

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Hans Jürgen-Thiesen

# **Der Einfluss von allogener Knochenmark auf die Entwicklung des Knochenphänotyps in der Maus**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Anja Osterberg, geb. am 09.09.1986 in Friedrichroda

Aus Ettlingen

Rostock, 22.08.2016

Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke

Institut für Immunologie

Universität Rostock

Prof. Dr. Brigitte Vollmar

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Universität Rostock

Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda

Julius Wolff Institut

Charité Berlin

Einreichung: 22.08.2016

Verteidigung: 11.04.2017

Für Paul Dreifuß, Cleo, Vroni, Renaaade & Kalle, sowie all ihre nahen und fernen Verwandten,  
die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

## **I. Inhaltsverzeichnis**

I. Inhaltsverzeichnis .....	I
II. Abbildungsverzeichnis .....	V
III. Tabellenverzeichnis .....	VII
IV Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
i. Allgemeine Abkürzungen .....	VIII
ii. Maßeinheiten.....	X
1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	3
2.1 Der Knochen im Detail .....	3
2.1.1 Zusammensetzung und struktureller Aufbau .....	4
2.1.2 Knochenzellen.....	5
2.1.2.1 Die Osteoblastenlinie .....	5
2.1.2.2 Osteoklasten .....	9
2.1.3 Ossifikation .....	12
2.1.4 Remodeling.....	13
2.1.5 Knochenkrankheiten.....	16
2.2 Transplantation von Hämatopoetischen Stammzellen .....	17
2.2.1 Indikationen.....	18
2.2.2 Prinzip der HSCT .....	18
2.2.2.1 Konditionierung.....	19
2.2.2.2 Gewinnung der Transplantate .....	20
2.2.2.3 HLA-Kompatibilität.....	21
2.2.3 Komplikationen und Spätfolgen .....	23
2.2.3.1 Osteoporose nach HCST.....	25
2.3 Tiermodelle .....	26
2.3.1 C57BL/6J .....	26
2.3.2 STR/ort.....	27
2.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	29
3. Material und Methoden .....	30

---

3.1 Material .....	30
3.1.1 Puffer .....	30
3.1.1.1 ACD-A-Stabilisator.....	30
3.1.1.2 FACS-Puffer (pH 7,4) .....	30
3.1.1.3 HBSS – ohne Mg <sup>2+</sup> / Ca <sup>2+</sup> .....	30
3.1.1.4 Maus-Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,4) .....	30
3.1.1.5 PBS (pH 7,4).....	31
3.1.1.6 TRAcP-Färbepuffer (pH 5,0) .....	31
3.1.1.7 TRAcP-Färbelösung – auf Basis von TRAcP-Färbepuffer .....	31
3.1.2 Antikörper.....	31
3.2 Methoden .....	32
3.2.1 Versuchstiere .....	32
3.2.2 Bestrahlung.....	32
3.2.3 Rekonstitution .....	33
3.2.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer.....	35
3.2.5 Probensammlung.....	36
3.2.6 Durchflusszytometrie .....	37
3.2.7 Mikrosatellitenanalyse .....	39
3.2.7.1 DNA-Isolation aus Blutzellen.....	39
3.2.7.2 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	40
3.2.7.3 Touchdown-PCR.....	41
3.2.7.4 Kapillar-Gelelektrophorese .....	43
3.2.8 Mikro-Computertomographie-Analyse .....	44
3.2.9 Histologie .....	47
3.2.9.1 Vorbereitung .....	47
3.2.9.2 HE-Färbung.....	48
3.2.9.3 TRAcP-Hämalaun-Färbung .....	49
3.2.9.4 Fast Green/ Safranin-O-Färbung.....	50
3.2.10 Konzentrationsbestimmung von Knochenumbaumarkern und Zytokinen im Plasma .....	51
3.2.10.1 Enzym-gebundene Immunsorptionsverfahren .....	51

---

3.2.10.2 Bead-basierte Multiplexanalyse im Durchflusszytometer .....	53
3.2.11 Statistik .....	54
4. Ergebnisse.....	55
4.1 Überlebensrate nach der Knochenmarktransplantation .....	55
4.2 Nachweis von erfolgreich transplantiertem Knochenmark.....	56
4.3 Körperliche Entwicklung der Versuchstiere im Vergleich .....	57
4.4 Einfluss von allogenen Knochenmark auf die Knochenmikrostruktur .....	58
4.4.1 Distale Metaphyse .....	59
4.4.2 Mittlere Diaphyse .....	61
4.5 Einfluss der Konditionierung auf die Knochenmasse .....	64
4.6 GvHD und Inflammation .....	65
4.6.1 Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Zytokinen .....	65
4.6.1.1 Rahmenparameter der Messung .....	65
4.6.1.2 Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine im Plasma .....	66
4.6.2 Immunzellen der Milz .....	68
4.6.2.1 Anzahl der Milzzellen .....	68
4.6.2.2 Myeloide Immunzellen .....	70
4.6.2.3 Lymphoide Immunzellen.....	72
4.6.3 Größe der Milz und Anzahl von Megakaryozyten .....	74
4.7 Die Knochenzellen unter allogenen Bedingungen.....	76
4.7.1 Dichte der Osteoklasten in der mittleren Diaphyse der Femora .....	77
4.7.2 Knochenumbaumarker .....	78
4.7.2.1 RANKL/OPG-Verhältnis .....	79
4.7.2.2 PINP .....	79
4.8 Einfluss von allogenen Knochenmark auf die Osteoarthrose in männlichen STR/ort- Mäusen .....	81
5. Diskussion .....	83
5.1 Die Transplantation von allogenen Knochenmark war erfolgreich.....	83
5.2 Die Transplantation von allogenen Knochenmark, nicht aber die gewählte Konditionierung, bewirkt eine Reduktion der Knochenmasse in allen untersuchten Gruppen .....	84

5.3 GvHD kann als Ursache für die geringere Knochenmasse in Tieren mit allogenen Knochenmark ausgeschlossen werden.....	86
5.3.1 Die Plasmakonzentrationen der untersuchten Zytokine zeigten keine Änderungen, die mit dem allogenen Knochenmark assoziiert waren .....	87
5.3.2 Die Anteile der Immunzellen der Milz sind spenderstammspezifisch .....	89
5.4 Eine Fehlfunktion der Osteoblasten und nicht der Osteoklasten ist ursächlich für die reduzierte Knochenmasse nach einer allogenen HSCT .....	90
5.4.1 Osteoklasten zeigen in Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation keine Veränderung .....	90
5.4.2 Die Osteoblastenaktivität ist in Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation verringert .....	93
5.5 <i>In Vitro</i> -Kulturen können Aufschluss über die Beobachtungen geben .....	97
5.6 Die Transplantation von allogenen Knochenmark hat keinen Einfluss auf die Osteoarthroseentwicklung in der STR/ort-Maus .....	99
5.7 Schlussfolgerung .....	100
6. Literaturverzeichnis .....	101
7. Anhang.....	114
7.1 Verbrauchsmaterialien .....	114
7.2 Chemikalien .....	115
7.3 Geräte .....	116
7.4 Software.....	117

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Knochenaufbaus durch Osteoblasten. ....	6
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Knochenresorption durch einen Osteoklasten. ..	10
<b>Abbildung 3:</b> Chondrale Ossifikation von Röhrenknochen. ....	13
<b>Abbildung 4:</b> Verteilung der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Gene des Menschen und der Maus.....	22
<b>Abbildung 5:</b> Die Bestrahlung der Versuchstiere erfolgte mit der Kleintierbestrahlungsanlage IBL 637. ....	33
<b>Abbildung 6:</b> Punktwolkendarstellung und Regionendefinition der Milzzellen im Durchflusszytometer. ....	39
<b>Abbildung 7:</b> Definition der Referenzlevel und der „Region of Interest“ (ROI) für die Analyse der Mausfemora nach dem $\mu$ CT-Scan. ....	46
<b>Abbildung 8:</b> Umsatzreaktion von den Substraten Naphthol AS-MX Phosphat und Fast Red TR durch eine Alkalische Phosphatase zu einem roten, unlöslichen Azofarbstoff. ....	49
<b>Abbildung 9:</b> Beispiel einer Standardkurve der Bead-basierten Multiplexanalyse im Durchflusszytometer. ....	54
<b>Abbildung 10:</b> Das erfolgreiche Anwachsen des Knochenmarks wurde mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse des Markers D9Mit129 nachgewiesen. ....	56
<b>Abbildung 11:</b> Die prozentuale Änderung des Körpergewichts über den Versuchszeitraum ist vergleichbar. ....	57
<b>Abbildung 12:</b> Die Femurlänge der Versuchstiere ist unabhängig vom Spender des Knochenmarks. ....	58
<b>Abbildung 13:</b> Tiere mit allogenen Knochenmark haben weniger trabekulären Knochen in der distalen Metaphyse der Femora.....	60
<b>Abbildung 14:</b> STR/ort-Mäuse mit allogenen Knochenmark haben weniger trabekuläre Strukturen in der Diaphyse der Femora. ....	63
<b>Abbildung 15:</b> Die Konditionierung hat nur vereinzelt einen Einfluss auf die Knochenmasse..	64
<b>Abbildung 16:</b> Die Anzahl der Milzzellen ist spenderstammspezifisch.....	69
<b>Abbildung 17:</b> Der prozentuale Anteil der myeloiden Zellen in der Milz ist stammspezifisch..	71

**Abbildung 18:** Die Gesamtzahl von lymphoiden Zellen in der Milz sind teilweise stammspezifisch. .... 73

**Abbildung 19:** Das Milzgewicht pro Körpergewicht ist bei STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark geringer, als bei Tieren mit syngenen Knochenmark..... 75

**Abbildung 20:** Die Anzahl der Megakaryozyten pro Milzfläche ist bei STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark geringer, als bei Tieren mit syngenen Knochenmark..... 76

**Abbildung 21:** Allogenes Knochenmark hat keinen Einfluss auf die Osteoklastendichte. .... 78

**Abbildung 22:** Der Ursprung des transplantierten Knochenmarks hat einen Einfluss auf das RANKL/OPG-Verhältnis..... 79

**Abbildung 23:** Die PINP-Konzentration ist bei STR-Tieren mit allogenen Knochenmark niedriger als bei Tieren mit syngenen Knochenmark..... 80

**Abbildung 24:** Allogenes Knochenmark hat keinen Einfluss auf die Osteoarthritis der STR/ort-Maus. .... 82

### **III. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die wichtigsten systemischen und lokal produzierten Einflussfaktoren auf Osteoklasten (OC) und Osteoblasten (OB).....	14
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der Antikörper, die bei der durchflusszytometrischen Messung zum Einsatz kamen.....	31
<b>Tabelle 3:</b> Marker für die Durchflusszytometrie und die eingesetzten Mengen.....	38
<b>Tabelle 4:</b> Bestandteile der PCR mit den Konzentrationen in der Stocklösung und im 10 µl-Ansatz. ....	42
<b>Tabelle 5:</b> Programmverlauf der Touch-Down-PCR. ....	42
<b>Tabelle 6:</b> Einstellungen am Mikro-Computertomograph SkyScan 1076 für den Scan von Mausknochen. ....	44
<b>Tabelle 7:</b> Einstellungen für die Rekonstruktion der Rohdaten mit der Software NRecon. ....	45
<b>Tabelle 8:</b> µCT-Parameter, die für die Auswertung der Versuchsreihe ausgewählt wurden, sowie deren Definition. ....	47
<b>Tabelle 9:</b> HE-Färbeprotokoll. ....	48
<b>Tabelle 10:</b> TRAcP-Hämalaun-Färbeprotokoll.....	50
<b>Tabelle 11:</b> Fast Green/ Safranin-O-Färbeprotokoll.....	51
<b>Tabelle 12:</b> Rahmenparameter, die bei der Interpretation der Messungen berücksichtigt werden müssen. ....	66
<b>Tabelle 13:</b> Mediane Konzentrationen (pg/ ml) von inflammatorischen Zytokinen im Plasma von C57BL/6J-Mäusen. ....	67
<b>Tabelle 14:</b> Mediane Konzentrationen (pg/ ml) von inflammatorischen Zytokinen im Plasma von STR/ort-Mäusen.....	68

## IV Abkürzungsverzeichnis

### i. Allgemeine Abkürzungen

$\alpha$ -MEM	Zellkulturmedium; "Minimum essential Medium $\alpha$ -Modification"
$\mu$ CT	Mikro-Computertomographie
A. dest	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
ACD-A	Säure-Zitrat-Dextrose-Stabilisator A ( <i>engl.</i> anticoagulant citrate dextrose solution A)
B6	C57BL/6J-Mausstamm
B.Ar	Knochenfläche ( <i>engl.</i> bone area)
BV	Knochenvolumen ( <i>engl.</i> bone volume)
$\text{Ca}^{2+}$	zweifach positivgeladenes Kalzium-Ion
Cs	Cäsium
Cs.Th	Querschnittsdicke ( <i>engl.</i> crosssectional thickness)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gebundene Immunadsorptionsverfahren ( <i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
et al.	und andere ( <i>lat.</i> et alii)
FACS	Fluoreszenz-basierende Zellsortierung ( <i>engl.</i> fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum ( <i>engl.</i> fetal calf serum)
Gy	Gray
HBSS	Hank's Salzlösung ( <i>engl.</i> Hank's balanced salt solution)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IVC	Individuell-ventillierter Käfig ( <i>engl.</i> individually ventilated cage)

KM	Knochenmark
MFI	mittlere relative Fluoreszenzintensität
Mg <sup>2+</sup>	zweifach positiv-geladenes Magnesium-Ion
MNS	Mausnormalserum
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl.</i> ploymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/ Streptomycin
ROI	Bereich von Interesse ( <i>engl.</i> region of interest)
RPMI	Zellkulturmedium; benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>engl.</i> standard deviation)
SEM	Standardfehler ( <i>engl.</i> standarderror of the mean)
SMI	Strukturmuster-Index ( <i>engl.</i> structure model index)
SPF	spezifisch pathogenfrei ( <i>engl.</i> specific pathogen free)
STR	STR/ort-Mausstamm
Tab.	Tabelle
T.Ar	Gewebsfläche ( <i>engl.</i> tissue area)
Tb.N	Trabekelanzahl ( <i>engl.</i> trabecular number)
TRAcP 5b	Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b ( <i>engl.</i> tartrate-resistant acid phosphatase 5b)
TV	Gewebevolumen ( <i>engl.</i> tissue volume)
ÜN	über Nacht

**ii. Maßeinheiten**

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
g	Gramm
h	Stunde
IU	Internationale Einheit ( <i>engl.</i> international unit)
kg	Kilogramm
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s	Sekunde
U	Einheit ( <i>engl.</i> unit)

## **1. Zusammenfassung**

Osteopenie und Osteoporose gehören zu den Langzeitfolgen nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). Bisher wurden u.a. die Konditionierung, die Entwicklung einer Graft versus Host Disease (GvHD) oder die immunsuppressive Therapie dafür verantwortlich gemacht. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des allogenen Knochenmarks auf den Knochen bei gleichzeitiger Abwesenheit einer immunsuppressiven Therapie und einer GvHD zu untersuchen. Dazu wurden Knochenmarktransplantationen (KMT) zwischen 1,5 Monate alten Mäusen des osteopenen Inzuchtstammes C57BL/6J und des hyperostotischen Inzuchtstammes STR/ort durchgeführt (allogene KMT). Das Anwachsen des allogenen Knochenmarks wurde am Versuchsende im Alter von 6 Monaten mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse der peripheren Blutzellen bestätigt. Da beide Stämme denselben MHC-Haplotypen (H-2b) besitzen, konnte auf die Gabe von Immunsuppressiva vollständig verzichtet werden. Zum Vergleich wurden KMT mit Spendermaterial von genetisch identischen Geschwistertieren des eigenen Stammes durchgeführt (syngene KMT). Um außerdem den Einfluss der Konditionierung auf den Knochen abschätzen zu können, wurden die Tiere nach syngener KMT zusätzlich mit gleichaltrigen, unbehandelten Tieren verglichen. Bei beiden Mausstämmen sowie beiden Geschlechtern konnte in Tieren, die allogenes Knochenmark transplantiert bekamen, über eine Mikro-Computertomographie signifikant weniger trabekulärer Knochen nachgewiesen werden. Die Konditionierung hatte dagegen lediglich einen stamm- und geschlechtsspezifischen Effekt. Über die Analyse von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen sowie die Zusammensetzung der Immunzellen der Milz konnte gezeigt werden, dass die Tiere mit allogenum Knochenmark nicht unter einer systemischen Inflammation litten und keine veränderten Zellzahlen aufwiesen, die mit den allogenen Konditionen in Zusammenhang standen. In Kombination mit einer vergleichbaren Gewichtsänderung der Tiere schließt das die Entwicklung einer GvHD und somit die GvHD als Ursache für eine verminderte Knochenmasse aus. Die Osteoklastendichte im Femur, sowie das Verhältnis von RANKL zu OPG waren ebenfalls in

Tieren mit allogenen Knochenmark unverändert. Die PINP-Plasmakonzentrationen waren jedoch signifikant niedriger, was ein Hinweis auf eine verminderte Aktivität der Osteoblasten ist. Da die untersuchten Osteoklastenparameter vergleichbar, die Osteoblastenaktivität jedoch verringert war, scheint die Kopplung der beiden Zellen miteinander unter allogenen Konditionen gestört zu sein.

Diese Arbeit zeigt somit, dass unabhängig von der Entwicklung einer GvHD, der Gabe von Immunsuppressiva und bedingt unabhängig von der Konditionierung, eine verringerte trabekuläre Knochenmasse auch auf den allogenen Konditionen basiert und auf eine verminderte Osteoblastenaktivität zurückzuführen ist.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Der Knochen im Detail**

Die Knochen übernehmen im Körper wichtige und vielfältige Aufgaben und sind, betrachtet man sie als Einheit, mit etwa 15 % des Körpergewichtes das größte Organ im menschlichen Körper. Neben der Stütz- und Fortbewegungsfunktion schützen sie auch wichtige Organe wie das Gehirn, das Herz oder die Lunge. Außerdem bilden die Knochen den körpereigenen größten Speicher für Minerale wie Kalzium, Magnesium oder Phosphat, die bei Bedarf aus den Knochen freigelassen und so dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden können. Die Knochen beherbergen zudem das Knochenmark, das für die Herstellung und Aufrechterhaltung des blutbildenden Systems und der Immunzellen verantwortlich ist. Das Erstaunlichste am Knochen ist allerdings, dass er trotz seiner starren Beschaffenheit einem ständigen Umbau unterzogen wird. Im Rahmen des sogenannten Remodelings wird altes Knochengewebe ersetzt, Mikrorisse und kleinere Beschädigungen repariert oder die Knochenstruktur an veränderte Belastungsanforderungen angepasst. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Osteoblasten als knochenaufbauende Zellen, die Osteoklasten als abbauenden Zellen, sowie die Osteozyten, die primär eine regulatorische Funktion einnehmen. Über RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) und OPG (Osteoprotegerin) sind Osteoblasten und Osteozyten in der Lage, die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten zu steuern. Doch auch viele weitere Faktoren sind in den Knochenstoffwechsel involviert und können diesen aus dem Gleichgewicht bringen.

Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über den strukturellen Aufbau des Knochens (Abschnitt 2.1.1), die Knochenzellen (Abs. 2.1.2), die Entstehung und das Wachstum der Knochen (Abs. 2.1.3), den Vorgang des Remodelings (Abs. 2.1.4) und Knochenerkrankungen (Abs. 2.1.5) geben.

### **2.1.1 Zusammensetzung und struktureller Aufbau**

Die mechanischen Anforderungen an den Knochen sind durch seine Funktion als Stützapparat sehr hoch. Er muss belastbar und gleichzeitig elastisch sein und sollte dennoch möglichst wenig Gewicht aufbringen. Ermöglicht wird dies durch die besondere Bauweise und Zusammensetzung der Knochen (Bartl 2014a).

Das Grundgerüst bildet eine organische Matrix bestehend aus Kollagen-Typ-I, nicht-kollagene Proteine sowie Proteoglykane, die zusammen die nötige Elastizität gewährleisten. Die Mineralisierung mit Hydroxyapatit gibt dem Knochen gleichzeitig die Festigkeit, die für seine Funktion als Stützapparat benötigt wird. Doch die Zusammensetzung des Knochens allein reicht noch nicht aus, um den Anforderungen gerecht zu werden. Eine weitere Besonderheit ist der strukturelle Aufbau der Knochen. Auf der einen Seite gibt es die Kortikalis, ein kompaktes Knochengewebe, das die Hülle der Röhrenknochen bildet. Beim Menschen besteht die Kortikalis aus zylinderförmigen Einheiten, die parallel zu Längsachse der Diaphyse angeordnet sind und Osteone genannt werden. Interessanterweise besitzen Mäuse, die häufig als Tiermodell für humane Knochenkrankheiten herangezogen werden, dagegen keine Osteone (Jilka 2013).

Auf der anderen Seite gibt es den trabekulären Knochen, der oft auch als spongiös bezeichnet wird, weil er aus miteinander verbundenden Knochenbälkchen besteht und schwammartig aufgebaut ist. Durch die Ausrichtung an den Belastungslinien und Verknüpfungen miteinander sorgen sie gleichzeitig für Elastizität und Stabilität während der Bewegung. Allgemein ergibt sich die Knochenfestigkeit also aus der Knochenmasse, der Geometrie und chemische Zusammensetzung, sowie der Mikrostruktur. So können verschiedene Stellen eines Knochens trotz vergleichbarer Knochenmineraldichte (BMD, *engl.* bone mineral density) unterschiedlich starken Belastungen standhalten, da sie sich in der Geometrie, Mikrostruktur und Form sowie der Anzahl der Trabekel unterscheiden.

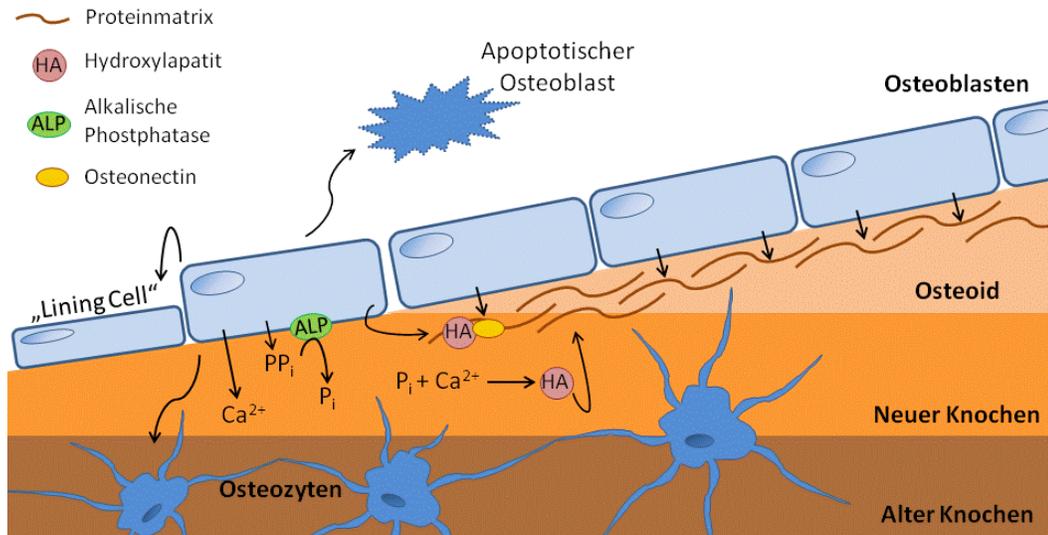
## **2.1.2 Knochenzellen**

### *2.1.2.1 Die Osteoblastenlinie*

Die Zellen der Osteoblastenlinie stammen von MSCs (Mesenchymalen Stammzellen) ab. Zu ihnen gehören die Osteoprogenitor- und Osteoblastenvorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und die sogenannten „Lining Cells“.

#### *Osteoblasten*

Osteoblasten sind kubische Zellen, die an der Knochenoberfläche zu finden sind. Sie sind bipolar, reich an rauem ER (Endoplasmatisches Retikulum), einem großen Golgi-Apparat und vielen Vesikeln. Das liegt daran, dass sie sowohl für die Herstellung des sogenannten Osteoids, also der proteinreichen, noch nicht mineralisierten Knochenmatrix zuständig sind, als auch die Mineralisierung koordinieren (Abb. 1). Die Proteinmatrix besteht zum einen aus Kollagen-Typ-I, aber auch aus vielen nicht-kollagenen Proteinen wie z.B. Osteocalcin, Proteoglykane, Osteopontin oder Osteonectin (Bartl 2014a). Für die Mineralisierung sekretieren die Osteoblasten u.a. Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Außerdem exprimieren sie ALP (Alkalische Phosphatase), welche die Freisetzung von anorganischem Phosphat  $\text{P}_i$  aus Pyrophosphat  $\text{PP}_i$  in der extrazellulären Matrix katalysiert. Die Kalziumionen und das Phosphat bilden Hydroxylapatit und lagern sich an die  $\text{COO}^-$ Gruppen des Osteocalcins an. Zudem sekretieren Osteoblasten auch fertiges Hydroxylapatit, das den Startpunkt für die Kristallisation von weiterem Hydroxylapatit bildet. Weitere Bestandteile der Matrix, wie z.B. Osteonectin können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sowohl Hydroxylapatit, als auch Kollagen binden und sorgen damit für eine weitere Vernetzung zwischen den organischen und anorganischen Bestandteilen des Knochens. Während der Knochenbildung können sich vereinzelt Osteoblasten in den Knochen einbauen und so zu Osteozyten werden (Abs. „Osteozyten“). Die restlichen Osteoblasten werden im Anschluss zu „Lining Cells“ und begeben sich in einen Ruhemodus oder gehen in Apoptose (Bartl 2014a).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenaufbaus durch Osteoblasten.** Eigene Darstellung.

Der wichtigste Schritt zur Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Runx2 (Runt-related transcription factor 2), der eine zentrale Rolle während der gesamten Differenzierung der Osteoblasten einnimmt (Otto et al. 1997). Neben Runx2 ist auch Osx (Osterix) in den späteren Differenzierungsschritten ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der Osteoblasten (Nakashima et al. 2002). Allgemein ist die Regulation der Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten vielfältig. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg hat beispielsweise einen Einfluss auf die Differenzierung von MSCs in Osteoblasten und Chondrozyten. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg während der enchondralen Ossifikation (Abs. 2.1.3) die Differenzierung in Osteoblasten fördert und die der Chondrozyten verhindert (Day et al. 2005). Eine besonders wichtige Rolle nimmt IGF-I (Insulin-like growth factor I) ein, dessen Produktion durch diverse Hormone und Wachstumsfaktoren (z.B. GH (Growth hormone), Östrogen, Progesteron) aktiviert werden kann, aber auch von den Osteoblasten selbst exprimiert wird (Giustina et al 2008). Es beeinflusst sowohl die Differenzierung der MSC und Vorläuferzellen zu Osteoblasten, als auch die Mineralisierung der Knochen durch reife Osteoblasten (Guntur & Rosen 2013). So beruht u.a. auch die osteoporotische Wirkung von Glukokortikoiden auf die systemische und lokale IGF-I-Produktion und die Sensitivität, die jeweils herabgesetzt werden kann und so die Proliferation und Aktivität der Osteoblasten

vermindert (Olney 2009). IGF-I und andere Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) und PDGF (Platelet-derived growth factor), die ebenfalls Osteoblastendifferenzierung und Aktivität stimulieren, können auch in die Knochenmatrix eingebaut werden. Man vermutet, dass so im Rahmen des Remodelings gewährleistet wird, dass nach der Resorption von altem Knochen auch wieder neuer Knochen nachgebaut wird (Fogelman et al 2012). BMP's (Bone morphogenetic proteins), die zur TGF- $\beta$ -Familie gehören, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Stimulation von Osteoblasten. Sie fördern nicht nur die Differenzierung von MSCs in Richtung Osteoblasten, sondern können auch in die Knochenmatrix eingebaut werden (Zhang et al. 2014). Neben den genannten Wachstumsfaktoren, können zudem Vitamin D<sub>3</sub> (Calciferol), Androgene, Insulin oder PTH (Parathormon) einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten haben. PTH, das in den Nebenschilddrüsen produziert wird, hat dabei eine besondere Funktion, da es zusammen mit Calcitonin den Kalziumhaushalt des Körpers regelt. So fördert PTH bei einer konstant hohen Konzentration im Blut die RANKL-Produktion und damit Knochenresorption, während es in intermittierenden Konzentrationen den Knochenaufbau durch die Osteoblasten stimuliert.

Neben der Aufgabe als knochenaufbauende Zelle, wird dem Osteoblasten aber auch eine wichtige Rolle als Teil der HSC (Hämatopoetische Stammzelle)-Nische im Knochenmark zugeschrieben (Park et al. 2012). Durch *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten in der Lage sind, eine HSC-angereicherte Zellpopulation in ihrem Wachstum und den Erhalt der Stammzeleigenschaften zu unterstützen (Taichman et al. 1996). Eine Reihe von extrazellulären sowie membrangebundenen Faktoren der Osteoblasten (z.B. Angiopoietin-1, Thrombopoietin, Notch ligand) werden entsprechend diskutiert, die diese Funktion der Osteoblasten vermitteln sollen (Park et al. 2012). Außerdem sollen die Osteoblasten am Homing der HSC ins Knochenmark beteiligt sein, also dem Auffinden ihrer Nische (Jung et al. 2005). Dennoch gibt es auch einige Arbeiten, die die Bedeutung der Osteoblasten in diesem Kontext relativieren. Die genaue Funktion und die Regulation der HSC-Nische durch Osteoblasten bleibt also ein spannendes Thema, das erst noch genauer aufgeklärt werden muss.

### *Osteozyten*

Osteozyten können bis zu 25 Jahre alt werden und machen ca. 90-95 % der Knochenzellen aus (Arboleya & Castañeda 2013). Sie sind in Lakunen in der Knochenmatrix eingebettet und stehen über Kanälchen namens Kanalikuli miteinander und mit anderen Zellen in Kontakt. Über dieses riesige Netzwerk können Signalmoleküle ausgetauscht werden und es ermöglicht den Osteozyten mechanische Veränderungen oder Knochenläsionen zu detektieren und den Remodeling-Prozess zu aktivieren (Arboleya & Castañeda 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die spezifische Deletion von RANKL in murinen Osteozyten *in vivo* einen osteopetrotischen Phänotyp hervorruft und die Tiere keine Knochenmasse verlieren, wenn die Knochen über längere Zeit mechanisch entlastet werden (Xiong et al. 2011; Nakashima et al. 2011). Man geht zudem davon aus, dass Osteozyten die wichtigsten Produzenten von RANKL während des Remodelings (Abs. 2.1.4) unter physiologischen Bedingungen sind (Xiong et al. 2015). Außerdem rücken Sklerostin und DKK-1 (Dickkopf-related protein 1) vermehrt in den Fokus der Osteozyten-Forschung. Diese Moleküle sind Inhibitoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs, der bei der Differenzierung zu Osteoblasten aktiviert ist (Day et al. 2005). Zuletzt gibt es Hinweise, dass apoptotische Osteozyten an den Stellen von Mikrorissen und – Frakturen das Remodeling auslösen, indem sie Osteoklasten durch freiwerdende Proteine wie RANKL oder VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) an die entsprechenden Stellen im Knochen leiten (Kennedy et al. 2012, Kennedy et al. 2014).

Obwohl man immer besser versteht, welche Funktion die Osteozyten einnehmen, ist die Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten bisher wenig verstanden. Morphologisch nehmen Organellen wie das raue ER oder der Golgi-Apparat sowie die Expression von Osteoblasten-typischen Genen, wie OCN, Kollagen-Typ-I oder ALP ab. Osteozyten-spezifische Marker wie DMP1 (dentine matrix protein 1) und Sklerostin werden dagegen bei der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten vermehrt exprimiert (Poole et al. 2005; Florencio-Silva 2015). Welche Transkriptionsfaktoren jedoch dafür verantwortlich sind oder durch welche Signale bestimmt wird, welcher Osteoblast zu einem Osteozyt wird, konnte bisher noch nicht herausgefunden werden (Dalles & Bonewald 2010).

### „Lining Cells“

Die Funktion von „Lining Cells“ ist bisher kaum untersucht bzw. charakterisiert. Es wird angenommen, dass sie inaktive Osteoblasten darstellen, die den Knochen an den Stellen bedecken, an denen weder Resorption noch Knochenaufbau erfolgen und im Rahmen des Remodelings die Osteoklasten aktivieren können. So können sie durch die Produktion von OPG und RANKL sowohl verhindern, dass Osteoklasten den Knochen resorbieren als auch die Differenzierung der Osteoklasten aktivieren (Florencio-Silva 2015). Außerdem gibt es Hinweise, dass PTH einerseits reife Osteoblasten daran hindert zu „Lining Cells“ zu werden und zum anderen die Reaktivierung von „Lining Cells“ zu aktiven Osteoblasten vermittelt (Kim et al. 2012; Jang et al. 2015). Dennoch sind auch hier die genauen Mechanismen noch nicht aufgeklärt.

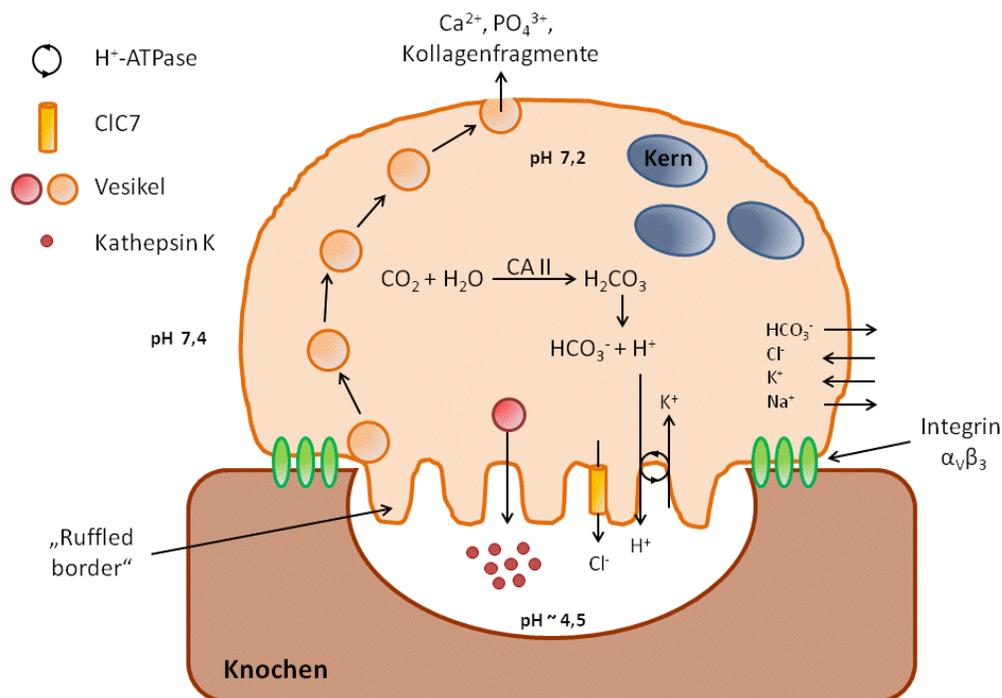
#### 2.1.2.2 Osteoklasten

Osteoklasten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und bauen den Knochen ab. Sie leiten sich von Monozyten ab, entwickeln sich zu Osteoklastenvorläuferzellen und fusionieren schließlich zu mehrkernigen Osteoklasten.

Neben der Mehrkernigkeit zeichnen sich reife und aktive Osteoklasten durch einen polarisierten Aufbau aus. Auf der knochenzugewandten Seite erfolgt die Knochenresorption und auf der abgewandten Seite werden Ionen und Abbauprodukte sezerniert. Der Vorgang der Knochenresorption bedarf dabei der Bildung einer speziellen Resorptionslakune. Durch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine setzt sich der Osteoklast an der Knochenoberfläche fest („Sealing Zone“) und formt einen abgeschlossenen Bereich – die Resorptionslakune. Innerhalb der Resorptionslakune bildet die Membran der Osteoklasten einen Faltsaum („ruffled border“). Dies dient der Oberflächenvergrößerung, um Platz für Protonenpumpen oder Chloridkanäle zu schaffen, damit über Vesikel proteolytische Enzyme freigelassen oder Abbauprodukte durch Endozytose wieder aufgenommen werden können (Bartl 2014a).

Im Detail (Abb. 2) katalysiert die  $\alpha$ -Carboanhydrase II im Zytoplasma die Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) zu Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), die gleich darauf in ein Proton ( $\text{H}^+$ ) und Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) dissoziiert.  $\text{H}^+$  wird dann über die ATPase-Protonenpumpe in die Resorptionslakune gepumpt und sorgt dort für eine Ansäuerung des Milieus. Dadurch wird das

Knochengewebe demineralisiert und das Hydroxylapatit aufgelöst. Die dabei entstehenden Kalzium- und Phosphationen können dann über Endozytose von den Osteoklasten aufgenommen und auf der anderen Seite wieder in die extrazelluläre Matrix sekretiert werden. Durch Proteasen wie Kathepsin K, die ihr pH-Optimum im sauren Bereich haben, wird gleichzeitig in der Resorptionslakuune die Proteinmatrix abgebaut und ebenfalls durch Endozytose in die Osteoklasten aufgenommen und auf der gegenüberliegenden Seite wieder freigesetzt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Knochenresorption durch einen Osteoklasten.** Erstellt und abgewandelt nach Bartl 2014a, Abb. 1.12: Form und Funktion des Osteoklasten.

Der erste Schritt der Differenzierung ist die Bindung von M-CSF (Monozytenkolonienstimulierender Faktor) an seinen Rezeptor c-Fms (Arboleya & Castañeda 2013). M-CSF bestimmt dabei die Differenzierung der HSC in Richtung der Monozyten/ Makrophagen-Linie, zu der die Osteoklasten gehören. Notwendig für die weitere Differenzierung ist anschließend die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK (Receptor Activator of NF-κB). RANKL kann dabei sowohl als lösliches Molekül, als auch in Membran-gebundener Form vorliegen. Die Bindung von RANKL an RANK aktiviert eine Signalkette, u.a. über das Adaptermolekül TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), und führt zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-

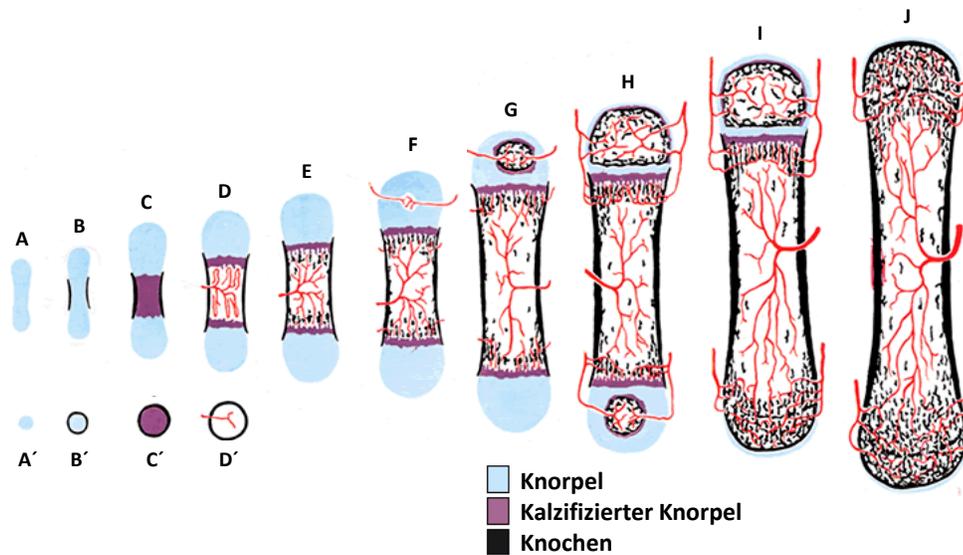
Fos, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) und NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1) (Arboleya & Castañeda 2013).

Dadurch werden wichtige Osteoklastengene aktiviert wie beispielsweise TRAcP (Tartrate resistant acid phosphatase), den Kalzitininrezeptor, Katepsin K oder DC-STAMP (Dendritic cell-specific transmembrane protein) (Florencio-Silva 2015). Die Aktivierung durch RANKL kann allerdings durch den löslichen Rezeptor OPG verhindert werden, der in der Lage ist, RANKL extrazellulär zu binden und „abzufangen“. Somit stellt OPG ebenfalls einen wichtiger Faktor zur Regulierung der Osteoklasten dar. Sowohl RANKL als auch OPG werden primär von Zellen der Osteoblastenlinie oder von Stromazellen des Knochenmarks produziert. Unter pathologischen Umständen können aber auch T- und B-Lymphozyten gewisse Mengen an RANKL und OPG herstellen (Weitzmann 2014). Damit Osteoklasten unter physiologischen Umständen nicht übermäßig durch das RANKL von T-Lymphozyten aktiviert werden, produzieren und sezernieren diese Zellen zeitgleich IFN- $\gamma$ , welches TRAF6 inaktiviert und dadurch die Differenzierung hemmt (Takayanagi et al. 2000). Viele inflammatorischen Zytokine wie die Interleukine IL-1, IL-6, IL-17 oder TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) können die Osteoklastengnese indirekt fördern, indem sie die RANKL-Expression steigern. IL-1 ist zudem in der Lage die Fusion, das Überleben und *in vitro* die Aktivierung der Osteoklasten zu fördern (Braun & Zwerina 2011). Inflammatorische Zytokine können aber auch einen negativen Effekt auf die Entwicklung und Aktivierung der Osteoklasten haben. So werden beispielsweise IFN- $\gamma$ , IL-4/IL-13, IL-10 oder IL-12 als Osteoklasten-hemmend diskutiert (Zhao & Ivashkiv 2011). Neben den inflammatorischen Zytokinen rücken auch vermehrt Immunoglobulin-like Rezeptoren auf den Osteoklasten in den Fokus. Dazu gehören u.a. OSCAR (Osteoclast-associated receptor) und TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), die nach Bindung mit ihren Liganden mit den Adaptermolekülen FcR $\gamma$  (Fc-Rezeptor gamma) bzw. DAP12 (DNAX-associated protein 12 kDa size) assoziieren müssen, damit die Signalweiterleitung im Osteoklasten stattfinden kann (Barrow et al. 2011; Otero et al. 2012). Die Adaptermoleküle zeichnet dabei aus, dass sie selbst keine LigandenbindungsKapazitäten besitzen, aber über ein ITAM (Immune tyrosine-based activation motif) am zytoplasmatischen Ende die Signale weiterleiten können. Auch wenn bisher kaum etwas über die Liganden bekannt ist, wird den Rezeptoren bei der Regulation der Osteoklasten zunehmend eine wichtige Rolle zugeschrieben (Humphrey & Nakamura 2015).

### **2.1.3 Ossifikation**

Beim Knochenwachstum unterscheidet man zwischen zwei unterschiedlichen Prozessen: die desmale Ossifikation und die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation bilden sich die Osteoblasten direkt aus dem Mesenchym und beginnen mit der Produktion von Knochensubstanz. Auf diese Weise entstehen flache Knochen wie z.B. Schädelknochen, Gesichtsschädel oder das Schlüsselbein.

Röhrenknochen entstehen dagegen durch chondrale Ossifikation, bei der bereits bestehendes Knorpelgewebe nach und nach abgebaut und durch Osteoblasten mit Knochensubstanz ersetzt wird. Abbildung 3 zeigt schematisch die Vorgänge während der chondralen Ossifikation. Als Grundlage dient eine Art Knorpelmodell des Knochens (Abb. 3 A), das von Chondroblasten gebildet wurde und im Laufe der Ossifikation mit Knochengewebe ersetzt wird. Im Rahmen der perichondralen Ossifikation wird zunächst im Bereich der Diaphyse eine Knochenmanschette gebildet, indem sich die Osteoblasten aus dem Perichondrium (äußere Bindegewebsschicht) herausbilden und dem Knorpel von außen eine Knochenschicht aufsetzen (Abb. 3 B). Gleichzeitig sorgen die aus den Chondroblasten entstehenden Chondrozyten durch Teilung im Inneren des Knochens für das Längenwachstum (Interstitielles Wachstum). In der Diaphyse des Knochens entsteht zudem ein primäres Ossifikationszentrum, bei dem die Chondrozyten hypertroph werden und anfangen, die Knorpelmatrix zu kalzifizieren (Abb. 3 C). Es kommt zu einer vermehrten Vaskularisierung des Knochens und weiterem interstitiellem Wachstum in die Länge (Abb. 3 D). Durch die Vaskularisierung können mesenchymale Stammzellen in das Knorpelgewebe eindringen und sich in knorpelabbauende Chondroklasten und Osteoblasten differenzieren. Es beginnt die enchondrale Ossifikation, bei der durch den Abbau des kalzifizierten Knorpels die Markhöhle entsteht und gleichzeitig die Osteoblasten mit der Synthese von neuem Knochen beginnen (Abb. 3 E, F). All diese Vorgänge laufen noch vor der Geburt eines Menschen ab. Nach der Geburt entstehen dann im Bereich der Epiphysen die sekundären Ossifikationszentren (Abb. 3 G, H), die sich ebenfalls ausdehnen, bis sie auf das primäre Ossifikationszentrum stoßen. Den Bereich zwischen den Ossifikationszentren nennt man dann Epiphysenfuge und erst am Ende des Wachstums, wenn die Röhrenknochen ihre endgültige Länge erreicht haben, werden sie vollständig geschlossen (Abb. 3 I, J).



**Abbildung 3: Chondrale Ossifikation von Röhrenknochen.** Modifiziert nach <https://www.med-ed.virginia.edu/courses/cell/handouts/images/Bone2.gif> (10.06.2016)

### 2.1.4 Remodeling

Das Remodeling dient der Aufrechterhaltung und Anpassung des Knochens an die aktuellen Belastungsanforderungen und wird in verschiedene Phasen unterteilt (Fogelman et al 2012). Bevor es beginnt, befindet sich der Knochen an der entsprechenden Stelle in einer Ruhephase und ist von „Lining Cells“ bedeckt. In der Aktivierungsphase ziehen sich die „Lining Cells“ allmählich zurück und Osteoklastenvorläuferzellen werden durch Signale der Osteozyten rekrutiert. An der Stelle des Remodelings differenzieren die Osteoklasten und beginnen in der Resorptionsphase den Knochen abzubauen. Dabei werden Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-I, TGF- $\beta$ , PDGF) freigesetzt, die wiederum die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten bewirkt. Dieser Vorgang nennt sich Umkehrungsphase, bei der durch den allmählichen Differenzierungsvorgang der Osteoblasten der Knochenaufbau eingeleitet wird. In der anschließenden Aufbauphase sekretieren die reifen Osteoblasten zunächst Osteoid, das in der abschließenden Mineralisierungsphase dann durch die Anlagerung von Hydroxylapatit gefestigt wird.

Damit die Knochenresorption der Osteoklasten den Knochenaufbau durch die Osteoblasten nicht überwiegt, oder umgekehrt, müssen diese beiden Prozesse genauestens aufeinander abgestimmt sein. Gerät dieser Vorgang aus dem Gleichgewicht, kann das Krankheiten wie die Osteoporose (Abs. 3.1.5) zur Folge haben. Tabelle 1 fasst die Faktoren, die die am Remodelling

beteiligten Knochenzellen beeinflussen, nochmal zusammen, zeigt auf welche Zelle sie wirken und welchen Ursprung sie haben. Es wird deutlich, wie vielschichtig und verschachtelt die Regulation des Remodelings tatsächlich ist. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass systemische Faktoren, wie Sexualhormone und Wachstumsfaktoren eher die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten begünstigen, während sich lokale Faktoren, wie inflammatorische Zytokine, positiv auf Osteoklasten auswirken.

**Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten systemischen und lokal produzierten Einflussfaktoren auf Osteoklasten (OC) und Osteoblasten (OB).** (+) wirkt positiv, (-) wirkt negativ; ( ) hat keinen Einfluss bzw. Einfluss unbekannt.

Faktor	Wirkung auf		Ursprung
	OC	OB	
RANKL	+		OB, OZ, akt. T-Zellen
OPG	-		OB, OZ, T-/B-Zellen
mechan. Stimulation		+	Bewegung
Parathormon	+	+	Nebenschilddrüse
Kalzitinin	-		Schilddrüse
Östrogene	-	+	Ovarien
Androgene		+	Hoden
Progesteron		+	Ovarien (Gelbkörper)
Vitamin D <sub>3</sub>	+	+	Haut, Nahrung
Somatropin (Growth hormone)		+	Hypophysenvorderlappen
FSH	+		Hypophysenvorderlappen
TSH	-		Hypophysenvorderlappen
IGF-I		+	Leber, OB
TGF-β	-	+	u.a. Leukozyten
BMP2/7		+	Divers
PDGF		+	u.a. Thromboz., Megakaryozyten, Fibrobl.
FGF		+	u.a. Gehirn
VEGF	+		Divers
IL-1	+	+	u.a. Monozyten, Makrophagen
IL-6	+		u.a. T-/B-Zellen, Makrophagen, OB
IL-11	+		Stromazellen des Knochenmark
TNF	+		Makrophagen, Lymphozyten
IFN-γ	-		Subpopulationen der T-Zellen, NK-Zellen
Prostaglandin E2	+		u.a. Makrophagen
Glukokortikoide	+	-	Nebennierenrinde

BMP: Bone morphogenetic protein; FGF: Fibroblast growth factor; IGF-I: Insulin-like growth factor I; OPG: Osteoprotegerin; FSH: Follikel-stimulierendes Hormon; OZ: Osteozyt; PDGF: Platelet-derived growth factor; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; TGF-β: Transforming growth factor-β; TSH: Schilddrüsen-stimulierendes Hormon; TNF: Tumor necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor. NK-Zellen: Ntürliche Killerzellen. Aus Sedlacek 2014; Fogelman et al 2012; Bartl 2014a.

Neben der Vielzahl an systemischen Signalen sowie Faktoren, die lokal von den umliegenden Zellen und Gewebe abgegeben werden, treten vermehrt Signalmoleküle in den Vordergrund, über die Osteoklasten und Osteoblasten direkt mit einander kommunizieren. Diese Faktoren, die der zeitlichen Abstimmung der Osteoklasten- und Osteoblastendifferenzierung bzw. – Aktivität dienen, nennt man Coupling-Faktoren. Semaphorin4D (Sema4D) wird beispielsweise von Osteoklasten exprimiert und in deren Zellmembran eingebaut. Sobald es an seinen Rezeptor Plexin-B1 bindet, der auf Osteoblasten zu finden ist, inhibiert es den IGF-I-Signalweg in den Osteoblasten und verhindert so deren Differenzierung (Negishi-Koga et al. 2011). Es wird davon ausgegangen, dass auf diese Weise verhindert werden soll, dass die Osteoblasten mit dem Knochenaufbau beginnen, bevor der alte Knochen entfernt wurde. Ein weiterer, bidirektionaler Signalweg, der vermutlich in die Regulation des Remodelings involviert ist, wird über die Bindung von EphB4 (Ephrin Typ-B Rezeptor 4) mit EphrinB2 vermittelt. EphrinB2 wird auf reifen Osteoklasten exprimiert, während EphB4 auf Osteoblasten zu finden ist. Die Bindung dieser beiden Moleküle fördert einerseits die Differenzierung der Osteoblasten, während es auf der anderen Seite die der Osteoklasten verhindert (Zhao et al. 2006). Es wird vermutet, dass so während der Umkehrphase des Remodellings sichergestellt werden soll, dass keine weitere Knochenresorption erfolgt, während der neue Knochen aufgebaut wird. Es werden noch viele weitere Moleküle als Coupling-Faktoren diskutiert. Dazu zählen u.a. S1P (Sphingosine-1-phosphate), BMP-6, Wnt10b, CT-1 (Cardiotropin-1) oder CTHRC1 (collagen triple helix repeat containing 1) (Ikeda & Takeshita 2014; Sims & Martin 2014).

Neuerdings rückt der Focus auch auf microRNAs (miRNA) (Jing et al. 2015). miRNAs sind nicht-kodierende Einzelstrang-RNAs, die aus 20-25 Nukleotiden bestehen und eine Rolle bei der posttranskriptionalen Modifikation spielen. Durch Bindung an die mRNA können sie die Translation in das Protein verhindern oder ein Zerkleinern der mRNA bewirken. Jing und Kollegen haben 2015 die Vielzahl der miRNAs, ihre Zielproteine und ihre Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten detailliert zusammengefasst. Dabei wird deutlich, dass bisher weit mehr miRNAs bekannt sind, die einen Einfluss auf Osteoblasten haben, als solche, die auf Osteoklasten wirken. Dennoch ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren noch wesentlich mehr miRNAs gefunden werden, die sich auf die Entwicklung und Aktivierung der Knochenzellen auswirken können.

### **2.1.5 Knochenkrankheiten**

Knochenkrankheiten können entweder das gesamte Skelett betreffen oder vereinzelt im Körper auftreten. Sie können auf Anomalien der Knochenmasse, der Knochenarchitektur, der Knochenmatrix, der Mineralisation und des Knochenumbaus beruhen (Bartl 2014b).

Mit einer Inzidenz von 24 % der über 50-jährigen Frauen im Jahr 2009 ist die Osteoporose die häufigste Knochenkrankheit (Hadji et al. 2013). Sie zeichnet sich durch eine Abnahme der Knochenmineraldichte, eine Verschlechterung der Mikroarchitektur und einer damit verbundenen erhöhten Frakturnrate aus. Über eine DXA-Messung (Dual-energy X-ray absorptiometry) wird die Knochenmineraldichte gemessen und der T-Score bestimmt. Der T-Score bei Frauen ist dabei definiert als Standardabweichung (SD) der Knochenmineraldichte im Vergleich zu dem statistischen Mittel gesunder prämenopausaler Frauen (WHO 1994). Als normal bezeichnet man entsprechend den Knochen mit einem T-Score von -1,0 und höher, als osteopen, wenn der T-Score zwischen -1,0 und -2,5 liegt und eine Osteoporose liegt bei einem T-Score von -2,5 und niedriger vor.

Man kann die Osteoporose in primäre (z.B. Postmenopausale (Typ-I) Osteoporose, Senile (Typ-II) Osteoporose, Idiopathische juvenile Osteoporose) und sekundäre Osteoporosen unterteilen (Bartl 2014c). Während primäre Osteoporosen mit einem veränderten Hormonhaushalt und dem Alter zusammenhängen, sind die sekundären Osteoporosen auf Mangelernährung, Medikamenteneinnahme oder inflammatorischen Krankheiten zurückzuführen.

Neben der Osteoporose gibt es noch viele weitere Krankheiten, die den Knochen betreffen (Bartl 2014d). Die Osteomalazie („weicher Knochen“) beruht auf einer Mineralisationsstörung und äußert sich bei Kindern in dem Krankheitsbild der Rachitis. Der Osteomalazie liegt häufig ein Mangel an Vitamin D oder eine Störung im Vitamin D-Stoffwechsel zugrunde. Osteosklerosen bzw. Hyperostosen gehören ebenfalls zu den krankhaften Veränderungen des Knochens, die sich in einer übermäßigen Vermehrung von Knochengewebe äußern. Bekannteste Form ist die Osteopetrose, die auch unter dem Namen Marmorknochenkrankheit bekannt ist. Sie beruht auf einer Unterfunktion der Osteoklasten, die mit einem ungerichteten Knochenzuwachs verbunden ist und resultiert in einer verminderten mechanischen Stabilität. Als Folge leiden die betroffenen Patienten häufig an einem erhöhten Frakturrisiko und einer Knochenmarkinsuffizienz. Bei Morbus Paget kommt es, ähnlich wie bei der Osteopetrose, zu

einem ungeordneten Knochenumbau, der in einem dichten, sklerotischen Knochen resultiert, allerdings kaum Belastungen standhält. Entscheidender Unterschied zur Osteopetrose ist, dass Morbus Paget nicht systemisch sondern lokal auftritt und Deformierung einzelner Knochen bewirken kann. Auch entzündliche Reaktionen, wie bei der Osteomyelitis und der Rheumatoiden Arthritis oder primäre Knochentumore, wie z.B. das Osteoblastom oder Osteosarkom, können Einfluss auf den Knochen haben und Veränderungen hervorrufen. Die Art und Ausprägung der möglichen Knochenkrankheiten ist vergleichbar divers, wie die Faktoren, die den Umbau des Knochens beeinflussen können. Dennoch ist die Osteoporose mit einer Prävalenz von 48 % der über 75-Jährigen Frauen in Deutschland und einer Gesamtzahl von ca. 6,3 Millionen betroffenen Patienten im Jahre 2009 immer noch die mit Abstand bedeutendste Knochenkrankheit (Hadjji et al. 2013).

## **2.2 Transplantation von Hämatopoetischen Stammzellen**

Stammzellen sind in der Lage, sich selbst zu erneuern und in unterschiedliche Linien zu differenzieren. Hämatopoetische Stammzellen sind dabei die Grundlage für alle zellulären Bestandteile des Blutes. Da die Blutzellen zum Teil eine recht begrenzte Lebensdauer haben, werden sie täglich millionenfach neu generiert. Diesen Vorgang nennt man Hämatopoese und er findet ab dem ungefähr siebten Entwicklungsmonat des Menschen im Knochenmark statt (Herr 2015a). Somit stellt das Knochenmark den Ort dar, an dem die hämatopoetischen Stammzellen in besonders großer Anzahl zu finden sind.

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCT; *engl.* hematopoietic stem cell transplantation) findet vielfältig Anwendung um Krankheiten zu therapieren, die das blutbildende System betreffen (Abs. 3.2.1). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Prozedur vorzubereiten und durchzuführen (Abs. 3.2.2). Durch eine Verbesserung der Therapie über die letzten Jahre haben sich zwar die Überlebenschancen verbessert, gleichzeitig sind aber auch zunehmend Spätfolgen wie die Osteoporose sichtbar geworden (Abs. 2.2.3). Im Folgenden sollen entsprechend die Indikation, Prinzipien einer Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen sowie mögliche Komplikationen und Spätfolgen erläutert werden.

### **2.2.1 Indikationen**

Eine HSCT kommt überwiegend bei Tumoren des Immunsystems oder schweren Formen angeborener Immundefekte zum Einsatz. Man unterscheidet dabei zwischen der Transplantation von eigenen Zellen (autologe Transplantation), genetisch identischen Zellen von Zwillingsgeschwistern (syngen) oder fremden Zellen (allogene Transplantation). So wurden laut einem Bericht der Europäischen Gesellschaft für Knochenmarktransplantationen (EBMT, *engl.* European Society for Bone Marrow Transplantation) 2014 in 47 teilnehmenden Ländern insgesamt 16946 allogene und 23883 autologe HSCT durchgeführt (Passweg et al. 2015). Im Detail waren die Patienten, die einer allogenen HSCT unterzogen wurden, am häufigsten an einer Akuten Myeloischen Leukämie (36 %), der Akuten Lymphatischen Leukämie (16 %), Myelodysplastische/ myeloproliferative Neoplasien (15 %) oder an dem Non-Hodgkin-Lymphom (8 %) erkrankt. Die autologe HSCT kam dagegen meistens bei einer Plasmazellerkrankung (50 %), dem Non-Hodgkin-Lymphom (30 %) oder dem Hodgkin-Lymphom (9,8 %) zum Einsatz. In Deutschland wurden 2014 laut dem Bericht des Deutschen Registers für Stammzelltransplantationen DRST 2966 allogene und 3241 autologe HSCT durchgeführt und die Indikationen ähneln denen des europäischen Gesamtbildes (DRST 2015). Bei den allogenen HSCT's in Deutschland stehen Akute Myeloische Leukämie, Chronische Myeloische Leukämie, Myelodysplastisches Syndrom, Akute Lymphatische Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) an erster Stelle während mit einem autologen HSCT primär Plasmazellerkrankung, NHL, Hodgkin-Lymphom und solide Tumore behandelt wurden. In seltenen Fällen kommt eine HSCT aber auch bei Krankheiten, wie der Aplastischen Anämie, Immundefekten, wie SCID (Severe combined immunodeficiency) oder sogar Autoimmunerkrankungen zum Einsatz. Die Möglichkeiten einer HSCT sind also vielfältig, aber letztendlich immer abhängig vom Patienten, der körperlichen Verfassung und vielen weiteren Faktoren.

### **2.2.2 Prinzip der HSCT**

Bei der HSCT wird der Patient einer oftmals myeloablativen Therapie unterzogen (Konditionierung), wodurch nahezu alle blutbildenden Zellen des Patienten ausgelöscht werden, bevor die zuvor gewonnenen eigenen oder fremden hämatopoetischen Stammzellen durch Infusion wieder in den Körper gebracht und das Knochenmark des Patienten mit neuen

Stammzellen besiedelt werden kann. Es gibt allerdings entscheidende Unterschiede in der Vorgehensweise, die an die Patienten und die Krankheit angepasst werden müssen und maßgeblich zum Erfolg der Therapie beitragen.

#### *2.2.2.1 Konditionierung*

Je nach Quelle der Stammzellen, der Diagnose, dem Krankheitsstadium, vorangegangene Therapien und Komorbiditäten gibt es mehrere Möglichkeiten den Patienten zu konditionieren. Dabei werden mehrere Ziele verfolgt: (1) das Immunsystem des Patienten soll unterdrückt werden, damit es zu keiner Abstoßungsreaktion kommt, (2) durch eine vorangehende Myeloablation soll es den fremden, hämatopoetischen Zellen ermöglicht werden anzuwachsen und (3) Tumorzellen, sofern möglich, sollen geschwächt oder sogar beseitigt werden.

Man unterscheidet dabei zwischen hochdosierter/ myeloablativer und nichtmyeloablativer Konditionierung, sowie dem sogenannten Reduced Intensity Conditioning (RIC, reduzierte Konditionierungsintensität) (Bacigalupo et al. 2009). Zur Anwendung kommen eine Radiotherapie in Form von Ganzkörperbestrahlungen (TBI: engl. total body irradiation), eine Chemotherapie oder eine Kombination aus beiden.

Für die Ganzkörperbestrahlung wird ionisierende Strahlung genutzt. Die Dosis kann einmalig oder fraktioniert über einen bis mehrere Tage appliziert werden. Zudem spielt die Dosis der Bestrahlung eine wichtige Rolle, die über den Erfolg der Therapie entscheiden kann und liegt i.d.R. zwischen 12 – 16 Gy (Gyurkocza & Sandmaier 2014). Der Vorteil der Bestrahlung ist, dass sie auch Orte im Körper erreichen kann, die über die Blutbahn kaum oder gar nicht erreicht werden. Bestrahlung bewirkt eine Schädigung der DNA, was eine erfolgreiche Zellteilung verhindert bis die Zellen schließlich apoptotisch werden und sterben. Da diese Schäden mit Hilfe von unterschiedlichen Enzymen mit der Zeit wieder repariert werden können, betrifft der Schaden vor allem sich schnell und häufig teilende Zellen, wie die des blutbildenden Systems, der Mukosa oder Tumorzellen.

Erfolgt die Bestrahlung in Kombination mit einer Chemotherapie, kommt i.d.R. ein alkylierendes Zytostatika, wie Cyclophosphamid oder Busulfan zum Einsatz. Um die Nebenwirkungen zu minimieren, die mit der Bestrahlung assoziiert sind (Abs. 3.2.3), werden

allerdings auch Chemotherapeutika ohne Strahlung eingesetzt oder mehrere Chemotherapeutika in Kombination. Ihre Wirkung ist vielfältig und basiert ebenfalls auf der Hinderung des Wachstums bis hin zum Absterben der betroffenen Zellen.

Das Reduced Intensity Conditioning und die nichtmyeloablative Konditionierung ermöglichen eine Therapie von oftmals alten oder geschwächten Patienten, für die eine Hochdosistherapie aufgrund von Begleiterkrankungen nicht in Frage kommt. Der größte Vorteil ist, dass die Nebenwirkungen der Konditionierung erheblich verringert werden und somit die Zeit nach der Transplantation für die Patienten erträglicher macht. Es ist mittlerweile auch möglich eine Abstoßung des Transplantats hinreichend mit Gabe geeigneter Medikamente (z.B. Fludarabin) zu reduzieren. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch, dass die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls (Rezidiv) erhöht ist (Fadilah & Agilah 2012).

Insgesamt gibt es also vielfältige Möglichkeiten, die Patienten auf die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen vorzubereiten. Auch wenn die häufigsten Konditionierungsregimes heutzutage eine hochdosierte Konditionierung mit einer Kombination aus Cyclophosphamid und Busulfan oder Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung ist (Gyurkocza & Sandmaier 2014), muss je nach Krankheit und Vorgeschichte des Patienten sowie Erfahrung und Möglichkeiten des behandelnden Arztes die Konditionierung individuell angepasst werden.

### *2.2.2.2 Gewinnung der Transplantate*

Die Zellen, die transplantiert werden sollen, können aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut oder auch in seltenen Fällen aus Nabelschnurblut gewonnen werden.

Die Entnahme von Knochenmark erfolgt unter Narkose und stellt einen kleinen, operativen Eingriff dar, bei dem aus dem Beckenkamm der Patienten mit einer Kanüle Knochenmark abgesaugt wird. Das Knochenmark-Blut-Gemisch, das man dabei gewinnt, wird anschließend noch von größeren Partikeln und Fett getrennt und nach einer abschließenden Untersuchung direkt in den Patienten übertragen (Herr 2015b) Die Stammzellgewinnung aus dem peripheren Blut ist dagegen nicht-invasiv, erfordert aber mehr Vorbereitung. Der Spender muss 4-5 Tage zuvor den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) einnehmen, der bewirkt, dass die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in das Blut abgegeben

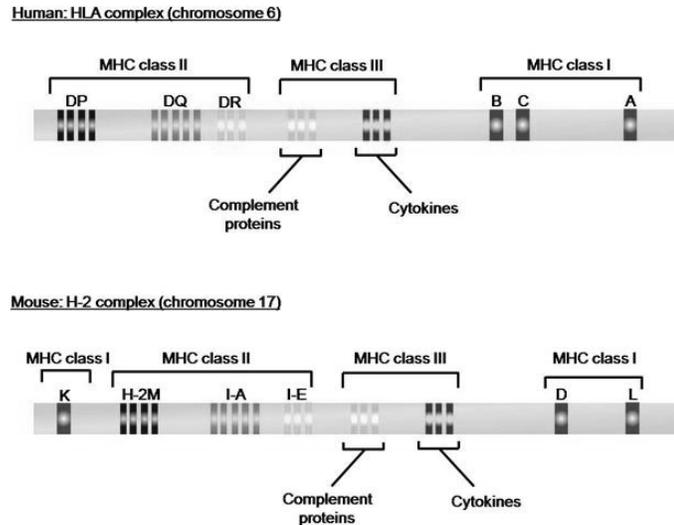
werden (Dührsen et al. 1988). Über eine Stammzellapherese werden anschließend gezielt nur die Stammzellen isoliert und das restliche Blut dem Spender wieder zurückgeführt. Der Vorteil ist, dass bei einer zu niedrigen Ausbeute die Prozedur zeitnah wiederholt werden kann.

Hämatopoetische Stammzellen können auch direkt nach einer Geburt aus Nabelschnurblut gewonnen werden. Die Zellen werden kryokonserviert und in Nabelschnurblutbanken gelagert. Das Nabelschnurblut ist zwar reich an hämatopoetischen Stammzellen, allerdings ist die Gesamtzellzahl der Stammzellen häufig zu gering und das Anwachsen der Zellen im Knochenmark kann deutliche Verzögerungen erfahren (Kröger & Zander 2011).

Heutzutage erfolgt der Großteil der Stammzellgewinnung für eine HSCT über das periphere Blut. 2014 wurden in Europa 88,9 % der HSCT-Patienten dabei mit hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut behandelt, während nur bei 9,2 % der Fälle die Zellen aus dem Knochenmark kamen und sogar nur 1,9 % aus dem Nabelschnurblut (Passweg et al. 2016). Der Grund hierfür ist, dass die Patienten die Transfusion mit den Zellen aus dem peripheren Blut i.d.R. besser vertragen. Schmitz et al. zeigten 1996, dass in Lymphom-Patienten die hämatopoetischen Zellen schneller regenerierten, die Patienten weniger Thrombozytentransfusionen benötigten und schneller aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten.

### *2.2.2.3 HLA-Kompatibilität*

Um als Spender für hämatopoetische Stammzellen in Frage zu kommen, muss geklärt werden, ob die Humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) zwischen Spender und Empfänger übereinstimmen. HLAs sind zuständig für die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Sie werden von T-Lymphozyten durch die T-Zell-Rezeptoren (TCR) erkannt und bewirken die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten. So entscheiden sie auch über die Immunerkennung, den Erfolg von Transplantationen und machen die immunologische Individualität aus. Die Proteine des HLA-Systems werden im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) codiert, der beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 zu finden ist. Man unterscheidet zwischen den HLA-Klasse-I Genen HLA-A, HLA-B und HLA-C, sowie den HLA-Klasse-II Genen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP. Bei der Maus heißen die Antigene H-2 und sind auf Chromosom 17 codiert. Abbildung 4 zeigt die grobe Aufteilung der Gene für den Menschen und für die Maus.



**Abbildung 4: Verteilung der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Gene des Menschen und der Maus.** Beim Menschen ist der sogenannte HLA Komplex (human leucocyte antigen) auf Chromosom 6 zu finden. Bei der Maus ist der MHC-Komplex - auch H-2-Komplex genannt - auf Chromosom 17 lokalisiert. Quelle: <http://nptel.ac.in/courses/102103038/module2/lec9/images/z1.JPG> (08.06.2016)

Aktuell sind mehr als 4100 Allele für die HLA-Gene bekannt (Wassmuth 2010). Da sie kodominant sind, werden sowohl die mütterlich, als auch die väterlich vererbten Allele exprimiert. Entscheidend für die Transplantation unter Geschwistern ist dabei häufig, inwiefern sie in den entsprechenden Merkmalen übereinstimmen. HLA-identisch, HLA-haploidentisch oder HLA-nichtidentisch bezeichnet man jeweils Geschwister, wenn sie zwei, einen oder keinen HLA-Haplotypen gemeinsam haben.

Bei der Transplantation zwischen Individuen, die nicht mit einander verwandt sind, werden zur Vorbereitung einer HSCT vor allem die HLA-A, -B, -C, DRB1 und DQB1-Loci untersucht, sowie unter Umständen auch HLA-DPB1. Stimmen alle Haplotypen überein, spricht man von einem 10/10 bzw. 12/12-Match. Diskrepanzen in den HLA-Haplotypen können eine Abstoßung des Transplantats oder eine GvHD (engl. Graft-versus-Host-Disease) zur Folge haben (Abs. 2.2.3), denn je größer die Unterschiede, desto schwerwiegender sind die Folgen. Die Quelle des Transplantats kann ebenfalls einen Einfluss haben. So sind die Unterschiede in den HLA-Haplotypen weniger gravierend, wenn die gespendeten HSCs aus Nabelschnurblut stammen. Die Methoden zur HLA-Typisierung sind vielfältig. Neben serologischen Techniken, kommen vor allem molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Die Typisierung erfolgt zunächst

niedrigauflösend über eine konventionelle PCR, die Allelgruppen erkennt und eine ähnliche Auflösung, wie serologischen Techniken hat. Eine hochauflösende Typisierung erfolgt dann durch eine Sequenzierung der Exone 2 und 3 der HLA-Klasse-I und des Exons 2 der HLA-Klasse-II Gene (Herr 2015c).

Doch auch bei einer kompletten Übereinstimmung kann es zu einer Abstoßungsreaktion kommen. Verantwortlich hierfür sind meistens die sogenannten Minor-Histokompatibilitätsantigene. MHC-Moleküle präsentieren Peptide von körpereigenen Proteinen. Unterscheiden sich diese Peptide allerdings individuell aufgrund von Polymorphismen, dann können diese Unterschiede als Minor-Histokompatibilitätsantigene erkannt werden und ebenfalls eine Abstoßung hervorrufen (Murphy et al. 2009).

### **2.2.3 Komplikationen und Spätfolgen**

Komplikationen nach einer Transplantation ergeben sich zum einen als Folge der Konditionierung und zum anderen als Reaktion auf bzw. mit dem Transplantat. Typische, akute Nebenwirkungen, die mit der Konditionierung zusammenhängen, sind Übelkeit und Erbrechen, Entzündungen der Schleimhäute im Mund und Magen-Darm-Trakt (Mukositis), Durchfall, Hauterytheme, Haarausfall und in seltenen Fällen auch Organfunktionsschäden, die die Leber, Niere, Herz und Lunge betreffen können. Sie variieren in Vorkommen und Schweregrad abhängig von der Art der Konditionierung und dem Zustand des Patienten.

Bei unter 5 % der Patienten kann es außerdem zu einer Abstoßung der transplantierten Zellen kommen. Dieses Phänomen nennt man Graft Failure und Ursache können u.a. ein HLA-inkompatibler Spender, die Transplantation von zu wenig Zellen oder eine unzureichende Konditionierung sein (Kröger & Zander 2011). Eine weitere Form einer akuten Komplikation stellen Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Viren oder sogar Parasiten dar. In der frühen Transplantationsphase von etwa 30 Tagen leiden die Patienten aufgrund der Konditionierung unter einer Leukopenie. Die Leukozyten der Patienten wurden zerstört und die neuen Leukozyten sind noch nicht vollständig angewachsen. In Kombination mit einer Mukositis macht dies die betroffenen Patienten entsprechend besonders anfällig für Infektionen.

Eine häufige Form der Komplikation nach der Transplantation von allogenen Stammzellen stellt die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung dar, die auch unter der Abkürzung GvHD

bekannt ist. Sie kann akut auftreten oder sich chronisch manifestieren. Bei der GvHD richtet sich das neu aufbauende Immunsystem des Spenders gegen die Organe des Empfängers. Am häufigsten sind bei der akuten Form Haut, Darm und Leber betroffen. Dabei äußert sich die GvHD innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation in Exanthenen, gefolgt von Fieber, Diarrhö und einem Bilirubinanstieg im Blut (Ferrara et al. 2009; Kröger & Zander 2011). Das 3-Phasen-Model von Ferrara et al. aus 2009 beschreibt den Ablauf dabei beginnend mit einer Entzündungsreaktion, die auf die Konditionierung zurückzuführen ist. Es werden inflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 freigesetzt, die die antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl. antigen-presenting cells) des Empfängers aktivieren und in der zweiten Phase durch die T-Lymphozyten des Spenders erkannt werden. Das löst wiederum eine Aktivierung und Freilassung von weiteren Effektoren, wie zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) und weiteren inflammatorischen Zytokinen aus und führt letztendlich zu einer Gewebeschädigung, die eine Nekrose und Apoptose der Gewebezellen herbeiführt. Die chronische GvHD ist mit einer Inzidenz von ungefähr 50 % die häufigste Spätfolge und zudem die Ursache für ca. 25 % der Todesfälle (Herr 2015d). Im Vergleich zu der akuten Form sind die Symptome der chronischen GvHD jedoch um einiges vielfältiger. Es treten zunehmend fibrosierende, chronisch entzündliche Prozesse auf, die die Dermis, Augen, Mundschleimhaut, Speicheldrüsen aber auch innere Organe (z.B. Darm, Leber, Lunge) betreffen können.

Um einer GvHD entgegenzuwirken, werden den Patienten vor allem immunsuppressive Medikamente verabreicht. Diese sollen nicht nur eine Abstoßungsreaktion unterbinden, sondern auch die Reaktion des neuen Immunsystems auf den Wirt. Die Gabe von Immunsuppressiva muss allerdings gut dosiert sein und ist erneut abhängig von Patient und zugrundeliegender Krankheit. So kann man sich bei Leukämie die Reaktion der fremden T-Zellen auf die verbliebenen Leukämiezellen des Patienten auch zunutze machen und so das Risiko eines Rezidivs verringern. Man nennt diesen Effekt dann Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (GVL, engl. graft-versus-leukemia). Da sowohl GvHD als auch GVL auf die Erkennung von fremden HLA-Molekülen durch die T-Lymphozyten des Spenders beruht, wird aktuell versucht die Spenderlymphozyten so zu verändern, dass nur noch die GVL auftritt (Ghorashian et al. 2011).

### 2.2.3.1 Osteoporose nach HSCT

Auch die Osteoporose kann eine Spätfolge der HSCT sein, die eine erhebliche Belastung für den Patienten darstellt. Bis zu einem Drittel der Patienten nach allogener HSCT entwickeln eine Osteopenie und bei 10 % der Patienten wird eine Osteoporose mit erhöhter Frakturrate diagnostiziert (Kröger & Zander 2011). Prospektive Studien haben gezeigt, dass es dabei innerhalb der ersten 6 bis 12 Monate nach der HSCT zu einer Demineralisierung des Knochens kommt. Dem schließt sich zwar eine Verbesserung des BMD in vereinzelt Bereichen an, doch beispielsweise im Femurkopf kann der Knochenverlust 48 bis 120 Monate anhalten (Tauchmanová et al. 2007).

Die Ursache für die reduzierte Knochenmasse wurde bisher als multifaktoriell betrachtet und als Folge eines Hypogonadismus, der Konditionierung oder der Behandlung der GvHD angesehen. Bei der Behandlung mit Kortikosteroiden sind es vor allem die Glukokortikoide, die bei einer Langzeittherapie eine Reduktion der Knochenmasse bewirken. Grund hierfür ist u.a. die Hemmung der Proliferation und Funktion der Osteoblasten bei gleichzeitiger Steigerung der Osteoklastenaktivität und verminderter Apoptose der Osteoklasten. Auch die Bestrahlung an sich hat eine schädigende Wirkung auf den Knochen. Patienten, die aufgrund von Tumoren im Beckenbereich oder Brustkrebs lokal bestrahlt wurden, weisen erhöhte Frakturraten an den umliegenden Knochen auf (Bartl 2014f). Als Grund hierfür wird angeführt, dass ionisierende Strahlen Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen schädigen. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten nach Bestrahlung reduziert ist (He et al. 2011). Dieses Phänomen wurde aber bisher primär nach einer hochdosierten, lokalen Bestrahlung von Tumoren beobachtet. Dennoch haben nicht alle Patienten, die eine Osteoporose als Spätfolge entwickeln auch eine Langzeittherapie mit Glukokortikoiden durchgemacht (Tauchmanová et al. 2007), sodass man davon ausgehen kann, dass es noch weitere Faktoren gibt, die einen Einfluss auf den Knochen haben können. Da Osteoporosen häufig auf eine Dysregulierung des Remodelings mit übermäßiger Osteoklasten- oder reduzierter Osteoblastenaktivität einhergehen, bleibt die Frage, ob die veränderte Zusammensetzung der Knochenmarkszellen nach einer allogenen HSCT ebenfalls einen Einfluss auf den Knochen haben könnte.

## 2.3 Tiermodelle

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von allogenen HSCs durch Transplantation von komplettem Knochenmark auf den Knochenphänotyp zu untersuchen (siehe Abs. 3.4). Um dieser Fragestellung im Rahmen einer Dissertation gerecht werden, haben wir für eine Versuchsreihe im Mausmodell entschieden. Da zusätzlich überprüft werden sollte, ob der zugrunde liegende Knochenphänotyp einen Einfluss auf das Ergebnis des allogenen HSCT hat, fiel die Wahl auf die Mausstämme C57BL/6J und STR/ort, die in ihrer Ausprägung jeweils osteopen bzw. hyperostotische Merkmale aufweisen. Die beiden Stämme sind sogenannte Inzuchtstämme, die den Vorteil haben, dass sie jeweils genetisch homogen sind und sich so die Individuen eines jeden Stammes in ihrem Phänotyp kaum voneinander unterscheiden. Die folgenden Abschnitte geben einen kurzen Überblick über die Besonderheiten der C57BL/6J und STR/ort-Mäuse.

### 2.3.1 C57BL/6J

Der C57BL/6J-Stamm ist einer der weitverbreitetsten Mausstämme in der Forschung, der bei vielfältigen Fragestellungen zum Einsatz kommt und sehr gut charakterisiert ist. Aufgrund ihrer Beliebtheit waren es auch C57BL/6J-Mäuse, die als Grundlage ausgewählt wurden, um das komplette Genom der Spezies *Mus musculus* zu sequenzieren - als zweites direkt nach dem Menschen (Waterston et al. 2002). Neben einigen Besonderheiten, wie der freiwilligen Aufnahme von Alkohol (Belknap et al. 1993) und einem häufig vorkommenden Gehörverlust am Ende des ersten Lebensjahres (Johnson et al. 1997), gelten die Mäuse im Vergleich zu anderen Stämmen auch als osteopen bzw. osteoporotisch (Beamer et al. 1996). Sowohl die Dicke der Kortikalis, als auch Mineraleichte der Femora liegt deutlich unter den Werten von Vergleichsstämmen, wie z.B. BALB/cByJ oder DBA/2J. Zudem nimmt sowohl ihre kortikale, als auch ihre trabekuläre Knochenmasse mit zunehmendem Alter stark ab, was bei den Weibchen noch ausgeprägter ist, als bei den Männchen (Silbermann et al. 1987; Glatt et al. 2007). Der C57BL/6J-Stamm stellt somit das Modell dar, das das osteopene Ende der möglichen Knochenphänotypen bedient.

### **2.3.2 STR/ort**

Die Geschichte des STR/ort-Mausmodells reicht bis in die 1950er Jahre zurück, als sie aus einer Folge von In- und Auszuchten allmählich aus dem Elternstamm STR/1N generiert wurden (Mason et al. 2001). Der STR/ort-Mausstammes dient heutzutage einerseits als Modell für die Entwicklung einer spontanen Osteoarthritis (OA) im Kniegelenk und zum anderen als Modell für einen hyperostotischen Knochenphänotyp. Das Besondere dabei ist, dass die STR/ort-Männchen häufiger von der OA betroffen sind, während die Hyperostose bei den Weibchen ausgeprägter ist. Die OA betrifft primär die mediale Seite des Kniegelenks und findet seinen Anfang an der Verbindungsstelle des Kreuzbandes und des Knorpelgewebes des medialen Tibiaplateaus (Walton 1977). Als Begünstigung für diese Entwicklung wird eine Verschiebung der Patella vermutet (Walton 1979). Allerdings gibt es auch vielfältige Ansätze, die die spontane OA-Entwicklung in den STR-Männchen auf zellbiologischer oder molekularbiologischer Ebene untersucht haben (Mistry et al. 2004; Jaeger et al. 2007; Pasold et al. 2012b).

Während der OA-Phänotyp bereits bei dem Elternstamm bekannt war und vielfach charakterisiert wurde (Mason et al. 2001), wurde man erst in den letzten Jahren auf den besonderen Knochenphänotyp der STR/ort-Mäuse aufmerksam. Zunächst lag nur der subchondrale Knochen im Fokus der Untersuchungen, der sich während der OA-Entstehung in der STR/ort-Maus in seiner Dicke und Architektur verändert (Stok et al. 2009). Außerdem untersuchte man die Knochenmineraldichte des subchondralen Knochens als potentiellen Marker für den Fortschritt der OA (Sarukawa et al. 2010). 2012 wurden dann gleich mehrere Arbeiten veröffentlicht, die sich primär dem Knochen der STR/ort-Mäuse widmeten. Uchida et al. zeigten, dass der trabekuläre Knochen mit zunehmenden Alter deutlich zunimmt, dass dadurch die Knochenmarkhöhle entsprechend kleiner wird und dieses Phänomen bei den weiblichen STR/ort-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Männchen deutlich ausgeprägter ist. Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte dies ebenfalls beobachten und zusätzlich zeigen, dass die Verdrängung des Knochenmarks eine Verlagerung der Hämatopoese in die Milz und Leber (extramedulläre Hämatopoese) zur Folge hat (Pasold et al. 2012a). Dies ging mit einer Vergrößerung von Milz und Leber und dem vermehrten Auftreten von Megakaryozyten in der Milz einher. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete außerdem, dass sich der Unterschied in der

Knochenmasse zwischen männlichen und weiblichen STR/ort-Mäusen bereits im Alter von 2 Monaten signifikant unterscheidet und die Knochenmasse der STR-Mäuse, im Gegensatz zu den C57BL/6J-Tieren, sogar bis zum Alter von 9 Monaten deutlich zunimmt. Diese Beobachtungen wurden auf eine erhöhte Knochenbildungsrate (BFR: bone formation rate) und einer im Vergleich zu C57BL/6J reduzierten Aktivität der Osteoklasten *in vivo* zurückgeführt. Im Vergleich zu C57BL/6J stehen die STR/ort-Mäuse somit am anderen Ende der möglichen Knochenphänotypen und dienen als Modell für einen hyperostotischen Knochen.

Da, wie oben beschrieben, die STR-Männchen ein Modell für die spontane Entwicklung der Kniegelenkarthrose sind, stellt sich die Frage, ob sich allogenes Knochenmark auf die Entwicklung der Osteoarthritis (OA) in den STR/ort-Männchen auswirkt. Uchida et al. zeigten 2013 bereits, dass fremde Zellen nach einer Knochenmarktransplantation in der Synovialmembran des Knies zu finden sind. Aufgrund der räumlichen Nähe zu den Gelenkflächen stellte sich also für uns die Frage, ob die fremden Zellen auch einen Einfluss auf die Entwicklung und die Ausprägung der OA in den STR/ort-Mäusen haben können. Es bestand allerdings auch die Möglichkeit, dass eine Veränderung der subchondralen Knochenstruktur einen Einfluss auf den Knorpel hat. Schon seit längerem wird vermutet, dass der subchondrale Knochen und das Knorpelgewebe während der Entwicklung der OA miteinander kommunizieren und sich gegenseitig beeinflussen können (Sharma et al. 2013). Tatsächlich konnten wir vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass im Vergleich zu STR/ort-Tieren der subchondrale, kortikale Knochen in C57BL/6J-Mäusen nach OA-Induktion weniger stark sklerosiert und gleichzeitig die Abnahme von trabekulären Strukturen nach OA-Induktion weiter in den Knochen hineinreicht (Osterberg et al. 2016). Wir erklären uns dieses Phänomen mit der Annahme, dass in den C57BL/6J-Mäusen mit der geringeren Knochenmasse die Kommunikation über Signalmoleküle effektiver abläuft. Für diese These spricht, dass eine vermehrte Vaskularisierung und die Entstehung von Mikrorissen während der OA-Entwicklung eine Signalweiterleitung begünstigen kann (Burr & Radin 2003). Zudem berichten Bailey et al. 2004, dass der Knochenumsatz während der OA-Entwicklung um ein 20-faches erhöht ist und Sanchez et al. konnten 2008 zeigen, dass der subchondrale Knochen von OA-Patienten vermehrt Zytokine und Signalmoleküle, wie z.B. Osteocalcin, IL-6 oder IGF-1 sekretieren. Das Knorpelgewebe und der subchondrale Knochen scheinen sich also gegenseitig zu beeinflussen.

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Osteopenie und Osteoporose stellen Spätfolgen der allogenen HSCT dar, die nicht nur die Lebensqualität der Patienten einschränken, sondern auch erhebliche Kosten verursachen können. Derzeit werden die Konditionierung für die HSCT, bzw. deren direkte Folgen wie Hypogonadismus, sowie die nachfolgende medikamentöse Therapie einer GvHD und die GvHD selbst ursächlich für den Knochenverlust verantwortlich gemacht. Dennoch ist das Phänomen noch nicht komplett verstanden. Daher stelle ich mit der vorliegenden Arbeit die Hypothese auf, dass der Verlust an Knochenmasse auch aus einer Inkompatibilität der Empfänger-eigenen Osteoblasten und der fremden, aus den hämatopoetischen Stammzellen des Spenders stammenden Zellen resultieren kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, bedarf es eines Tiermodells, bei dem sowohl eine GvHD als auch die nachfolgende immunsuppressive Therapie ausgeschlossen werden können. Wir haben daher mit zwei genetisch unterschiedlichen Maus-Inzuchtstämmen gearbeitet, die jedoch den gleichen MHC-Haplotypen tragen. Die folgenden Fragen sollten untersucht und beantwortet werden:

1. Kann in dem gewählten System zweier genetisch unterschiedlicher aber MHC-identischer Mausstämmen eine geringere Knochenmasse nach einer allogener HSCT beobachtet werden?
  - a. Hat der zugrunde liegende Knochenphänotyp des Empfängers einen Einfluss?
  - b. Spielt das Geschlecht bei der Entwicklung einer der HSCT nachfolgenden Osteoporose eine Rolle?
2. Welchen Einfluss hat die Konditionierung auf die Knochenmasse?
3. Tritt ein Verlust an Knochenmasse auch in Abwesenheit von GvHD und immunsuppressiver Therapie auf?
4. Ist eine Fehlfunktion der Osteoblasten oder der Osteoklasten ursächlich für die reduzierte Knochenmasse nach einer allogenen HSCT?

Da die Männchen des STR/ort-Mausstamm als Model für die spontane Entwicklung der Osteoarthritis gilt, soll zusätzlich folgendes geklärt werden:

5. Hat die allogene HSCT einen Einfluss auf die spontan im fortgeschrittenen Alter auftretende Osteoarthritis in männlichen STR/ort-Mäusen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Geräte und die Computer-Software, sowie der entsprechende Hersteller und, falls vorhanden, die Bestellnummer sind dem Anhang zu entnehmen. Im Folgenden werden lediglich die Puffer und Antikörper aufgelistet, die zum Einsatz kamen.

##### 3.1.1 Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer mit A. dest. angesetzt.

###### *3.1.1.1 ACD-A-Stabilisator*

Glukose	136,0 mM	
Natriumcitrat	85,2 mM	
Zitronensäure	38,0 mM	→ autoklaviert

###### *3.1.1.2 FACS-Puffer (pH 7,4)*

BupH™ Modified DPBS	1 Pck	
Bovines Serumalbumin	0,5 %	
NaN <sub>3</sub>	0,1 %	→ sterilfiltriert

###### *3.1.1.3 HBSS – ohne Mg<sup>2+</sup> / Ca<sup>2+</sup>*

NaCl	137,0 mM	
KCl	5,4 mM	
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27 mM	
Glukose	5,6 mM	→ autoklaviert

###### *3.1.1.4 Maus-Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,4)*

NH <sub>4</sub> Cl	155 mM	
KHCO <sub>3</sub>	10 mM	
EDTA (pH 8,0)	0,1 mM	→ sterilfiltriert

**3.1.1.5 PBS (pH 7,4)**

NaCl	137 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	
KCl	2,7 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	→ autoklaviert

**3.1.1.6 TRAcP-Färbepuffer (pH 5,0)**

Di-Natriumtartrat-Dihydrat	200 mM
Natriumacetat	40 mM

**3.1.1.7 TRAcP-Färbelösung – auf Basis von TRAcP-Färbepuffer**

Fast Red Violet LB Salt	3 mM
Naphthol AS-MX Phosphat	0,5 mM
N-N-Di-Methylformamid	2 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)

**3.1.2 Antikörper**

Die Antikörper wurden standardmäßig nach der Lieferung in 0,625 ml Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, mit Parafilm verschlossen und nur eines der Aliquots verwendet um Verunreinigungen des gesamten Produkts zu vermeiden. Die wichtigsten Produktinformationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Übersicht der Antikörper, die bei der durchflusszytometrischen Messung zum Einsatz kamen.**

Zielprotein	Klon	Konjugat	Bestellnummer	Hersteller
B220	RA3-6B2	PE/Cy7	103222	Biolegend (San Diego, USA)
CD11b	M1/70	PE	101207	Biolegend (San Diego, USA)
CD3e	145-2C11	APC	100312	Biolegend (San Diego, USA)
CD4	GK1.5	FITC	100405	Biolegend (San Diego, USA)
CD8a	53-6.7	PE	100708	Biolegend (San Diego, USA)
F4/80	BM8	APC	123115	Biolegend (San Diego, USA)
GR-1	RB6-8C5	PE/Cy7	108416	Biolegend (San Diego, USA)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Versuchstiere**

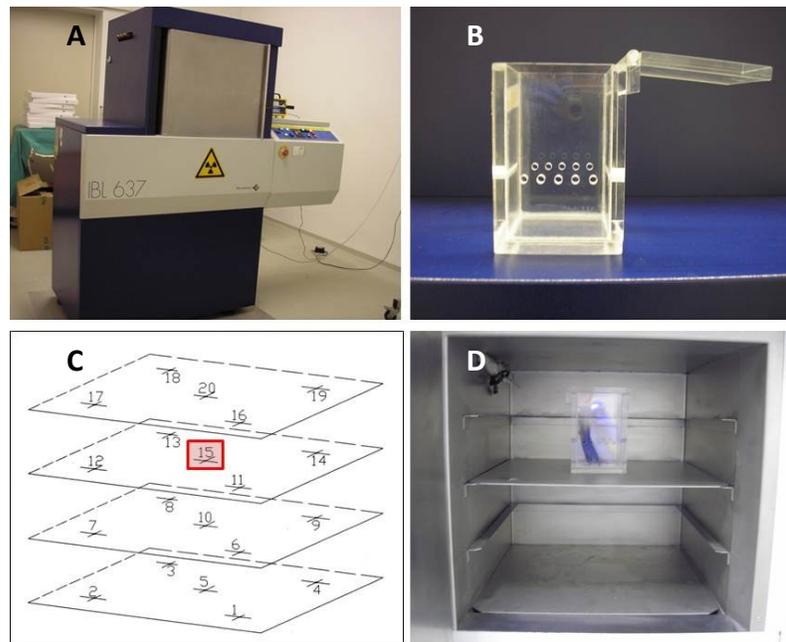
Alle für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der „Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung“ der Universität Rostock in SPF-Tierhaltungsräumen gezüchtet und dort bis Experimentbeginn gehalten. Der STR/ort-Mausstamm wurde ursprünglich von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) und der C57BL/6J-Mausstamm von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bis zu 5 Tiere wurden in Standardkäfigen in Temperaturregelmerten Räumen ( $22 \pm 2$  °C) mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten und erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden im Alter von 6 – 7 Wochen für die Versuche herangezogen. Spendertiere wurden in jedem verfügbaren Alter verwendet. Die Versuche wurden durch das örtliche Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern geprüft und genehmigt (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-011/13).

### **3.2.2 Bestrahlung**

Für die letale Ablation des Knochenmarks wurde die Kleintier-Bestrahlungsanlage IBL 637 (Abb. 5 A) mit einer  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle des Instituts für Experimentelle Chirurgie genutzt. Tiere im Alter von 6 – 7 Wochen wurden einige Tage vor Versuchsbeginn in die SPF-nahe Haltung gebracht und in IVC-Käfige gesetzt. Am Tag der Bestrahlung wurden die Tiere zunächst einem äußeren Gesundheitscheck unterzogen und gewogen, da ausschließlich gesunde Tiere verwendet werden sollten. Anschließend wurden sie in Transportboxen überführt und zur Bestrahlungsanlage gebracht. Dort wurden die Tiere einzeln mit je 5 Gy Gamma-Strahlung bestrahlt, wofür sie in eine zuvor desinfizierte Bestrahlungsbox aus Plexiglas (Abb. 5 B) gesetzt und dann in die Bestrahlungsanlage gestellt wurden. Entscheidend war dabei Position der Box und Dauer der Bestrahlung, damit die Tiere mit der ausgewählten Dosis bestrahlt wurden.

Wie Abbildung 5 C zu entnehmen, gab es verschiedene Ebenen und Positionen, an denen die Bestrahlung entsprechend der Entfernung von der Strahlungsquelle unterschiedlich stark ist. Um die Aufenthaltszeit in der Anlage minimal zu halten und Dosis pro Minute nicht zu hoch zu setzen, wurde die Position 15 auf der zweiten Ebene gewählt (Abb. 5 D). Die Bestrahlungszeit

lag zunächst bei 380 s, musste aber im Laufe der Zeit an die schwächer werdende  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle angepasst werden, sodass die Bestrahlungszeit am Ende der Versuchsreihe bei 390 s lag. Nach Ablauf der Bestrahlungszeit wurde die jeweilige Maus in die Transportboxen zurückgesetzt, die Bestrahlungsbox mit Wasser und Desinfektionsmittel gereinigt und die nächste Maus bestrahlt. Nach einer Ruhephase von 4 h, in der die Mäuse zurück in die SPF-nahe Tierhaltung gebracht wurden, wurde die Prozedur wiederholt, sodass jede Maus insgesamt 10 Gy Gamma-Strahlung ausgesetzt war.



**Abbildung 5: Die Bestrahlung der Versuchstiere erfolgte mit der Kleintierbestrahlungsanlage IBL 637. A** Die IBL 637-Kleintierbestrahlungsanlage. **B** Box aus Plexiglas, in die die Tiere für die Bestrahlung gesetzt wurden. **C** Innerhalb der Anlage wurde Position 15 ausgewählt. **D** Eine C57BL/6J-Maus in der Bestrahlungsbox auf Position 15 ist bereit zum Bestrahlen. Quelle: A, B, D Privataufnahmen; C modifiziert nach Tobias Siebert, Strahlenschutzbevollmächtigter der Universitätsmedizin Rostock.

### **3.2.3 Rekonstitution**

Ungefähr 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung erfolgte die Rekonstitution mit Knochenmarkzellen von Spendern des gleichen Stammes (syngene Transplantation) oder des jeweils anderen Stammes (allogene Transplantation). Dafür wurden die Spender durch zervikale Dislokation getötet, Vorder- und Hinterbeine mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Femora, Tibiae und gegebenenfalls die Humeri herauspräpariert. Die Knochen wurden von Muskeln und Sehnen weitestgehend befreit und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml PBS auf

Eis, getrennt nach Spendern, gesammelt. Unter der Sterilbank wurden die Enden der Knochen mit einer abgeflamten Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit 1–2 ml HBSS (+ 1 % ACD-A)-Lösung herausgespült, bis der Knochen weißlich war und kaum mehr Knochenmark enthielt. Dafür wurde eine 5 ml-Luer-Lock-Einmalspritze mit einer 26G ½“-Kanüle verwendet, die vorsichtig in den Knochenmarkkanal geführt wurde. Das Knochenmark wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und vorsichtig durch Verwendung der Spritze mit einer 18G 2“-Kanüle resuspendiert, um die Zellen in Lösung zu bekommen. Anschließend wurden die Zellen über einen 40 µm Zellsieb in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Abs. 3.2.4).  $5 \times 10^7$  Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß abgenommen, zentrifugiert, in 500 µl 0,9 % NaCl aufgenommen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ µl) und bis zur Transplantation auf Eis gelagert.

Für die intravenöse Injektion der frisch präparierten Knochenmarkszellen wurden diese in 1 ml Einmalspritzen aufgezogen, die bestrahlten Tiere zunächst nochmal gewogen und dann mit Ether betäubt. Dafür wurde ein 5 Liter fassender Glasbehälter mit Einweghandtüchern ausgelegt, ca. 5 - 10 ml Ether darauf verteilt, verschlossen und wenige Minuten gewartet bis sich der Behälter mit Ether gesättigt hatte. Zum Schutz der Tiere wurde eine weitere Schicht Einweghandtücher auf die mit Ether getränkten Tücher gelegt und die Tiere in den Glasbehälter gesetzt bis sie narkotisiert waren. Anschließend wurden die Tiere herausgeholt und ein Erlenmeyer-Kolben, in dem ebenfalls ein mit Ether getränktes Tuch lagerte, wurde lose an die Nase der Mäuse gelegt, damit sie nicht aus der Narkose aufwachten. Bei der gesamten Prozedur war dringend darauf zu achten, dass die Tiere nicht an einer Überdosis starben oder dass die Tiere keinen Haut- oder Augenkontakt mit dem Ether hatten, da es dadurch zu Verätzungen kommen kann. Bei Ausbleiben der Reflexe, nach Drücken der Schwanzspitze mit dem Fingernagel, konnte die Injektion erfolgen. Dafür wurden die Tiere seitlich gelegt, der Schwanz mit zwei Finger festgehalten und anschließend die 26G ½“-Kanüle vorsichtig in die Schwanzvene eingeführt. Es wurden 100 µl der Zellsuspension und somit ca.  $1 \times 10^7$  Zellen appliziert, wobei zu beachten war, dass keine Luftblasen oder Zellklumpen injiziert wurden, um einen Embolie zu vermeiden. Nach erfolgreicher Injektion wurden die

Tiere noch, falls notwendig, mit Ohrlöchern markiert und dann zum Aufwachen in die IVC-Box zurückgesetzt. Da durch die Bestrahlung das Immunsystem der Tiere stark angegriffen wurde, wurden die Tiere für 4 – 6 Wochen in speziellen IVC-Filterkäfigen gehalten, in die gereinigte Luft über eine spezielle Filteranlage zugeführt wird. Außerdem wurden die Tiere für mindestens 4 Wochen prophylaktisch mit einer Antibiose im Trinkwasser (10 mg/ml Ciprofloxazin) behandelt. Anschließend an diese Vorsichtsmaßnahmen wurden die Tiere in Standardkäfige umgesetzt.

### **3.2.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer**

Für mehrere Versuche war es notwendig, die Anzahl vitaler Zellen in einer Lösung zu bestimmen. Es wurde dabei immer nach dem gleichen Prinzip vorgegangen und eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

5 µl der Zellsuspension wurden mit 10 – 15 µl Trypanblau-Lösung (0,1 % Trypanblau in PBS) und 40 – 60 µl Medium gemischt. Das genaue Mischverhältnis wurde entsprechend der zu erwarteten Zellzahl angepasst und so gewählt, dass man nicht mehr als 100 Zellen pro Großquadrat der Neubauer-Zählkammer erhielt. Nach Anhauchen des Deckglases wurde dieses auf die Zählkammer gedrückt und somit befestigt. Anschließend konnten ca. 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert werden, wobei sich das Zellgemisch aufgrund von Kapillarkräften zwischen Deckglas und Zählkammer gleichmäßig verteilte. Mit dem Lichtmikroskop wurden bei 100-facher Vergrößerung die 4 Großquadrate ausgezählt, wobei Zellen, die sich bläulich gefärbt hatten, nicht mitgezählt wurden, da sie durch die Einlagerung von Trypanblau als perforiert bzw. tot gelten. Um eine Doppelzählung zu vermeiden wurden dabei nur die Zellen ausgezählt, die sich auf der linken bzw. unteren Begrenzung der Teilquadrate befanden. Unter Beachtung des Kammerfaktors der Neubauer-Zählkammer ( $10^4$ ), des Verdünnungsfaktor und dem Mittelwert der Zellzahlen pro Großquadrat ließ sich die Zellzahl/ml berechnen:

$$\underline{\text{Zellzahl/ml}} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

### **3.2.5 Probensammlung**

Im Anschluss an die Versuche wurden die Tiere aufgearbeitet und verschiedene Gewebe und Proben entnommen. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 150 mg/ kg Ketamin und 10 mg/ kg Xylazin betäubt. Nach Eintreten der Narkose, was durch Ausbleiben der Reflexe beim Drücken der Schwanzspitze mit dem Fingernagel getestet wurde, wurde das Gewicht und die Größe der Tiere bestimmt und retrobulbär mit einer Glaskapillare Blut entnommen. Das Blut wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 30 IU Heparin/ ml Blut aufgefangen, bei 1800 x g für 7 min zentrifugiert und anschließend das Plasma gewonnen. Dafür wurde das Plasma in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung (Abs. 3.2.10) bei -20 °C gelagert. Die Serum-reduzierten Blutzellen wurden anschließend für die DNA-Gewinnung weiterverwendet (Abs. 3.2.7).

Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die benötigten Organe entnommen. Die linken Hinterbeine wurden komplett entnommen, von Muskeln und Sehnen freipräpariert in Histologiekassetten überführt und in 4 % PFA fixiert. Die rechten Femora wurden ebenfalls von Muskeln und Sehnen freipräpariert, in Mull eingewickelt und in Kryoröhrchen mit 0,9 %-NaCl-Lösung bei -20 °C eingefroren. Die rechten Femora wurden jedoch aufgrund einer Planänderung nach der Lagerung bei -20 °C in Histologiekassetten überführt und für eine Woche in 4 % PFA fixiert. Zusätzlich wurde die Milz entnommen. Da von der Milz ein 3-5 mm großes Stück für eine histologische Untersuchung (Abs 3.2.9) benötigt wurde, wurde sie vor und nach der Abtrennung gewogen. Die Teile für die Histologie wurden in Histologiekassetten überführt und für 1-2 Wochen in 4 % PFA fixiert. Die restliche Milz wurde in RPMI-Medium gesammelt und anschließend die Zusammensetzung der Immunzellen per Durchflusszytometrie analysiert (Abs. 3.2.6). Die ermittelte Zellzahl wurde dann mit Hilfe des Gewichts auf die gesamte Milz bezogen.

### **3.2.6 Durchflusszytometrie**

Um die Zusammensetzung der Immunzellen nach der Transplantation von syngenen bzw. allogenen Knochenmarkszellen zu bestimmen, wurden die Zellpopulationen der Milz anhand ihrer Oberflächenmarker per Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen entsprechend ihrer Morphologie, wie Größe und Granularität, und ihrer Markierung erfasst und charakterisiert. Bei der Markierung macht man sich zunutze, dass Zellen bestimmter Populationen bzw. Herkunft charakteristische Oberflächenmoleküle ausbilden, an die dann Fluorochrom-markierte Antikörper binden können. Bei der Durchflusszytometrie werden so markierte Zellen durch einen Laserstrahl geleitet und das dabei entstandene Streulicht und Fluoreszenzsignal kann von einem Detektor erfasst und anschließend ausgewertet werden. Das ermöglicht, eine große Anzahl Zellen einzeln und in kurzer Zeit zu analysieren.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen wurden die Milzen nach Präparation aus der Maus mit einem Spritzenkolben durch ein Metallsieb in eine Petrischale mit RPMI-Medium und 50 µg/ mg DNase I gepresst. Die so entstandene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm-Zellsieb in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellen mit 5 ml kaltem Maus-Erythrozyten-Lyse-Puffer für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 14 ml Medium gestoppt, die Zellen erneut zentrifugiert und in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer, wurden Aliquots mit je  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße entnommen und zentrifugiert. Dabei wurde von jeder Probe ein Aliquot für die jeweiligen Markerkombinationen (Tab. 3) entnommen sowie je ein Aliquot, das unmarkiert blieb. Zu Beginn der Versuchsreihe und in regelmäßigen Abständen wurden außerdem von einer Probe noch zusätzlich Aliquots für Einzelmarkierungen entnommen.

Die Aliquots wurden für 7 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, in FACS-Puffer resuspendiert und mit 5 µl MNS versetzt. Dabei wurde so viel FACS-Puffer verwendet, dass nach Zugabe der Marker ein Volumen von 100 µl erreicht wurde. Die Zellen in dem FACS-Puffer-MNS-Gemisch wurden für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Markergemische bzw. die

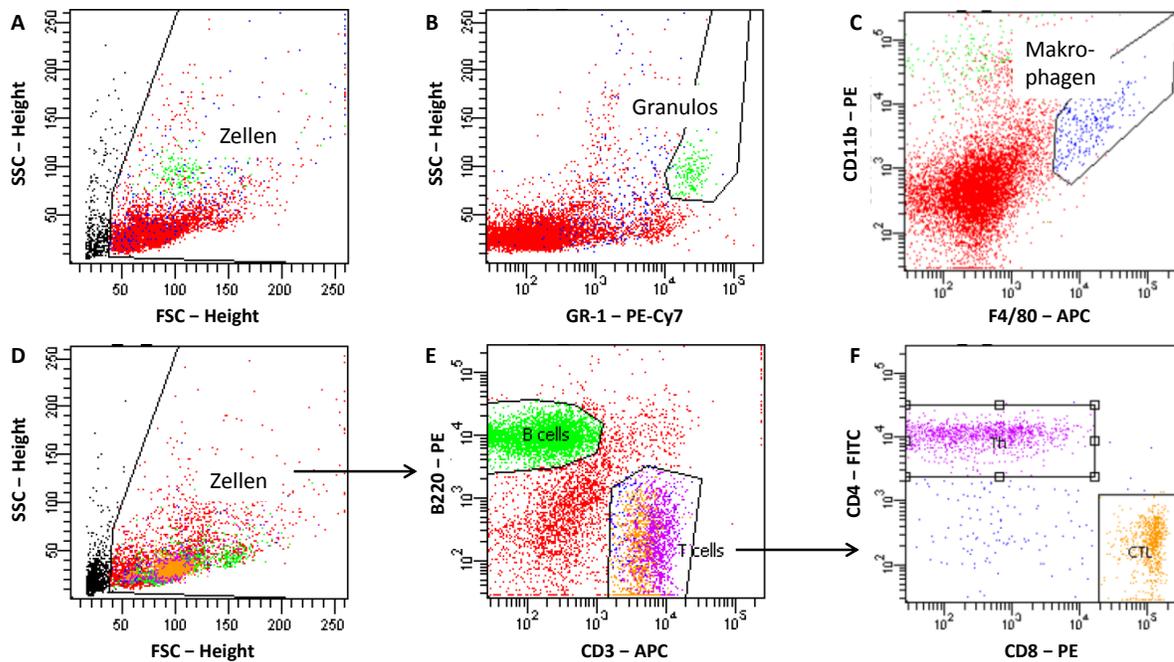
einzelnen Antikörper dazugegeben. Wie viel von jedem Antikörper verwendet wurde, ist in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Marker für die Durchflusszytometrie und die eingesetzten Mengen.**

Markerkombination	Antikörper (+Fluorochrom)	Menge (µg)
Lymphoid	anti-CD3e (APC)	0,2
	anti-CD4 (FITC)	0,5
	anti-CD8a (PE)	0,2
	anti-B220 (PE-Cy7)	0,2
Myeloid	anti-CD11b (PE)	0,2
	anti-F4/80 (APC)	0,2
	anti-GR-1 (PE/Cy7)	0,2

Nach 15 min Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen durch Zugabe von 900 µl FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, in 5 ml Polystyren-Rundboden-Röhrchen überführt und bei 4 °C maximal 1 h bis zur Analyse gelagert.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACS-Calibur verwendet. Abbildung 6 zeigt die Punktwolkendarstellung der Zellen und die Regionendefinition. In einem ersten Schritt wurden Zelltrümmer und Erythrozyten ausgeschlossen (Abb. 6 A und D). Anschließend wurden die Zellen nach den jeweiligen Markern sortiert aufgetragen und die Populationen definiert.



**Abbildung 6: Punktwolkendarstellung und Regionendefinition der Milzzellen im Durchflusszytometer.** A-C Myeloide Markerkombination. D-F Lymphoide Markerkombination. Zunächst wurden tote Zellen und Zelltrümmer aus der Analyse ausgeschlossen (A, D). Die verbleibenden Zellen wurden auf die Markern für Granulozyten (B GR-1), Monozyten und Makrophagen (C CD11b bzw. F4/80), B-Zellen (B220) und T-Zellen (CD3) analysiert (E). Die CD3+T-Zellen wurden zusätzlich auf die Marker CD4 für T-Helferzellen und CD8 für zytotoxische T-Zellen untersucht (F). Jeder einzelne Punkt entspricht einer Zelle.

### 3.2.7 Mikrosatellitenanalyse

Als Mikrosatelliten bezeichnet man kurze DNA-Sequenzen im nicht-kodierenden Bereich, die sich individuell oft wiederholen. Mit Hilfe von informativen Mikrosatelliten, also solchen in denen sich die Mausstämmen C57BL/6J und STR/ort in der Länge unterscheiden, sollten die Blutzellen der Mäuse auf ihren Ursprung untersucht werden. Dafür wurde eine Touchdown-PCR mit der DNA der Blutzellen durchgeführt und anschließend die so erhaltenen Fragmente mit einer kapillaren Gelelektrophorese analysiert.

#### *3.2.7.1 DNA-Isolation aus Blutzellen*

Um mit der Mikrosatellitenanalyse den Ursprung der Blutzellen bestimmen zu können, musste zunächst ihre DNA gewonnen werden. Dafür wurde Heparin-Blut per Zentrifugation von dem Blut-Plasma getrennt (Abs. 3.2.5) und die verbleibenden Zellen per Vortexmischer wieder aufgelockert. Die DNA wurde dann mit dem „Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit“

entsprechend der Anleitung aus den Blutzellen isoliert. Dafür wurden 900 µl Zell-Lyse-Lösung in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 200 µl der Zellsuspension hinzugefügt, um die Blutzellen aufzulösen. Zell-Lyse-Lösung und die Zellsuspension wurden durch 5-6maliges Invertieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt mit 16.000 x g für 20 s wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne das weißliche Pellet mit den Zellkernen zu zerstören. Anschließend wurden 300 µl Kern-Lyse-Lösung zu dem Pellet pipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Dabei entstand ein viskoses Gemisch, da die Zellkerne zerstört und die DNA freigesetzt wurde. Zu jeder Probe wurden 100 µl einer Protein-Fällungslösung dazugeben und für 10-20 s mit einem Vortexmischer gemischt. Das Protein-Präzipitat wurde durch Zentrifugation von 3 min bei 16.000 x g sedimentiert und der Überstand in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in das zuvor 300 µl Isopropanol vorgelegt wurde. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA gefällt und anschließend durch Zentrifugation von 1 min bei 16.000 x g sedimentiert. Anschließend war die DNA als dünnes, weißliches Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes zu erkennen. Der Überstand wurde abgegossen, 300 µl 70%iger Ethanol auf das Pellet pipettiert und erneut für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand vorsichtig und diesmal so vollständig wie möglich abgenommen. Das Reaktionsgefäß mit dem DNA-Pellet am Boden wurde mit offenem Deckel verkehrt herum auf den Tisch gestellt und das Pellet für 30 min getrocknet. Abschließend wurden 100 µl Rehydrierungslösung auf das getrocknete, ethanolfreie Pellet gegeben und entweder für 1 h bei 65 °C oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Die DNA-Lösung wurde für den baldigen Gebrauch bei 4 °C und für die längere Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

#### *3.2.7.2 DNA-Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem NanoDrop® ND-1000 UV-Vispektrophotometer, bei dem die Quantifizierung durch eine Probensäule von 1 mm Länge erfolgte. Dazu wurden 1 µl der DNA-Probe auf den Probensockel pipettiert und die Absorption (A) bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA-Konzentrationen wurden von dem Gerät automatisch berechnet, wobei ein Messwert von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 ng/ µl doppelsträngiger DNA entsprach. Über das Verhältnis  $A_{260/280}$  konnte eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA gemacht werden, da das Absorptionsmaximum für Proteine

bei 280 nm liegt.  $A_{260/280}$ -Werte von 1,7 bis 1,9 deuten dabei auf reine DNA-Lösungen hin, während Werte  $< 1,7$  auf Proteinkontaminationen hinweisen. Bei 230 nm absorbieren z.B. Guanidin-Salze oder Phenole, die bei der Aufreinigung der DNA zum Einsatz kommen können und nachfolgenden Anwendungen stören können. Das Verhältnis  $A_{230/260}$  sollte mehr als 1,5 betragen. Kleinere Werte deuten auf zu hohe Anteile von Salzen und anderen Kontaminationen hin.

### 3.2.7.3 Touchdown-PCR

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) wird mit Hilfe der Taq-Polymerase ein DNA-Fragment *in vitro* enzymatisch vervielfältigt. Das Fragment wird dabei von zwei Oligonukleotidprimern flankiert, die die Startposition für das Enzym vorgeben und das Amplifikat begrenzen (Mullis et al. 1986). Generell ist diese Reaktion in drei Stufen unterteilt. Im ersten Schritt erfolgt die Hitze-Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA getrennt wird, um als DNA-Matrize dienen zu können. Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer an die komplementäre DNA-Sequenz (Annealing) damit in einem dritten Schritt die Taq-Polymerase an den Primern anknüpfend die fehlenden, komplementären Stränge mit freien Nukleotiden auffüllen kann (Elongation). Neben den generellen Bestandteilen einer PCR, wie die Matrizen-DNA, die Taq-Polymerase, freie Nukleotide zur Verlängerung der DNA, Primer und  $Mg^{2+}$ -Ionen, die das Enzym benötigt, werden für die Fragmentanalyse mit einer Gelelektrophorese auch noch zusätzliche, mit einem Fluorochrom markierte Primer benötigt. Diese lagern sich im Verlauf der PCR an eine spezielle M13-Teilsequenz des Vorwärtsprimers und können während der kapillaren Gelelektrophorese angeregt und detektiert werden, da sie in einer andere Farbe (grün oder blau) fluoreszieren als der später zum Einsatz kommende Größenmarker (Abs. 3.2.7.4). Die genaue Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Entsprechend der Probenanzahl wurde ein großes PCR-Reaktionsgemisch hergestellt, die DNA-Lösungen jeweils in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und das PCR-Reaktionsgemisch auf die Gefäße verteilt. Es wurden ungefähr 50-200 ng DNA eingesetzt und das Reaktionsgemisch so angesetzt, dass das Endvolumen der DNA-Reaktionsgemisch-Mischung bei 10  $\mu$ l lag. Entsprechend wurde versucht, pro Durchgang das gleiche Volumen an DNA einzusetzen, wodurch die Varianz an eingesetzter DNA-Menge zustande kam.

**Tabelle 4: Bestandteile der PCR mit den Konzentrationen in der Stocklösung und im 10 µl-Ansatz.**

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im 10 µl-Ansatz
PCR-Puffer S	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM
dNTP-Mix	Je 2,5 mM	Je 0,2 mM
Primer-Mix	Je 1 µM	Je 0,1 µM
Fluorochrom-markierte Primer	2 µM	0,06 µM
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,25 U/µl

Die fertigen Ansätze wurden verschlossen und in den vollautomatischen Thermocycler GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Systems) gestellt, der die PCR-Zyklen mehrfach wiederholt bis das gewünschte DNA-Fragment millionenfach amplifiziert wurde. Für die Mikrosatellitenanalyse wurde ein Touchdown-PCR gewählt, bei der die Annealing-Temperatur in den ersten Zyklen schrittweise herabgesetzt wurde, um unspezifische Amplifikationen zu reduzieren. Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, wurde die Annealing-Temperatur dabei von 59 °C in zwei 2 °C-Schritten auf 57 °C und dann auf 55 °C reduziert. Dieser Zyklus wurde dann 35-mal wiederholt. Nach Beendigung des Programms, wurde die Temperatur bei 4 °C gehalten, bis die Proben direkt weiterverarbeitet oder in den Kühlschrank verlagert wurden.

**Tabelle 5: Programmverlauf der Touch-Down-PCR.**

	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
1. Denaturieren	5 min	94 °C	
2. Denaturieren	30 s	94 °C	} 2
3. Annealing	1 min	59 °C	
4. Elongation	1 min	72 °C	
5. Denaturieren	30 s	94 °C	} 2
6. Annealing	1 min	57 °C	
7. Elongation	1 min	72 °C	
8. Denaturieren	30 s	94 °C	} 35
9. Annealing	1 min	55 °C	
10. Elongation	1 min	72 °C	
11. Elongation	7 min	72 °C	
12. Lagerung	∞	4 °C	

#### *3.2.7.4 Kapillar-Gelelektrophorese*

Die Analyse der Amplifikate erfolgte per Kapillar-Gelelektrophorese. Das Prinzip beruht dabei wie bei einer gewöhnlichen Elektrophorese auf der Auftrennung in einem Gel nach Anlegen einer Spannung. Entscheidender Unterschied ist, dass die Trennung über eine dünne Kapillare, mit einem Innendurchmesser von 50 bis 200  $\mu\text{m}$  erfolgt. Die Kapillare ist mit einem Polyacrylamidgel gefüllt, das als Molekularsieb eine Trennung nach Molekülgröße und Mobilität ermöglicht. Da zu jeder Probe ein Größenmarker gegeben wird, der rot fluoreszierende DNA-Fragmente bekannter Größe von 60 bp bis 400 bp enthält, ist es möglich eine exakte Größenbestimmung der Mikrosatelliten vorzunehmen. Dies ist besonders wichtig, da sich Mikrosatelliten um nur ein bis zwei Nukleotide unterscheiden können. Um dennoch Fehler bei der Amplifikation ausschließen zu können, wurde für die Unterscheidung der Proben von C57BL/6J- und STR/ort-Mäusen Primer für einen Mikrosatelliten ausgewählt, in dem sich die beiden Mausstämme um 18 Nukleotide unterscheiden. Das Proben/Größenmarker-Gemisch wird über eine elektrokinetische Injektion in die Kapillare gesaugt und durch Anlegen einer entsprechenden Spannung von 10 bis 50 kV durch das Gel in der Kapillare geleitet. Wie bei einer herkömmlichen Gelelektrophorese bewegen die Amplifikate sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Ladung und damit Mobilität auch unterschiedliche schnell durch die Kapillare. Am Ende der Kapillare werden die Proben dann an einem Detektor vorbeigeleitet, der die Fluoreszenz misst.

Für die Auftrennung über die Kapillar-Gelelektrophorese mussten die Amplifikate noch vorbereitet werden. Dafür wurden je 2  $\mu\text{l}$  der PCR-Produkte mit 0,4  $\mu\text{l}$  des CEQ<sup>TM</sup> Größenmarker 400 und 27,6  $\mu\text{l}$  CEQ<sup>TM</sup> Sample Loading Solution gemischt und das Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$  in je eine Kavität (Well) einer CEQ<sup>TM</sup> 96-Well-Probenplatte gegeben. Die Platte wurde kurz anzentrifugiert und anschließend wurde je 1 Tropfen CEQ<sup>TM</sup> Mineralöl in jede Kavität gegeben, um das Gemisch vor Verdunstung zu schützen. Zusätzlich wurde noch eine CEQ<sup>TM</sup> 96-Well-Pufferplatte mit 1-2 Tropfen CEQ<sup>TM</sup> Separationspuffer, entsprechend der CEQ<sup>TM</sup> 96-Well-Probenplatte, befüllt und zum Messen in das CEQ<sup>TM</sup> 8800 Genetic Analysis System gestellt.

### **3.2.8 Mikro-Computertomographie-Analyse**

Zur Untersuchung der Knochenstrukturen der Versuchstiere wurde ein Mikro-Computertomograph ( $\mu$ CT) verwendet. Dabei nutzt man die dreidimensionale Röntgenbildgebung, um kortikale und trabekuläre Knochenparameter aufzunehmen und auswerten zu können.

Die Femora der Versuchstiere wurde nach Ende des Versuches wie in Abschnitt 3.2.5 entnommen, von Muskel- und Sehngewebe weitestgehend befreit und für mindestens 7 Tage in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min unter fließendem Wasser gewaschen und ÜN in 0,9 % NaCl-Lösung gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden sie aus den Histologiekassetten in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt, die mit 0,9 % NaCl-Lösung gefüllt waren, und so verschlossen, dass möglichst keine Luftblasen mehr in dem Reaktionsgefäß zu finden war. Jeweils 5 Reaktionsgefäße mit Knochen wurden dann in das Probenbett des SkyScan 1076 gelegt und die Einstellungen für den Scan (Tab. 6) in die 1076 Control Software eingegeben.

**Tabelle 6: Einstellungen am Mikro-Computertomograph SkyScan 1076 für den Scan von Mausknöcheln.**

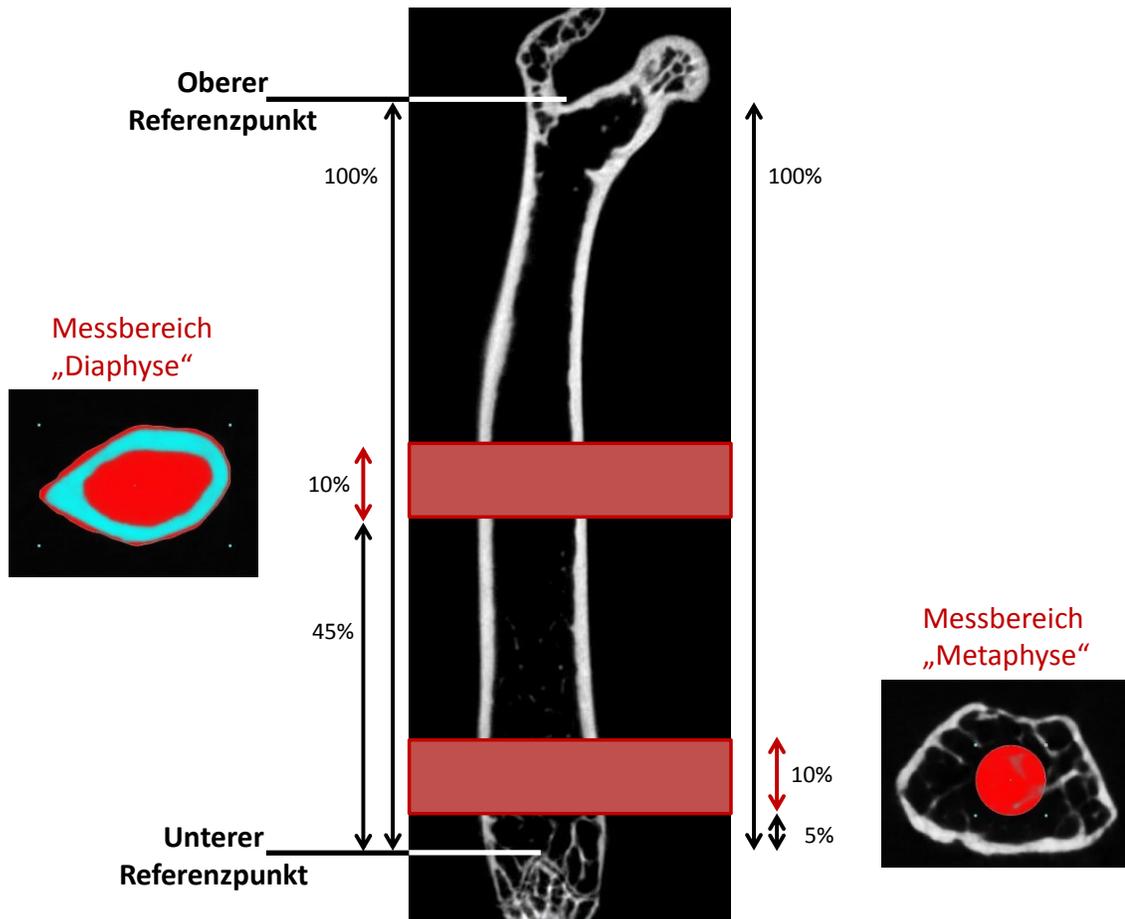
<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Filter	Al, 0,5 mm
Isotrope Voxelgröße	9 $\mu$ m
Rotationsschritt	0,5°
Mittlere Bildfeldberechnung	3
Expositionszeit	1,5 s
Spannung/ Stromstärke	49 kV/ 200 $\mu$ A

Um die benötigten Strukturparameter zu erhalten, mussten die Rohdaten nach dem Scan mit vier weiteren Programmen bearbeitet werden. Zunächst wurden die Scans mit dem Programm NRecon rekonstruiert. Dabei wurden die Bilder optimiert, indem z.B. das Rauschen verringert oder Scan-Artefakte ausgeschlossen wurden. Die wichtigsten Einstellungen sind in der Tabelle 7 zu finden.

**Tabelle 7: Einstellungen für die Rekonstruktion der Rohdaten mit der Software NRecon.**

<b>Parameter</b>	<b>Funktion</b>	<b>Einstellung</b>
Smoothing	Verringert das Bildrauschen	2
Ring artefact reduction	Bereinigt Artefakte	6
Beam hardening correction	Korrigiert die Absorption niedrig-energetischer Strahlung außerhalb des Objekts	30 %

Nach der Rekonstruktion der Daten wurden der Knochen mit dem Programm DataViewer digital ausgerichtet, sodass alle Knochen für die spätere Analyse ungefähr die gleiche Position im Koordinaten System hatte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Knochen in ihrer Länge parallel zur z-Achse lagen und die Sagittalebene der Femora, gemessen an den Kondylen, parallel zu der y-Achse lagen. Mit dem Programm CTAnalyser wurden anschließend die ROI (region of interest) festgelegt. Um die ROI bei allen Knochen in vergleichbaren Bereichen zu wählen, wurde das proximale Ende der Wachstumsfuge im distalen Bereich des Femurs und der Verbindungspunkt von Femurkopf und großen Trochanter im proximalen Ende des Femurs als Referenzpunkte festgelegt und die Distanz dazwischen als Gesamtlänge ermittelt (Abb 7). 10 % der Gesamtlänge wurden anschließend in der mittleren Diaphyse des Femurs bestimmt (Abb. 7 E, Messbereich „Diaphyse“) und weitere 10 % der Gesamtlänge innerhalb der Metaphyse bestimmt, die 5 % Gesamtlänge oberhalb des distalen Referenzpunkt lagen (Abb. 7 E, Messbereich „Metaphyse“). Nun wurden die ROI markiert und für die Analysen gespeichert. Im Messbereich „Diaphyse“ wurde der Knochen im ersten und letzten Bild des Messbereichs entlang des Periost umrandet. In den dazwischen liegenden Bildern wurde die Markierung von der Software interpoliert. Im Messbereich „Metaphyse“ wurde ebenfalls im ersten und letzten Bild des Bereichs ein Kreis mit einem Durchmesser von 50 % der geringsten Breite des Knochens an dieser Stelle in die Mitte gesetzt, um die trabekulären Strukturen abgegrenzt von der Kortikalis untersuchen zu können.



**Abbildung 7: Definition der Referenzlevel und der „Region of Interest“ (ROI) für die Analyse der Mausfemora nach dem  $\mu$ CT-Scan.** Im mittleren Bild sind der obere Referenzpunkt und der untere Referenzpunkt eingezeichnet. Die Strecke zwischen diesen Punkten wurde als 100 % gesetzt. 10 % der Gesamtstrecke wurden innerhalb der Diaphyse sowie innerhalb der distalen Metaphyse für den Scan ausgewählt.

Nachdem die ROI für jeden Knochen gesetzt und gespeichert wurden, erfolgte die Berechnung der gewünschten Strukturparameter mit der BatMan-Software. Für den Messbereich „Diaphyse“ erfolgte eine 2D-Analyse und für den Messbereich „Metaphyse“ eine 3D-Analyse. Anhand der Kontrastunterschiede wird von der Software zwischen mineralisierten Knochengewebe und nicht-mineralisierten Gewebe unterschieden und anschließend eine Liste mit Strukturparametern erstellt. Die Parameter sind mit ihrer Definition und den entsprechenden Abkürzungen in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:  $\mu$ CT-Parameter, die für die Auswertung der Versuchsreihe ausgewählt wurden, sowie deren Definition.**

	<b>Parameter</b>	<b>Begriffsbedeutung</b>	<b>Definition</b>
<b>Messbereich „Diaphyse“</b>	B.Ar/T.Ar (%)	<u>B.Ar</u> : mean total crosssectional bone area <u>T.Ar</u> : mean total Crosssectional tissue area	Prozentualer Anteil der mittleren Fläche des Knochens an der gesamten Gewebefläche im Querschnitt
	Cs.Th ( $\mu$ m)	Crosssectional thickness	Knochendicke der Kortikalis im Querschnitt
<b>Messbereich „Distale Metaphyse</b>	BV/TV (%)	<u>BV</u> : bone volume <u>TV</u> : tissue volume	Prozentualer Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebevolumen
	Tb.N	Trabecular number	Trabekelanzahl
	SMI	Structure model index	Maß für die Form der Trabekel

### **3.2.9 Histologie**

Zum Nachweisen und Zählen von Megakaryozyten in der Milz, sowie zur Bestimmung des Arthrose-Grads in den Knien der Versuchstiere wurden Gewebeschnitte mit Hämalaun/Eosin (HE) angefärbt. Zur Bestimmung der Anzahl, Größe und der Kontaktfläche der Osteoklasten mit dem Knochen wurde eine TRAcP-Färbung in Kombination mit Hämalaun an Knochenschnitten vorgenommen.

#### *3.2.9.1 Vorbereitung*

Die in 4 % PFA fixierten Gewebeproben wurden zunächst für 30 min unter fließendem Wasser gespült. Die Milzen wurden anschließend in 70 % Ethanol überführt und zur Einbettung in Paraffin abgegeben. Die Knochen wurden für die Paraffineinbettung zuvor, je nach Probenanzahl für 3 – 5 Tage mit Usedecalc entkalkt, bevor sie erneut für 30 min gespült und anschließend in 70 % Ethanol überführt wurden. Wichtig war dabei, dass es bei einem Stichtest mit einer Nadel oder Kanüle möglich war, in den Knochen einzudringen. Die Einbettung erfolgte in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und wurde standardmäßig von Herrn Daniel Wolter durchgeführt. Kurz zusammengefasst, lief die Einbettung wie folgt statt: Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, indem sie hintereinander 2-mal für 5 h in 80 % Ethanol, 2-mal für 5 h in 90 % Ethanol und 3-mal für 5-6 h in 100 % Ethanol gelagert wurden.

Anschließend wurden sie 2-mal für 6 h in Xylol überführt, was als Intermedium dient und so eine Infiltration mit dem Paraffin ermöglicht. Als letzter Schritt wurden die Proben für 1 h in flüssigem Paraffin infiltriert und zuletzt bei RT in den dazugehörigen Histologiekassetten ausgehärtet. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, und auf beschriftete Objektträger gezogen. Diese wurden über Nacht bei 35 °C getrocknet und bis zur Färbung in Objektträgerkästen gelagert.

### *3.2.9.2 HE-Färbung*

Die HE-Färbung verwendet man standardmäßig als Übersichtsfärbung und wurde für die Zählung von Megakaryozyten in der Milz verwendet. Dabei färbt Hämalaun die basophilen Zellkerne blau während Eosin die azidophilen Proteine in Zytoplasma rötlich und kollagene Fasern rosa färbt.

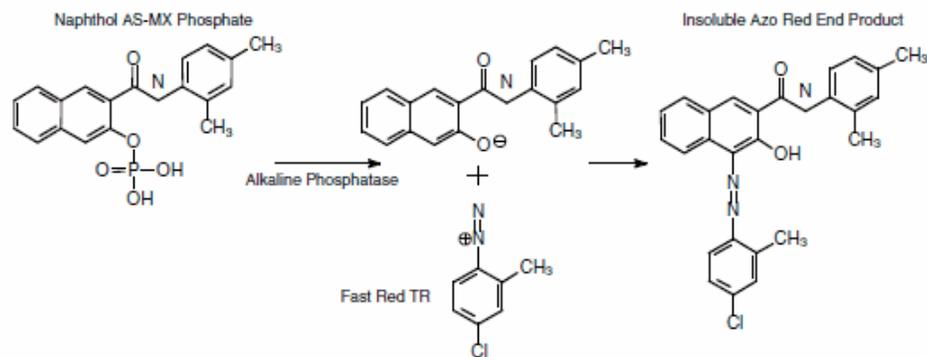
Zunächst wurden die Schnitte entparaffinieren und in einer absteigenden Ethanolreihe gewässert. Dann folgte die Hämalaunfärbung, eine Bläuung unter fließenden Wasser und die Eosinfärbung. Die Proben wurden anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder entwässert und mit Kanadabalsam eingedeckt (Tab. 9).

**Tabelle 9: HE-Färbeprotokoll.**

<b>Färbeschritt</b>	<b>Dauer</b>
<b>1.</b> Roti-Histol	2x 10 min
<b>2.</b> Propanol	2x 5 min
<b>3.</b> 96 % Ethanol	5 min
<b>4.</b> 80 % Ethanol	5 min
<b>5.</b> 70 % Ethanol	5 min
<b>6.</b> A. dest	2x 5 min
<b>7.</b> Hämalaun	25 s
<b>8.</b> Fließendes Leitungswasser	30 min
<b>9.</b> A. dest	5 min
<b>10.</b> Eosin	2 min
<b>11.</b> A. dest	3x eintauchen
<b>12.</b> 70 % Ethanol + NH <sub>3</sub>	3x eintauchen
<b>13.</b> 80 % Ethanol	5 min
<b>14.</b> 96 % Ethanol	5 min
<b>15.</b> Propanol	2x 5 min
<b>16.</b> Roti-Histol	1 – 2 h
<b>17.</b> Roti-Histol	ÜN
<b>18.</b> Eindecken	

**3.2.9.3 TRAcP-Hämalaun-Färbung**

Die Osteoklasten in Gewebeschnitten von Mausknochen wurden mit Hilfe des Enzyms Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAcP: tartrate-resistant acid phosphatase) nachgewiesen. Dieses Enzym ist spezifisch für Osteoklasten und weist die Besonderheit auf, dass es nicht durch Tartrat inhibiert werden kann. Indem man also einen Tartrat-haltigen Puffer verwendet, kann man andere Phosphatasen ausschalten und durch Verwendung eines Naphthols und dem Farbstoff Fast Red die TRAcP-positiven Osteoklasten sichtbar machen. Dabei wird die Phosphatgruppe von dem Naphthol-AS-MX-Phosphat abgespalten und kann dann mit dem Fast Red TR zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff umgewandelt werden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Umsatzreaktion von den Substraten Naphthol AS-MX Phosphat und Fast Red TR durch eine Alkalische Phosphatase zu einem roten, unlöslichen Azofarbstoff.** Diese Umsatzreaktion und damit einhergehende Färbung ist charakteristisch für Osteoklasten. Quelle: <http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html> (23.10.2015)

Da dieser Farbstoff jedoch in Alkohol löslich ist, wurde bei dem Protokoll auf eine stufenweise Entwässerung verzichtet und die Schnitte gleich nach der Färbung mit einem wässrigen Medium eingedeckt.

Die Vorgehensweise allgemein ist mit der HE-Färbung vergleichbar. Nach einer Entparaffinierung und einer schrittweisen Wässerung der Proben, wurde erst die TRAcP-Färbung und dann die Hämalaun-Färbung vorgenommen und die Schnitte anschließend eingedeckt. Die genaue Schrittfolge ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10: TRAcP-Hämalaun-Färbeprotokoll.**

<b>Färbeschritt</b>	<b>Dauer</b>
<b>1.</b> Roti-Histol	2x 10 min
<b>2.</b> Propanol	2x 5 min
<b>3.</b> 96 % Ethanol	5 min
<b>4.</b> 80 % Ethanol	5 min
<b>5.</b> 70 % Ethanol	5 min
<b>6.</b> A. dest	2x 5 min
<b>7.</b> TRAcP-Färbepuffer	30 min
<b>8.</b> TRAcP-Färbelösung	20-30 min
<b>9.</b> A. dest	1x eintauchen
<b>10.</b> Hämalaun	25 s
<b>11.</b> Fließendes Leitungswasser	30 min
<b>12.</b> A. dest	5 min
<b>13.</b> Eindecken	

#### *3.2.9.4 Fast Green/ Safranin-O-Färbung*

Die Färbung mit Fast Green und Safranin-O eignet sich besonders gut, um den artikulären Knorpel zu visualisieren und einen möglichen Knorpelabbau zu beurteilen. Neben dem grünlich gefärbten Zytoplasma der Zellen hebt sich deutlich die rötliche Färbung des Knorpels ab, die durch eine Färbung der Glykosaminoglykane zustande kommt. Da der Abbau der Glykosaminoglykane einer der ersten Schritte bei einem Knorpelabbau markiert, lassen sich mit dieser Färbung frühe Stadien der Osteoarthrose erkennen (Glasson et al. 2010).

Ähnlich wie bei der HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe gewässert. Dann folgten die Hämalaunfärbung sowie eine Bläuung unter fließendem Wasser. Die anschließende Färbung mit 0,1 % Fast Green wurde mit 1 % Essigsäure differenziert und zuletzt mit Safranin-O gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder entwässert und mit Kanadabalsam eingedeckt. Die genaue Schrittfolge ist Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11: Fast Green/ Safranin-O-Färbeprotokoll.**

<b>Färbeschritt</b>	<b>Dauer</b>
1. Roti-Histol	2x 10 min
2. Propanol	2x 5 min
3. 96 % Ethanol	5 min
4. 80 % Ethanol	5 min
5. 70 % Ethanol	5 min
6. A. dest	2x 5 min
7. Hämalan	30 s
8. Fließendes Leitungswasser	30 min
9. A. dest	5 min
10. Fast Green	15 min
11. Essigsäure	15 s
12. A. dest	2x eintauchen
13. Safranin-O	1 min
14. A. dest	2x eintauchen
15. 70 % Ethanol + NH <sub>3</sub>	2x eintauchen
16. 80 % Ethanol	2x eintauchen
17. 96 % Ethanol	2x eintauchen
18. Propanol	4x eintauchen
19. Roti-Histol	5 min
20. Roti-Histol	ÜN
21. Eindecken	

### **3.2.10 Konzentrationsbestimmung von Knochenbaumarkern und Zytokinen im Plasma**

#### *3.2.10.1 Enzym-gebundene Immunadsorptionsverfahren*

Zur Konzentrationsbestimmung der Knochenbaumarker RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand), OPG (Osteoprotegerin) und PINP (N-terminales Prokollagen-Typ-I-Propeptid) im Plasma der Mäuse wurden kommerziell erhältliche ELISAs (Enzym-gebundene Immunadsorptionsverfahren) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und durchgeführt.

RANKL und OPG, die zur Differenzierung und Aktivierung bzw. Inhibierung von Osteoklasten dienen, wurden mit Kits der Firma „Cloud-Clone Corp“. bestimmt. Die beiden Kits basierten dabei auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA's und verliefen nach dem gleichen Prinzip: auf eine

96-Well-Platte sind Antikörper gebunden, die das gesuchte Protein binden können. An die gebundenen Proteine können freie Detektionsantikörper binden, die ein anderes Epitops des gesuchten Proteins erkennen. Dadurch entsteht ein „Antikörper-Sandwich“, mit dem gesuchten Protein in der Mitte. An die Detektionsantikörper können wiederum Antikörper binden, die meist dessen schwere Kette erkennen und an die ein Enzym gebunden ist. Diese Enzyme sind in der Lage passende Substrate in lösliche, farbige Reaktionsprodukte umzusetzen, die per Absorptionsmessung gemessen werden können. Um auf diese Weise ELISAs quantitativ auswerten zu können, ist es notwendig eine Standardreihe in Form einer Serie mit bekannter Antigenkonzentration mitlaufen zu lassen.

Der Ablauf war bei beiden Kits identisch:

In einem ersten Schritt wurden 100 µl der Proben, der Standardreihe sowie diverser Kontrollen auf den Platten verteilt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung der Platten entfernt und direkt 100 µl der Detektionslösung A dazugegeben, die den Detektionsantikörper enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde die Flüssigkeit erneut abgenommen und die Vertiefung 4-mal mit 350 µl Waschpuffer gewaschen um ungebundene Proteine und Antikörpern zu entfernen. Anschließend wurden je 100 µl der Detektionslösung B mit den Enzym-gebundenen Antikörpern in jede Vertiefung verteilt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 4 weiteren Waschschritten wurden je 90 µl der Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und für 15-25 min inkubiert. Um die Farbreaktion abzustoppen wurden 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung gegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen.

PINP ist ein Nebenprodukt des Propeptid des Kollagen-Typ-I und wird während des Aufbaus der Knochenmatrix produziert. Zur Messung der PINP-Konzentration im Plasma der Mäuse wurde ein kompetitiver Enzymimmunoassay von „ids“ verwendet. Dabei konkurriert das im Plasma-enthaltene PINP mit dem markierten PINP des Kits, sodass eine starke Färbung am Ende der Durchführung für eine geringe Konzentration im Plasma steht und umgekehrt.

Zunächst wurden die Plasmaproben 10-fach verdünnt 50 µl der Proben, der Standardreihe, sowie eine Kontrollprobe auf der Platte verteilt. Anschließend wurden je 50 µl von Biotin-markierten PINP dazugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Mikrolattenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen, indem der

Überstand abgekippt wurde und mit 250 µl Waschpuffer aufgefüllt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und dann 150 µl Enzymkonjugatlösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und dann 150 µl TMB-Substrat in die Vertiefungen gegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurden 50 µl HCl zum Abstoppen der Reaktion in jede Vertiefungen gegeben und die Absorption bei 450 nm und mit einem Referenzwert von 650 nm gemessen.

Alle Pipettierschritte wurden mit einer Mehrkanalpipette durchgeführt. Außerdem wurden bei allen Inkubationsschritten die Platten mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen.

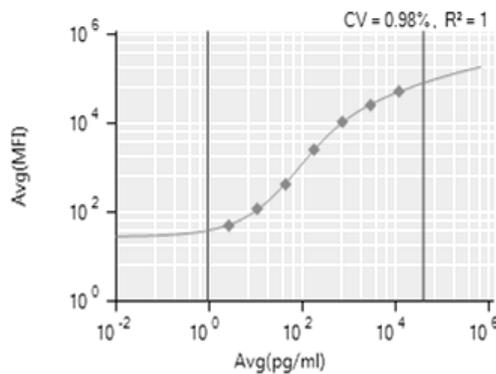
### *3.2.10.2 Bead-basierte Multiplexanalyse im Durchflusszytometer*

Mit dem LEGENDplex-System von BioLegend ist es möglich, in einem kleinen Probenvolumen 13 verschiedene Zytokine gleichzeitig nachzuweisen und zu quantifizieren. Dabei wurden 2 Beadpopulationen mit unterschiedlicher Größe und je 6-7 verschiedenen Fluoreszenzintensitäten verwendet, wo bei an jeden Bead-Typ die Antikörper für ein spezielles Zytokin gekoppelt sind. Für die Untersuchung des Plasma wurde dabei das „Mouse Inflammation panel“ verwendet, mit dem es möglich ist gleichzeitig IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, CCL2 (MCP-1), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF zu bestimmen.

Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Reagenzien und Proben vorbereitet und das Protokoll anschließend durchgeführt: je 25 µl Puffer, 25 µl Standard oder Plasmaprobe, 25 µl Beadmischung und 25 ml biotinylierte Detektionsantikörper wurden in einer 96-Well V-Bodenplatte gemischt und für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde direkt je 25 µl PE-gekoppeltes Streptavidin in jede Vertiefung hinzupipettiert und für weitere 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Beads wurden bei 1000 x g für 5 min sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen und die Beads durch Hinzugabe von 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Beads in 200 µl Waschpuffer resuspendiert und mit einem automatisierten FACSVerse gemessen.

Für jedes Zytokin wurde durch das mitgelieferte Programm eine Standardkurve (Abb. 9) generiert, in der das untere Detektionslimit (linke, vertikale Linie) und das obere

Detektionslimit (rechte, vertikale Linie) markiert waren. Proben, die außerhalb dieser Bereiche lagen, wurden von dem Programm markiert.



**Abbildung 9: Beispiel einer Standardkurve der Bead-basierten Multiplexanalyse im Durchflusszytometer.** Die roten Linien markieren das untere Detektionslimit (links) und das obere Detektionslimit (rechts). Avg: mittlere (*engl.* average); MFI: mittlere relative Fluoreszenzintensität (*engl.* Mean or Median *Fluorescence* Intensity)

### **3.2.11 Statistik**

Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung erfolgten mit dem Programm GraphPadPrism 5-7. Ob die Daten normalverteilt sind, wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Bei vorliegender Normalverteilung wurde mit dem Student's T-Test auf statistische Signifikanz getestet, während bei nicht-normalverteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test angewendet wurde. Signifikanzen sind folgendermaßen angegeben:

- \*            p = 0,01 – 0,05
- \*\*          p = 0,001 – 0,01
- \*\*\*        p = 0,0001 – 0,001
- \*\*\*\*       p < 0,0001

## **4. Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese, dass der Knochenmasseverlust nach einer allogenen HSCT auch aus einer Inkompatibilität der Spender-eigenen Osteoblasten und der fremden Osteoklasten bzw. hämatopoetischen Zellen resultieren kann, zu untersuchen. Dazu wurden Transplantationen von gesamtem Knochenmark zwischen zwei MHC-identischen, ansonsten jedoch genetisch unterschiedlichen Inzuchtstämmen durchgeführt. Als Referenz bzw. Kontrolle dienten sowohl gleichaltrige, ungehandelte Tiere, sowie Tiere, die syngenes Knochenmark transplantiert bekamen.

Im Folgenden soll zunächst gezeigt werden, dass die gesamte Prozedur vertragen wurde und dass die Transplantation von syngenen und allogenen Knochenmarkszellen erfolgreich war. Anschließend soll im Einzelnen untersucht werden, ob in dem gewählten Modell tatsächlich eine reduzierte Knochenmasse nach allogener HSCT im Vergleich zu syngener HSCT zu beobachten ist, welchen Einfluss die Konditionierung auf den Knochen hat und ob der zugrundeliegende Knochenphänotyp, sowie das Geschlecht relevante Faktoren darstellen. Zudem soll geklärt werden, ob ein Knochenmasseverlust auch in Abwesenheit einer GvHD und immunsuppressiver Therapie auftritt und ob eine Fehlfunktion der Osteoblasten oder der Osteoklasten ursächlich für eine veränderte Knochenmasse ist. Schlußendlich widme ich mich der Frage, ob eine allogene HSCT einen Einfluss auf die spontane Entwicklung einer Osteoarthritis im fortschreitenden Alter der STR/ort-Männchen hat.

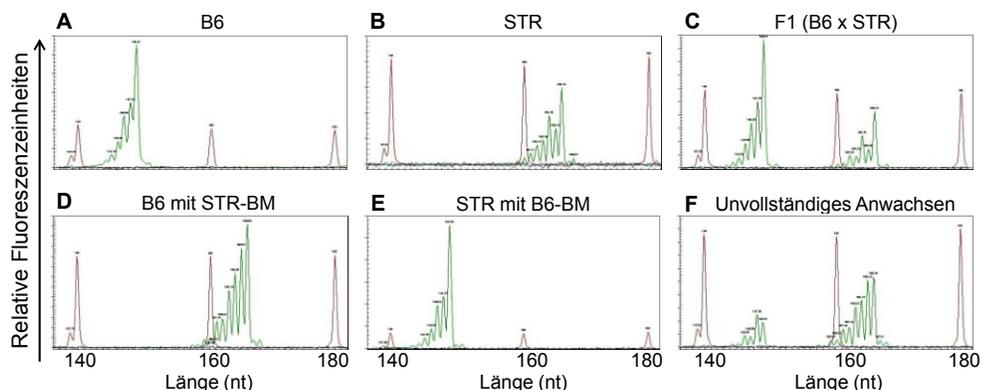
### **4.1 Überlebensrate nach der Knochenmarktransplantation**

Je 50 Mäuse des Stammes C57BL/6J und STR/ort wurden für die Transplantationen eingesetzt. Zwei STR/ort-Weibchen sind während der Rekonstitution mit allogenen Knochenmarkszellen an einer Überdosierung der Narkose gestorben und wurden somit in die Überlebensrate der Prozedur nicht einberechnet. Kurz vor dem Beenden der Versuchszeit sind ein C57BL/6J-Weibchen und zwei STR/ort-Männchen aus unbekanntem Gründen gestorben, sodass die Überlebensrate aller Tiere nach einer Knochenmarktransplantation insgesamt 96,9 % betrug.

## 4.2 Nachweis von erfolgreich transplantiertem Knochenmark

Da das Knochenmark den Ursprung der Blutzellen darstellt, erfolgte der Nachweis, dass das fremde Knochenmark erfolgreich angewachsen ist, über einer Mikrosatellitenbestimmung der Blutzellen am Ende der Versuchszeit eines jeden Tieres. In Abbildung 10 A und B sind jeweils die charakteristischen Längenprofile des Markers D9Mit129 für C57BL/6J bzw. STR/ort-Mäuse mit einer Länge von 148 nt bzw. 166 nt zu sehen. Durch die Betrachtung der F1-Generation lässt sich zudem über die relative Fluoreszenzeinheiten abschätzen, welches Allel mit den verwendeten Primern besser amplifiziert wird (Abb. 10 C).

Tiere, die allogenes Knochenmark erhalten haben, wiesen nach vollständiger Rekonstitution des Knochenmarks das Mikrosatellitenprofil des Spenders auf, wie in Abbildung 10 D bzw. E zu sehen ist. Bei einem unvollständigen Anwachsen zeigt sich ein gemischtes Längenprofil, ähnlich wie bei den Tieren der F1-Generation (Abb. 10 F). Da dieses Verfahren qualitativ genutzt und nicht quantitativ bestimmt wurde, zu welchem Anteil die Zellen von Spender bzw. dem Empfänger stammten, wurden alle Tiere, die eine gemischtes Längenprofil aufwiesen, aus den weiteren Untersuchungen herausgenommen. Das gleiche gilt für Tiere, bei denen nicht die Fragmentlänge des Spenders detektiert wurde. Auf diese Weise wurden zwei STR/ort-Weibchen und zwei STR-Männchen, die allogenes Knochenmark erhalten hatten, ausgeschlossen. Damit lag die Erfolgsquote der Knochenmarktransplantation bei 95,8 %.

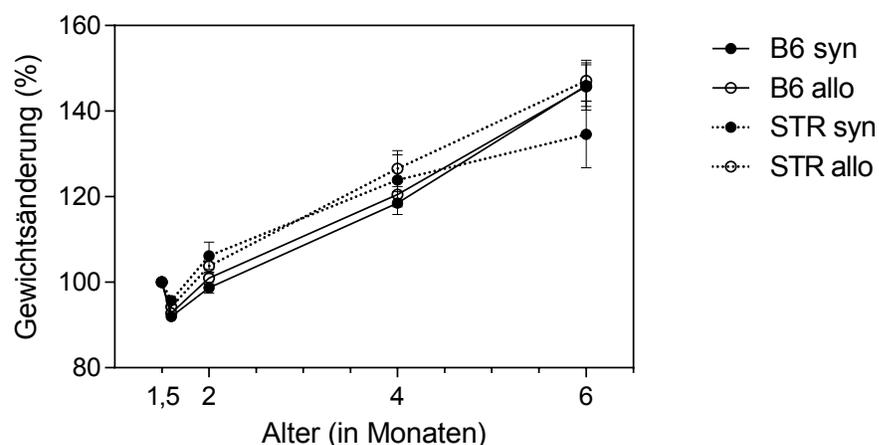


**Abbildung 10:** Das erfolgreiche Anwachsen des Knochenmarks wurde mit Hilfe einer Mikrosatellitenanalyse des Markers D9Mit129 nachgewiesen. A und B zeigen das charakteristische Profil von C57BL/6J (B6) und STR/ort (STR) Mäusen. C Kreuzt man beide Stämme, findet man in der F1-Generation beide Fragmentlängen vor. Nach vollständiger Rekonstitution des Knochenmarks (D, E) lässt sich nur noch die Fragmentlänge des Spenders nachweisen, während bei einem unvollständigen Anwachsen, ähnlich wie bei der F1-Generation beide Fragmentlängen detektiert werden (F).

### 4.3 Körperliche Entwicklung der Versuchstiere im Vergleich

Um in einer ersten Näherung die körperliche Entwicklung der verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurde die Gewichtszunahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht herangezogen (Abb. 11), sowie die Länge der Femora am Endpunkt des Versuches (Abb. 12). Die Tiere wurden im Alter von 1,5 Monaten in die Versuchsreihe aufgenommen, was somit den Versuchsbeginn markiert.

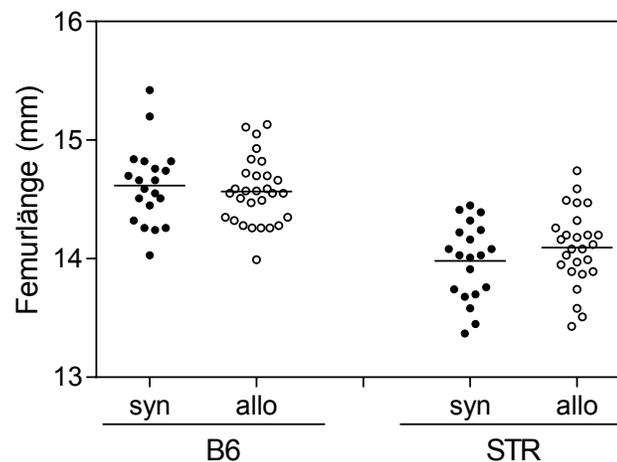
Weder in den Gruppen der syngenem, noch der der allogenen Knochenmarktransplantation wurden äußere Anzeichen einer GvHD, wie beispielsweise Buckelhaltung, Haarausfall, Hautläsionen oder äußerlich sichtbare Geschwürbildungen beobachtet. Da sich C57BL/6J und STR/ort deutlich in ihren Normalgewichten unterscheiden, wurde die prozentuale Gewichtszunahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht betrachtet. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, kommt es einen Tag nach Versuchsbeginn zu einem Gewichtsverlust in allen Gruppen. Dieser Verlust ist vermutlich ein Effekt der letalen Ganzkörperbestrahlung (Duran-Struuck und Dysko 2009) und konnte bereits nach wenigen Tagen wieder von den Tieren ausgeglichen werden. Unabhängig davon entwickeln sich die Tiere ausgehend vom Startgewicht vergleichbar und es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit syngemem oder allogem Knochenmark.



**Abbildung 11: Die prozentuale Änderung des Körpergewichts über den Versuchszeitraum ist vergleichbar.** Die Tiere wurden im Alter von 1,5 Monaten letal bestrahlt und 24 h später mit frischen Knochenmarkszellen rekonstituiert. Im Alter von 6 Monaten wurde die Tiere aus dem Versuch genommen und untersucht. Zum Zeitpunkt der Rekonstitution (ein Tag nach der Bestrahlung) wurde in allen Gruppen eine Gewichtsabnahme beobachtet, die jedoch innerhalb von wenigen Tagen wieder von den Tieren ausgeglichen werden konnte. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM. B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogem.

Betrachtet man die Längen der Femora am Versuchsende im Alter von 6 Monaten, zeigt sich, dass die Tiere nach der Transplantation von allogenen Knochenmark vergleichbare Werte aufweisen wie die Tiere, die syngenes Knochenmark erhalten hatten (Abb. 12). Bei den C57BL/6J- Gruppen lagen die Mittelwerte bei 14,62 und 14,57 mm (syn bzw. allo;  $p=0,5690$ ) und bei den STR/ort-Tieren bei 13,98 und 14,09 (syn bzw. allo;  $p=0,2471$ ).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Tiere mit allogenen Knochenmark im Vergleich zu den Tieren mit syngenen Knochenmark keine Einschränkung im Wachstum erfahren haben, da weder die prozentuale Gewichtsänderung noch die Femurlänge signifikante Unterschiede aufweisen.



**Abbildung 12: Die Femurlänge der Versuchstiere ist unabhängig vom Spender des Knochenmarks.** Die Länge wurde am Versuchsende *ex vivo* per  $\mu$ CT bestimmt. Männchen und Weibchen wurden zusammengefasst. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte. B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogenen.

#### 4.4 Einfluss von allogenen Knochenmark auf die Knochenmikrostruktur

Mit Hilfe der  $\mu$ CT-Analyse der Femora sollte geklärt werden, ob in dem gewählten Mausmodell tatsächlich eine geringere Knochenmasse bzw. veränderte Mikrostruktur nach einer allogenen HSCT im Vergleich zu der syngenen HSCT zu beobachten ist. Ob der zugrundeliegende Knochenphänotyp dabei eine Rolle spielt, soll durch die Verwendung der Tiere des Stammes C57BL/6J als auch des STR/ort-Stammes geklärt werden, die jeweils als osteopen bzw. hyperostotisch gelten. Außerdem wurde sowohl Männchen als auch Weibchen analysiert, um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss das Geschlecht auf die Entwicklung einer der HSCT nachfolgenden Osteoporose hat.

Innerhalb der Femora wurden zwei verschiedene Bereiche analysiert: die distale Metaphyse, sowie die mittlere Diaphyse. In der Metaphyse lag das Augenmerk auf dem trabekulären Knochen und in der Diaphyse auf dem kortikalen Knochen. Im Folgenden werden die Werte immer im Vergleich syngene zu allogener Transplantation und der p-Wert im Anschluss in Klammern angegeben.

#### **4.4.1 Distale Metaphyse**

In der distalen Metaphyse wurde der trabekuläre Knochen anhand des prozentualen Anteils des Knochenvolumens am gesamten Gewebenvolumen (BV/TV), der Trabekelzahl (Tb.N) und des SMI quantifiziert. Der SMI gilt als Maß für die Struktur der Trabekel und die Werte variieren zwischen 0 (plattenförmige Trabekel) und über 3 (stäbchenförmige Trabekel) bis hin zu 4 (kugelige Trabekel). Je höher der Wert ist, desto mehr gilt der Knochen als osteoporotisch.

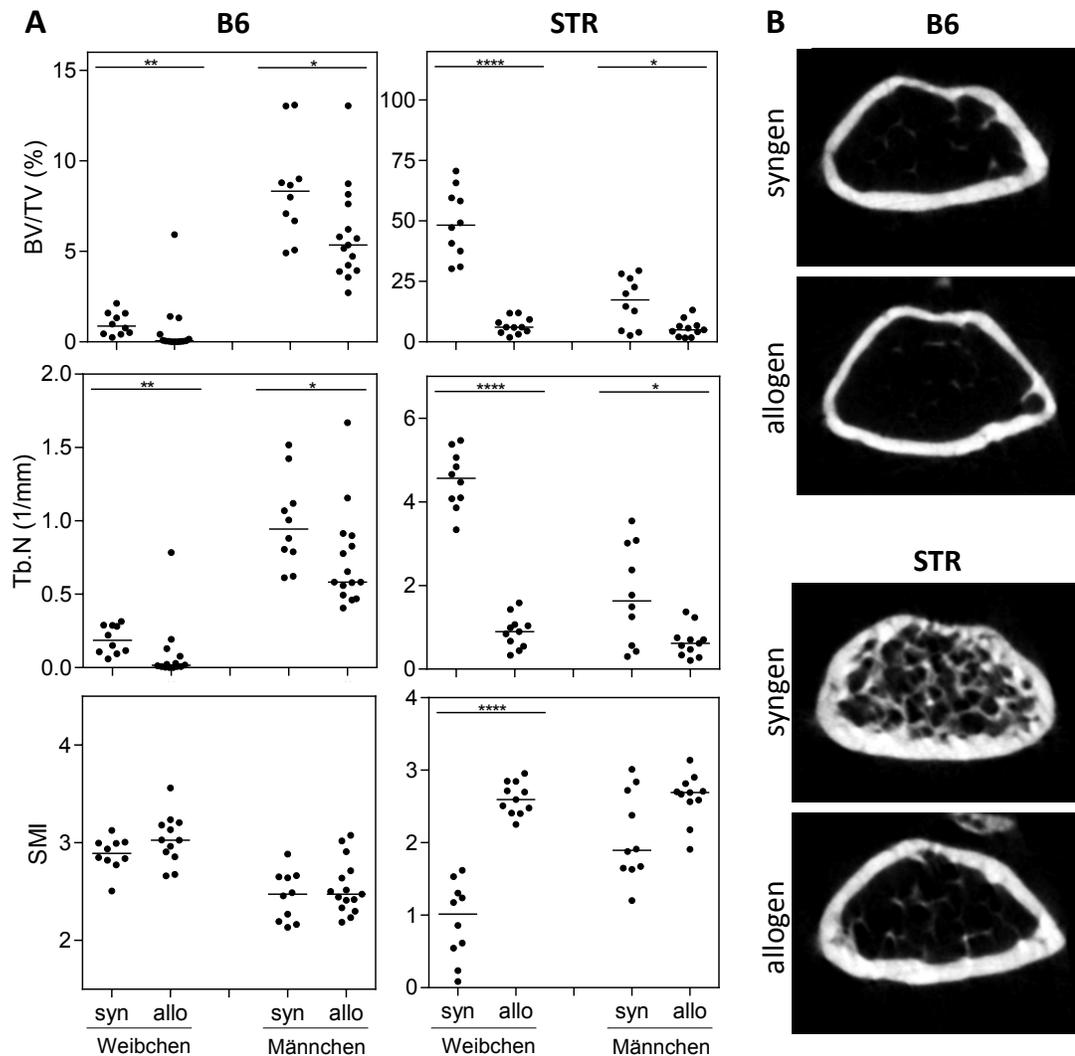
Sowohl bei den C57BL/6J- als auch bei den STR/ort-Mäusen konnte eine geringere, trabekuläre Knochenmasse beobachtet werden (Abb. 13 A, obere Reihe): Bei den C57BL6J-Weibchen lagen die Mediane der BV/TV-Werte bei 0,875 % und 0,055 % ( $p=0,0071$ ) und die der C57BL6J-Männchen bei 8,32 % und 5,35 % ( $p=0,0226$ ); bei den STR/ort-Weibchen wurden dagegen BV/TV-Werte von 48,26 % und 6,05 % ( $p<0,0001$ ) sowie bei den Männchen von 17,32 % und 4,98 % ( $p=0,0242$ ) ermittelt.

In beiden Stämmen sind diese verminderten BV/TV-Werte auf eine verminderte Trabekelzahl pro mm zurückzuführen (Abb. 13 A, mittlere Reihe): In den C57BL/6J-Tieren wurden 0,186 und 0,016 Trabekel pro mm ( $p=0,0023$ ) bei den Weibchen sowie 0,944 und 0,583 Trabekel pro mm ( $p=0,0308$ ) bei den Männchen detektiert; bei den STR/ort-Weibchen waren es 4,566 und 0,893 Trabekel pro mm ( $p<0,0001$ ) und bei den STR/ort-Männchen 1,630 und 0,616 Trabekel pro mm ( $p=0,0285$ ).

Die reduzierte Knochenmasse in Tieren mit allogenem Knochenmark zeigt in den STR/ort-Mäusen auch eine Erhöhung im SMI-Wert mit 1,017 und 2,595 ( $p<0,0001$ ) bei den Weibchen sowie 1,895 und 2,691 ( $p=0,0845$ ) bei den Männchen (Abb. 13 A, untere Reihe), was allerdings nur bei den Weibchen statistische Signifikanz erreicht hatte. Daraus folgt, dass in STR/ort-Tieren mit syngenen Knochenmark eher plattenförmige Trabekel zu finden sind, während sie

in Tieren mit allogenen Knochenmark eine Stäbchenform annehmen. Bei den C57BL/6J-Mäusen konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tiere mit allogenen Knochenmark im Vergleich zu Tieren mit syngenen Knochenmark deutlich weniger trabekulären Knochen haben. Dies konnte sowohl bei beiden Stämmen, als auch bei beiden Geschlechtern beobachtet werden.



**Abbildung 13: Tiere mit allogenen Knochenmark haben weniger trabekulären Knochen in der distalen Metaphyse der Femora.** A Prozentualer Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebvolumen (BV/TV), Trabekelanzahl (Tb.N) und Strukturmodelindex (SMI) sind jeweils getrennt für die Weibchen und Männchen des Stammes C57BL/6J (B6; linke Spalte) und STR/ort (STR; rechte Spalte) aufgetragen. B Repräsentative Querschnittsbilder des µCT-Scans von C57BL/6J (B6; oben) bzw. STR/ort (STR; unten) - Femora in der distalen Metaphyse nach syngener oder allogener Knochenmarktransplantation. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mediane. Mann-Whitney-Test: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

#### 4.4.2 Mittlere Diaphyse

In der mittleren Diaphyse wurden die kortikale Dicke (Cs.Th), der prozentuale Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche (B.Ar/T.Ar), sowie die entsprechenden Einzelparameter Gesamtgewebefläche (T.Ar) und Knochenfläche (B.Ar) untersucht.

Betrachtet man die kortikale Dicke (Cs.Th; nicht dargestellt) der C57BL/6J-Tiere scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Tiere syngenes oder allogenes Knochenmark transplantiert bekamen: Bei den C57BL/6J-Weibchen lag die mittleren Werte bei 0,256 und 0,251 mm ( $p=0,319$ ) und bei den Männchen bei 0,268 und 0,266 mm ( $p=0,733$ ). Bei den STR/ort-Mäusen lässt sich dagegen keine Aussage treffen, da eine Besonderheit der STR/ort-Mäuse ist, dass es innerhalb der Diaphyse zu einer starken Verwachsung von kortikalem und trabekulären Knochen kommt (Abb. 14 B). Dies erschwert es, die Dicke des kortikalen Knochens (Cs.Th) adäquat zu messen und somit zu untersuchen, welchen Einfluss allogenes Knochenmark im Vergleich zu syngemem Knochenmark auf die Kortikalis der Femora von STR/ort-Mäusen hat.

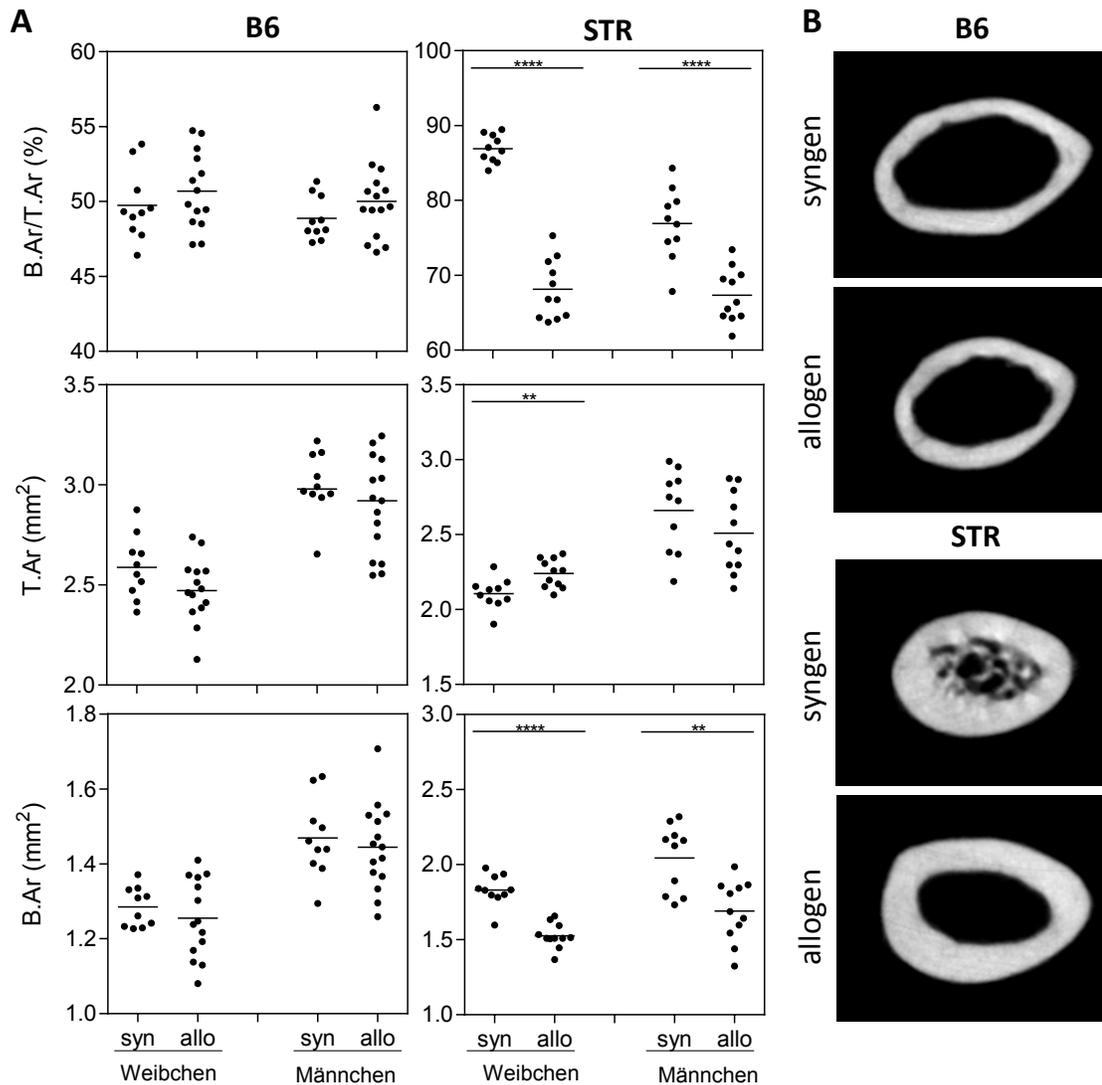
Die Messung von B.Ar/T.Ar und der entsprechenden Einzelparameter zeigt dagegen deutliche Unterschiede zwischen den STR/ort-Gruppen mit syngemem und allogemem Knochenmark auf, die in den C57BL/6J-Mäusen nicht beobachtet werden konnten (Abb. 14 A): bei den C57BL/6J-Weibchen lagen die B.Ar/T.Ar-Werte bei 49,7 % und 50,7 % ( $p=0,356$ ) und bei den Männchen bei 48,9 % und 50,0 % ( $p=0,209$ ); bei den STR/ort-Tieren wurden dagegen B.Ar/T.Ar-Werte von 86,9 % und 68,1 % ( $p<0,0001$ ) bei den Weibchen sowie 76,9 % und 67,4 % ( $p<0,0001$ ) bei den Männchen ermittelt (Abb. 14 A, obere Reihe).

Die mittlere Gesamtgewebefläche T.Ar war mit 2,59 mm<sup>2</sup> und 2,48 mm<sup>2</sup> ( $p=0,098$ ) bei den C57BL/6J-Weibchen sowie 3,00 mm<sup>2</sup> und 2,89 mm<sup>2</sup> ( $p=0,210$ ) bei den C57BL/6J-Männchen zwischen den Gruppen mit syngemem und allogemem Knochenmark vergleichbar (Abb. 14 A, mittlere Reihe). Bei den STR/ort-Weibchen lagen die T.Ar-Werte nach der Transplantation von allogemem Knochenmark mit durchschnittlich 2,24 mm<sup>2</sup> höher als bei den Weibchen mit syngemem Knochenmark mit 2,11 mm<sup>2</sup> ( $p=0,0051$ ), während sie bei den STR/ort-Männchen mit 2,66 mm<sup>2</sup> sowie 2,51 mm<sup>2</sup> ( $p=0,212$ ) vergleichbar waren.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, betrachtet man die mittlere Knochenfläche B.Ar. Auch hier waren die Werte innerhalb der C57BL/6J-Gruppen vergleichbar mit Werten von  $1,29 \text{ mm}^2$  zu  $1,26 \text{ mm}^2$  ( $p=0,415$ ) bei den Weibchen und  $1,47 \text{ mm}^2$  zu  $1,44 \text{ mm}^2$  ( $p=0,591$ ) bei den Männchen. Bei den STR/ort-Tieren sind dagegen erneut deutlichen Unterschiede zwischen den Tiere mit syngenen und allogenen Knochenmark zu beobachten: die Weibchen lagen bei  $1,83 \text{ mm}^2$  zu  $1,33 \text{ mm}^2$  ( $p<0,0001$ ) und die Männchen bei  $2,04 \text{ mm}^2$  zu  $1,69 \text{ mm}^2$  ( $p=0,0012$ ). Der verminderte prozentuale Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche (B.Ar/T.Ar) ist in STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark also primär auf eine reduzierte Knochenfläche B.Ar. zurückzuführen. Betrachtet man Abbildung 14 B, lässt sich erkennen, dass dies erneut auf einer Reduktion von trabekulären Strukturen beruht.

Von den C57BL/6J-Mäusen ausgehend scheint die Kortikalisdicke nach allogener Knochenmarktransplantation weder vermindert noch erhöht zu sein. Da dies aber nur bei einem der untersuchten Stämme ausgewertet werden konnte, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich um einen allgemeinen oder einen stammspezifischen Effekt handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tiere nach allogener Knochenmarktransplantation in der distalen Metaphyse weniger trabekulären Knochen aufwiesen als die Vergleichstiere, denen syngenes Knochenmark transplantiert wurde. Dies wurde in beiden untersuchten Stämmen beobachtet, sowie in beiden Geschlechtern. Die Dicke des kortikalen Knochens ist jedoch, ausgehend von den C57BL/6J-Mäusen, vergleichbar zwischen Tieren nach syngener und allogener Knochenmarktransplantation.

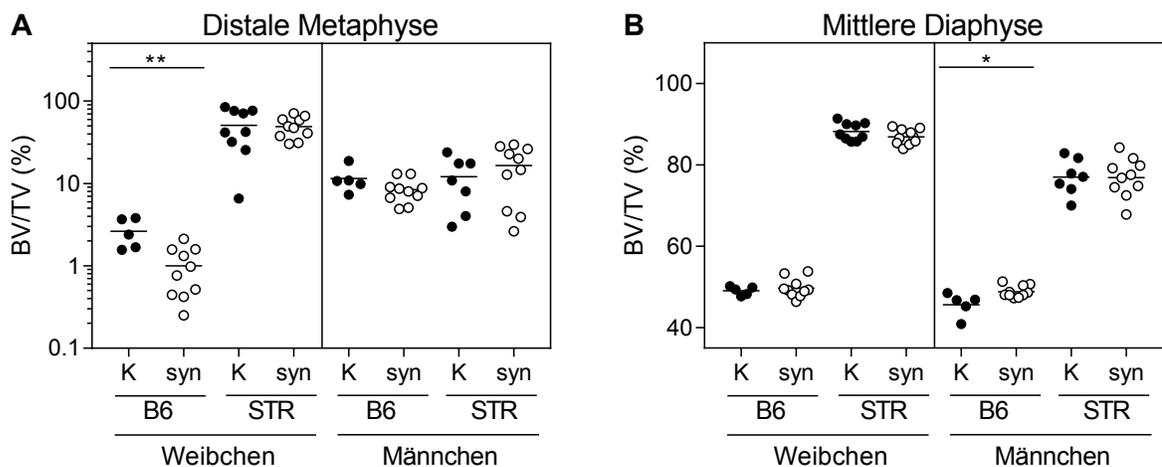


**Abbildung 14: STR/ort-Mäuse mit allogenen Knochenmark haben weniger trabekuläre Strukturen in der Diaphyse der Femora. A** Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche (B.Ar/T.Ar), Gesamtgewebefläche (T.Ar) und Knochenfläche (B.Ar) sind jeweils getrennt für die Weibchen und Männchen des Stammes C57BL/6J (B6; links) und STR/ort (STR; rechts) aufgetragen. **B** Repräsentative Querschnittsbilder des  $\mu$ CT-Scans von C57BL/6J (B6; oben) bzw. STR/ort (STR; unten)-Femora in der Diaphyse nach syngener oder allogener Knochenmarktransplantation. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte. Student's *t*-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.5 Einfluss der Konditionierung auf die Knochenmasse

Um den Einfluss der Konditionierung bzw. ihrer Spätfolgen, hier in Form einer Ganzkörperbestrahlung, auf den Knochen zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines  $\mu$ CTs der prozentuale Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebevolumen (BV/TV) in der distalen Metaphyse und mittleren Diaphyse der Femora untersucht. Gleichaltrige, unbehandelte Mäuse wurden dafür mit Tieren verglichen, die syngenes Knochenmark transplantiert bekamen, um den Effekt der Konditionierung beurteilen zu können.

Wie der Abbildung 15 A zu entnehmen ist, wurde in der distalen Metaphyse lediglich bei den C57BL/6J-Weibchen ein signifikanter Unterschied detektiert: Nach der Transplantation von syngemem Knochenmark lag der BV/TV-Wert mit 0,87 % signifikant unter dem Wert der unbehandelten Kontrollen (2,40 %;  $p=0,008$ ). In der mittleren Diaphyse (Abb. 15 B) wurde nur bei den C57BL/6J-Männchen ein Unterschied beobachtet: hier war der BV/TV-Wert mit 48,9 % in den Tieren nach syngener Knochenmarktransplantation im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren (45,7 %) signifikant erhöht ( $p= 0,012$ ). Dennoch ist bei der Mehrheit der Gruppen kein Effekt zu beobachten. Folglich hat die Konditionierung nur stammspezifisch in den C57BL/6J-Mäusen einen Einfluss auf die Knochenmasse.



**Abbildung 15: Die Konditionierung hat nur vereinzelt einen Einfluss auf die Knochenmasse.** Prozentualer Anteil des Knochenvolumens am gesamten Gewebevolumen (BV/TV) in der distalen Metaphyse (A) und der mittleren Diaphyse (B) zeigen kaum Veränderungen nach der Ganzkörperbestrahlung und anschließender Rekonstitution mit syngenen Knochenmarkzellen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mediane (A) bzw. die Mittelwerte (B). Mann-Whitney-Test (A) bzw. Student's t-Test: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ .

## 4.6 GvHD und Inflammation

Die Graft versus Host Disease und die damit verbundene Gabe von Immunsuppressiva wird als häufigste Ursache für die Entwicklung einer Osteoporose nach der HSCT angegeben. Bei der hier vorliegenden Versuchsreihe wurde auf die Gabe von Immunsuppressiva allerdings komplett verzichtet. Daher stellt sich die Frage, ob Anzeichen einer GvHD in Form der damit verbundenen systemischen Inflammation in den Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation zu beobachten sind. Im Folgenden werden daher die Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Zytokinen und die Zusammensetzung der Immunzellen in der Milz untersucht. Im Anschluss soll zusätzlich noch auf eine Besonderheit der Milz in den STR/ort-Tieren eingegangen werden.

### 4.6.1 Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Zytokinen

#### *4.6.1.1 Rahmenparameter der Messung*

Die Messung erfolgte mit Hilfe einer Bead-basierten Multiplexanalyse im Durchflusszytometer. Gemessen wurden die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, CCL2 (MCP-1), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF. Vor der Betrachtung der Ergebnisse müssen jedoch einige Faktoren beachtet werden, die später bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Tabelle 12 fasst die wichtigsten Punkte zusammen, die im Folgenden genannt werden.

Zunächst lagen die unteren Detektionslimits der Messungen von IL-23, IL-27 und IFN- $\beta$  weit abseits der Assay-Sensitivitäten, wie sie im Kit angegeben wurden (Tab. 12 A und B). Zudem konnte für manche Zytokine kaum genaue Messwerte generiert werden, da die Konzentrationen der Proben größtenteils unterhalb des Detektionslimits lagen. Wie groß der Anteil der Proben war, deren Zytokinkonzentrationen sich innerhalb des Detektionslimits befanden, ist in Tabelle 12 C aufgelistet. So lagen die IL-1  $\alpha$ -Konzentrationen aller Proben innerhalb des Detektionslimits, während das bei der Messung für IFN- $\beta$  nur für 12 % der Proben galt.

Um besser abschätzen zu können, wie realistisch die gemessenen Werte tatsächlich waren, wurde außerdem eine Kit-interne Liste über die endogenen Konzentrationen der Zytokine im

Plasma von C57BL/6J-Tieren (Tab. 12 D) herangezogen. Diese Werte wurden mit den medianen Zytokinkonzentrationen aller C57BL/6J-Mäuse verglichen, die syngenes Knochenmark transplantiert bekamen (Tab. 12 E). Bei IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, sowie erneut IL-23 und IL-27 wurden dabei Konzentrationen gemessen, die stark von den Angaben des Kits abwichen. Diese Punkte sind zu Bedenken bei der Betrachtung der einzelnen Werte.

**Tabelle 12: Rahmenparameter, die bei der Interpretation der Messungen berücksichtigt werden müssen.**

	A Assay- Sensitivität * (pg/ml)	B unteres Detektions- limit (pg/ml)	C Anteil d. Proben über dem unteren Detektionslimit (%)	D Konz. (pg/ml) B6-endogen *	E Med. Konz. (pg/ml) B6-syngen
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	1,2	-	100,0	9,0	8,8
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	3,3	2,0	22,9	ND	2,0
<b>IL-6</b>	1,0	1,3	62,7	14,5	1,7
<b>IL-10</b>	1,8	2,6	72,3	83,5	9,9
<b>IL-12p70</b>	1,3	1,6	18,1	0,9	1,6
<b>IL-17A</b>	1,3	0,9	72,3	2,7	1,1
<b>IL-23</b>	4,7	11,2	38,6	7,0	11,9
<b>IL-27</b>	8,0	17,5	48,2	170,6	30,2
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	4,8	17,0	12,0	14,3	17,0
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,0	1,6	71,1	8,7	1,9
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	2,1	1,0	43,4	9,9	1,0
<b>MCP-1</b>	1,8	4,8	54,2	10,1	6,9
<b>GM-CSF</b>	2,7	4,6	25,3	14,7	4,6

\* Angaben aus dem Kit LEGENDplex der Firma BioLegend. B6: C57BL/6J.

#### 4.6.1.2 Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine im Plasma

Die Zytokinkonzentrationen sind für die Stämme jeweils getrennt dargestellt: Tabelle 13 zeigt die Mediane der C57BL/6J-Tiere, denen syngenes bzw. allogenes Knochen transplantiert wurde und Tabelle 14 zeigt die Mediane der STR/ort-Mäuse. Außerdem sind innerhalb der Tabellen Weibchen und Männchen getrennt voneinander aufgelistet.

Die Mediane der IL-1 $\alpha$ -Konzentrationen waren bei den C57BL/6J-Mäusen, die allogenes Knochenmark erhalten hatten, höher als bei den Tieren, die syngenes Knochenmark bekamen (Tab. 13). Dennoch erreichte der Unterschied nur bei den Männchen statistische

Signifikanz. Bei den STR/ort-Mäusen war es genau umgekehrt, denn hier wiesen die Tiere mit allogener Knochenmark eine niedrigere Konzentration auf, die aber nur innerhalb der Weibchen statistische Signifikanz erreichte (Tab. 14). Bei den IL-10-Konzentrationen verhielt es sich umgekehrt. Sowohl bei den C57BL/6J-Weibchen, als auch bei den Männchen waren die Konzentrationen im Median bei den Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation niedriger, als bei den Tieren nach syngener Knochenmarktransplantation, während sie bei den STR-/ort-Tieren höher waren. Allerdings erreichte hier nur der Unterschied innerhalb der C57BL/6J-Weibchen statistische Signifikanz. Sowohl bei den IL-1 $\alpha$ - als auch bei den IL-10-Konzentrationen konnten somit lediglich spenderstammspezifische Unterschiede detektiert werden.

Bei den Zytokinen IL-17A, IL-27, MCP-1 gibt es zwar vereinzelt, beispielsweise bei den STR/ort-Mäusen, signifikante Unterschiede zwischen den Tieren die syngenes bzw. allogenes Knochenmark transplantiert bekamen, doch korreliert dies weder mit den allogenen Konditionen, noch ist es spenderstammspezifisch.

Die Konzentrationen der verbleibenden Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Tieren, die syngenes bzw. allogenes Knochenmark erhalten hatten. Dies galt für beide Geschlechter beider Stämme.

**Tabelle 13: Mediane Konzentrationen (pg/ ml) von inflammatorischen Zytokinen im Plasma von C57BL/6J-Mäusen.**

	Weibchen			Männchen		
	syn	allo	<i>p</i>	syn	allo	<i>p</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	8,5	21,9	0,0638	11,6	15,6	** 0,0059
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	2,0	2,0	>0,999	2,0	2,0	0,2344
<b>IL-6</b>	1,3	1,4	0,4404	2,1	3,9	0,1487
<b>IL-10</b>	9,9	2,6	* 0,0359	9,7	4,7	0,0917
<b>IL-12p70</b>	1,6	1,6	>0,999	1,6	1,6	0,5119
<b>IL-17A</b>	1,6	1,3	0,6272	1,0	2,1	0,3268
<b>IL-23</b>	11,2	11,2	0,4726	12,7	11,2	0,8282
<b>IL-27</b>	17,5	17,5	0,9621	38,3	17,5	0,1079
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	17,0	17,0	>0,999	17,0	17,0	0,5889
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,6	1,8	0,4359	2,1	2,7	0,3035
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,0	1,0	0,9508	1,0	1,0	0,1942
<b>MCP-1</b>	9,4	4,8	0,1537	6,8	7,5	0,8507
<b>GM-CSF</b>	4,6	4,6	0,6999	4,6	4,6	0,7323

**Tabelle 14: Mediane Konzentrationen (pg/ ml) von inflammatorischen Zytokinen im Plasma von STR/ort-Mäusen.**

	Weibchen			Männchen			
	syn	allo	<i>p</i>	syn	allo	<i>p</i>	
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	25,3	11,5	*	0,0136	15,2	10,1	0,0720
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	3,0	2,0		0,1007	2,0	2,0	0,3246
<b>IL-6</b>	1,7	1,7		0,8801	2,8	1,7	0,1435
<b>IL-10</b>	13,1	15,5		0,9616	2,6	5,3	0,1768
<b>IL-12p70</b>	1,6	1,6		0,6335	1,6	1,6	0,7381
<b>IL-17A</b>	2,2	1,0	*	0,0232	1,7	1,7	0,6042
<b>IL-23</b>	13,2	12,6		0,8801	11,2	11,2	0,5621
<b>IL-27</b>	26,5	17,5		0,8769	17,5	70,2	** 0,0018
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	17,0	17,0		>0,999	17,0	17,0	0,7243
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	2,7	4,1		0,4156	1,8	1,6	0,6917
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4,8	7,9		0,3740	1,0	1,0	0,6084
<b>MCP-1</b>	4,8	9,9	*	0,0288	4,8	4,8	0,5074
<b>GM-CSF</b>	4,6	4,6		>0,999	4,6	4,6	0,7243

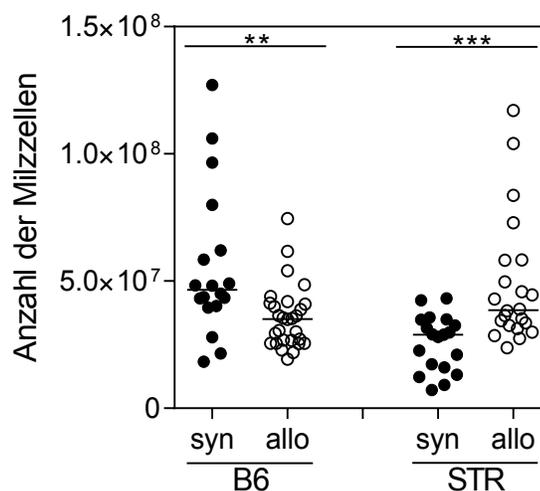
Zusammenfassend war keins der untersuchten pro- oder antiinflammatorischen Zytokine einheitlich in allen Tieren mit allogenen Knochenmark erhöht oder erniedrigt im Vergleich zu den Tieren, denen syngenes Knochenmark transplantiert wurde. Es konnte lediglich bei IL-1 $\alpha$  und IL-10 spenderstammspezifische Änderungen in den Plasmakonzentrationen ermittelt werden. In Kombination mit der hohen Überlebensrate und der Tatsache, dass kein anhaltender Gewichtsverlusts beobachtet wurde, spricht dies gegen das Vorhandensein einer GvHD.

## **4.6.2 Immunzellen der Milz**

### *4.6.2.1 Anzahl der Milzzellen*

Neben den Inflammatorischen Zytokinen kann auch die Zusammensetzung der Immunzellen während einer GvHD verändert sein. Zudem sind lymphoide Zellen wie T- oder B-Lymphozyten in der Lage, Osteoklasten über RANKL und OPG zu aktivieren oder zu inhibieren. Gleichzeitig stammen Osteoklasten der myeloiden Zelllinie ab. Eine Analyse der Immunzellen der Milz könnte also Aufschluss über eine veränderte Zusammensetzung dieser Zellen nach der Transplantation von allogenen Knochenmark geben.

Um sich einer möglichen Veränderung der Immunzellen der Milz zu nähern, wurde zunächst die Anzahl der Milzzellen bestimmt. Da von der Milz ein Teil für eine histologische Untersuchung (siehe Abschnitt 4.6.3) benötigt wurde, wurde sie vor und nach der Abtrennung dieses Stückes gewogen. Die ermittelte Zellzahl wurde dann auf die gesamte Milz bezogen. Abbildung 16 zeigt die Anzahl der gesamten Milzzellen für die jeweiligen Mausstämme zusammengefasst. Bei den C57BL/6J-Mäusen lagen die Mediane bei  $4,66 \cdot 10^7$  und  $3,51 \cdot 10^7$  Zellen (syn bzw. allo;  $p=0,0031$ ) und somit war die Zellzahl bei den Tieren mit allogenen Knochenmark signifikant niedriger. Bei den STR/ort-Mäusen war es umgekehrt und mit  $2,89 \cdot 10^7$  und  $3,86 \cdot 10^7$  (syn bzw. allo;  $p=0,0002$ ) war die Zellzahl der Milz bei den Tieren mit allogenen Knochenmark höher. Erneut scheinen die beobachteten Veränderungen mit der Stammeszugehörigkeit des Spenders zusammenzuhängen.

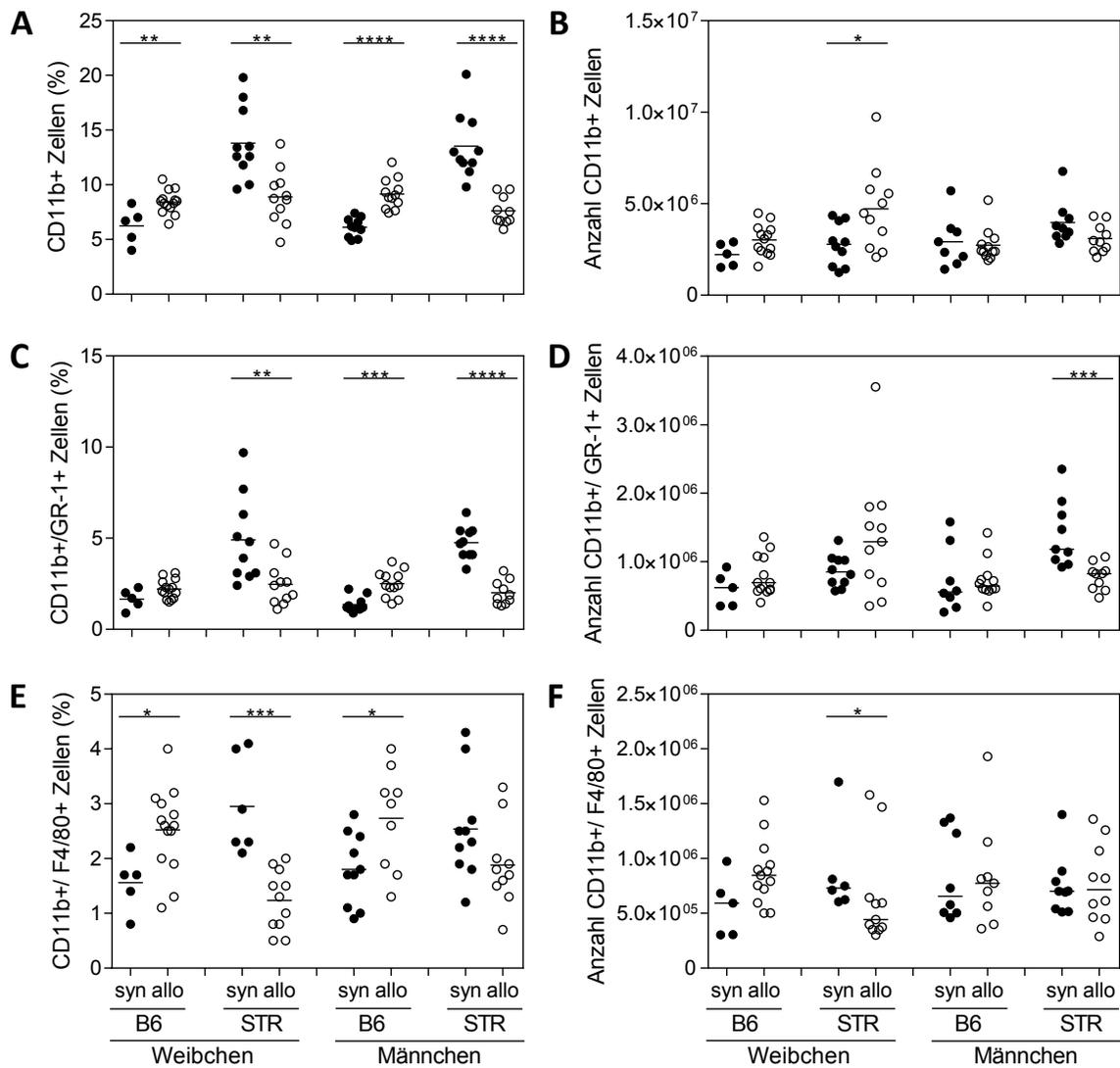


**Abbildung 16: Die Anzahl der Milzzellen ist spenderstammsspezifisch.** Männchen und Weibchen wurden zusammengefasst. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mediane. Mann-Whitney-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogenen.

#### *4.6.2.2 Myeloide Immunzellen*

Innerhalb der myeloiden Reihe wurden CD11b-positive Zellen sowie CD11b-GR-1- und CD11b-F4/80-doppelt-positive Zellen betrachtet. CD11b stellt allgemein ein Marker für myeloide Zellen dar, während er in Kombination mit GR-1 oder F4/80 Granulozyten bzw. Makrophagen kennzeichnet. Neben dem prozentualen Anteil der Zellen innerhalb der Milzzellen (Abb. 23 A/C/E) wurde zusätzlich auch noch die Gesamtzellzahl analysiert (Abb. 23 B/D/F). Betrachtet man die prozentualen Werte der drei untersuchten Zellpopulationen zeigt sich ein wiederkehrendes Muster. Bei den C57BL/6J-Mäusen mit allogenen Knochenmark sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellpopulation im Vergleich erhöht, während es sich bei den STR/ort-Tieren umgekehrt verhält. Dennoch erreichen nicht alle Gruppen statistische Signifikanz. Die prozentualen Anteile scheinen also erneut vom Stamm des Spenders abzuhängen und sind unabhängig davon, ob syngenes oder allogenes Knochenmark transplantiert wurde.

Bei der Gesamtzahl der Zellpopulationen ergibt sich allerdings ein weniger klares Bild. Hier scheint es weder Effekte zu geben, die auf den Stamm des Spenders, noch das Geschlecht, noch auf die Transplantation von allogenen oder syngenen Knochenmark zurückzuführen sind.



**Abbildung 17: Der prozentuale Anteil der myeloiden Zellen in der Milz ist stammspezifisch.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile der CD11b-positiven myeloiden Zellen (**A**), der CD-11b-/ GR-1-positiven Granulozyten (**C**) und der CD11b-/ F4/80-positiven Makrophagen (**E**), sowie die entsprechenden Gesamtzellzahlen (**B**, **D**, **F**) bezogen auf das Gesamtgewicht der Milz. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte in **A**, **B**, **C** und **E** und die Mediane in **D** und **F**. Student's *t*-Test (**A**, **B**, **C**, **E**) bzw. Mann-Whitney-Test (**D**, **F**): \*  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogene.

#### *4.6.2.3 Lymphoide Immunzellen*

Innerhalb der lymphoiden Zellen wurden B220-positive und CD3-positive Zellen, sowie das Verhältnis der CD4/CD8-positiven Zellen betrachtet. Das Oberflächenmolekül B220 ist auf B-Lymphozyten zu finden, während CD3 primär T-Lymphozyten markiert. CD4 und CD8 sind auf Subpopulationen von CD3-positiven Zellen zu finden und kennzeichnen T-Helfer- bzw. zytotoxische T-Lymphozyten.

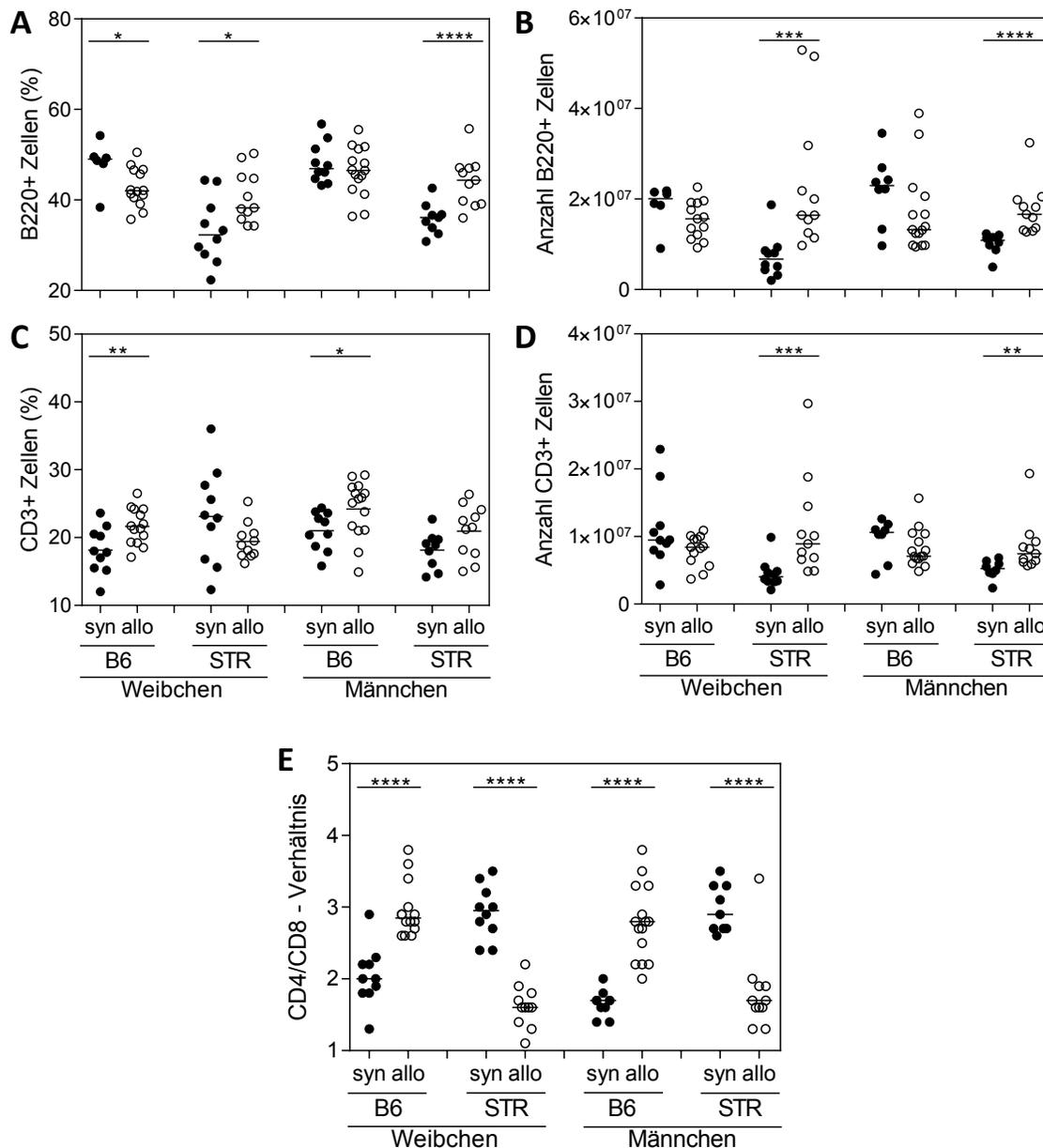
Im Folgenden sollen zunächst die B220-positiven B-Lymphozyten und die CD3-positiven T-Lymphozyten betrachtet werden. Anschließend wird innerhalb der CD3-positiven Zellen noch das Verhältnis der Subpopulationen der CD4- und CD8-positiven Zellen analysiert.

Weder beim prozentualen Anteil der B220-positiven (Abb. 24 A), oder der CD3-positiven Zellen (Abb. 23 C) lassen sich Veränderungen erkennen, die eindeutig der allogenen Konditionen zugeordnet werden können. Bei der Gesamtzellzahl der B220- bzw. CD3-positiven Zellen (Abb. 24 B bzw. D) ist spenderstammesspezifischer Effekt zu beobachten: Sowohl bei den B220-positiven, als auch bei den CD3-positiven Zellen zeigte sich, dass die C57BL/6J-Tiere mit allogenen Knochenmark weniger B220- bzw. CD3-positiven Zellen aufweisen, als die Tiere, die syngenes Knochenmark erhielten. Bei den STR/ort-Mäusen war es genau umgekehrt. Allerdings erreichten diese Beobachtungen nur bei den STR/ort-Tieren statistische Signifikanz.

Beim Verhältnis der CD4/CD8-Zellen (Abb. 24 E) konnte dagegen bei beiden Mausstämmen und Geschlechtern spenderstammesspezifische Unterschiede beobachtet werden, die deutlich signifikant waren. Das CD4/CD8-Verhältnis in Tieren mit Knochenmark aus STR/ort-Mäusen (B6-allo bzw. STR-syn) war höher als in Empfängertieren, deren Knochenmarkspender C57BL/6J-Mäuse waren (B6-syn bzw. STR-allo).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der untersuchten Parameter durch die Transplantation von allogenen Knochenmark eine deutliche, einheitlich auf alle Gruppen zutreffende Veränderung erfährt. Somit können veränderte Anteile oder Anzahlen der Immunzellen der Milz als Ursache für die beobachteten Effekte im Knochen ausgeschlossen werden. Dennoch bestätigen die spenderstammesspezifischen Veränderungen, wie sie beispielsweise bei dem CD4/CD8-Verhältnis beobachtet wurden, dass die Transplantation der Knochenmarkszellen an sich erfolgreich war.

Da insgesamt weder die inflammatorischen Zytokine noch die Zusammensetzung der Immunzellen eine Veränderung in Tieren nach einer allogenen Knochenmarktransplantation aufwiesen, kann eine systemische Inflammation ausgeschlossen werden.



**Abbildung 18: Die Gesamtzahl von lymphoiden Zellen in der Milz sind teilweise stammspezifisch.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile der B220-positiven B-Lymphozyten (**A**) und der CD3-positiven T-Lymphozyten (**C**), sowie die entsprechenden Gesamtzellzahlen (**B**, **D**) bezogen auf das Gesamtgewicht der Milz. **E** zeigt das Verhältnis der CD4- und CD8-positiven Zellen innerhalb der CD3-positiven Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte in **C** und die Mediane in **A**, **B**, **D** und **E**. Student's *t*-Test (**C**) bzw. Mann-Whitney-Test (**A**, **B**, **D**, **E**): \*  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogen.

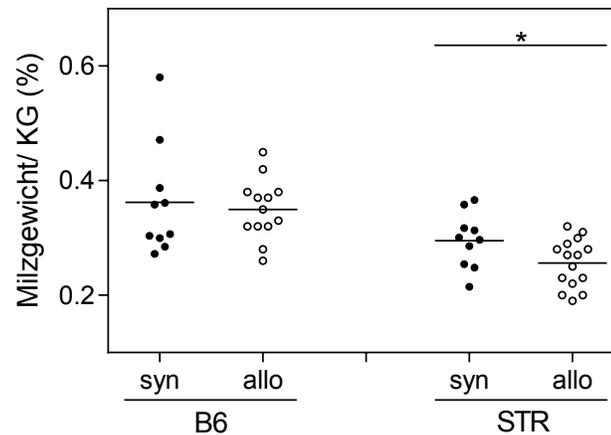
---

#### **4.6.3 Größe der Milz und Anzahl von Megakaryozyten**

Als Organ des lymphatischen Systems spielt die Milz eine wichtige Rolle bei Betrachtung des Immunsystems. So kann sie u.a. auch unter den pathologischen Bedingungen einer Knochenmarkdepression die Blutbildung übernehmen – ein Vorgang, den man extramedulläre Hämatopoese nennt (Kim 2010). Charakteristisch für die extramedulläre Hämatopoese sind eine Vergrößerung der Milz und ein vermehrtes Auftreten von Megakaryozyten. Dieses Phänomen wurde auch schon bei den Tieren des STR/ort-Mausstammes beobachtet (Pasold et al. 2012a), da es auf Grund der hohen Knochenmasse zu einer Verdrängung des Knochenmarks kommt und somit die Blutbildung u.a. in die Milz verlagert wird.

Um die extramedulläre Hämatopoese zu bestimmen, wurden zunächst die Milzen gewogen. Da die Körper- und Milzgewichte der C57BL/6J-Mäuse und der STR/ort-Mäuse stark voneinander abweichen, wurde das Gewicht der Milz in Relation zum Körpergewicht gesetzt (Abb. 19). Da in der  $\mu$ CT-Analyse die Unterschiede der trabekulären Knochenmasse zwischen den allogenen und syngen behandelten Gruppen bei den weiblichen Tieren am höchsten war, wurden im Folgenden nur noch die weiblichen C57BL/6J- und STR/ort-Mäuse betrachtet.

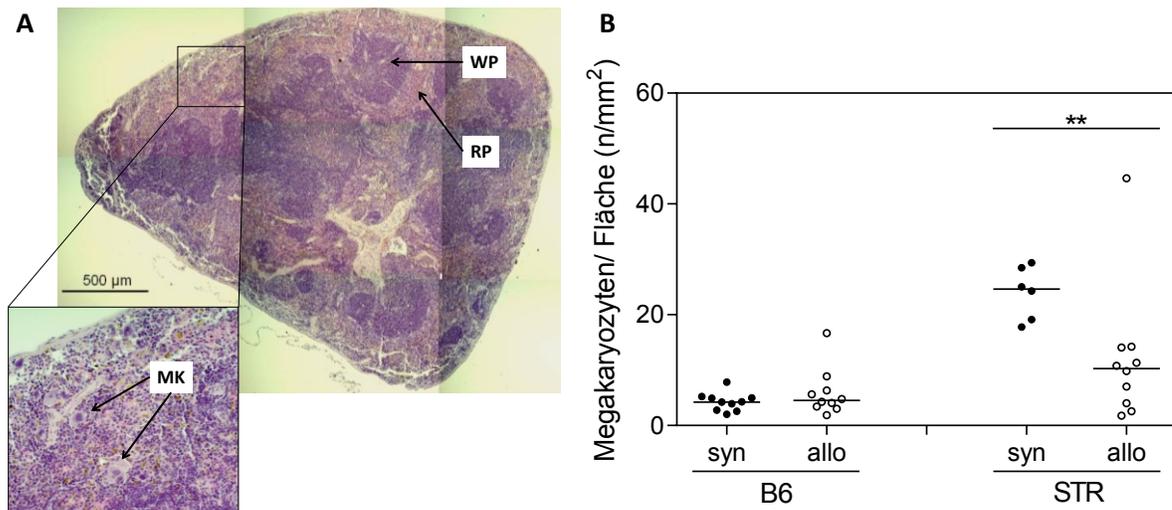
Bei den C57BL/6J-Weibchen liegen die mittlere, prozentualen Milzgewichte bei 0,363 und 0,350 % (syn bzw. allo;  $p=0,6957$ ) und unterscheiden sich damit nicht. Die STR-Tiere, die allogenes Knochenmark transplantiert bekamen, wiesen dagegen mit 0,256 % ein niedrigeres prozentuales Milzgewicht auf, als die Tiere, die syngenes Knochenmark erhalten hatten mit 0,296 % ( $p=0,0395$ ). Wie in Abschnitt 4.4 gesehen, war der trabekuläre Knochen bei den STR/ort-Weibchen mit allogenen Knochenmark sowohl in der Diaphyse, als auch in der distalen Metaphyse im Vergleich deutlich geringer. Das geringere, prozentuale Milzgewicht weist also darauf hin, dass in den STR/ort-Tieren weniger extramedulläre Hämatopoese stattfand, da wieder mehr Knochenmarkraum zur Verfügung stand.



**Abbildung 19: Das Milzgewicht pro Körpergewicht ist bei STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark geringer, als bei Tieren mit syngenen Knochenmark.** Da die Mausstämme sich im Gewicht stark voneinander unterscheiden, wurde das Milzgewicht auf das Körpergewicht (KG) bezogen. Gezeigt sind die Werte für die Weibchen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte. Student's *t*-Test: \*  $p < 0,05$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogen.

Um zu bestätigen, dass bei den STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark weniger extramedulläre Hämatopoese stattfand, wurde zusätzlich zu dem prozentualen Milzgewicht auch noch die Anzahl der Megakaryozyten bestimmt. Dafür wurde ein Teil der Milz fixiert, Dünnschnitte angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Da die Megakaryozyten auf unterschiedlich großen Milzdünnschnitten ausgezählt wurden, wurde die Anzahl auf die ausgezählte Fläche bezogen. Abbildung 20 A zeigt ein repräsentatives Bild einer C57BL/6J-Milz und in einem Ausschnitt zwei Megakaryozyten. Wie auch schon bei dem Gewicht der Milz gab es keine Unterschiede zwischen den C57BL/6J-Gruppen mit syngenen oder allogenen Knochenmark. Bei den STR/ort-Mäusen wurden jedoch bei den Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation weniger Megakaryozyten pro Fläche gezählt als bei den Tieren nach syngener Knochenmarktransplantation. Die Mediane lagen bei 24,63 und 10,29 Megakaryozyten pro  $\text{mm}^2$  (syn bzw. allo;  $p = 0,0075$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den STR-Weibchen, die allogenes Knochenmark erhielten, das Milzgewicht und die Anzahl der Megakaryozyten verringert waren. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der deutlich geringeren Knochenmasse, aufgrund derer es zu einer geringeren Verdrängung des Knochenmarks und somit auch zu weniger extramedullären Hämatopoese kam.



**Abbildung 20:** Die Anzahl der Megakaryozyten pro Milzfläche ist bei STR/ort-Mäusen mit allogem Knochenmark geringer, als bei Tieren mit syngemem Knochenmark. Ein Stück der Milzen wurde fixiert, 5 µm dicke Schnitte angefertigt und HE gefärbt. **A** Repräsentatives Bild einer C57BL/6J-Milz. Deutlich zu unterscheiden sind die lila-farbene „Weiße Pulpa“ (WP) und die hellere „Rote Pulpa“ (RP). In dem Ausschnitt links unten sind zwei Megakaryozyten (MK) zu erkennen. **B** Die Megakaryozyten wurden auf die ausgezählte Fläche bezogen, da die Fläche stark zwischen den Stämmen und den Individuen variierte. Gezeigt sind die Werte für die Weibchen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mediane. Mann-Whitney-Test: \*\*  $p < 0,01$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngem; allo: allogem.

#### 4.7 Die Knochenzellen unter allogenen Bedingungen

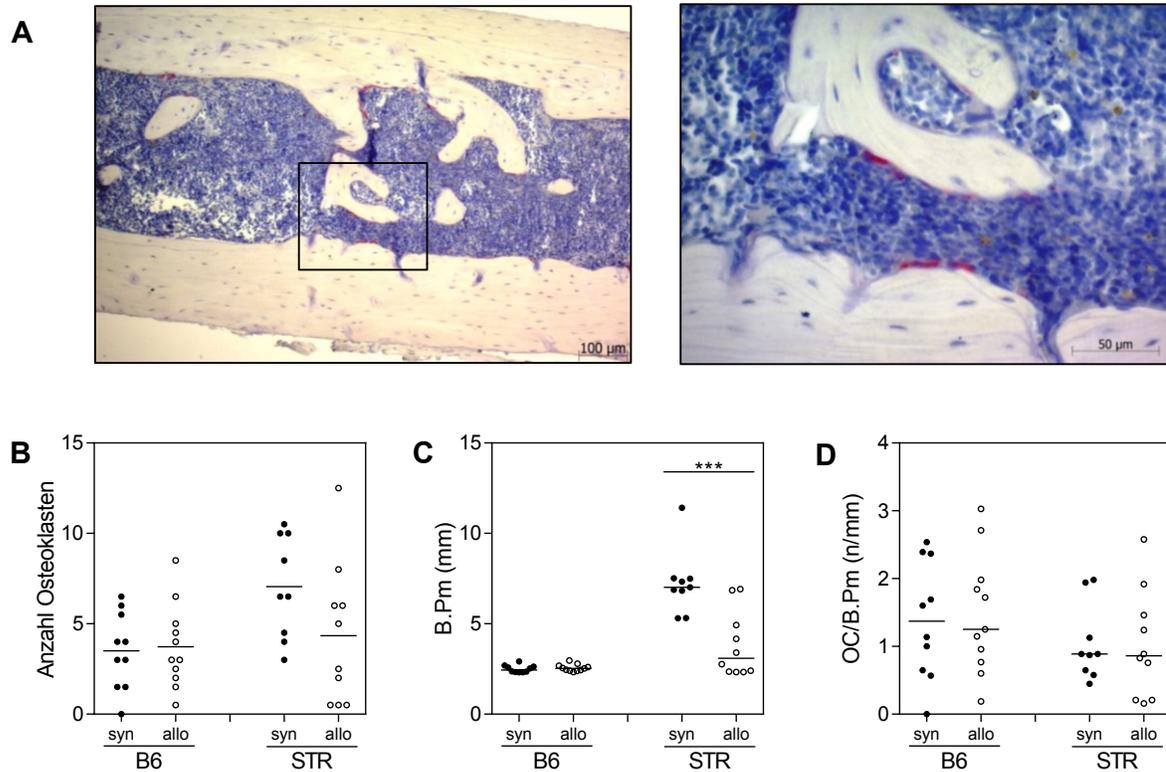
Im Folgenden soll geklärt werden, ob eine Fehlfunktion der Osteoblasten oder Osteoklasten ursächlich für die reduzierte Knochenmasse nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation ist. Es besteht die Möglichkeit, dass die Osteoklasten übermäßig aktiviert sind, oder ihre Anzahl erhöht ist bei vergleichbarer Osteoblastenaktivität. Alternativ ist eine reduzierte Anzahl oder Aktivität der Osteoblasten bei unveränderten Osteoklasten möglich. Da die Osteoklasten häufig die Ursache für die Entstehung von Osteoporosen ist, soll zunächst die Anzahl der Osteoklasten innerhalb der Femora betrachtet werden (Abs. 4.7.1). Anschließend werden zusätzlich Knochenumbaumarker, die spezifisch für Osteoklasten bzw. Osteoblasten sind, im Plasma der Tiere untersucht (Abs. 4.7.2)

#### **4.7.1 Dichte der Osteoklasten in der mittleren Diaphyse der Femora**

Mit Hilfe von Dünnschnitten der Femora und einer Osteoklasten-spezifischen TRAcP-Färbung wurde überprüft, ob die Anzahl dieser knochenabbauenden Zellen in den Knochen der Tiere nach allogener Knochenmarktransplantation erhöht war. Erneut wurden nur die weiblichen Tiere untersucht, da die Unterschiede im trabekulären Knochen zwischen den allogenen und syngen behandelten Gruppen innerhalb der Weibchen am höchsten war.

In Abbildung 17 A ist das Beispielbild eines Knochens zu sehen, bei dem die Osteoklasten deutlich als magentafarbene Zellen an der Oberfläche der Knochen zu erkennen sind. Innerhalb einer Aufnahme, wie in Abbildung 21 A links zu sehen, wurde die gesamte Länge der Knochenoberfläche (B.Pm), die Anzahl der Osteoklasten, sowie der daraus resultierenden Osteoklastendichte (OC/B.Pm) bestimmt. Dies wurde von je zwei Schnitten eines jeden Knochens durchgeführt.

Betrachtet man in Abbildung 21 B die Werte der C57BL/6J-Weibchen, ist die reine Anzahl der Osteoklasten mit im Mittel 3,5 bzw. 3,7 (syn bzw. allo;  $p=0,818$ ) vergleichbar und somit unabhängig von der Quelle des Knochenmarks. STR/ort-Mäuse, die allogenes Knochenmark bekamen, haben mit 4,4 Osteoklasten dagegen weniger als die STR/ort-Mäuse, die syngenes Knochenmark erhalten hatten (7,1 Osteoklasten). Dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ( $p=0,1068$ ). Da die Anzahl der Osteoklasten pro Ausschnitt stark variierte, war es notwendig, zusätzlich noch die zur Verfügung stehende Knochenoberfläche einzubeziehen (Abb. 21 C). Ähnlich wie auch schon bei den  $\mu$ CT-Messungen in der Diaphyse, war die Knochenoberfläche bei den STR/ort-Weibchen mit allogenen signifikant geringer als bei denen mit syngenen Knochenmark. Die medianen Werte lagen bei 7,02 mm und 3,09 mm (syn bzw. allo;  $p=0,0010$ ). Bei den C57BL/6J-Weibchen gab es dagegen mit 2,45 mm und 2,53 mm (syn bzw. allo;  $p=0,3768$ ) keinen signifikanten Unterschied in der Knochenoberfläche. Betrachtet man nun die Osteoklastendichte (Abb. 21 D), zeigt sich, dass weder bei den C57BL/6J-Weibchen, noch bei den STR/ort-Weibchen ein Unterschied zwischen den Tieren mit syngener oder allogener Knochenmarktransplantation zu beobachten war. Bei C57BL/6J wurden 1,37 bzw. 1,25 OC/B.Pm (syn bzw. allo;  $p=0,7564$ ) und bei STR/ort 0,89 bzw. 0,89 OC/B.Pm (syn bzw. allo;  $p=0,7620$ ) ermittelt. Allogenes Knochenmark hat also keinen Einfluss die Osteoklastendichte.



**Abbildung 21: Allogenes Knochenmark hat keinen Einfluss auf die Osteoklastendichte.** **A** TRAcP-Färbung einem Dünnschnitt des Femurs zeigt die Osteoklasten als deutliche, Magenta-farbene Zellen. Rechts: 10-fache Vergrößerung; links: 20-fache Vergrößerung **B** Anzahl der Osteoklasten. **C** Knochenoberfläche in mm. **D** Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche. Pro Maus wurden zwei Schnitte ausgewertet und pro Schnitt ein Bild (10-fache Vergrößerung). Gezeigt sind die Werte für die Weibchen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte in **B** und Mediane in **C** und **D**. **B**: Student's *t*-Test; **C** und **D**: Mann-Whitney-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngen; allo: allogen.

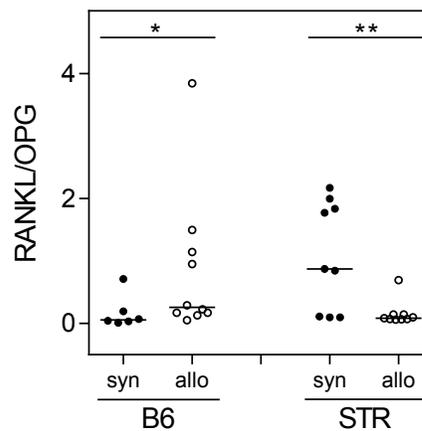
#### 4.7.2 Knochenumbaumarker

Da sich die Osteoklastendichte zwischen den Tieren, die syngenes bzw. allogenes Knochenmark transplantiert bekamen, nicht signifikant unterschied, stellt sich die Frage, ob die Osteoklasten dennoch unterschiedlich aktiviert wurden. Dafür wurde das Plasma der Tiere auf die Knochenumbaumarker RANKL und OPG untersucht, die das Wachstum, Proliferation und Resorptionsfunktion der Osteoklasten regulieren. Zusätzlich wurde der Umbaumarker PINP untersucht, der die Aktivität der Osteoblasten kennzeichnet.

#### 4.7.2.1 RANKL/OPG-Verhältnis

Die Konzentrationen von RANKL und OPG wurden per ELISA im Plasma gemessen. RANKL fördert die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten, während OPG als löslicher Rezeptor RANKL wegfangen und damit diese Prozesse verhindern kann. Daher ist vor allem der Quotient RANKL/OPG entscheidend für die Regulation der Osteoklasten.

Erneut wurde das RANKL/OPG-Verhältnis nur im Plasma von weiblichen Tieren untersucht. Abbildung 22 zeigt, dass es sowohl zwischen den beiden C57BL/6J-Gruppen, als auch zwischen den STR/ort-Gruppen signifikante Unterschiede gibt. Während der RANKL/OPG-Quotient in den C57BL/6J-Mäusen, die STR/ort-Knochenmark bekommen hatten, signifikant höher war ( $p=0,0420$ ), war er bei den STR-Weibchen mit Knochenmark aus C57BL/6J-Mäusen signifikant niedriger ( $p=0,0040$ ). Die Stammzugehörigkeit des transplantierten Knochenmarks hat also einen Einfluss auf das RANKL/OPG-Verhältnis, zeigt jedoch keine Abweichung, die den allogenen Bedingungen zuzuschreiben ist.



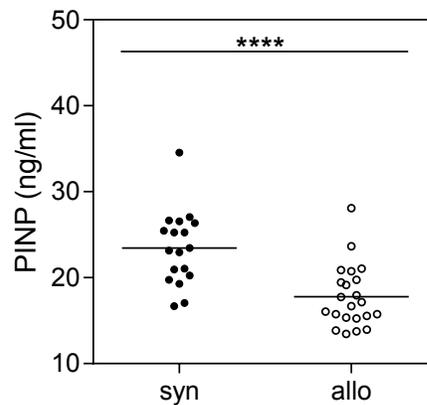
**Abbildung 22: Der Ursprung des transplantierten Knochenmarks hat einen Einfluss auf das RANKL/OPG-Verhältnis.** Die Konzentrationen der Marker wurden per ELISA im Plasma weiblicher Tiere gemessen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mediane. Mann-Whitney-Test: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ . B6: C57BL/6J; STR: STR/ort; syn: syngene; allo: allogene.

#### 4.7.2.2 PINP

Weder die Osteoklastendichte noch die Aktivierung durch das RANKL/OPG-Verhältnis zeigten Veränderungen, die mit den allogenen Konditionen in Zusammenhang standen. Daher rückten die Osteoblasten als knochenaufbauenden Zellen in den Fokus und die Konzentration von

PINP, das als Aktivitätsmarker der Osteoblasten gilt, wurde im Plasma der männlichen und weiblichen STR-Mäuse untersucht und zusammengefasst, da die syngenen und die allogenen Gruppen vergleichbare Werte zeigten.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, konnte in Tieren, die allogenes Knochenmark transplantiert bekamen, eine signifikant niedrigere PINP-Konzentration gemessen werden ( $p < 0,0001$ ). Im Mittel lag die PINP-Konzentration bei Tieren mit syngenen Knochenmark bei 23,43 ng/ml und bei Tieren mit allogenen Knochenmark bei 17,78 ng/ml. Dies deutet darauf hin, dass in Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation die Osteoblasten weniger aktiv sind als in Tieren nach einer syngenen Knochenmarktransplantation.



**Abbildung 23: Die PINP-Konzentration ist bei STR-Tieren mit allogenen Knochenmark niedriger als bei Tieren mit syngenen Knochenmark.** Die Konzentrationen wurden per ELISA im Plasma der männlichen und weiblichen STR/ort-Tiere gemessen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die horizontalen Linien markieren die Mittelwerte. Student's *t*-Test: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Syn: syngen; allo: allogene.

---

#### 4.8 Einfluss von allogenem Knochenmark auf die Osteoarthrose in männlichen STR/ort-Mäusen

Eine Besonderheit des STR/ort-Stammes ist, dass die Männchen spontan eine Kniearthrose (OA) entwickeln, die vor allem im medialen Gelenkkompartiment ausgeprägt ist. Im Alter von 9 Monaten sind bereits 85 % der Männchen von diesen degenerativen Gelenksveränderungen betroffen. Auch wenn mit der Transplantation von Knochenmark kaum mesenchymale Stammzellen und somit auch nur wenige potenziellen Vorläufer für Knorpelzellen transferiert werden, sollte geklärt werden, ob allogene Knochenmarkszellen einen Einfluss auf Entwicklung und Verlauf der Osteoarthrose in den STR/ort-Männchen haben. Dazu wurden Dünnschnitte der entkalkten, linken Knie der C57BL/6J- sowie der STR/ort-Männchen angefertigt und mit Safranin-O und Fast Green gefärbt. Bei dieser Färbung werden die Glykosaminoglykane des Knorpels rot gefärbt und Zytoplasma grün. Da es zu Beginn der Arthrose zu einem Verlust dieser Glykosaminoglykane kommt, kann anhand schwächer gefärbter Bereiche bereits das Frühstadium der OA detektiert werden.

Abbildung 24 A zeigt ein Schnittbild eines STR/ort-Knies, in dem die vier Gelenkflächen, die bewertet wurden, markiert sind. Allgemein unterscheidet man zwischen der medialen und lateralen Femurkondyle bzw. dem medialen und lateralen Tibiaplateau. Da diese Bereiche bei C57BL/6J- und STR/ort-Mäusen in unterschiedlichen Maße betroffen sind, werden diese Bereiche auch einzeln betrachtet (Abb. 24 B bis E). In Abbildung 24 B und D ist zu erkennen, dass der OA-Score für die mediale Femurkondyle bzw. dem medialen Tibiaplateau zwar bei den STR/ort-Männchen höher ist als bei den C57BL/6J-Männchen, dass aber keine Unterschiede zwischen den Tieren mit syngenen und allogenen Knochenmark bestehen. Auch auf der lateralen Seite machte es weder bei den C57BL/6J-Männchen noch bei den STR/ort-Männchen einen Unterschied, ob das Knochenmark syngenen oder allogenen Ursprungs war. Ein Transfer von allogenen Knochenmark hat also keinen Einfluss auf die Entstehung bzw. die Ausprägung der Osteoarthrose bei der STR/ort-Maus.



## **5. Diskussion**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die geringere Knochenmasse in Tieren nach einer allogenen Knochenmarktransplantation bedingt unabhängig von der Konditionierung, einer der GvHD folgenden systemischen Inflammation, der Gabe von Immunsuppressiva, dem Geschlecht oder dem zugrundeliegenden Knochenphänotyp ist. Während die Osteoklastendichte in Femur sowie die Aktivierungsmarker der Osteoklasten zwischen Tieren nach einer allogenen und einer syngenen Knochenmarktransplantation vergleichbar waren, war der Plasmaspiegel von PINP, einem Aktivitätsmarker der Osteoblasten, in Tieren mit allogenen Knochenmark deutlich verringert. Diese Erkenntnisse werden im Folgenden detailliert diskutiert.

### **5.1 Die Transplantation von allogenen Knochenmark war erfolgreich**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf mehreren Wegen gezeigt, dass die Transplantation und das Anwachsen der allogenen Knochenmarkszellen erfolgreich waren. Mit Hilfe einer Analyse des Mikrosatelliten D9Mit129 wurde für jedes Tier nachgewiesen, ob die Blutzellen genetisch zum Spender- oder Empfänger-Mausstamm gehörten. Somit konnte für die Tiere der allogenen Gruppen bestätigt werden, dass das Knochenmark als blutbildendes Organ tatsächlich fremden Ursprungs war. Die Mikrosatellitenanalyse wird auch bei HSCT-Patienten angewendet, um zu überprüfen, wie weit die fremden Zellen in einem Patienten nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation angewachsen sind, und gilt als sehr sensitive Methode (Khan et al. 2004). Leonard et al. nutzen 2015 gezielt Mäuse mit unterschiedlichen MHC-Haplotypen, um per Durchflusszytometrie nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ eine Aussage über die Übertragung von fremden Knochenmarkszellen zu treffen. Ein Vorteil ist, dass der Nachweis per Durchflusszytometrie schnell durchzuführen und leicht umzusetzen ist und ein genaues Bild liefert, wie viel Prozent der Knochenmarkszellen tatsächlich fremden Ursprungs sind. Zudem kann in Kombination mit weiteren Markern bereits eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein bestimmter Zelltyp nicht übertragen wurde oder nicht angewachsen ist und somit noch vom Empfänger stammt. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch, dass durch die unterschiedlichen MHC-Haplotypen eine Abstoßungsreaktion nicht

ausgeschlossen werden kann. Dies stellt einen Faktor unbestimmter Größe dar, der das Ergebnis der Experimente maßgeblich beeinflussen kann. Auch wenn die Mikrosatellitenanalyse sich nur zur qualitativen und weniger zur quantitativen Analyse eignet, bietet sie in meinem Modell dennoch die Möglichkeit die zwei Mausstämme aufgrund von genetischen Merkmalen zu unterscheiden und mögliche Komplikationen aufgrund von unterschiedlichen MHC-Haplotypen zu umgehen.

Neben dieser geplanten Kontrolle zeigten sich auch beim RANKL/OPG-Verhältnis, dem CD4/CD8-Verhältnis, der CD3-positiven Milzzellen, sowie bei der IL-1a-Konzentration im Plasma spenderstammsspezifische Unterschiede. Auch wenn das Ergebnis des spenderstammsspezifischen RANKL/OPG-Verhältnisses zunächst unerwartet war (Abs. 5.4.1), so bestätigt es doch auf der Ebene des Phänotyps die erfolgreiche Transplantation von allogenen Knochenmark.

## **5.2 Die Transplantation von allogenen Knochenmark, nicht aber die gewählte Konditionierung, bewirkt eine Reduktion der Knochenmasse in allen untersuchten Gruppen**

Um den Einfluss der Konditionierung auf den Knochen, hier in Form einer Ganzkörperbestrahlung, zu untersuchen, wurden Tiere nach syngener Knochenmarktransplantation mit gleichaltrigen, ungehandelten Tieren verglichen. Lediglich bei den Tieren des C57BL/6J-Stammes konnten signifikante Unterschiede detektiert werden, die jedoch bei Weibchen und Männchen unterschiedlich gerichtet waren. Während in den C57BL/6J-Weibchen eine geringere Knochenmasse in der distalen Metaphyse in Tieren nach syngener Knochenmarktransplantation gemessen wurde, war sie bei den Männchen in der mittleren Diaphyse erhöht. Interessanterweise betrachten wir in der distalen Metaphyse den trabekulären Knochen und in der mittleren Diaphyse den kortikalen Knochen und somit zwei unterschiedliche Arten des Knochens. Innerhalb der C57BL/6J-Mäuse scheint die Bestrahlung entsprechend in Männchen und Weibchen Auswirkung auf jeweils unterschiedliche Knochenkompartimente zu haben, aber insgesamt keinen einheitlichen Effekt auf alle untersuchten Gruppen.

Es ist bekannt, dass sich Bestrahlung, wie sie häufig für die Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt wird, negativ auf die Knochenmikrostruktur auswirken und eine gesteigerte Anzahl von Adipozyten im Knochenmark hervorrufen kann (Green & Rubin 2014). *In vitro*-Experimente mit Zellkulturen haben gezeigt, dass ionisierende Strahlung Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen schädigen kann, indem sie die Proliferation und die Differenzierung reduziert (He et al. 2011, Cruet-Hennequart et al. 2015). Bei Patienten konnte dieser Effekt allerdings lediglich bei lokaler Bestrahlung einiger Bereiche wie dem Becken oder den Rippen beobachtet werden (Bartl 2014f). Für eine Ganzkörperbestrahlung wurde die schädigende Wirkung auf Osteoblasten noch nicht nachgewiesen. Außerdem war die Beobachtung Resultat einer Bestrahlungstherapie ohne Rekonsitution und die genauen Ursachen sind noch nicht weiter aufgeklärt. Mit Hilfe der Rekonstitution mit syngenen Knochenmark konnte ich einen Knochenmasseverlust in STR/ort-Tieren allerdings verhindern. Dass in den C57BL/6J-Mäusen dennoch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Tieren mit syngener Knochenmarktransplantation zu beobachten war, könnte an der unterschiedlichen Sensitivität verschiedener Mausstämmen gegenüber Strahlung liegen (Duran-Struuck & Dysko 2009; Iwakawa et al. 2003). Der C57BL/6J-Stamm gilt als besonders strahlungsresistent und toleriert hohe Strahlendosen. Vorstellbar wäre jedoch, dass die STR/ort-Mäuse noch strahlungstoleranter sind und daher bei der gewählten Konditionierung kein Effekt auf den Knochen zu beobachten ist. Zudem ist der C57BL/6J-Stamm im Vergleich zu den STR/ort-Mäusen osteopen mit einem niedrigeren Basallevel an Knochenmasse. Dadurch verfügt er über mehr Knochenmark sowie mehr Knochenmarkzellen, wodurch die Weiterleitung einer systemischen Reaktion auf die Bestrahlung begünstigt sein könnte. Die unterschiedliche Reaktion der weiblichen und männlichen C57BL/6J-Tiere auf die Konditionierung kann auf den Sexualhormonen basieren, denn sowohl Östrogene als auch Androgene können spezifische Effekte auf den Knochen haben und Knochenmasse und -Mikrostruktur beeinflussen (Manolagas et al. 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit die Sexualhormone jedoch nicht gemessen wurden, kann über ihre Auswirkung auf den Knochen nach Bestrahlung an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Nach der Transplantation von allogenen Knochenmark scheinen die Sexualhormone dagegen keinen Effekt, welcher mit der reinen  $\mu$ CT-Analyse sichtbar wäre, auf die Knochenmasse zu haben: bei beiden Geschlechtern der untersuchten Stämmen wurde eine signifikant geringere, trabekuläre Knochenmasse in Tieren

nach allogener Knochenmarktransplantation gemessen. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass der zugrundeliegende Knochenphänotyp die Reduktion der Knochenmasse nicht verhindert. Sowohl in den osteopenen C57BL/6J- als auch in den hyperostotischen STR/ort-Mäusen konnte eine reduzierte trabekuläre Knochenmasse in Tieren mit allogenen Knochenmark im Vergleich zu den Tieren mit syngenen Knochenmark gemessen werden. Nicht nur die Knochenmasse, die sich auch in der verringerten Trabekelzahl widerspiegelt, ist reduziert und verschiebt den Knochen in Richtung osteopenen Phänotyp, sondern auch der erhöhte SMI-Wert der STR/ort-Tiere weist auf diese Veränderung hin.

Eine für zukünftige Untersuchungen interessante Frage wäre, ob bzw. inwiefern sich auch die mechanischen Eigenschaften der Knochen unterscheiden. Ein 3-Punkt- oder 4-Punkt-Biegetest könnte Aufschluss über die Biegesteifigkeit geben. Allerdings sollte dann auch der Mineralisationsgrad des Knochens untersucht werden, da er zu einem entscheidenden Teil zur Brüchigkeit und damit dem Biegeverhalten beiträgt (Turner 2006). Da in der vorliegenden Arbeit die Femora für die  $\mu$ CT-Analyse und für die histologische Untersuchung gebraucht wurden, konnten diese Tests nicht zusätzlich durchgeführt werden. Dennoch stellt die Messung der Biegefestigkeit einen Aspekt dar, der für die Risikoabschätzung von Frakturen von allogenen HSCT-Patienten sehr hilfreich sein könnte.

### **5.3 GvHD kann als Ursache für die geringere Knochenmasse in Tieren mit allogenen Knochenmark ausgeschlossen werden**

Während die C57BL/6J-Mäuse unter physiologischen Bedingungen eine geringe Knochenmasse haben, gelten die STR/ort-Mäuse als hyperostotisch (Pasold et al. 2012a). Trotz gegensätzlichem Knochenphänotyps besitzen die beiden Stämme den gleichen MHC-Haplotypen (H-2b). Daher wurde komplett auf immunsuppressive Medikamente nach der Transplantation von allogenen Knochenmark verzichtet. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass vor allem Patienten nach einer allogenen Knochenmarktransplantation häufig unter Osteoporose als Spätfolge leiden. Dies ist jedoch meist mit der Gabe von immunsuppressiven Medikamenten wie Steroiden assoziiert, die verabreicht werden um die Entwicklung einer GvHD zu hindern (McClune & Majhail 2013). Bei der GvHD richten sich die fremden Immunzellen, die bei der Knochenmarktransplantation übertragen werden, gegen den

Empfänger (Ferrara et al. 2009). Es ist hinreichend bekannt, dass Steroide wie z.B. Glukokortikoide einen hemmenden Einfluss auf Osteoblasten und Osteozyten haben, Osteoklasten zudem aktivieren und so zu einer Reduktion der Knochenmasse führen (Briot & Roux 2015). Da der MHC-Haplotyp bei den beiden untersuchten Mausstämmen bekannt war und übereinstimmte, war eine Gabe solcher Medikamente jedoch nicht notwendig. Dennoch bestand die Möglichkeit, dass sich die Stämme maßgeblich in den Minor-Histokompatibilitätsantigenen unterschieden und es dadurch zu Abstoßungsreaktionen kommen konnte. Dagegen sprechen allerdings die hohe Überlebensrate der Tiere sowie die Tatsache, dass keine GvHD-typischen äußeren Zeichen wie Buckelhaltung, Haarausfall, Hautläsionen oder Geschwürbildung bei den Tieren beobachtet werden konnten. Diese Symptome treten normalerweise innerhalb weniger Tage zum Vorschein. Zudem führt eine schwere GvHD recht schnell zum Tod der Tiere (Sadeghi et al. 2008).

Auch wenn die Überlebensrate, die physische Entwicklung und der äußere Gesundheitscheck eine GvHD unwahrscheinlich machten, bestand dennoch die Möglichkeit einer systemischen Inflammation. Da Entzündungsreaktionen einen Einfluss auf Osteoklasten und damit eine Reduktion des Knochens hervorrufen können (Lacativa & Farias 2010), wurde das Plasma der Tiere auf 13 verschiedene pro- und antiinflammatorische Zytokine und die Milz auf eine veränderte Anzahl von verschiedenen Immunzellen sowie untersucht. Im Folgenden soll zunächst auf die Messung der pro- und antiinflammatorische Zytokine im Plasma diskutiert und anschließend auf die Veränderung der Immunzellen eingegangen werden.

### **5.3.1 Die Plasmakonzentrationen der untersuchten Zytokine zeigten keine Änderungen, die mit dem allogenen Knochenmark assoziiert waren**

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokinen ist bekannt, dass sich IL-1, IL-6, IL-17A, MCP-1 und TNF- $\alpha$  direkt oder indirekt positiv auf die Differenzierung von Osteoklasten auswirken, während IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-27, TNF und GM-CSF einen negativen Einfluss haben (Kamiya et al. 2007; Schett 2011; Morrison et al. 2014). Bei keinem der 13 untersuchten inflammatorischen Zytokine konnte jedoch eine Konzentrationsänderung detektiert werden, die mit der Transplantation von allogenen Knochenmark korrelierte. Bei IL-1 $\alpha$  und IL-10 wurden dagegen spenderspezifische Veränderungen beobachtet, die aber nicht bei allen

Gruppen signifikant waren. IL-1a wird u.a. von Monozyten und aktivierten Makrophagen produziert, und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems, indem es eine Erhöhung der Neutrophilenzahl im Blut bewirkt, die Proliferation von Lymphozyten aktiviert und Fieber induziert (Rider et al. 2013). In Bezug auf den Knochen ist IL-1 *in vivo* in der Lage die Proliferation und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu erhöhen, die Knochenresorption durch Osteoklasten zu stimulieren sowie deren Apoptose zu inhibieren (Compston 2001). Primär agiert es aber vor allem wenn akut  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt und aus dem Knochen freigesetzt werden muss (Deng et al. 2012). IL-10 dagegen wirkt anti-inflammatorisch und wird u.a. von Makrophagen sowie einigen speziellen Subpopulationen von B- und T-Lymphozyten produziert (Trifunović et al. 2015). Den Knochen betreffend konnte gezeigt werden, dass IL-10 *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Osteoklastenentwicklung hat (Hong et al. 2000) und für Osteoblastendifferenzierung förderlich sein kann (Dresner-Pollak et al. 2004). Da aber auch die Anteile der CD11b-positiven Zellen spenderstammspezifisch verändert waren, besteht die Möglichkeit, dass die veränderten IL-1 $\alpha$ - und IL-10-Konzentrationen auf die verschobenen Anteile der CD11b-positiven Zellen zurückzuführen ist.

Insgesamt zeigte keines der untersuchten Zytokine eine Veränderung, die im Zusammenhang mit den allogenen Konditionen gebracht werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass zum Untersuchungszeitpunkt in den Tieren mit allogenen Knochenmark keine entzündlichen Reaktionen stattgefunden haben und die Ursache für die Beobachtungen im Knochen an einer anderen Stelle gesucht werden muss. Allerdings haben sich bei der Auswertung der Daten einige Schwierigkeiten ergeben, die die Interpretation der Daten im Gesamten erschweren. Bei den Messungen von IL-23, IL-27 und IFN- $\beta$  gab es große Unterschiede zwischen der Assay-Sensitivität, die im Kit angegeben wurde und dem tatsächlich gemessenen unteren Detektionslimit. Zudem lagen die Zytokinkonzentrationen vieler Proben außerhalb des Messbereichs, sodass keine genauen Konzentrationsangaben für diese Proben gemacht werden konnten. Beides deutet darauf hin, dass es ein Problem beim Erstellen der Standardkurven gab. Dies könnte auch erklären, warum sich bei manchen Zytokinen die Konzentrationen der Kontrolltiere mit syngenen Knochenmark so sehr von den Referenzwerten unterschieden, die vom Kit-Hersteller als Richtwert angegeben wurden. Eine andere Möglichkeit wäre auch, dass manche Zytokine schneller zerfallen als andere und sich daher nach längerer Lagerung nicht mehr korrekt nachweisen lassen.

Auch wenn das Prinzip der Bead-basierten Multiplexanalyse im Durchflusszytometer eine geeignete Methode darstellt, um in kurzer Zeit und mit verhältnismäßig wenig Aufwand die Proben auf viele Zytokine zu untersuchen, erschwerten die zuvor genannten Punkte, die bei der Interpretation berücksichtigt werden sollten, die Auswertung der Daten. Zusammenfassend ist das Ergebnis der IL-1 $\alpha$ -Messung wohl das Verlässlichste, da alle Proben über dem unteren Detektionslimit lagen und die Werte der C57BL/6J-Tiere mit syngenen Knochenmark vergleichbar zu den Angaben des Kits waren. Die anderen Ergebnisse sollten eher mit Vorsicht interpretiert werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Tiere über einen Zeitraum von über einem Jahr in die Versuche auf- und entnommen wurden, erfolgte die gleichzeitige Messung der Plasmaproben nach unterschiedlich langer Lagerungszeit. Für zukünftige Versuchsreihen dieser Art sollte noch besser geplant werden, was in welcher Form untersucht werden soll um die Proben möglichst zeitnah zu vermessen.

### **5.3.2 Die Anteile der Immunzellen der Milz sind spenderstammspezifisch**

Eine Besonderheit der STR/ort-Mäuse ist ihre veränderte Zusammensetzung der Immunzellen in der Milz. Aufgrund der hohen Knochenmasse kommt es bei den Tieren zu einer Verdrängung des Knochenmarks und damit zu einer extramedullären Hämatopoese, bei der die Bildung der Blutzellen in die Milz verlagert wird (Pasold et al. 2012a; Uchida et al. 2013). Dies äußert sich neben der Vergrößerung der Milz auch in einer höheren Anzahl an Megakaryozyten. Im Vergleich zu den C57BL/6J-Mäusen haben sie insgesamt weniger Milzzellen und u.a. einen höheren Anteil an CD11b-positiven Zellen sowie ein höheres CD4/CD8-Verhältnis (Uchida et al. 2013).

Sowohl bei den Zellen der myeloiden als auch bei denen der lymphoiden Reihe konnten nach Knochenmarktransplantation spenderstammspezifische Veränderungen in den Anteilen oder Gesamtzellzahlen beobachtet werden. Am deutlichsten zeigte sich dies bei dem CD4/CD8-Verhältnis. Spenderstammspezifische Veränderungen beobachteten 1998 auch schon Sim et al., als sie verschiedene Mausstämme für allogene Knochenmarktransplantationen nutzten und anschließend die Zusammensetzung der Immunzellen in den Lymphknoten der Tiere analysierten. Sie verwendeten Stämme mit unterschiedlichen CD4/CD8-Verhältnissen und Allelen von Thy1 (Thy1.1 und Thy1.2) und setzten dabei ein oder zwei Stämme in Kombination

miteinander als Spender ein. Sie beobachteten, dass das CD4/CD8-Verhältnis in den Lymphknoten der Empfänger nach der Transplantation dem Verhältnis des Spenders entsprach. Bei der gleichzeitigen Transplantation von Knochenmark aus zwei verschiedenen Spendern konnten sie zudem innerhalb der jeweiligen Thy1-Populationen die der Spender entsprechende CD4/CD8-Verhältnisse nachweisen. Sie bewiesen damit, dass die Verhältnisse der Subpopulationen durch genetische Einflüsse der hämatopoetischen Zelllinie reguliert werden und stammesspezifische Variationen übertragen werden können. Weiterhin zeigten 2008 jeweils Petkova et al. sowie Pinchuk & Filipov, dass sich diese stammsspezifischen Unterschiede auch im peripheren Blut bzw. der Milz nach einer Knochenmarktransplantation nachweisen lassen. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit demnach bestätigt werden.

Allgemein wurden die Veränderungen der Immunzellen nach der Transplantation von allogenem im Vergleich zu syngenen Knochenmark jedoch kaum untersucht. Die meisten Arbeiten wurden im Zusammenhang mit der Entwicklung und Ausprägung der GvHD durchgeführt. So wurde bereits mehrfach gezeigt, dass beispielsweise das CD4/CD8-Verhältnis nicht mit dem Auftreten der GvHD korreliert (Sviland et al. 1991; Fujimaki et al. 2001). Die vorliegende Arbeit gibt somit einen ersten Hinweis, dass die niedrigere Knochenmasse nach der Transplantation von allogenem Knochenmark nicht in Zusammenhang mit einer veränderten Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen stehen muss.

## **5.4 Eine Fehlfunktion der Osteoblasten und nicht der Osteoklasten ist ursächlich für die reduzierte Knochenmasse nach einer allogenen HSCT**

### **5.4.1 Osteoklasten zeigen in Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation keine Veränderung**

Osteoklasten sind hämatopoetischen Ursprungs, womit auch ihre Vorläuferzellen während einer Knochenmarktransplantation transferiert werden. Eine verstärkte Aktivierung in einem fremden Umfeld wäre also durchaus vorstellbar. Dennoch wichen weder die Osteoklastendichte noch das für die Aktivität der Osteoklasten relevante RANKL/OPG-Verhältnis einheitlich in Tieren mit allogenem Knochenmark von den Tieren, denen syngenes Knochenmark transplantiert wurde, ab.

Um die Osteoklastendichte zu bestimmen, wurden die Osteoklasten histologisch in den Femora weiblicher Tiere nachgewiesen, gezählt und auf den Knochenperimeter bezogen. Um möglichst vergleichbare Stellen auszuwerten, wurde ein Bereich in der mittleren Diaphyse ausgewählt. Für ein noch präziseres Ergebnis sollte in Zukunft allerdings ein Bereich in der distalen Metaphyse gewählt werden, da die Untersuchung im  $\mu$ CT vor allem dort geringere trabekuläre Strukturen in Tieren mit allogenen Knochenmark aufgezeigt hatte. Dennoch sind die Ergebnisse als valide anzusehen, da in STR/ort-Mäusen in der distalen Metaphyse und der mittleren Diaphyse der gleiche Effekt beobachtet werden konnte: eine verminderte trabekuläre Knochenmasse in Tieren mit allogenen Knochenmark im Vergleich zu Tieren mit syngenen Knochenmark. Aufgrund des hyperostotischen Knochenphänotyps des STR/ort-Stammes bildet sich der trabekuläre Knochen bis in die Diaphyse aus. Dies konnte in Tieren nach der Transplantation syngener Knochenmarkzellen sowohl im  $\mu$ CT als auch im Rahmen der histologischen Untersuchung bestätigt werden. Nach der Transplantation allogener Knochenmarkzellen war der trabekuläre Knochen in der Diaphyse, vergleichbar wie in der distalen Metaphyse, dagegen deutlich reduziert, was ebenfalls über die  $\mu$ CT-Analyse und die histologische Untersuchung gezeigt wurde.

Dennoch bestand die Möglichkeit, dass die Osteoklasten bei vergleichbarer Anzahl in Tieren mit allogenen Knochenmark stärker aktiviert waren. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde das RANKL/OPG-Verhältnis im Plasma der Tiere untersucht. RANKL wird primär von Zellen der Osteoblastenlinie produziert und sezerniert und bewirkt über den Rezeptor RANK eine Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen. OPG, das ebenfalls hauptsächlich von Zellen der Osteoblastenlinie produziert und sezerniert wird, ist ein löslicher Rezeptor von RANKL, der eine Bindung von RANKL mit RANK verhindert und somit die Aktivierung von Osteoklasten hemmt. Allgemein wird ein höheres RANKL/OPG-Verhältnis als Zeichen für eine Aktivierung der Osteoklasten angesehen (Kearns et al. 2007). In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der Knochenmarktransplantation bemerkenswert. Auch wenn signifikante Unterschiede im RANKL/OPG-Verhältnisses zwischen den Gruppen mit syngenen bzw. allogenen Knochenmark beobachtet werden konnten, waren diese Unterschiede bei den C57BL/6J- und STR/ort-Mäusen gegensätzlich gerichtet. Während bei den C57BL/6J-Tieren mit allogenen Knochenmark das RANKL/OPG-Verhältnis höher war, war es bei den STR/ort-Mäusen mit allogenen Knochenmark niedriger. Das legt den Schluss nahe,

dass das Verhältnis ebenfalls abhängig vom Stamm des Spenders ist. Es stellt sich also zum Einen die Frage, ob sich das RANKL/OPG-Verhältnis zwischen allen Mausstämmen so stark unterscheidet und welcher Faktor, der bei einer Knochenmarktransplantation übertragen werden kann, dafür verantwortlich ist.

Bisher gibt es keine Originalarbeiten, die gleichzeitig die basalen RANKL/OPG-Verhältnisse unterschiedlicher Mausstämmen näher untersuchen. Zudem macht es wenig Sinn, die Werte verschiedener Originalarbeiten zu vergleichen, da die Proben oftmals auf unterschiedliche Weise gewonnen, gelagert und untersucht wurden. Dennoch ist es bemerkenswert, dass das Knochenmark der STR/ort-Mäuse mit ihrem hyperostotischen Knochenphänotyp ein höheres RANKL/OPG-Verhältnis verursacht als das der C57BL/6J-Tiere. Gerade unter pathologischen Umständen weist ein erhöhtes RANKL/OPG-Verhältnis auf eine Aktivierung der Osteoklasten und somit eine geringe Knochenmasse hin (Kearns et al. 2007). Die im Plasma der Tiere gemessenen Unterschiede schienen aber keinen Einfluss auf den Knochen zu haben, was den Schluss nahelegt, dass entweder die Unterschiede nicht hoch genug waren, um sich auf die Osteoklasten auszuwirken oder die lokalen RANKL/OPG-Verhältnisse viel entscheidender sind als die systemisch gemessenen. Betrachtet man die potentiellen Quellen von RANKL und OPG ist der zweite Punkt durchaus denkbar. Unter physiologischen Bedingungen sind Zellen der Osteoblastenlinie, zu denen auch die Vorläuferzellen und die im Knochen residierenden Osteozyten gehören, für die RANKL- sowie für die OPG-Produktion verantwortlich (Goldring 2015). Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei entzündlichen Krankheiten wie der Rheumatoiden Arthritis, können auch B- und T-Lymphozyten einen erheblichen Beitrag zur RANKL und OPG-Expression beitragen (Weitzmann 2014). Zudem ist OPG komplett löslich, wohingegen es von RANKL drei verschiedene Formen gibt: neben dem trimeren Transmembranprotein und der verkürzten Ektodomäne, die davon abgespalten wird, gibt es auch noch eine primär sekretierte Form, die z.B. von aktivierten T-Lymphozyten produziert wird (Findlay & Aktins 2011). Zudem konnten Findlay et al. 2008 zeigen, dass der Serumspiegel von RANKL und der mRNA-Level von RANKL im Knochen negativ zueinander korrelierten, was einen weiteren Hinweis gibt, dass es Unterschiede zwischen den systemisch gemessenen Konzentrationen im Serum bzw. Plasma und den lokalen Konzentrationen am Knochen gibt. Für zukünftige Arbeiten ist es entsprechend ratsam, die Expression bzw. direkt die Proteinmenge von RANKL und OPG im Knochen zu messen und zu vergleichen, um eine

genauere Aussage treffen zu können. Dennoch ist es interessant, dass das RANKL/OPG-Verhältnis mit einer Knochenmarktransplantation übertragbar scheint, da die Zellen der Osteoblastenlinie mesenchymalen Ursprungs sind und nur einen geringen Teil des Knochenmarks ausmachen und somit auch kaum übertragen werden (Battiwalla & Hematti 2009). Zudem wurde bereits 2005 von Dickhut et al. gezeigt, dass die mit dem Knochenmark transferierten MSC nicht im Empfänger anwachsen. Es scheint also vielmehr ein spenderspezifischer, regulierender Faktor bzw. eine Zelle zu sein, der bzw. die übertragen wird und verantwortlich für diesen Effekt ist. Die genauen Mechanismen, die hinter dieser Beobachtung stehen, können an dieser Stelle zwar nicht geklärt werden, stellen aber eine interessante Herausforderung für die Zukunft dar.

Neben dem RANKL/OPG-Verhältnis kann in zukünftigen Arbeiten zusätzlich die CTX-I-Konzentration im Serum oder Plasma der Tiere einen Hinweis auf eine veränderte Aktivität der Osteoklasten geben. Allerdings muss bei der CTX-I-Messung beachtet werden, dass es stark schwankende, tageszeitabhängige Unterschiede in den Konzentrationen gibt, dass die Serumkonzentration durch Futteraufnahme reduziert werden kann und dass das Protein im Serum der Tiere bei Raumtemperatur bzw. längerer Lagerung sehr instabil ist (Seibel et al. 2006). Wenn man mehrere Tiere am gleichen Tag aufarbeiten oder alle Proben auf einmal messen muss, kann das die Vergleichbarkeit der Proben erheblich erschweren. Diese Limitationen sind bei RANKL und OPG jedoch nicht gegeben. Für zukünftige Untersuchungen sollte dennoch in Erwägung gezogen werden, auch CTX-I zu messen, da es einen Überblick über die tatsächliche Aktivität der Osteoklasten geben kann.

#### **5.4.2 Die Osteoblastenaktivität ist in Tieren nach allogener Knochenmarktransplantation verringert**

Da mit den genutzten Methoden keine veränderte Dichte oder Aktivierung der Osteoklasten nachgewiesen werden konnte, rückten die Osteoblasten, als knochenaufbauende Zellen in den Vordergrund und die Konzentration von PINP wurde im Plasma gemessen. Zum Zeitpunkt der Messung war kaum noch Plasma von C57BL/6J-Mäusen vorhanden, weshalb ausschließlich das Plasma von männlichen und weiblichen STR/ort-Tieren untersucht wurde. Es zeigte sich, dass die PINP-Konzentrationen in Tieren mit allogener Knochenmark deutlich

geringer waren, als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Da Vergleichswerte der C57BL/6J-Mäuse fehlen, kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier spenderstammspezifische Unterschiede beobachtet wurden. Geht man aber davon aus, dass der Knochenaufbau durch die Osteoblasten unter allogenen Konditionen tatsächlich gestört ist, kann es mehrere Gründe für die geringere Knochenmasse in Tieren mit allogenem Knochenmark geben.

Zum Einen ist es denkbar, dass ein aktivierendes Signal fehlt bzw. ein inhibierendes Signal dauerhaft aktiviert ist und somit eine erfolgreiche Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten verhindert wird. Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und die Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX2 (Runt-related transcription factor 2), DLX5 (distal-less homeobox5) und OSX (Osterix) sind entscheidend für die gesamte Differenzierung zu reifen Osteoblasten (Ducy et al. 1997; Nakashima et al 2002; Holleville et al. 2007). RUNX2 Knockout-Mäuse sterben bereits kurz nach der Geburt und sind komplett frei von Osteoblasten und von Knochen (Otto et al. 1997). OSX Knockout-Mäuse sind nicht in der Lage, im Rahmen der chondralen Ossifikation das vorhandene Knorpelgerüst in Knochen umzuwandeln, was ebenfalls mit der Abwesenheit von Osteoblasten zusammenhängt (Nakashima et al. 2002). Aktiviert wird RUNX2 u.a. durch BMPs (bone morphogenic proteins), TGF $\beta$ , IGF, mechanische Belastung oder auch PTH (Parathormon) (Franceschi & Xiao 2003; Logothetis & Lin 2005), während die OSX-Expression wiederum durch RUNX2 induziert wird. Die Differenzierung der Osteoblasten ist also stark abhängig von der Expression dieser beiden Gene und fehlt die Aktivierung einer dieser Faktoren, kann dies verheerende Folgen haben.

Neben einer verminderten Differenzierung ist es auch möglich, dass ein entscheidender Schritt in der Synthese des Knochens inhibiert wird. Die Osteoblasten sorgen nicht nur für die Produktion von organischer Knochenmatrix sondern auch für die Mineralisierung des Knochens. Für diese Prozesse werden während der Entwicklung der Osteoblasten vor allem die Osteoblastengene für Kollagen-Typ-I, alpha 1, Alkalische Phosphatase, Bone-Sialoprotein und Osteocalcin durch die oben genannten Transkriptionsfaktoren aktiviert. Auch hier würde das Ausbleiben eines Schrittes zur Folge haben, dass letztendlich ein Knochenaufbau verhindert wird. Da RUNX2 etc. vorwiegend von löslichen Signalmolekülen, wie BMP, TGF $\beta$  etc. stimuliert wird und diese über die Mausstämme hinweg konserviert sind, scheint eher eine Ligand-

Rezeptor-Interaktion zwischen Osteoblasten und allogenen Osteoklasten oder einem anderen transferierten Zelltyp gestört zu sein, die eine Osteoblasteninhibition zur Folge hat.

Im Rahmen des Knochen-Remodellings werden zunehmend Osteoklasten-assoziierte Coupling-Faktoren diskutiert, die in der Lage sind Osteoblasten zu aktivieren. Dazu gehören unter anderem EphrinB2 (EFNB2), Sphingosine-1-Phosphate (S1P), Cardiotrophin-1 (CT-1) oder Collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1) (Ryu et al. 2006; Zhao et al. 2006; Walker et al. 2008; Takeshita et al. 2013). Besonders das Zusammenspiel der Ephrine und den entsprechenden Rezeptoren Eph ist aufgrund seiner bidirektionalen Wirkungsweise interessant. So zeigten Zhao et al. 2006, dass die Interaktion von EphrinB2 auf Seiten der Osteoklasten und EphB4 auf Seiten der Osteoblasten einen Einfluss auf die Differenzierung der beiden Zelltypen hat. Dabei stimuliert die Bindung von EphrinB2 an EphB4 die Osteoblastendifferenzierung während es bei Osteoklastenvorläuferzellen eine weitere Differenzierung hemmt. Falls es stammspezifische Unterschiede in diesen beiden Molekülen gibt, könnte eine mangelhafte Bindung zu einer verminderten Osteoblastenaktivierung führen, während der Effekt auf die Osteoklasten ausbleibt. Auch wenn es nicht die Interaktion zwischen EphrinB2 und EphB4 ist, die für die Beobachtungen nach allogener Knochenmarktransplantation verantwortlich sind, ist doch ein vergleichbarer Mechanismus denkbar.

Auch die T-Lymphozyten werden als Regulator der Osteoblasten im Rahmen von einer allogenen HSCT und besonders beim Auftreten der GvHD diskutiert. 2010 zeigten Shono und Kollegen in einer Studie mit einem Mausmodell, das auf unterschiedliche MHC-Haplotypen beruht, dass bereits zu Beginn der GvHD-Entwicklung die Osteoblasten eliminiert werden und dies eine Störung des Knochenmarks mit einer fehlerhaften B-Lymphopoese zur Folge hat. Sie konnten nachweisen, dass diese Beobachtung durch die allogenen T-Lymphozyten des Spenders vermittelt wird und vermutlich auf der Diskrepanz in den MHC-Molekülen zurückzuführen ist. Da in der vorliegenden Arbeit der MHC-Haplotyp H2b identisch ist und anhand der Gewichtsentwicklung und der Überlebensrate eine GvHD ausgeschlossen wurde, scheint eine Beteiligung der T-Lymphozyten bei meiner Beobachtung unwahrscheinlich. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass über die Minor-Histokompatibilitätskomplexe eine vergleichbare Reaktion in abgeschwächter Form abgelaufen und für uns nicht nachweisbar ist.

Neben den Osteoklasten und den T-Lymphozyten werden aktuell auch sogenannte OsteoMacs als zelluläre Faktoren diskutiert, die in der Lage sind, die Osteoblastenfunktionen zu regulieren (Chang et al. 2008, Pettit et al. 2008, Winkler et al. 2010, Winkler et al. 2012). OsteoMacs sind residente Makrophagen, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage sind, die Mineralisierung der Osteoblasten zu fördern. Sie sind ähnlich der „Lining Cells“ an der Knochenoberfläche zu finden und decken den Knochen und die Osteoblasten ab. Pettit et al. vermuten sogar, dass es keinen Unterschied zwischen OsteoMacs und „Lining Cells“ gibt und dies ein und dieselben Zellen sind (Pettit et al. 2008), was allerdings noch nicht vollständig bewiesen wurde. Die größte Bedeutung wurde den OsteoMacs bisher beim Prozess des Knochenwachstums (Modeling) zugeschrieben, bei dem die Resorption durch die Osteoklasten und der Knochenaufbau durch die Osteoblasten nicht miteinander gekoppelt sind (Chang et al. 2008) und sie die Osteoklasten als zellulärer Regulator der Osteoblasten ersetzen. Die Tiere, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen, waren zu Beginn des Experimentes 1,5 Monate alt und wurden schlussendlich im Alter von 6 Monaten untersucht. Auch wenn Mäuse in diesem Alter als ausgewachsen gelten, ist nicht auszuschließen, dass noch Knochenaufbau in Form von Modeling erfolgt ist. Inwiefern Osteomacs allogenen Ursprungs eine Rolle bei der reduzierten Knochenmasse nach allogener HSCT spielen, muss also noch aufgeklärt werden. Denkbar wäre auch hier, sich der Immunhistochemie zu bedienen und Osteoblasten und Makrophagen anhand spezifischer Oberflächenmarker zu untersuchen und zu quantifizieren, um eine Beteiligung der Osteomacs abschätzen zu können. Ausgehend von gehemmten Osteoblasten erscheint es überraschend, dass die Osteoklasten normal differenzieren und aktiv sind, da zumeist die Osteoblasten als die Zellen angegeben werden, die die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten regulieren. Es wird jedoch seit längerem vermutet, dass die Osteozyten während des Knochen-Remodellings die Aktivierung der Osteoklasten übernehmen (Heino et al. 2002; Aguirre et al. 2006; Heino et al. 2009). Osteozyten entstehen aus reifen Osteoblasten, die während der Knochensynthese in die mineralisierte Matrix des Knochens eingebaut werden und über Kanalikuli mit weiteren Osteozyten oder anderen Zellen in Verbindung stehen. So bewirken sie z.B. über RANKL eine Stimulation der Osteoklasten und aktivieren somit den Knochenumbau. Da sie in die Knochenmatrix eingebettet sind, ist es gut vorstellbar, dass sie von einer gestörten Rezeptor-

Ligand-Interaktion nach allogener Knochenmarktransplantation nicht betroffen sind und daher die Osteoklasten wie gewohnt aktivieren können.

### **5.5 *In Vitro*-Kulturen können Aufschluss über die Beobachtungen geben**

Um die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten zu untersuchen, wären Co-Kulturen mit Osteoklasten oder gesamten Knochenmarkzellen denkbar, bei denen die Zelltypen jeweils aus einem anderen Mausstamm isoliert werden. Indem man verschiedene Reifestufen von Osteoblasten mit Osteoklasten oder gesamten Knochenmark zusammenbringt, könnte beispielsweise festgestellt werden, an welcher Stelle es zu einer Hemmung der Differenzierung kommt. Zusätzlich könnte über Co-Kulturen im Trans-Well-System kontrolliert werden, ob die Hemmung über Zell-Zell-Kontakt stattfindet, oder über einen löslichen Faktor. Über Microarray-Analysen könnte zudem untersucht werden, ob es Gene gibt, die unterschiedlich exprimiert werden und somit von der gestörten Interaktion betroffen sind.

Um gezielt die Beteiligung der Osteoblasten an dem beobachteten Phänotyp noch genauer beurteilen zu können, sind noch weitere Strategien vorstellbar. Ob die Osteoblasten tatsächlich weniger aktiv sind, kann herausgefunden werden, indem neben der Konzentrationsbestimmung von PINP auch ALP im Plasma oder Serum der Tiere gemessen wird. ALP wird schon lange als Marker der Osteoblastenaktivität gemessen. Da ALP aber sowohl von Osteoblasten, als auch von Zellen der Leber gebildet wird, muss ein Testverfahren gewählt werden, das die beiden Isoformen voneinander unterscheiden kann. Alternativ kann auch die Knochenbildungsrate per Fluorochrom-Injektionen überprüft werden. Dabei wird den Mäusen im Abstand von mehreren Tagen ein fluoreszierender, nicht-toxischer Stoff injiziert, der in den Knochen eingebaut wird und post mortem in Knochendünnschliffen nachgewiesen werden kann. Wichtig dabei ist, dass die Stoffe Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen emittieren und so gut auseinander gehalten werden können (Ott 2008). Dabei kommen häufig Tetracyclin und Calcein zum Einsatz, die dann als orange bzw. grünliche Linie im Knochen sichtbar gemacht werden können. Der Abstand der Linien wird ins Verhältnis zum zeitlichen Abstand der Injektionen gesetzt, wodurch man die Knochenbildungsrate erhält.

Wenn eine verminderte Knochenbildungsrate und damit auch Osteoblastenaktivität bewiesen wurde, wäre auch eine histologische Untersuchung denkbar, bei der das Osteoblasten-

typische ALP oder ein Transkriptionsfaktor, wie z.B. RUNX2 nachgewiesen wird. Während RUNX2 einen Überblick über die Anzahl der Osteoblasten-Vorstufen sowie die reifen Osteoblasten geben würde, kann mit der ALP-Färbung ein Eindruck der Osteoblastenaktivität gewonnen werden. Für einen ersten Überblick ist diese Herangehensweise sicherlich denkbar, doch gehen wichtige Informationen verloren wie z.B., ob die Osteoblasten im vollen Maße entwicklungsfähig sind oder ob sie in der Lage sind Knochen zu synthetisieren. Um die Differenzierung der Osteoblasten besser beurteilen zu können, wäre eine *in vitro*-Differenzierung von MSC aus dem Knochenmark transplantierter Tiere zu reifen Osteoblasten vorstellbar. Man könnte so vergleichen, ob bei Tieren mit syngenen und allogenen Knochenmark unterschiedliche Ausbeuten generiert werden, die verschiedenen Entwicklungsstufen überwachen und nochmals per Mikrosatellitenanalyse überprüfen, welchen Ursprung die MSCs und die daraus resultierenden Osteoblasten tatsächlich haben. Über Alizarin Red-, Sirius Red-, Masson's Trichrome- und ALP-Färbungen der Osteoblastenkulturen könnte zudem überprüft werden, ob die Kollagensynthese und die Kalziumablagerungen erfolgreich stattfinden oder ob ein Schritt bei der Knochenbildung gestört ist (Taylor et al. 2014). Davon ausgehend könnte man in einem zusätzlichen Kulturansatz über Expressionsanalysen genauer herausfinden, welcher Syntheseschritt beeinträchtigt ist.

Lee et al. beobachteten bereits 2002, dass man MSCs von HSCT-Patienten nach der Transplantation in Kultur nehmen kann und diese auch *in vitro* ein verändertes Verhalten zeigen. Sie differenzierten MSCs zu Osteoblasten, die sie sowohl aus dem Knochenmark von HSCT-Patienten, als auch von gesunden Spender isoliert hatten und beobachteten, dass die HSCT-Patientenzellen länger zum Differenzieren brauchten und zudem weniger Mineralisierung zu beobachten war.

Lee et al korrelierten weiterhin ihre Beobachtung mit einer verminderten Knochenmasse in den Transplantationspatienten. Sie kamen dabei zu dem Schluss, dass die Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen einen Schaden durch myeloablative Bestrahlung erfahren haben müssen, oder durch die Cyclosporingabe nach der Transplantation, die zur Verhinderung einer GvHD verabreicht wurde. Das stellt den entscheidenden Unterschied zu meiner Arbeit dar: Die Bestrahlung der Tiere war sowohl für die Empfänger des syngenen, als auch für die Empfänger

des allogenen Knochenmarks komplett gleich. Zudem wurde den Tieren, wie schon zu Beginn der Diskussion erwähnt wurde, keine immunsuppressiven Medikamente verabreicht und dennoch war im Vergleich die Knochenmasse der Tiere mit allogenem Knochenmark deutlich geringer. Lee's Vermutungen sind im Rahmen seiner Studie schlüssig, dennoch weisen unsere Daten auf einen weiteren Mechanismus hin, der Grund für die reduzierte Knochenmasse und die scheinbar reduzierte Osteoblastenaktivität ist.

### **5.6 Die Transplantation von allogenem Knochenmark hat keinen Einfluss auf die Osteoarthroseentwicklung in der STR/ort-Maus**

85 % der STR/ort-Männchen entwickeln bis zum Alter von 9 Monaten eine Kniegelenksarthrose, die besonders auf der medialen Seite des Knies ausgeprägt ist (Chambers et al. 1997; Mahr et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich zu dem Einfluss auf den Knochen auch untersucht werden, ob sich allogenes Knochenmark auf die Entwicklung der Osteoarthrose (OA) in den STR/ort-Männchen auswirkt. Als Vergleich dienten die C57BL/6J-Männchen, die im Gegensatz zu den STR/ort-Tieren unter physiologischen Umständen nur geringe und später auftretende Läsion im Kniegelenk entwickeln (van der Kraan et al. 2001). Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass eine Veränderung des subchondralen Knochens einen Einfluss auf den Knorpel hat. Es wurde jedoch bei keinem der untersuchten Stämme ein veränderter OA-Score ermittelt. Die übertragenen hämatopoetischen Zellen hatten also keinen Effekt auf die OA-Entwicklung und auch die geringere trabekuläre Knochenmasse in der distalen Metaphyse scheint keinen Einfluss ausgeübt zu haben. Die Beobachtung, dass der subchondrale Knochen den Knorpel und die OA-Entwicklung beeinflussen kann (Sharma et al. 2013, Osterberg et al. 2016), steht jedoch nicht im Widerspruch mit der vorliegenden Arbeit, da ich mir lediglich die distale Metaphyse, nicht aber den subchondralen Knochen angeschaut habe.

Unabhängig von der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bleibt dennoch die Frage, ob allogene mesenchymale Stammzellen einen Einfluss die Osteoarthrose haben können. Sofern OA-Patienten für eine Stammzelltherapie in Frage kommen, werden sie mit eigenen MSCs behandelt. In einigen Fällen, z.B. bei Lupus, wurde aber bereits gezeigt, dass allogene MSCs geeigneter sind, als autologe bzw. syngene (Gu et al. 2012; Collins et al. 2014).

Ob allogene MSCs zu Komplikation oder einer deutlichen Verbesserung führen können, bleibt eine spannende Frage, vor allem, da MSCs als Therapieform noch nicht lange existieren und somit noch deutlicher Aufklärungsbedarf besteht. Auch gibt es viele verschiedene Behandlungsansätze, bei denen die MSCs entweder aus Fettgewebe gewonnen und direkt appliziert werden (Jo et al. 2014), aus Knochenmark gewonnen und zunächst kultiviert werden (Emadedin et al. 2015), oder die isolierten MSC vor der Injektion noch stimuliert werden (Morille et al. 2016; Succar et al. 2016). Die STR/ort-Männchen würden daher mit ihrer hohen natürlichen OA-Prävalenz ein geeignetes Modell darstellen, um die Risiken und die Heilungschancen besser untersuchen zu können und einen geeigneten Therapieplan zu entwickeln.

### **5.7 Schlussfolgerung**

Osteopenie und Osteoporose gehört zu den Langzeitfolgen nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass Tiere nach einer Transplantation von allogener Knochenmark weniger trabekulären Knochen aufweisen, als Vergleichstiere nach syngener Knochenmarktransplantation. Ursächlich scheinen die Osteoblasten mit einer verringerten Aktivität unter allogenen Konditionen zu sein. Da ich die bisher beschriebenen Ursachen einer Osteoblasteninaktivierung wie z.B. die Entwicklung einer GvHD oder die Gabe immunsuppressiver Medikamente ausschließe, scheint die Beobachtung auf einen weiteren, bisher noch nicht registrierten Mechanismus zu beruhen. Die Beobachtung, dass zeitgleich die Osteoklastendichte und –Aktivierung vergleichbar ist, legt den Schluss nahe, dass eine Inkompatibilität der empfängereigenen Osteoblasten und der aus den Stammzellen des Spenders stammenden Osteoklasten oder eines anderen transferierten Zelltyps die Ursache darstellt. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit die genauen Mechanismen nicht weiter aufgeklärt werden konnten, eröffnet sie dennoch einen spannenden Anhaltspunkt, der bei der weiteren Erforschung und Behandlung der Osteoporose als Langzeitfolge einer allogenen HSCT bedacht werden sollte.

## 6. Literaturverzeichnis

- **Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T (2006)**. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 21(4):605-15.
- **Aoki H, Hara A, Motohashi T, Kunisada T (2011)**. Protective effect of Kit signaling for melanocyte stem cells against radiation-induced genotoxic stress. *J Invest Dermatol* 131(9):1906-15.
- **Arboleya L, Castañeda S (2013)**. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin* 9(5):303-15.
- **Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralto S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M (2009)**. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 15(12):1628-33.
- **Bailey AJ, Mansell JP, Sims TJ, Banse X (2004)**. Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology* 41(3-4):349-58.
- **Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, Cella M, Kim T, Rho J, Negishi-Koga T, Delaisse JM, Takayanagi H, Lorenzo J, Colonna M, Farndale RW, Choi Y, Trowsdale J (2011)**. OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest* 121(9):3505-16.
- **Bartl R (2014a)**. *Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 1: Normaler Knochen und Mineralstoffwechsel.* Stuttgart; New York: Thieme.
- **Bartl R (2014b)**. *Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 2: Einteilung der Knochenkrankheiten.* Stuttgart; New York: Thieme.
- **Bartl R (2014c)**. *Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 6: Osteoporose.* Stuttgart; New York: Thieme.
- **Bartl R (2014d)**. *Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 7: Andere systemische Knochenkrankheiten.* Stuttgart; New York: Thieme.

- **Bartl R (2014e)**. Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 24: Medikamente und Knochen. Stuttgart; New York: Thieme.
- **Bartl R (2014f)**. Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 25: Ionisierende Strahlen und Knochen. Stuttgart; New York: Thieme.
- **Battiwalla M, Hematti P (2009)**. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 11(5):503-15.
- **Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ (1996)**. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 18(5):397-403.
- **Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (1993)**. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112(4):503-10.
- **Berger K, Schopohl D, Rieger C, Ostermann H (2015)**. Economic and clinical aspects of intravenous versus oral busulfan in adult patients for conditioning prior to HSCT. *Support Care Cancer* 23(12):3447-54.
- **Braun T, Zwerina J (2011)**. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 13(4):235.
- **Briot K, Roux C (2015)**. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *RMD Open* 1(1):e000014
- **Burr DB, Radin EL (2003)**. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 29(4):675-85.
- **Chambers MG, Bayliss MT, Mason RM (1997)**. Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 5(5):301-8.
- **Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoll VM, Hume DA, Pettit AR (2008)**. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol* 181(2):1232-44.
- **Collins E, Gu F, Qi M, Molano I, Ruiz P, Sun L, Gilkeson GS (2014)**. Differential efficacy of human mesenchymal stem cells based on source of origin. *J Immunol* 193(9):4381-90.
- **Cruet-Hennequart S, Drougard C, Shaw G, Legendre F, Demoor M, Barry F, Lefaix JL, Galéra P (2015)**. Radiation-induced alterations of osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 10(3):e0119334.
- **Dallas SL, Bonewald LF (2010)**. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* 1192:437-43.

- **Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005).** Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8(5):739-50.
- **Deeg HJ, Sullivan KM, Buckner CD, Storb R, Appelbaum FR, Clift RA, Doney K, Sanders JE, Witherspoon RP, Thomas ED (1986).** Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission: toxicity and long-term follow-up of patients conditioned with single dose or fractionated total body irradiation. *Bone Marrow Transplant* 1(2):151-7.
- **Deng X, Oguri S, Funayama H, Ohtaki Y, Ohsako M, Yu Z, Sugawara S, Endo Y (2012).** Prime role of bone IL-1 in mice may lie in emergency Ca(2+)-supply to soft tissues, not in bone-remodeling. *Int Immunopharmacol* 14(4):658-64.
- **Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, Brendel C (2005).** Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84(11):722-7.
- **Dresner-Pollak R, Gelb N, Rachmilewitz D, Karmeli F, Weinreb M (2004).** Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology* 127(3):792-801.
- **DRST (2015).** Jahresbericht '14: <http://www.drst.de/download/jb2014.pdf> (14.07.2016)
- **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997).** *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-54.
- **Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D (1988).** Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72(6):2074-81.
- **Duran-Struock R and Dysko R (2009).** Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. *JAALAS* 48(1):11-22.
- **Emadedin M, Ghorbani Liastani M, Fazeli R, Mohseni F, Moghadasali R, Mardpour S, Hosseini SE, Niknejadi M, Moeininia F, Aghahosseini Fanni A, Baghban Eslaminejhad R, Vosough Dizaji A, Labibzadeh N, Mirazimi Bafghi A, Baharvand H, Aghdami N (2015).** Long-Term Follow-up of Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients with Knee, Ankle, or Hip Osteoarthritis. *Arch Iran Med* 18(6):336-44.
- **Fadilah SA, Aqilah MP (2012).** Promising role of reduced-toxicity hematopoietic stem cell transplantation (PART-I). *Stem Cell Rev* 8(4):1254-64.

- **Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009).** Graft-versus-host disease. *Lancet* 373(9674):1550-61.
- **Findlay D, Chehade M, Tsangari H, Neale S, Hay S, Hopwood B, Pannach S, O'Loughlin P, Fazzalari N (2008).** Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis Res Ther* 10(1):R2.
- **Findlay DM, Atkins GJ (2011).** Relationship between serum RANKL and RANKL in bone. *Osteoporos Int* 22(10):2597-602.
- **Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015).** Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746.
- **Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H (2012).** Radionuclide and hybrid bone imaging. Kapitel 2: Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Berlin ; Heidelberg (u.a.): Springer.
- **Franceschi RT, Xiao G (2003).** Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 88(3):446-54.
- **Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H, Ishigatsubo Y (2001).** Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 27(12):1275-81.
- **Ghorashian S, Nicholson E, Stauss HJ (2011).** T cell gene-engineering to enhance GVT and suppress GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 24(3):421-33.
- **Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008).** Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29(5):535-59.
- **Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB (2010).** The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3:S17-23.
- **Glatt V, Canalis E, Stadmeier L, Bouxsein ML (2007).** Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res* 22(8):1197-207.
- **Goldring SR (2015).** The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open* 1(Suppl 1):e000049.
- **Green DE, Rubin CT (2014).** Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone* 63:87-94.

- **Gu F, Molano I, Ruiz P, Sun L, Gilkeson GS (2012).** Differential effect of allogeneic versus syngeneic mesenchymal stem cell transplantation in MRL/lpr and (NZB/NZW)F1 mice. *Clin Immunol* 145(2):142-52.
- **Guntur AR, Rosen CJ (2013).** IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *Bonekey Rep* 2:437.
- **Gyurkocza B, Sandmaier BM (2014).** Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood* 124(3):344-53.
- **Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013).** The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110(4):52-7.
- **He J, Qiu W, Zhang Z, Wang Z, Zhang X, He Y (2011).** Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts. *J Craniofac Surg* 22(5):1635-40.
- **Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK (2002).** Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 85(1):185-97.
- **Heino TJ, Kurata K, Higaki H, Väänänen HK (2009).** Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care* 17(1):49-56
- **Herr W, Theobald M, Ehninger G, Einsele H, Meyer RG (2015a).** Hämatopoetische Stammzellen: Grundlagen und klinische Einsatzgebiete. Kapitel 1: Die hämatopoetischen Stammzellen – Mobilisierung und Charakterisierung. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- **Herr W, Theobald M, Ehninger G, Einsele H, Meyer RG (2015b).** Hämatopoetische Stammzellen: Grundlagen und klinische Einsatzgebiete. Kapitel 12: Geschichte und Entwicklung. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- **Herr W, Theobald M, Ehninger G, Einsele H, Meyer RG (2015c).** Hämatopoetische Stammzellen: Grundlagen und klinische Einsatzgebiete. Kapitel 14: Die allogene hämatopoetischen Stammzelltransplantation – HLA. Köln: Dt. Ärzte-Verlag.
- **Herr W, Theobald M, Ehninger G, Einsele H, Meyer RG (2015d).** Hämatopoetische Stammzellen: Grundlagen und klinische Einsatzgebiete. Kapitel 21: Die allogene hämatopoetischen Stammzelltransplantation – Graft-versus-Host-Disease. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- **Holleville N, Matéos S, Bontoux M, Bollerot K, Monsoro-Burq AH (2007).** Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev Biol* 304(2):860-74.

- **Hong MH, Williams H, Jin CH, Pike JW (2000)**. The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins. *J Bone Miner Res* 15(5):911-8.
- **Humphrey MB, Nakamura MC (2015)**. A Comprehensive Review of Immunoreceptor Regulation of Osteoclasts. *Clin Rev Allergy Immunol* [Epub ahead of print].
- **Ikeda K, Takeshita S (2014)**. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab* 21(3):163-7.
- **Iwakawa M, Noda S, Ohta T, Ohira C, Lee R, Goto M, Wakabayashi M, Matsui Y, Harada Y, Imai T (2003)**. Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction. *J Radiat Res* 44(1):7-13.
- **Jaeger K, Selent C, Jaehme W, Mahr S, Goebel U, Ibrahim S, Vollmar B, Mueller-Hilke B (2008)**. The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice. *Osteoarthritis Cartilage* 16(5):607-14.
- **Jang MG, Lee JY, Yang JY, Park H, Kim JH, Kim JE, Shin CS, Kim SY, Kim SW (2015)**. Intermittent PTH treatment can delay the transformation of mature osteoblasts into lining cells on the periosteal surfaces. *J Bone Miner Metab* [Epub ahead of print].
- **Jilka RL (2013)**. The relevance of mouse models for investigating age-related bone loss in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(10):1209-17.
- **Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Li ML, Huang SH, Zhao ZH (2015)**. The role of microRNAs in bone remodeling. *Int J Oral Sci* 7(3):131-43.
- **Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, Kim JE, Shim H, Shin JS, Shin IS, Ra JC, Oh S, Yoon KS (2014)**. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 32(5):1254-66.
- **Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY (1997)**. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 114(1-2):83-92.
- **Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley LK, Taichman RS (2005)**. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 38(4):497-508.
- **Jung SM, Kim KW, Yang CW, Park SH, Ju JH (2014)**. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res* 2014:263625.
- **Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, Wada S (2007)**. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 25(5):277-85.

- **Karmakar S, Kay J, Gravalles EM (2010)**. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am* 36(2):385-404.
- **Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2007)**. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29(2):155-92.
- **Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB (2012)**. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone* 50(5):1115-22.
- **Kennedy OD, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB (2014)**. Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo. *Bone* 64:132-7.
- **Khan F, Agarwal A, Agrawal S (2004)**. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 34(1):1-12.
- **Kim CH (2010)**. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* 1:13-9.
- **Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, Baek WY, Kim JE, Kronenberg HM (2012)**. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res* 27(10):2075-84.
- **Kröger N, Zander AR (2011)**. *Allogene Stammzelltherapie : Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. Kapitel 8: Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation.* Bremen; London; Boston, Mass.: UNI-MED-Verlag.
- **Lacativa PG, Farias ML (2010)**. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(2):123-32.
- **Lee WY, Cho SW, Oh ES, Oh KW, Lee JM, Yoon KH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim CC (2002)**. The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(1):329-35.
- **Leonard CA, Lee WY, Taylor P, Salo PT, Kubes P, Krawetz RJ (2015)**. Allogeneic Bone Marrow Transplant from MRL/MpJ Super-Healer Mice Does Not Improve Articular Cartilage Repair in the C57Bl/6 Strain. *PLoS One* 10(6):e0131661.
- **Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN (2007)**. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 109(9):3839-48.

- **Logothetis CJ, Lin SH (2005)**. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5(1):21-8.
- **Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB (2003)**. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 170(5):2655-62.
- **Mahr S, Menard J, Krenn V, Müller B (2003)**. Sexual dimorphism in the osteoarthritis of STR/ort mice may be linked to articular cytokines. *Ann Rheum Dis* 62(12):1234-7.
- **Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M (2013)**. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 9(12):699-712.
- **Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT (2001)**. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9(2):85-91.
- **McClune BL, Majhail NS (2013)**. Osteoporosis after stem cell transplantation. *Curr Osteoporos Rep* 11(4):305-10.
- **Mistry D, Oue Y, Chambers MG, Kayser MV, Mason RM (2004)**. Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12(2):131-41.
- **Morille M, Toupet K, Montero-Menei CN, Jorgensen C, Noël D (2016)**. PLGA-based microcarriers induce mesenchymal stem cell chondrogenesis and stimulate cartilage repair in osteoarthritis. *Biomaterials* 88:60-9.
- **Morrison NA1, Day CJ, Nicholson GC (2014)**. Dominant negative MCP-1 blocks human osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 115(2):303-12.
- **Murphy K, Travers P, Walport M (2009)**. *Janeway Immunologie*. Kapitel 14: Autoimmunität und Transplantation. Heidelberg: Spektrum.
- **Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002)**. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.
- **Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H (2011)**. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17(10):1231-4.
- **Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H (2011)**. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17(11):1473-80.

- **Olney RC (2009)**. Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage. *Horm Res* 72 Suppl 1:30-5.
- **Osterberg A, Thiem D, Herlyn P, Mittlmeier T, Frerich B, Müller-Hilke B (2016)**. Subchondral bone sclerosis and cancellous bone loss following OA induction depend on the underlying bone phenotype. *Joint Bone Spine* [Epub ahead of print].
- **Otero K, Shinohara M, Zhao H, Cella M, Gilfillan S, Colucci A, Faccio R, Ross FP, Teitelbaum SL, Takayanagi H, Colonna M (2012)**. TREM2 and  $\beta$ -catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. *J Immunol* 188(6):2612-21.
- **Ott SM (2008)**. Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3:S151-6.
- **Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997)**. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-71.
- **Park D, Sykes DB, Scadden DT (2012)**. The hematopoietic stem cell niche. *Front Biosci* (Landmark Ed 17:30-9.
- **Pasold J, Engelmann R, Keller J, Joost S, Marshall RP, Frerich B, Müller-Hilke B (2012a)**. High bone mass in the STR/ort mouse results from increased bone formation and impaired bone resorption and is associated with extramedullary hematopoiesis. *J Bone Miner Metab* 31(1):71-81.
- **Pasold J, Osterberg A, Peters K, Taipaleenmäki H, Säämänen AM, Vollmar B, Müller-Hilke B (2012b)**. Reduced expression of *Sfrp1* during chondrogenesis and in articular chondrocytes correlates with osteoarthritis in STR/ort mice. *Exp Cell Res* 319(5):649-59.
- **Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Kuball J, Farge-Bancel D, Gennery A, Kröger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M (2016)**. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* 51(6):786-92.
- **Petkova SB, Yuan R, Tsaih SW, Schott W, Roopenian DC, Paigen B (2008)**. Genetic influence on immune phenotype revealed strain-specific variations in peripheral blood lineages. *Physiol Genomics* 34(3):304-14.
- **Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ (2008)**. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone* 43(6):976-82.

- **Pinchuk LM, Filipov NM (2008)**. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun Ageing* 5:1.
- **Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J (2005)**. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 19(13):1842-4.
- **Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN (2013)**. Interleukin-1 $\alpha$ . *Semin Immunol* 25(6):430-8.
- **Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH (2006)**. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J* 25(24):5840-51.
- **Sadeghi B, Aghdami N, Hassan Z, Forouzanfar M, Rozell B, Abedi-Valugerdi M, Hassan M (2008)**. GVHD after chemotherapy conditioning in allogeneic transplanted mice. *Bone Marrow Transplant* 42(12):807-18.
- **Sanchez C, Deberg MA, Bellahcène A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, Crielaard JM, Henrotin YE (2008)**. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis Rheum* 58(2):442-55.
- **Sarukawa J, Takahashi M, Doi M, Suzuki D, Nagano A (2010)**. A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62(2):463-71.
- **Schett G (2011)**. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest* 41(12):1361-6.
- **Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuyneck HM, Link H, Zander A, Barge A (1996)**. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 347(8998):353-7.
- **Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (2006)**. Dynamics of bone and cartilage metabolism. Kapitel 33: Measurement of Biochemical Markers of Bone Resorption. London: Academic Press.
- **Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS (2013)**. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 14(10):19805-30.
- **Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K (2010)**. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115(26):5401-11.

- **Silbermann M, Weiss A, Reznick AZ, Eilam Y, Szydel N, Gershon D (1987)**. Age-related trend for osteopenia in femurs of female C57BL/6 mice. *Compr Gerontol A* 1(1):45-51.
- **Sim BC, Aftahi N, Reilly C, Bogen B, Schwartz RH, Gascoigne NR, Lo D (1998)**. Thymic skewing of the CD4/CD8 ratio maps with the T-cell receptor alpha-chain locus. *Curr Biol* 8(12):701-4.
- **Sims NA, Martin TJ (2014)**. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3:481.
- **Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R (1998)**. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91(3):756-63.
- **Socié G, Clift RA, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin PJ, Remberger M, Deeg HJ, Ruutu T, Michallet M, Sullivan KM, Chevret S (2001)**. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* 98(13):3569-74.
- **Stok KS, Pelled G, Zilberman Y, Kallai I, Goldhahn J, Gazit D, Müller R (2009)**. Revealing the interplay of bone and cartilage in osteoarthritis through multimodal imaging of murine joints. *Bone* 45(3):414-22.
- **Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, Leisenring W, Shulman H (1997)**. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 89(8):3048-54.
- **Succar P, Medynskyj M, Breen EJ, Batterham T, Molloy MP, Herbert BR (2016)**. Priming Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells with Hyaluronan Alters Growth Kinetics and Increases Attachment to Articular Cartilage. *Stem Cells Int* 2016:9364213.
- **Sviland L, Pearson AD, Green MA, Baker BD, Eastham EJ, Reid MM, Hamilton PJ, Proctor SJ, Malcolm AJ (1991)**. Immunopathology of early graft-versus-host disease--a prospective study of skin, rectum, and peripheral blood in allogeneic and autologous bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 52(6):1029-36.
- **Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG (1996)**. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro BM cultures. *Blood* 87(2):518-24.

- **Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T (2000)**. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408(6812):600-5.
- **Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park KA, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K (2013)**. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest* 123(9):3914-24.
- **Tauchmanová L, Colao A, Lombardi G, Rotoli B, Selleri C (2007)**. Bone loss and its management in long-term survivors from allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 92(12):4536-45.
- **Taylor SE, Shah M, Orriss IR (2014)**. Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey Rep* 3:585.
- **Thomas ED, Clift RA, Hersman J, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Fefer A, McGuffin R, Smith JW, Storb R (1982)**. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemic in first remission using fractionated or single-dose irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8(5):817-21.
- **Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V (2015)**. Pathologic patterns of interleukin 10 expression-a review. *Biochem Med (Zagreb)* 25(1):36-48.
- **Turner CH (2006)**. Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci* 1068:429-46.
- **Uchida K, Urabe K, Naruse K, Kozai Y, Onuma K, Mikuni-Takagaki Y, Kashima I, Ueno M, Sakai R, Itoman M, Takaso M (2012)**. Differential age-related bone architecture changes between female and male STR/Ort mice. *Exp Anim* 61(1):59-66.
- **Uchida K, Naruse K, Satoh M, Onuma K, Ueno M, Takano S, Urabe K, Takaso M (2013)**. Increase of circulating CD11b(+)Gr1(+) cells and recruitment into the synovium in osteoarthritic mice with hyperlipidemia. *Exp Anim* 62(3):255-65.
- **van der Kraan PM, Stoop R, Meijers TH, Poole AR, van den Berg WB (2001)**. Expression of type X collagen in young and old C57Bl/6 and Balb/c mice. Relation with articular cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 9(2):92-100.
- **Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA (2008)**. Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 23(12):2025-32.
- **Walton M (1977)**. Degenerative joint disease in the mouse knee; histological observations. *J Pathol* 123(2):109-22.

- **Walton M (1979)**. Patella displacement and osteoarthritis of the knee joint in mice. *J* 127(4):165-72.
- **Wassmuth R (2010)**. Primer on the HLA-System. Kapitel 1: Basic concepts. Heidelberg; München; Landsberg; Frechen; Hamburg: ecomed Medizin.
- **Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E et al. (2002)**. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915):520-62.
- **Weitzmann MN (2014)**. T-cells and B-cells in osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21(6):461-7.
- **WHO (1994)**. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843:1-129.
- **Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ, Lévesque JP (2010)**. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116(23):4815-28.
- **Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, Jacobsen RN, Forristal CE, Barbier V, Nowlan B, Cisterne A, Bendall LJ, Sims NA, Lévesque JP (2012)**. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. *Leukemia* 26(7):1594-601.
- **Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA (2011)**. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17(10):1235-41.
- **Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, Bonewald L, Manolagas SC, O'Brien CA (2015)**. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One* 10(9):e0138189.
- **Zhang W, Zhu C, Wu Y, Ye D, Wang S, Zou D, Zhang X, Kaplan DL, Jiang X (2014)**. VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cell* 27:1-11; discussion 11-2.
- **Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K (2006)**. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4(2):111-21.
- **Zhao B, Ivashkiv LB (2011)**. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther* 13(4):234.

## 7. Anhang

### 7.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
α-MEM (Minimum essential Medium α-Modification)	22571-020	gibco, life technologies (Paisley, GB)
CEQ™ 96-Well-Pufferplatte	609844	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ 96-Well-Probenplatte	609801	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Größenmarker 400	608098	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Mineralöl	608114	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Sample Loading Solution (SLS)	608082	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Separation Capillary Array, 33 cm x 75 mm	608087	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Separationsgel	608010	Beckman Coulter (Krefeld, D)
CEQ™ Separationspuffer	608012	Beckman Coulter (Krefeld, D)
Deckgläser, 24 x 50 mm	1871.2	Roth (Karlsruhe, D)
Dulbeccos's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190-094	gibco, life technologies (Paisley, GB)
ELISA-Kit, mouse OPG	SEA108Mu	Cloud-Clone Corp. (Houston, USA)
ELISA-Kit, mouse RANKL	SEA855Mu	Cloud-Clone Corp. (Houston, USA)
ELISA-Kit, Rat/ Mouse PINP EIA	AC-33F1	ids immuno diagnostic systems (Frankfurt a. M., D)
FCS, Superior	S0615	Merck (Darmstadt, D)
Formafix, 4% gepuffert	F10010G	Grimm med. Logisitk (Torgelow, D)
Glaskapillare, 20µl, K2 EDTA	19.447	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Histologiekassetten, weiß	14039440100	Leica Biosystems (Nussloch, D)
Histologiekassetten, grün	39LC-550-4	Leica Biosystems (Nussloch, D)
Kanadabalsam	8016.1	Roth (Karlsruhe, D)
Kanüle, 18G 2", rosa	301900	BD Microlance 3 (Heidelberg, D)
Kanüle, 26G 1/2", braun	303800	BD Microlance 3 (Heidelberg, D)
Kanüle, 27G 3/4", grau	302200	BD Microlance 3 (Heidelberg, D)
Kryoröhrchen, 2.0 ml	126263	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Labormarker	6130603	Marienfeld Superior (LaudaKönigshofen, D)
LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel	740150	Biologend (San Diego, USA)
Objektträger	PC67.1/ PC68.1	Roth (Karlsruhe, D)
Parafilm® M Verschlussfolie	701606	BRAND (Wertheim, D)
PCR dNTP-Mix, "Taq all inclusive"-Kit	01-1001	Peqlab (Erlangen, D)
PCR M13-Primer		Metabion
PCR MgCl <sub>2</sub> , "Taq all inclusive"-Kit	01-1001	Peqlab (Erlangen, D)
PCR Primer		Metabion
PCR Puffer S, "Taq all inclusive"-Kit	01-1001	Peqlab (Erlangen, D)
PCR Taq-Polymerase, "Taq all inclusive"-Kit	01-1001	Peqlab (Erlangen, D)
Pen/Strep, 5000 U/ml Penicilin, 5000 U/ml Streptomycin)	15070	gibco, life technologies (Paisley, GB)
Petrischale, 94 x 16 mm		Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen, 10 µl	07-902-0000	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettenspitzen, 200 µl	07-902-0003	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)

Pipettenspitzen, 1250 µl	07-902-0005	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettenspitzen, 20 µl, mit Filter	07-622-7300	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettenspitzen, 200 µl, mit Filter	07-662-7300	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettenspitzen, 1000 µl, mit Filter	2279	ART, Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, D)
Polystyren-Rundboden-Röhrchen	352054	BD Biosciences (Bedford, USA)
Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit	A1120	Promega (Madison, USA)
Reaktionsgefäße, 0.2 ml	04-012-1130	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Reaktionsgefäße, 0.5 ml	30121023	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	30120086	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße, 2.0 ml	30120094	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße, 15 ml	188271	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Reaktionsgefäße, 50 ml	210261	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Serologische Pipette, 5 ml	606180	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Serologische Pipette, 10 ml	607180	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Serologische Pipette, 25 ml	760180	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Spritze, 1 ml	9161406V	Omnifix, Braun (Melsungen, D)
Spritze, 5 ml	4617053V	Omnifix, Braun (Melsungen, D)
Sterilfiltereinheit, 0.2 µm, 75 mm, 500 ml	151-4020	Nalgene, Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, D)
Trypanblau (0,1 % in PBS)		Chemapol (Prag, CZ)
Usedecalc®	40-3310-00	Medite (Burgdorf, D)
Zellschaber, 24 cm	99002	Tpp (Trasadingen, CH)
Zellsieb, 40 µm	352340	BD Biosciences (Bedford, USA)
Zellsieb, 70 µm	352350	BD Biosciences (Bedford, USA)
Zellstofftupfer, 4x5 cm	1432130	Pur-Zellin, Paul Hartmann AG (Heidenheim, D)

## 7.2 Chemikalien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	101145	Merck (Darmstadt, D)
Di-Natriumphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	106580	Merck (Darmstadt, D)
Di-Natriumtartrat-Dihydrat (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	254.1	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol 96 % (v/v), mit Methylethylketon vergällt (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	-	Zentralapotheke d. UMR
Ethylendiamintetraessigsäure (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	108418	Merck (Darmstadt, D)
Fast Red Violet LB Salz (C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O · ½ZnCl <sub>2</sub> )	F3381	Sigma-Aldrich (München, D)
Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	22720	Serva (Heidelberg, D)
Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	WAL11601 1000	Walter CMP (Kiel, D)
Kaliumchlorid (KCl)	6781.1	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3904.1	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	P748.1	Roth (Karlsruhe, D)
N-N-Di-Methylformamid (HCON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	D4551	Sigma-Aldrich (München, D)
Naphthol AS-MX Phosphat (C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub> P)	N5000	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	106268	Merck (Darmstadt, D)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	71290	Sigma-Aldrich (München, D)

Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid 0.9 % (NaCl)	CE 0123	Braun (Melsungen, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	106329	Merck (Darmstadt, D)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	106448	Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100 (C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )	X-100	Sigma-Aldrich (München, D)
Wasser, nukleasefrei (H <sub>2</sub> O)	1039498	QIAGEN (Hilden, D)
Zitronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O)	100244	Merck (Darmstadt, D)

### 7.3 Geräte

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
µCT-Scanner	SkyScan 1076	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
Absaugvorrichtung	Vacumat 130	H. Sauer Laborbedarf (Reutlingen, D)
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Bioscience (Heidelberg, D)
	FACSVerse	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Handzähler	7100001	Marienfeld Superior (LaudaKönigshofen, D)
Kapillar-Gelelektrophorese	CEQ 8800 Genetic Analysis System	Beckman Coulter (Krefeld, D)
Kleintierbestrahlungsalage	IBL 637	GIP sources HA (Gif-sur-Yvette Cedex, F)
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus (Hamburg, D)
Magnetrührer	R3T	MLW Rührerätewerk (Freital, D)
	IKAMAG RH	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Mikroliterpipette, 0.5-10 µl	Reference 10	Eppendorf (Hamburg, D)
	Pipetman P10	Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Mikroliterpipette, 2-20 µl	Reference 20	Eppendorf (Hamburg, D)
	Pipetman P20	Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Mikroliterpipette, 10-100 µl	Reference 100	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroliterpipette, 20-200 µl	Pipetman P200	Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Mikroliterpipette, 100-1000 µl	Reference 1000	Eppendorf (Hamburg, D)
	Pipetman P1000	Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Mikroplatten-Reader	Infinite <sup>®</sup> 200 PRO	Tecan (Mainz-Kastel, D)
Mikrotom	Microm HM 355S	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Multikanalpipette, 20-200 µl	Transferette-8	Brand, (Wertheim, D)
Pipettierhilfe, elektrisch	Multipette plus	Eppendorf (Hamburg, D)
	PIPETBOY acu	Integra Biosciences (Konstanz, D)
Schüttler		
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Sterilwerkbank	Nu-440-400E	NuAire (Plymouth, USA)
Thermocycler	GeneAmp PCR Systems 9700	Applied Biosystems, Life Technologies (Darmstadt, D)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifuge	Microfuge 16	Beckman Coulter (Krefeld, D)
	Mikro 22R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen, D)
	Minifuge	Labnet (Edison, USA)

Vortexmischer	2x <sup>3</sup> VF2	UniEquipLaborgeräte (Martinsried, D) IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Waage	Acculab ALC 810.2 BA 110S H 110 PT 1200	Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D)
Wasserbad	WB 20	P-D Industriegesellschaft (Dresden, D)
Zählkammer, Neubauer	640110	Marienfeld Superior (LaudaKönigshofen, D)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products (Langenselbold, D)

## **7.4 Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
1076 Control (Version 2.6.5)	Einrichtung des $\mu$ CT-Scans	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
AxioVision Rel. 4.8	mikroskopische Aufnahmen	Carl Zeiss (Oberkochen, D)
BatMan64	Kalkulation der Konchenparameter	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
CTAnalyser (Version 1.15.4.0)	Bestimmung der ROIs	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
DataViewer (Version 1.5.1.2)	Ausrichtung der Knochen	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
GenomeLab <sup>TM</sup> GeXP	Auswertung d. Mikrosateliten	Beckman Coulter (Krefeld, D)
GraphPad Prism (Version 5.01-7)	statistische Auswertung und Datenpräsentation	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Image J (Version 1.45s)	Erstellung von histologischen Übersichtsbilder	Wayne Rasband, NIH, (Bethesda, USA)
LEGENDplex <sup>TM</sup> (Version 7)	Auswertung der LEGENDplex-Daten	Biolegend (San Diego, USA)
ND-1000 (Version 3.3.0)	DNA-Konzentrationsbestimmung	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
NRecon (Version 1.6.9.18)	Rekonstruktion der $\mu$ CT-Scans	SkyScan, Bruker microCT (Kontich, B)
BD CellQuest <sup>TM</sup> Pro	Bedienung des FACS Caliburs	BD Bioscience (Heidelberg, D)
i-control <sup>TM</sup>	Bedienung des Mikroplatten-Readers	