen *in vivo* zeigen, daß Knochenformation und Knochenresorption nicht unbedingt aufeinander angewiesen sind. Außerdem existiert nach den hier vorgestellten Ergebnissen zur osteoklastären Resorption in Verbindung mit Untersuchungen zur osteoblastären Knochenformation, die in Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe um Dr. Karsenty in Houston und unserer Arbeitsgruppe in Hamburg erarbeitet wurden, eine Steuerung des Knochens über den Hypothalamus. Damit fügen diese Untersuchungen unserem bisherigen Verständnis der Knochenphysiologie eine völlig neue Dimension hinzu.

Insgesamt kann also die Hypothese von Rodan und Martin dahingehend erweitert werden, daß Knochenremodeling zumindest teilweise über das Gehirn gesteuert wird (Abb.29).

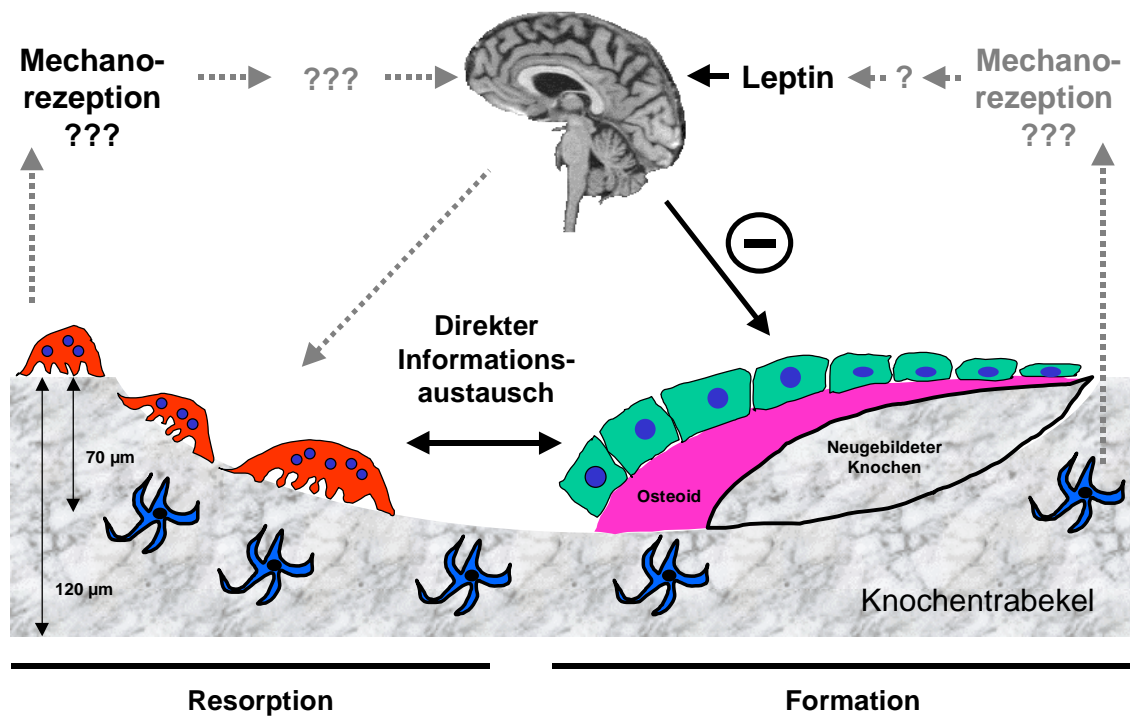


Abb.29: Hypothese der zentralen Regulation des Knochenstoffwechsels (rot: Osteoklasten, grün: Osteoblasten, blau: Osteozyten; schwarz: experimentell nachgewiesene Regelkreise, grau: putative Regelkreise).

Wie nun diese zentrale Regulation funktioniert, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Es wären verschiedene Arten eines Regulationskreises denkbar: Es könnte beispielsweise über einen unbekanntem Mechanismus global ein Soll-Wert für die der Knochenmasse überprüft werden, vergleichbar etwa der Körpertemperaturregulation. Möglich wäre aber auch, daß die gesamte Knochenarchitektur der Steuerung durch das Gehirn unterliegt, vielleicht mit einer dem Homunkulus vergleichbaren Struktur auch für den Knochen. Hinweise auf einen über die reine Knochenmasseregulation hinausgehenden Einfluß des Gehirns auf das Skelettsystem sind Beobachtungen bei Schädelhirntraumata, wo es aus ungeklärter Ursache zu heterotopen Ossifikationen mit spontaner knöcherner Überbauung ganzer Gelenke kommen kann.¹⁵ Um hier allerdings zu sicheren Aussagen gelangen

zu können wird es erst notwendig sein, den Signalweg zwischen Gehirn und Knochen genauer zu untersuchen und die Faktoren zu finden, die diese Steuerung bewerkstelligen.

Auf diesem Weg zum erweiterten Verständnis der Physiologie der Knochenmasseerhaltung zeichnet sich für die Zukunft als große Aufgabe ab, den Signalweg vom Gehirn zum Knochen im Rahmen der zentralen Kontrolle der Knochenmasse näher zu charakterisieren. Insbesondere wird es dabei um die Frage gehen, wie das Signal vom Hypothalamus zum Knochen vermittelt wird. Vorstellbar wären sowohl eine nervale Signalweiterleitung wie zur Muskulatur, als auch eine Steuerung über Hormone.

Wenn das komplette Bild vor uns liegt, werden wir möglicherweise in der Lage sein die entscheidenden Parameter aktiv so zu beeinflussen, daß wir ein gestörtes Fließgleichgewicht im Knochen kausal therapieren können. Erst durch Integration dieser Erkenntnisse wird es vielleicht möglich werden, bisher nicht suffizient therapierbare Knochenstoffwechselkrankheiten, wie die Osteoporose, nicht mehr nur zu verlangsamen, sondern zu heilen.

6 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Knochenresorption und Knochenformation ist essentiell für eine physiologische Funktion des Skelettsystems. Störungen dieser Balance führen unweigerlich zu Knochenerkrankungen, wie Osteoporose oder Osteopetrose, mit starken Beeinträchtigungen der betroffenen Patienten und Ihrer Umwelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der osteoklastären Knochenresorption *in vitro* und *in vivo* studiert. Dabei wurde das Zusammenspiel zwischen osteoklastärer Resorption und osteoblastärer Formation genauer untersucht.

Zuerst wurde ein *in vitro* Modell der Osteoklastendifferenzierung aus humanen Blutstammzellen etabliert. Anhand dieses Modelles konnte gezeigt werden, daß die Differenzierung zu funktionellen Osteoklasten unabhängig von der Anwesenheit von Osteoblasten ablaufen kann. In einem zweiten Schritt wurde *in vivo* ein Knockout-Mausmodell studiert, dem ein für die osteoklastäre Funktion essentielles Gen (*c-src*) fehlt. Die Entwicklung einer progressiven Osteopetrose in diesem Modell zeigt, daß Knochenformation nicht über Knochenresorption gesteuert wird. Diese Daten widersprechen der bisher gültige Hypothese des direkten funktionellen Couplings zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Daraus ergab sich die Frage, welcher übergeordnete Mechanismus die Balance zwischen Knochenformation und Knochenresorption aufrechterhält. Die klinische Beobachtung, daß Körpergewicht und Gonadenfunktion in direktem Zusammenhang mit der Knochenmasse stehen, führte zur Untersuchung von zwei genetischen Mausmodellen, denen das Leptin-Signal fehlt. Leptin ist ein Hormon, über das Gonadenfunktion, Körpergewicht und Knochenformation gesteuert werden. Es zeigte sich, daß Leptin eine bisher unbekannte indirekte Wirkung auf Osteoklasten hat. Ergebnisse von Experimenten dieser Arbeit konnten demonstrieren, daß Leptin zentral über den Hypothalamus auf die Osteoklastenzahl wirkt. Diese Ergebnisse eröffnen eine neue Sichtweise der Steuerung der Aufrechterhaltung der Knochenmasse und legen damit die Grundlage für mögliche neue Therapieansätze gegen Knochenstoffwechselstörungen.

Summary

Bone mass is maintained nearly constant under physiological conditions. This is achieved by a strict balance between bone formation and bone resorption. Changes in this balance inevitably result in pathologic syndromes like osteoporosis or osteopetrosis with all complications for the patients and their environment.

This study was laid out to analyse the mechanisms regulating osteoclast differentiation and function, to better understand the interaction between osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in the process of remodeling.

As a first step, an *in vitro* model of osteoclast differentiation from hematopoietic precursors was established. This model was used to show, that osteoclasts can develop *in vitro* in the complete absence of osteoblasts. As a second step a knockout mouse model, lacking an essential gene for osteoclastic function (*c-src*) was studied *in vivo*. Development of progressive osteopetrosis in this model demonstrated, that bone formation is not regulated by bone resorption. These data are in contrast to the common hypothesis of a direct functional coupling of bone formation and bone resorption.

If bone resorption and bone formation are not coupled directly, this leads to the question, how bone mass is maintained constant. Clinical observations link body weight and gonadal function to bone mass and fracture risk. Two genetic mouse models were examined, which lack the signaling of leptin, a hormone known to regulate body weight, gonadal function and bone formation. Lack of function of this hormone, could be shown to have a so far unknown influence on osteoclasts. This study demonstrates, that leptin has an indirect effect on osteoclast number via a hypothalamic relay. These results open a new way in our understanding of bone mass maintenance and may possibly lead to new therapeutic strategies against skeletal diseases.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrams, S.A. (2001). Calcium turnover and nutrition through the life cycle. *Proc Nutr Soc* 60, 283-289.
2. Albers-Schönberg, H.E. (1903). Projektions-Röntgenbilder einer seltenen Knochenerkrankung. *Fortschr Geb Röntgenstrahlen* 7, 158-159.
3. Amling, M. and Delling, G. (1998). Osteoklastenbiologie: Bedeutung im Rahmen von Knochenmetastasen (1998). *Orthopäde* 27, 214-223.
4. Amling, M., Neff, L., Priemel, M., Schilling, A.F., Rueger, J.M., and Baron, R. (2000). Progressive increase in bone mass and development of odontomas in aging osteopetrotic c-src-deficient mice. *Bone* 27, 603-610.
5. Amling, M., Priemel, M., Holzmann, T., Chapin, K., Rueger, J.M., Baron, R., and Demay, M.B. (1999). Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140, 4982-4987.
6. Amling, M., Priemel, M., Schilling A.F., and Haberland, M. (2002). Mouse-Models For Osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact* *in press*
7. Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2(1):81-94.
8. Baron, R. (1989). Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 224, 317-324.
9. Bergstrom, J.D., Bostedor, R.G., Masarachia, P.J., Reszka, A.A., and Rodan, G. (2000). Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* 373, 231-241.

10. Bi, Y., Seabold, J.M., Kaar, S.G., Ragab, A.A., Goldberg, V.M., Anderson, J.M., and Greenfiel, E.M. (2001). Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 16, 2082-2091.
11. Bonjour, J.P., Burckhardt, P., Dambacher, M., Kraenzlin, M.E., and Wimpfheimer, C. (1997). Epidemiologie der Osteoporose. *Schweiz Med Wochenschr* 127, 659-667.
12. Boyce, B.F., Aufdemorte, T.B., Garrett, I.R., Yates, A.J., and Mundy, G.R. (1989). Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 125, 1142-1150.
13. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Simonet, W.S. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12(9), 395-400.
14. Burger, E.H., Boonekamp, P.M., and Nijweide, P.J. (1986). Osteoblast and osteoclast precursors in primary cultures of calvarial bone cells. *Anat Rec* 214, 32-40.
15. Catz, A., Snir, D., Groswasser, Z., Mendelson, L., and Solzi, P. (1992). Is the appearance of periarticular new bone formation related to local neurological disability? *Paraplegia* 30, 361-365.
16. Clohisy, D.R., Perkins, S.L., and Ramnaraine, M.L. (2000). Review of cellular mechanisms of tumor osteolysis. *Clin Orthop* 104-114.
17. Coleman, R.E. (2001). Should bisphosphonates be the treatment of choice for metastatic bone disease? *Semin Oncol* 28, 35-41.
18. Corral, D.A., Amling, M., Priemel, M., Loyer, E., Fuchs, S., Ducy, P., Baron, R., and Karsenty, G. (1998). Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13835-13840.

19. Diels, H. (1959). Die Fragmente der Vorsokratiker (Stuttgart: Alfred Kröner Verlag).
20. Ducey, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197-207.
21. Ducey, P., Schinke, T., and Karsenty, G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501-1504.
22. Dunstan, C.R., Bekker, P.J., Jalloway, A., Nakanishi, A., Arrighi, M., and Leese, P.T. (2001). The Effect of a Single Dose of Osteoprotegerin in Postmenopausal Women. *J Bone Miner Res* 16, 348-360.
23. European Research in Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) (2001). <http://www.medes.fr/osteo.html>
24. Felix, R., Cecchini, M.G., and Fleisch, H. (1990). Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 127, 2592-2594.
25. Felix, R., Hofstetter, W., and Cecchini, M.G. (1996). Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis. *Eur J Endocrinology* 134, 143-156.
26. Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., and Anderson, J.J. (1993). Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 8, 567-573.
27. Fleisch, H., Russell, R.G., Simpson, B., and Muhlbauer, R.C. (1969). Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats. *Nature* 223, 211-212.
28. Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.

29. Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N., and Suda, T. (1996). Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137, 2187-2190.
30. Kachel, W. (1989). Blutbildung und Blutgerinnung. In *Pädiatrie*. K. Niessen, ed. (Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft), 59-63.
31. Kumar, S., Votta, B.J., Rieman, D.J., Badger, A.M., Gowen, M., and Lee, J.C. (2001). IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol* 187, 294-303.
32. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufmann, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W.J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2), 165-176.
33. Lavelle, C.L. (1993). Biomechanical considerations of prosthodontic therapy: the urgency of research into alveolar bone responses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 8, 179-185.
34. Leeuwenburgh, S., Layrolle, P., Barrere, F., de Bruijn, J., Schoonman, J., van Blitterswijk, C.A., and de Groot, K. (2001). Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro. *J Biomed Mater Res* 56, 208-215.
35. Marchisio, P.C., Naldini, L., Cirillo, D., Primavera, M.V., Teti, A., and Zambonin-Zallone, A. (1984). Cell-substratum interactions of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J Cell Biol* 99, 1696-1705.
36. Marks, S.C. and Schmidt, C.J. (1978). Bone remodeling as an expression of altered phenotype: studies of fracture healing in untreated and cured osteopetrotic rats. *Clin Orthop* 259-264.

37. Miller, P.D. (2001). New possibilities for diagnosis and treatment of osteoporosis. *Int J Fertil Womens Med* 46, 215-221.
38. Mundy, G.R. (1996). Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 24-28.
39. Neff, L., Gailit, J., and Baron, R. (1995). Ultrastructural demonstration of the av subunit of the vitronectin receptor in the sealing zone of resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 10 (suppl.1), 329
40. Nijweide, P.J., Burger, E.H., and Feyen, J.H. (1986). Cells of bone: Proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66, 855-886.
41. Pacifici, R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11, 1043-1051.
42. Pandey, R., Quinn, J., Joyner, C., Murray, D.W., Triffitt, J.T., and Athanasou, N.A. (1996). Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. *Ann rheum Dis* 55, 388-395.
43. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H.H., Meunier, P.J., Ott, S.M., and Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610.
44. Ralston, S.H. (1997). What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 479-494.
45. Ravn, P., Cizza, G., Bjarnason, N.H., Thompson, D., Daley, M., Wasnich, R.D., McClung, M., Hosking, D., Yates, A.J., and Christiansen, C. (1999). Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. *Early*

- Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res* 14, 1622-1627.
46. Riggs, B. and Melton III, L. J. (1986). Medical progress: involuntional osteoporosis. (314), 1676-1684.
47. Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, L.J. (1998). A unitary model for involuntional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773.
48. Rodan, G.A. and Martin, T.J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33, 349-351.
49. Roodman, G.D. (2001). Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 19, 3562-3571.
50. Rosen, C.J. and Bilezikian, J.P. (2001). Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 957-964.
51. Rueger, J.M. (1998). Knochenersatzmittel. *Orthopäde* 27, 72-79.
52. Schenk, R., Spiro, D., and Wiener, J. (1967). Cartilage resorption in tibial epiphyseal plate of growing rats. *J Cell Biol* 34, 275-291.
53. Schinke, T., McKee, M.D., and Karsenty, G. (1999). Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* 21, 150-151.
54. Schmidt, C.J., Marks, S.C.J., Jordan, C.A., and Hawes, L.E. (1977). A radiographic and histologic study of fracture healing in osteopetrotic rats. *Radiology* 122, 517-519.
55. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliot, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw Gegg, L., Hughes, T.M.,

- Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., and Boyle, W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2), 309-319.
56. Singer, F.R. and Chang, S.S. (1992). Osteopetrosis. *Semin Nephrol* 12, 191-199.
57. Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702.
58. Spiegelman, B.M. and Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87, 377-89.
59. Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., and Takahashi, N. (1995). Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17(2suppl), 87-91.
60. Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J., and Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602.
61. Takayanagi, H., Juji, T., Miyazaki, T., Iizuka, H., Takahashi, T., Isshiki, M., Okada, M., Tanaka, Y., Koshihara, Y., Oda, H., Kurokawa, T., Nakamura, K., and Tanaka, S. (1999). Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest* 104, 137-146.
62. Tanaka, S., Amling, M., Neff, L., Peymann, A., Uhlmann, E., Levy, J.B., and Baron, R. (1996). c-Cbl is downstream of c-Src in a signalling pathway necessary for bone resorption. *Nature* 383, 528-531.
63. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., and Deeds, J. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.

64. Teitelbaum, S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
65. Tremollieres, F.A., Pouilles, J.M., and Ribot, C. (1993). Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 683-686.
66. Walker, D.G. (1972). Congenital osteopetrosis in mice cured by parabiotic union with normal siblings. *Endocrinology* 91, 916-920.
67. Walker, D.G. (1975). Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *J Exp Med* 142, 651-663.
68. Walker, D.G. (1975). Spleen cells transmit osteopetrosis in mice. *Science* 190, 785-787.
69. Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4828-4832.
70. Wüster, C. (1997). Klinik und Therapie der primären Osteoporosen. In *Metabolische Osteopathien*. M.J. Seibel and H. Stracke, eds. (Stuttgart, New York: Schattauer), 161-190.
71. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., and Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7), 3597--3602

72. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., and Shultz, L.D. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of macrophage colony stimulating factor. *Nature* 345, 442-444.
73. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1995). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
74. Zheng, Q., Du, J., Xia, Z., Zeng, H., Li, S., Yan, Y., and Chen, F. (1998). Biodegradation of tricalcium phosphate ceramics by osteoclasts. *J Tongji Med Univ* 18, 257-261.

Preise und Publikationen im Rahmen der Dissertation

Preise

2001 Travel Grant der International Bone and Mineral Society (IBMS) und der European Calcified Tissue Society (ECTS)

Originalarbeiten

1. Ducy P., Amling M., Takeda S., Priemel M., Schilling A.F., Beil F.T., Shen J., Vinson C., Rueger J.M., Karsenty G. (2000).

Leptin inhibits Bone Formation Through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. **Cell** 100: 197-207 (Anlage 1)

2. Amling M., Neff L., Priemel M., Schilling A.F., Rueger J.M., Baron R. (2000).

Progressive osteopetrosis and development of odontomas in aging src-deficient mice. **Bone** 27: 603-610 (Anlage 2)

3. Schilling A.F., Priemel M., Beil F.T., Haberland M., Holzmann T., Catala-Lehnen P., Pogoda P., Blicharski D., Müldner C., Löcherbach C., Rueger J.M., Amling M. (2001).

Transgenic mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton. **J Musculoskeletal Neuronal Interactions** 1(3): 275-289 (Anlage 3)

4. Haberland M., Schilling A.F., Rueger J.M., Amling M. (2001).

Brain & Bone: Central regulation of bone mass: A new paradigm in skeletal biology. **Journal of Bone and Joint Surgery** 83-A(12):1871-1876

5. Haberland M., Schilling A.F., Rueger, J.M., Amling M. (2001).

Think Bone. The Novel Paradigm of Central Bone Mass Control. **Eur J Trauma** 27: 218-225

6. Amling M., Pogoda P., Beil FT., Schilling A.F., Holzmann T., Priemel M., Blicharski D., Catala-Lehnen P., Rueger J.M., Ducy P., Karsenty G. (2001).
Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton. **Adv Exp Med Biol** 496: 85-94.

7. Schilling A.F., Briem D., Rueger J.M., Amling M. (1999).
Generierung von Osteoklasten aus menschlichen CD34+ Stammzellen und peripheren Blutzellen: Zwei neue Modelle zur *in vitro* Untersuchung der Knochenresorption. **Hefte zur Zeitschrift "Der Unfallchirurg"** 275: 151-152

8. Schilling A.F., Priemel M., Linhart W., Rueger J.M., Amling M. (2000).
Neue Perspektiven für die Knochenbruchheilung durch genetische Kontrolle der Knochenbildung. **Osteosynthese International** 184-187

9. Linhart W., Peters F., Lehmann W., Schwarz K., Amling M., Schilling A.F., Rueger J.M., Epple M. (2001).
Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. **J Biomed Mat Res** 162-171

10. Amling M., Schilling A.F., Haberland M., Rueger J.M. (2001).
Leptin: Faktor in der zentralnervösen Regulation der Knochenmasse. Entwicklung eines neuen Verständnisses von Knochenremodeling, Skeletumbau, Skeletterhaltung und Skelettrepaur. **Orthopäde** 30(7): 418-424

Buchbeiträge

Amling M., Pogoda P., Beil F.T., Schilling A.F., Holzmann T., Priemel M., Blicharski D., Catala-Lehnen P., Rueger J.M., Ducy P., Karsenty G. (2001).
Central Control of Bone Mass: Brainstorming of the skeleton. In: **Proceedings of non-invasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone**. Majumdar S, Bay BK, eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers 85-94

Amling M., Schilling A.F., Rueger J.M. (2000).

Osteoklasten: Universelle Zellen der Knochenumstrukturierung.

In: **Zelluläre Interaktionen mit Biomaterialien**; Ed. Meenen NM, Katzer A, Rueger JM; *Hefte zur Zeitschrift der Unfallchirurg* 278:43-61

Eingeladene Vorträge

Der Osteoblast 2001, Würzburg

Schilling A.F.

Osteoklasten – Befunde im *in vitro* Modell

Vorträge

Deutscher Orthopädenkongreß 2000, Wiesbaden

Schilling A.F., Rueger J.M., Amling M.

Progressive Osteopetrose und defekte Zahnentwicklung in *c-fos*^{-/-}, *op/op* und *c-src*^{-/-} Mausmodellen beruht auf einer Differenzierungs- und Funktionsstörung im Osteoklasten

Deutscher Orthopädenkongreß 2000, Wiesbaden

Schilling A.F., Zander A.R., Rueger J.M., Amling M.

Generierung humaner Osteoklasten aus Knochenmark und peripherem Blut: Neues System zur *in vitro* Analyse von Knochenresorptionsmechanismen

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie 2000, Berlin

Schilling A.F., Priemel M., Rueger J.M., Amling M.

Leptin reguliert die Knochenmasse über den Hypothalamus

International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2000, Wien

Schilling A.F., Holzmann T., Beil F.T., Priemel M., Rueger J.M., Amling M.

Neuroendocrine Regulation of Bone Mass by Leptin

Osteologie 2000, Würzburg:

Schilling A.F., Amling M., Rueger J.M.

Osteoklasten Differenzierungs und Funktionsstörung: Progressive Osteopetrose und defekte Zahnentwicklung in *c-fos*^{-/-}, *op/op*, *deltaFosB* und *c-src*^{-/-} Mausmodellen

Poster

Tagung der Nordwestdeutschen Chirurgen 2000, Hamburg

Schilling A.F., Beil F.T., Priemel M., Rueger J.M., Amling M.

Leptin reguliert die Knochenmasse über den Hypothalamus

American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2000, Toronto

Schilling A.F., Rueger J.M., Amling M.

Human Osteoclast Formation *in vitro* is dependent on Cell Density of Precursors

European Calcified Tissue Society (ECTS) 2000, Turku

Schilling A.F., Zander A.R., Rueger J.M., Amling M.

Human Osteoclasts from Bone Marrow and Peripheral Blood - Development of an *in vitro* Culture System for Comparative Studies

American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 1999, St. Louis

Schilling A.F., Briem D., Rueger J.M., Amling M.

Human Bone Marrow Cells and Peripheral Blood Cells Have the Same Capacity to differentiate into Functional Active Osteoclast-Like-Cells (OCLs)

Küntscher Kreis 1999, Frankfurt

Schilling A.F., Briem D., Linhart W., Rueger J.M., Amling M.

Humane Osteoklasten - Protagonisten bei der Knochenbruchheilung

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mit Ihrer Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rueger möchte ich mich sehr herzlich für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Bearbeitung dieses von der täglichen unfallchirurgischen Praxis doch scheinbar relativ weit entfernten Grundlagenthemas bedanken.

Meinen Eltern Annelie Schilling und Prof. Dr. Wolfgang Schilling danke ich für ihre bedingungslose Liebe, die Anleitung zu freiem Denken und grammatischen Feinschliff, meinen Geschwistern Annerose und Wolf Walter Schilling für moralischen Rückhalt und kritische Diskussion.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Michael Amling bedanken, durch dessen exzellente Betreuung das Arbeiten an diesem Thema zu einem intellektuellen Genuß wurde und der es verstanden hat, eine Ansammlung von Individualisten mit den unterschiedlichsten Charakteren zu einer Gruppe zu formen, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Bei Prof. Dr. Delling bedanke ich mich für seine wohlwollende Unterstützung insbesondere als Sprecher des Graduiertenkollegs von 1999 bis 2000.

Bei unseren Kooperationspartnern bedanke ich mich für den unkomplizierten und fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch: Bei Prof. Dr. Karsenty und Dr. Takeda für die Hilfe bei der Charakterisierung von Leptin und die freundliche Aufnahme während meines Forschungsaufenthaltes in Houston, bei Prof. Dr. Zander für die Überlassung des Knochenmarks, bei Prof. Dr. Soriano für die Überlassung der *c-src*-defizienten-Mäuse, bei Prof. Dr. Horton für den 23C6-Antikörper.

8 Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung des Graduiertenstipendiums.

Bei Dr. Thorsten Schinke und Dr. Mike Haberland möchte ich mich für die vielen Denkanstöße bedanken.

Bei Michael, Marc, Matthias, Mike, Thorsten, Timo, Tim, Philip und Cordula, für die fröhliche Seite der Forschung. Bei Daniela für die gute Idee.

9 Curriculum Vitae

29. Januar 1972 Geboren in Georgsmarienhütte, Niedersachsen
- 1983 - 1991 Gymnasium Paulinum Münster, Abiturjahrgang 1991
- 1991 - 1992 Wehrdienst, Leer, 4. Sanitätsbataillon 11
- 1992 - 1994 Medizinstudium Universität Göttingen
- 1994 - 1998 Medizinstudium Universität Hamburg
- 1997 Famulatur: Nuffield Orthopaedic Center, University of Oxford, UK
- 1997 USMLE, United States Medical Licensing Exam Step One
- 1997 - 2000 Wissenschaftliche Arbeit zur Osteoklastenbiologie im Zentrum Biomechanik der Universität Hamburg
- 1999 - 2001 Stipendiat der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs 476 „Knochensubstanz und Strukturverlust“
(Sprecher: Prof. Dr. G. Delling / Prof. Dr. J. M. Rueger)
- 1999 - 2000 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. J. M. Rueger)
- 1999 - 2001 Aufbaustudium Molekularbiologie *magna cum laude*, ZMNH, Universität Hamburg
(Kommissionsleitung: Prof. Dr. M. Schachner)
- 2000 Forschungsaufenthalt im Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA (Prof. Dr. G. Karsenty)
- 2000 Erteilung der Approbation als Arzt
- seit 1.3.2001 Wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. J. M. Rueger)

10 Anlagen

Anlage 1

Ducy P., Amling M., Takeda S., Priemel M., Schilling A.F., Beil F.T., Shen J., Vinson C., Rueger J.M., Karsenty G. (2000). Leptin inhibits Bone Formation Through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass.

Cell 100: 197-207

Anlage 2

Amling M., Neff L., Priemel M., Schilling A.F., Rueger J.M., Baron R. (2000). Progressive osteopetrosis and development of odontomas in aging src-deficient mice.

Bone 27: 603-610

Anlage 3

Schilling A.F., Priemel M., Beil F.T., Haberland M., Holzmann T., Catala-Lehnen P., Pogoda P., Blicharski D., Müldner C., Löcherbach C., Rueger J.M., Amling M. (2001). Transgenic mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton.

J Musculoskeletal Neuronal Interactions 1: 275-289

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig 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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Arndt F. Schilling)

Hamburg, den 16. Januar 2002
