

Aus dem Departement für Biomedizinische Wissenschaften  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik  
(Leiter: Univ.-Prof. DDr. Reinhold Erben)

**Auswirkungen einer selektiven Inaktivierung des Estrogenrezeptor- $\alpha$  in  
hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen auf den Knochenturnover im  
Achsen skelett von ovariectomierten Mäusen**

DIPLOMARBEIT

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Tamara Huber

Wien, im Juni 2020

**Betreuer:** Univ.-Prof. Dr.med. Dr.med.vet. Reinhold Erben

Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle  
Endokrinologie

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik

Department für Biomedizinische Wissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

**Gutachter:** Priv.-Doz. Dr.med.vet. Florian Zeugswetter

Interne Medizin Kleintiere

Department/Universitätsklinik für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1 Östrogen und seine allgemeinen Wirkungen .....	3
2.2 Östrogenrezeptoren .....	4
2.2.1 Struktur und Lokalisation.....	5
2.2.2 Wirkung auf den Knochen turnover .....	5
2.2.3 Selektive Inaktivierung des Estrogenrezeptor- $\alpha$ .....	6
2.3 Der Knochen .....	6
2.3.1 Funktion, Struktur und Zusammensetzung.....	7
2.3.2 Zelluläre Bestandteile des Knochens .....	10
2.3.2.1 Osteoblasten .....	10
2.3.2.2 Osteoklasten .....	11
2.3.2.3 Osteozyten und endostale Knochenbelegzellen .....	12
2.3.3 Knochenbildung .....	13
2.3.4 Knochenwachstum: Modeling und Remodeling.....	14
2.3.5 Östrogenwirkung auf den Knochen .....	16
2.3.6 Kalziumhomöostase.....	18
2.3.6.1 Vitamin D.....	19
2.3.6.2 Parathormon (PTH) .....	20
2.3.6.3 Calcitonin .....	21
2.3.6.4 Störungen der Kalziumhomöostase.....	21
2.4 Osteoporose.....	23
2.4.1 Definition und Epidemiologie.....	23
2.4.2 Einteilung.....	24
2.4.2.1 Primäre Osteoporose Typ I: Postmenopausale Osteoporose .....	24

2.4.2.2 Primäre Osteoporose Typ II: Senile Osteoporose.....	25
2.4.2.3 Primäre Osteoporose Typ III: Idiopathische juvenile Osteoporose.....	25
2.4.2.4 Sekundäre Osteoporose.....	25
2.4.3 Risikofaktoren .....	26
2.4.4 Klinik .....	29
2.4.5 Therapie und Prävention.....	30
2.5 Stammzellen .....	33
2.5.1 Hämatopoetische Stammzellen.....	33
2.5.2 Mesenchymale Stammzellen .....	34
3. Material und Methoden .....	35
3.1 Versuch.....	35
3.1.1. Versuchstiere .....	35
3.1.2. Versuchsaufbau .....	35
3.1.3. Euthanasie und Probengewinnung.....	39
3.2 Aufbereitung der Knochen.....	40
3.2.1 Einbettung der nicht entkalkten Knochen .....	40
3.2.2 Trimmen der Blöcke.....	41
3.2.3 Schneiden mittels Mikrotoms .....	42
3.3 Eindecken mit Fluoromount für die Fluoreszenzanalyse.....	43
3.4 Färbungen.....	43
3.4.1 Von Kossa/McNeal Färbung .....	43
3.4.2 Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Färbung.....	46
3.5. Auswertung .....	48
3.4.1 Analyse der nach TRAP gefärbten Schnitte .....	48
3.4.2. Analyse der nach Kossa/McNeal gefärbten Schnitte .....	49
3.4.3. Analyse der fluoreszenzmarkierten Schnitte .....	50
3.6. Statistische Auswertung .....	50

4. Ergebnisse.....	51
5. Diskussion .....	57
6. Zusammenfassung .....	60
7. Summary .....	62
8. Abkürzungsverzeichnis .....	64
9. Literaturverzeichnis.....	68
10. Abbildungsverzeichnis .....	76
11. Tabellenverzeichnis .....	77

## 1. Einleitung und Fragestellung

Osteoporose ist ein weltweites Gesundheitsproblem und wird von der WHO als eine der 10 wichtigsten und als eine der teuersten Volkskrankheiten eingestuft (Bartl 2002). Etwa ein Drittel aller postmenopausalen Frauen sind betroffen (Bartl R. und Bartl C. 2015). Durch die Verminderung der Knochenmasse und der unzureichenden Knochenneubildung kommt es zu einer Verringerung der Knochenfestigkeit (Felsenberg 2001). Die Zahl der Patienten mit osteoporotischen Hüftfrakturen wurde im Jahr 2017 weltweit auf mehr als 200 Millionen geschätzt (Sözen et al. 2017).

Um zu begreifen, wie übermäßige Knochenresorption und unzureichende Bildung zu Skelettzerbrechlichkeit führen, muss der Prozess des Knochenumbaus (Knochen turnover) verstanden werden (Raisz 2005).

Das menschliche Skelett ist ein metabolisch aktives Organ (Hadjidakis und Androulakis 2006), welches im Laufe des Lebens ständig modelliert und einem kontinuierlichen Umbau unterzogen wird, um sich an die sich ändernden biomechanischen Kräfte anzupassen (Clarke 2008, Hadjidakis und Androulakis 2006, Mosimann und Kohler 1990). Durch das Gleichgewicht zwischen zwei entgegengesetzten Prozessen, des Knochenabbaus (Resorption) durch Osteoklasten und der Knochenbildung durch Osteoblasten wird die Knochenmasse bestimmt und die Knochenfestigkeit erhalten (Seeman 2008).

Östrogene sind ein wichtiger Regulator dieses Prozesses. Sie sind für die Entwicklung des Skeletts und die Aufrechterhaltung der Knochengesundheit während des gesamten Erwachsenenlebens von wesentlicher Bedeutung (Compston 2001). Dies wird vor allem durch die Tatsache verdeutlicht, dass Östrogenmangel eine der Hauptursachen für postmenopausale Osteoporose ist (Raisz 2005). Vor bereits knapp 80 Jahren wurde dieser Zusammenhang zwischen Östrogenmangel und Osteoporose durch Albright et al. (1941) gezeigt. Dabei wurde auch festgestellt, dass die Gabe von Östrogenen eine protektive Wirkung auf den Knochen zeigt.

Östrogene zählen zu den Steroidhormonen, welche eine Vielfalt an Wirkungen, die Wachstum, Differenzierung und Funktionen in vielen verschiedenen Zielgeweben betreffen, besitzen (Compston 2001) und sind außerdem die wichtigsten Sexualhormone im weiblichen Organismus. Die Wirkung von Östrogen wird über zwei Rezeptoren, Estrogenrezeptor-alpha ( $ER\alpha$ ) und -beta ( $ER\beta$ ) vermittelt, die in einer Vielzahl von Zellen, sowohl in mesenchymalen,

als auch in hämatopoetischen Zellen und somit auch in Knochen und Knochenmark weit verbreitet sind (Streicher et al. 2017). Die beiden Estrogenrezeptoren zeigen unterschiedliche räumlich-zeitliche Expressionsmuster und nicht überlappende Funktionen (Park et al. 2017). Für die Regulation des Knochenstoffwechsels spielt vor allem ER $\alpha$  eine wichtige Rolle (Sims et al. 2003).

Mit Hilfe von Bestrahlung und anschließender Knochenmarkstransplantationen ist es in genetisch veränderten Mäusen möglich, den für die Regulation des Knochenturnovers relevanten ER $\alpha$  selektiv in hämatopoetischen (u.a. Osteoklasten) oder mesenchymalen (u.a. Osteoblasten) Zellen zu inaktivieren. Ziel ist es, die trabekuläre Knochenmasse sowie die Knochenumbau-Aktivität (Knochenformation und osteoklastäre Knochenresorption) zu quantifizieren und dadurch ein besseres Verständnis des Östrogenmangel-induzierten Knochenabbaus zu erlangen.

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen einer selektiven Inaktivierung des Estrogenrezeptor- $\alpha$  in hämatopoetischen oder mesenchymalen Zellen auf den Knochenturnover im ersten Lendenwirbel von ovariectomierten und Östrogen-behandelten Mäusen quantifiziert werden.

Die Hypothese ist, dass die protektive Östrogenwirkung am Knochen ausschließlich durch Zellen mesenchymalen Ursprungs (Knochen und Knorpelzellen) und nicht durch hämatopoetische Zellen vermittelt wird.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Östrogen und seine allgemeinen Wirkungen

Östrogene zählen zu den Steroidhormonen, welche eine Vielfalt an Wirkungen, die Wachstum, Differenzierung und Funktionen in vielen Zielgeweben betreffen, besitzen (Compston 2001) und sind außerdem die wichtigsten Sexualhormone im weiblichen Organismus. Steroidhormone (SHs) sind lipophile Moleküle, die aus Cholesterin als Ausgangssubstanz synthetisiert werden und in Säugetieren unter anderem von den Gonaden und der Nebennierenrinde produziert werden (Almeida et al. 2017, Beato und Klug 2000). Sie werden in die fünf Hauptgruppen Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide unterschieden (Beato und Klug 2000). Alle diese SHs regulieren eine große Anzahl von Prozessen in einer Vielzahl von Zielzellen im menschlichen Körper, die den entsprechenden Steroidhormonrezeptoren (SHRs) besitzen (Beato und Klug 2000). SHRs sind intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung von spezifischen agonistischen oder antagonistischen Liganden aktiviert werden, um dadurch die Expression von Zielgenen steuern (Beato und Klug 2000).

Vor allem die Sexualsteroiden sind nicht nur für die Skelettentwicklung, sondern auch die Aufrechterhaltung der Knochengesundheit während des gesamten Lebens von wesentlicher Bedeutung. Eine Unterversorgung mit SHs, wie z.B. beim Östrogenmangel bei postmenopausalen Frauen, stellt einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung von Erkrankungen wie der Osteoporose dar (Compston 2001).

Östrogene und insbesondere 17-Östradiol (E2) spielen eine entscheidende Rolle bei der sexuellen Entwicklung und Fortpflanzung und haben Auswirkungen auf viele physiologische Prozesse (Arnal et al. 2010), wie zum Beispiel auf den Fettstoffwechsel, den Kohlenhydratstoffwechsel, den Stoffwechsel des Bindegewebes und des Skelettes, auf viele Serumproteine und Hormone (Kuhl 1997) und auf das Herz-Kreislauf-System (Arnal et al. 2010). Bei Frauen wird E2 hauptsächlich in den Granulosa- und Thekazellen der Ovarialfollikel gebildet. Bei Männern werden 15 % des E2 direkt aus den Hoden ausgeschieden und die restlichen 85 % stammen aus der peripheren Aromatisierung (Almeida et al. 2017).

In Bezug auf das menschliche Skelett ist Östrogen ein wichtiger Regulator der Knochenmasse und der Knochenhomöostase (Raisz 2005). Seine direkte Wirkung am Skelett beruht auf Östrogenrezeptoren in Osteoblasten, während seine indirekte Wirkung durch Östrogenrezeptoren bei verschiedenen anderen Zelltypen vermittelt wird, beispielsweise Stromazellen oder Zellen des Immunsystems (Sipos et al. 2009).

Östrogene und Androgene werden durch Gonadotropine (Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH)) über ein Feedback-System gesteuert (Almeida et al. 2017).

## 2.2 Östrogenrezeptoren

Östrogen wirkt über zwei Rezeptoren, Estrogenrezeptor-alpha ( $ER\alpha$ ) und -beta ( $ER\beta$ ), wobei  $ER\alpha$  für die Regulation des Knochenstoffwechsels wichtiger ist (Sims et al. 2003, Thomasius und Hadji 2019). Sie stellen verschiedene Proteine dar, die von getrennten Genen codiert werden und sich auf verschiedenen Chromosomen befinden (Bord et al. 2002).

Der Estrogenrezeptor (ER) ist ein nukleärer Rezeptor (Kernrezeptor), der Mitglied einer Familie ligandenaktivierter Transkriptionsfaktoren ist und in einer Vielzahl von Zellen weit verbreitet ist (Streicher et al. 2017). Diese Rezeptorfamilie umfasst nach dem heutigen Wissensstand über 60 bekannte Proteine, darunter Rezeptoren für Östrogene, Androgene, Gluco- und Mineralokortikoide, Progestine, Schilddrüsenhormone, Retinsäure und Vitamin D (Beato und Klug 2000). Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Differenzierung und die Homöostase in einer Vielzahl von Zellen (Hanstein und Bender 1998). Allen nukleären Rezeptoren gemeinsam ist der Weg der Transaktivierung von Genen (Bord et al. 2002). Die Rezeptoren liegen in inaktiver Form vor. Durch die Bindung von Liganden werden sie in die aktive Form überführt. Nukleäre Rezeptoren können sowohl eine Stimulation als auch eine Hemmung der Transkription bewirken (Beato und Klug 2000). Da die Transkription und die Translation der Gene eine gewisse Zeit benötigt, setzt die Hormonwirkung erst ca. 1-2 Stunden später ein (Rassow et al. 2012). Aus diesem Grund dienen lipophile Hormone nicht zur kurzfristigen Regulation, sondern für längerfristige Einstellungen eines veränderten Stoffwechselzustandes (Horn 2019).

### 2.2.1 Struktur und Lokalisation

Um ihre Funktion vollständig ausfüllen zu können, müssen Rezeptoren bestimmte strukturelle Voraussetzungen besitzen (Rassow et al. 2012). Wie andere nukleäre Rezeptoren weist der Östrogenrezeptor eine modulare Struktur auf, die sich aus verschiedenen Domänen zusammensetzt (Hanstein und Bender 1998).

- ◆ Einer aminoterminalen Domäne (NTD)
- ◆ einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) mit zwei sog. Zink-Fingern
- ◆ einer carboxyterminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD)
- ◆ eine Transaktivierungsdomäne und
- ◆ einer Dimerisierungsdomäne

(Hanstein und Bender 1998, Rassow et al. 2012)

In der nicht stimulierten Zelle liegen die Steroidhormonrezeptoren als Monomere im Zytosol vor. Solange noch keine Bindung mit dem Hormon stattgefunden hat, ist die Struktur labil und wird nur durch die Bindung an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) stabilisiert (Rassow et al. 2012). Sobald das Hormon an den Rezeptor bindet erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors und die Dissoziation des HSP 90 (Horn 2019), wodurch sich ein stabiler Hormon-Rezeptor-Komplex bildet (Rassow et al. 2012). In dieser Form erfolgt der Transport des Komplexes in den Zellkern, wo er sich mittels der Zink-Finger an die DNA bindet und die Transkription einleitet (Rassow et al. 2012).

### 2.2.2 Wirkung auf den Knochenturnover

Der Nachweis von ER $\alpha$  sowohl in Osteoblasten, als auch in Osteoklasten legte nahe, dass die direkten Wirkungen von Östrogenen auf beide Zelltypen für ihre vorteilhaften Wirkungen auf den Knochen verantwortlich sind (Almeida et al. 2013). Almeida et al. (2013) fand außerdem heraus, dass ER $\alpha$  in Osteoblasten-Vorläufern die Proliferation und Differenzierung von Periostzellen erhöht. Dies führte zu einer erhöhten Knochenbildung in der Periostoberfläche und damit zu einer erhöhten kortikalen Dicke. Des Weiteren dient ER $\alpha$  in beiden Zellen dazu, die Knochenmasse zu optimieren, jedoch in unterschiedlichen Knochenkompartimenten und in Reaktion auf verschiedene Reize (Almeida et al. 2013).

### 2.2.3 Selektive Inaktivierung des Estrogenrezeptor- $\alpha$

Um zu klären, ob hämatopoetische oder mesenchymale Zellen die Haupteffektorzellen sind, die für die Auswirkungen von Östrogen auf den Knochen verantwortlich sind, wurden Rekonstitutionsmodelle etabliert, die durch die Kombination von Bestrahlung und Knochenmarkstransplantationen in Mäusen zu einer selektiven Inaktivierung des ER $\alpha$  in hämatopoetischen oder mesenchymalen Zellen führen (Streicher et al. 2017).

Um dies zu erreichen, wurden 16 Wochen alte weibliche Wildtyp (WT)- und globale ER $\alpha$ Knockout-Mäuse ( $\alpha$ ERKO) mit genetischem C57BL/6-Hintergrund letal bestrahlt und anschließend mit geschlechtsangepasstem Knochenmark von  $\alpha$ ERKO- bzw. WT-Mäusen wiederhergestellt. Hämatopoetische Zellen sind wesentlich empfindlicher gegenüber ionisierenden Strahlen als Zellen des Stromazellsystems. Aus diesem Grund kann man eine letale Bestrahlung und nachfolgende Rekonstitution mit fremdem Knochenmark dazu benutzen, um eine Differenzierung zwischen beiden Kompartimenten zu erreichen, also selektiv nur das hämatopoetische Kompartiment auszutauschen. Die Bestrahlung dient dabei zur selektiven Eliminierung der hämatopoetischen Zellen, um diese durch Spender-Zellen zu ersetzen. In bestrahlten WT-Mäusen, die mit  $\alpha$ ERKO-Mäuseknochenmark rekonstituiert wurden, sind alle Mesenchymzellen die Zellen des Empfängers und exprimieren einen funktionierenden ER $\alpha$ , wohingegen hämatopoetische Zellen Spenderzellen sind und keinen ER $\alpha$  aufweisen. Umgekehrt exprimieren in bestrahlten  $\alpha$ ERKO-Mäuse, die mit WT-Knochenmark rekonstituiert wurden, hämatopoetische Zellen einen funktionierenden ER $\alpha$ , wohingegen mesenchymalen Zellen ER $\alpha$  fehlt (Streicher et al. 2017).

## 2.3 Der Knochen

Das Skelett ist eines der strukturell komplexesten und heterogensten Gewebe bei Säugetieren. Insgesamt umfasst es beim Menschen 206 Knochen mit unterschiedlichsten Formen und Größen (Almeida et al. 2017). Durch das perfekte Zusammenspiel von Knochengewebe, Knochenhaut, Knochenmark, Gefäße und Nerven bildet es ein organartiges System (König und Liebich 2019). Man kann der äußeren Form nach vier bzw. fünf (König und Liebich 2019) Arten von Knochen unterscheiden:

- ◆ Lange oder Röhrenknochen (z.B. Femur, Tibia, Radius)

- ◆ Kurze Knochen (z.B. Hand- und Fußwurzelknochen)
- ◆ Platte Knochen (z.B. Schulterblatt, Schädelknochen)
- ◆ Unregelmäßige Knochen (z.B. Wirbel)
- ◆ Lufthaltige Knochen (z.B. Oberkiefer, Siebbein) (König und Liebich 2019)  
(Clarke 2008, König und Liebich 2019, Nickel et al. 2004)

### 2.3.1 Funktion, Struktur und Zusammensetzung

#### FUNKTION

Knochengewebe ist nach dem Zahngewebe die härteste Substanz des Körpers (Salomon et al. 2014) und dient unserem Körper vor allem als Stützgerüst und großer Mineralspeicher (Sinowatz und Rodler 2019). Darüber hinaus ermöglicht es uns Bewegung und Fortbewegung durch die Bereitstellung von Hebeln für die Muskeln, schützt lebenswichtige innere Organe, sorgt für die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts, dient als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine und bietet Raum für die Hämatopoese in seinen Markräumen (Clarke 2008). Unser Skelett erfüllt somit eine Vielzahl an wichtigen Funktionen für unseren Körper und unser Leben. Zug- und Druckkräften von außen wirken vor allem die Kollagenfasern und die mineralischen Baustoffe entgegen, was uns bis zu einem gewissen Grad vor Verletzungen und Frakturen schützt (Salomon et al. 2014).

#### STRUKTUR und ZUSAMMENSETZUNG

Der Knochen besteht aus Knochenzellen und einer mineralisierten Interzellulärsubstanz (Mosimann und Kohler 1990) und enthält ca. 8 % Wasser und 92 % Trockensubstanz (Engelhardt et al. 2015). Die Trockensubstanz setzt sich aus ca. 65 % Mineralien (Calcium und Phosphat) und 35 % organischer Matrix zusammen. Hauptbestandteil der organischen Matrix bildet mit ca. 90 % Kollagen, vor allem Kollagen-Typ-I. Die restlichen 10 % setzen sich aus nichtkollagenen Proteinen, vor allem Syntheseprodukte von Osteoblasten (Osteocalcin, Osteonectin, Proteoglycane, Wachstumsfaktoren etc.) und Plasmaproteinen (Albumin,  $\alpha_2$ -HS-Glykoproteine) zusammen (Engelhardt et al. 2015).

Außen wird der Knochen an seiner Oberfläche vom Periost, der Knochenhaut, bedeckt, das je nach lokaler Belastung unterschiedlich dick ist (Mosimann und Kohler 1990). Es besteht aus gefäß- und nervenführendem Bindegewebe (Sinowatz und Rodler 2019) und lässt sich während der Knochenbildung in 2 Schichten unterteilen. Das Kambium, die innere Schicht mit zahlreichen Osteoblasten und Blutgefäßen und die äußere Faserschicht, die Fibrosa (Nickel et al. 2004), die aus kollagenen und elastischen Fasern mit zahlreichen Fibroblasten und Fibrozyten besteht. Letztere erfüllt vorwiegend mechanische Aufgaben (Mosimann und Kohler 1990). Durch zahlreiche kollagene Faserbündel, den sogenannten Sharpey-Fasern, ist das Periost intensiv mit dem Knochen verbunden (Nickel et al. 2004, Sinowatz und Rodler 2019a, 2019b). Durch das Vorhandensein von sensiblen Nervenfasern im Periost ist dieses schmerzempfindlich (Mosimann und Kohler 1990). Ausgenommen vom Überzug mit Periost sind die mit Knorpel bedeckten Gelenkflächen, sowie die Ansatzstellen von Sehnen (Salomon et al. 2014).

Der erwachsene Knochen setzt sich morphologisch aus zwei grundlegenden Anteilen zusammen, der Substantia compacta (Kompakta, 85 % des gesamten Skeletts) und der Substantia spongiosa (Spongiosa, 15 %) (Felsenberg 2001). Die Knochenenden werden statt von der Kompakta von einer dünneren Knochenrinde, der Substantia corticalis (Kortikalis) überzogen (Nickel et al. 2004). Der kortikale Knochen bildet den gesamten Außenbereich eines Knochens (Salomon et al. 2014), ist dicht und fest und umgibt den Markraum (Clarke 2008). Dieser Hohlraum wird von Knochenmark erfüllt (Salomon et al. 2014), welches aus den aus der Kambiumschicht des Periosts eingewanderten Myeloblasten und Hämozytoblasten entsteht. Bei noch wachsenden Lebewesen wird es rotes Knochenmark genannt, da seine Hauptaufgabe die Blutbildung ist. Nach Abschluss des Körperwachstums wird immer mehr in gelbes Knochenmark, sog. Fettmark, umgewandelt (Nickel et al. 2004). Das Fettmark ist das einzige Fettgewebe, das zum Knochen gehört. Es nimmt mit dem Alter immer mehr zu und verdrängt das rote Knochenmark zunehmend (Luther und David 2016).

Die Spongiosa stellt ein dreidimensionales Gerüst aus Knochenbälkchen oder –trabekeln dar, welches sich im Knocheninneren, vor allem in den Epiphysen (Endstücken) der Röhrenknochen befindet (Salomon et al. 2014). Das Verhältnis Kortikalis zu Spongiosa variiert in den einzelnen Knochen zum Teil ganz erheblich (Felsenberg 2001). Die Anordnung dieser beiden Knochenformen verkörpert das Prinzip der „Leichtbauweise“, in der

bei minimalem Einsatz an Baumaterial maximale Festigkeit erreicht wird (Salomon et al. 2014).

Das Knocheninnere ist mit Endost, einer dünnen Lage von flachen Bindegewebszellen, überzogen und liegt dem Knochen eng an. Es grenzt den Knochen vom Markraum ab und enthält Zellen, welche sich zu Osteoblasten oder auch zu Osteoklasten differenzieren können (Mosimann und Kohler 1990).

Sowohl Kortikalis als auch Spongiosa bestehen im reifen Knochen aus Lamellenknochen, welcher je nach Aufbau in 3 verschiedene Lamellenarten unterschieden wird:

- ◆ Grund- oder Speziallamellen
  - ◆ Schaltlamellen: liegen als Bruchstücke früherer Osteone zwischen den Lamellen der neu gebildeten Osteone
  - ◆ Haupt- oder Generallamellen: schließen die Kompakta zum Periost und zum Markraum durch dicke Lagen von Lamellen ab
- (Salomon et al. 2014)

Die strukturelle Grundeinheit (BSU, bone structural unit) des Lamellenknochens ist ein Osteon (Sinowatz und Rodler 2019). Kortikale Osteone werden Havers'sche Systeme genannt. Havers'sche Systeme haben eine zylindrische Form, sind an ihrer Basis ungefähr 400 µm lang und 200 µm breit und bilden ein verzweigtes Netzwerk innerhalb des Kortexknochens (Clarke 2008). Im Zentrum des Osteons liegt der HAVERS-Kanal, welcher ein bis zwei Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe enthält. Konzentrisch um diesen angeordnet finden sich bei Grund- oder Speziallamellen 4-20 Einzellamellen. Die einzelnen HAVERS-Kanäle sind in Längsrichtung des Knochens angeordnet und stehen untereinander durch quer und schräg verlaufende VOLKMANN-Kanäle in Verbindung. In diesen Kanälen verlaufen Blutgefäße, die Anschluss an die Gefäße des Periosts und des Markraumes finden (Salomon et al. 2014). Jedes Osteon ist gegen die Nachbarosteone und gegen die Schaltlamellen durch eine fibrillenarme Grundsubstanzschicht, die sogenannte Kittfläche (Kittlinie, Ebner-Linie, Linea cementalis) abgegrenzt. Nur wenige Osteozytenfortsätze durchdringen die Grenzschicht und treten mit Knochenzellen aus Nachbarosteonen in Kontakt (Mosimann und Kohler 1990).

### **2.3.2 Zelluläre Bestandteile des Knochens**

Für die Bildung und Entfernung von Knochen werden zwei hochspezialisierte und terminal differenzierte Knochenzelltypen unterschieden: Osteoblasten, die für die Bildung neuer Knochenmatrix und deren Mineralisierung verantwortlich sind, und Osteoklasten, die die mineralisierte Matrix wieder resorbieren können (Almeida et al. 2017).

Osteoblasten sind Abkömmlinge der mesenchymalen Zelllinie bzw. des Stromazellsystems (Engelhardt et al. 2015), während Osteoklasten von hämatopoetischen Vorläufern stammen (Almeida et al. 2017). Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten sind relativ kurzlebige Zellen. Bei Menschen leben Osteoklasten zwischen einem und 25 Tagen und Osteoblasten 1-200 Tage. Nach Beendigung ihrer Funktion sterben alle Osteoklasten und die Mehrzahl der Osteoblasten durch Apoptose ab. Einige der verbleibenden Osteoblasten werden abgeflacht und bedecken ruhende Knochenoberflächen. Diese Zellen werden als endostale Knochenbelegzellen bezeichnet. Einige andere Osteoblasten durchlaufen eine morphologische Transformation zu so genannten Osteozyten. Im Gegensatz zu den kurzlebigen Osteoblasten und Osteoklasten leben Osteozyten bis zu 50 Jahre lang (Almeida et al. 2017).

Neben den bereits erwähnten Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten unterscheidet man noch endostale Knochenbelegzellen (Engelhardt et al. 2015).

#### **2.3.2.1 Osteoblasten**

Osteoblasten sind Nachkommen der mesenchymalen Zelllinie (Almeida et al. 2017) bzw. des Stromazellsystems (Engelhardt et al. 2015). Diese Zelllinie leitet sich von einer gemeinsamen Stammzelle, der mesenchymalen Stammzelle, ab und stellt neben dem hämatopoetischen Zellsystem das zweitgrößte Zellsystem des Knochenmarks dar (Engelhardt et al. 2015). Osteoblasten besitzen einen großen rundlichen Kern und basophiles Zytoplasma, welches zahlreiche Mitochondrien, einen ausgeprägten Golgiapparat sowie zahlreiche Vesikel und rER (raues endoplasmatisches Retikulum) -Zisternen enthält. Daneben enthalten sie Lysosomen, Glykogenpartikel, Fetttröpfchen und eine große Zahl an freier Ribosomen (Mosimann und Kohler 1990).

Osteoblasten sezernieren eine glykoproteininhaltige Grundsubstanz und Kollagen, woraus das Grundgerüst des Knochen, das Osteoid, besteht (Salomon et al. 2014). Dieses wird anschließend mineralisiert und zunehmend verkalkt (Mosimann und Kohler 1990).

### **2.3.2.2 Osteoklasten**

Osteoklasten stammen von hämatopoietischen Vorläufern ab und dienen der Knochenresorption (Almeida et al. 2017). Die Osteoklastendifferenzierung wird durch Östrogen über eine reduzierte Aktivierung der Signalwege, an denen „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (NFκB) und „receptor activator of NFκB“ (RANK) beteiligt sind, vermindert. RANK wird von Osteoklasten exprimiert und bindet den RANK-Liganden (RANKL). Hierüber wird die Osteoklastenaktivität reguliert (Thomasius und Hadji 2019). RANKL wird hauptsächlich von Markstromazellen und osteoblastären Zellen in membrangebundener und löslicher Form produziert (Clarke 2008). Durch die Bindung von RANKL an RANK werden die Osteoklasten aktiviert (Engelhardt et al. 2015), die sich wiederum an die Knochenmatrix binden und diese resorbieren (Clarke 2008).

Osteoprotegerin (OPG) wird unter anderem von osteoblastären Zellen produziert und inhibiert durch seine Bindung an RANKL dessen Bindung an RANK (Engelhardt et al. 2015). Dadurch kommt es bei dessen Abwesenheit zu einer massiven Steigerung der Knochenresorption durch Osteoklasten (Engelhardt et al. 2015).

Osteoklasten sind sehr große, vielkernige Zellen (Engelhardt et al. 2015), die einen Durchmesser von 100 µm erreichen können (Mosimann und Kohler 1990) und reich an Lysosomen und Mitochondrien sind (Engelhardt et al. 2015). Sie entstehen durch die Fusion von Präosteoklasten, was vor allem durch das oben genannte RANK/RANKL/OPG-System gesteuert wird (Engelhardt et al. 2015). Die dem abzubauenen Knochen direkt anliegende Oberfläche der Osteoklasten entwickelt zahlreiche fingerförmige und verzweigte Ausläufer, wodurch die Berührungsfläche stark vergrößert wird (Mosimann und Kohler 1990). Sie liegen in kleinen Knochenvertiefungen, den HOWSHIP-Lakunen und lösen durch die Erzeugung eines sauren Milieus die Mineralien der Grundsubstanz des Knochens (Salomon et al. 2014), wodurch diese buchtenartige Vertiefungen entstehen (Mosimann und Kohler 1990).

Neben den genannten Faktoren ist auch Parathormon (PTH) ein wichtiger Regulator der Knochenresorption (Engelhardt et al. 2015). Parathormon stimuliert die Osteoklasten,

Calcitonin hemmt sie, wodurch sie sich abrunden und vom Knochen lösen (Mosimann und Kohler 1990).

Die Abbau-Leistung eines einzigen Osteoklasten entspricht der selben Knochensubstanz, welche von 30-60 Osteoblasten in der gleichen Zeit gebildet wurde (Salomon et al. 2014). Unter Normalbedingungen ist die Knochensubstanz des Körpers ausgewogen, steht dem osteoklastischen Abbau ein quantitativ entsprechender Aufbau durch Osteoblasten gegenüber (Mosimann und Kohler 1990).

### **2.3.2.3 Osteozyten und endostale Knochenbelegzellen**

Osteozyten sind flache, spindelförmige Zellen (Nickel et al. 2014) mit elliptischem Zellkern (Mosimann und Kohler 1990), die allseitig von Knochengewebe umgeben sind (Engelhardt et al. 2015). Sie stellen terminal differenzierte Osteoblasten dar, welche aus Osteoblasten, die sich durch die Produktion von Osteoid und Kollagen gleichsam einmauern, entstehen (Salomon et al. 2014) und in oder zwischen den Speziallamellen in kleinen langgestreckten Knochenhöhlen (Lakunen) liegen (Nickel et al. 2004). Ihre Organellenausstattung ist eher bescheiden, da sie nur noch in geringem Umfang organische Knochenmatrix produzieren (Mosimann und Kohler 1990). Ihre Aufgabe ist die Unterstützung der Knochenstruktur und außerdem spielen sie eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels (Clarke 2008, Engelhardt et al. 2015, Thomasius und Hadji 2019), indem sie unter anderem den wichtigen RANK-Liganden produzieren (Almeida et al. 2017). Osteozyten exprimieren mehrere Matrixproteine, die die interzelluläre Adhäsion unterstützen und den Mineralaustausch in der Knochenflüssigkeit innerhalb der Lücken und des Kanalnetzwerks regulieren (Clarke 2008). Das ermöglicht ihnen einerseits die Mobilisierung von Kalzium aus dem Gewebe und das Auffangen von Kalzium aus dem Blut (Salomon et al. 2014), andererseits auch den Transport von gelösten Stoffen, wie z.B. Hormone und Proteine (Almeida et al. 2017).

Endostale Knochenbelegzellen sind flache endothelartige Zellen, die ruhende Knochenoberflächen bedecken (Engelhardt et al. 2015). Über ihre vielfältigen filipodialen Ausläufer stehen Osteozyten nicht nur untereinander, sondern auch mit den endostalen Knochenbelegzellen in Verbindungen (Clarke 2008). Diese beiden Zellarten stellen somit eine funktionelle Einheit, den „Osteozyten-Knochenbelegzellen-Komplex“ dar (Engelhardt et

al. 2015). Durch diese Zusammenarbeit können Informationen, die mit Veränderungen der mechanischen Kräfte einhergehen, erfasst und zwischen den Zellen ausgetauscht werden (Almeida et al. 2017, Clarke 2008).

Osteozyten sind die häufigsten Knochenzellen und kommen 10 mal häufiger als Osteoblasten und bis zu 300 mal häufiger als Osteoklasten vor (Almeida et al. 2017, Thomasius und Hadji 2019).

### 2.3.3 Knochenbildung

Nach verschiedenen Autoren unterscheidet man zwei Formen der Knochenbildung:

- ◆ Desmale Osteogenese (Ossifikation)
  - ◆ Chondrale Osteogenese (Ossifikation)
- (Nickel et al. 2004, Salomon et al. 2014, Sinowatz und Rodler 2019)

Bei der desmalen Osteogenese entwickelt sich das Knochengewebe im embryonalen Bindegewebe direkt aus den mesenchymalen Vorläuferzellen (Salomon et al. 2014). Diese Mesenchymzellen wandeln sich zu Osteoblasten um und bilden anschließend die Grundsubstanz (Sinowatz und Rodler 2019). Diese Form wird daher auch als direkte Knochenbildung bezeichnet und der so gebildete Knochen wird Bindegewebs-, Deck- oder Belegknochen genannt. Auf diese Weise entstehen zum Beispiel die Knochen des Schädeldaches, des Gesichtsschädels und die Schulterblätter (Salomon et al. 2014, Sinowatz und Rodler 2019).

Bei der chondralen Osteogenese entstehen die Knochen über den „Umweg“ knorpelig vorgebildeter Skelettelemente, die allmählich aufgelöst und durch den eigentlichen Knochen ersetzt werden (Sinowatz und Rodler 2019). Auf diesem Weg der indirekten Knochenbildung entstehen die sogenannten Ersatzknochen. Das knorpelig vorgebildete Skelett wird als Primordialskelett bezeichnet. Es entwickelt sich wie die Bindegewebsknochen aus dem Mesenchym (Salomon et al. 2014). Es hat den großen Vorteil, dass es über ein höheres Wachstumstempo als das Knochengewebe verfügt und somit mit dem schnell wachsenden Embryo mithalten kann (Nickel et al. 2004). In Abhängigkeit von der Gestalt der knorpelig vorgebildeten Skelettstücke erfolgt die chondrale Ossifikation auf verschiedene Weise. Bei kurzen Stücken beginnt die Verknöcherung von innen her, was als enchondrale Ossifikation

bezeichnet wird. Bei der perichondralen Ossifikation bei langen Röhrenknochen bildet sich zunächst um die Schaftmitte eine knöcherne Hülse. Als Ergebnis sowohl der desmalen als auch der chondralen Osteogenese, aber auch bei der Heilung von Knochenfrakturen entsteht zunächst Geflecht- oder Faserknochen. Dabei wird durch Osteoblasten zunächst eine von Mineralsalzen freie, reichlich kollagene Fasern enthaltende Grundsubstanz, das Osteoid, gebildet (Sinowatz und Rodler 2019). Dieses besteht zu etwa 95 % aus Kollagen (überwiegend Typ I) und zu 5 % aus Proteoglykanen. In das Osteoid wird im Zuge der Mineralisierung Kalziumphosphat eingelagert (Salomon et al. 2014), was zu einer Festigung des Osteoids führt. Zu einem späteren Zeitpunkt wird der Geflechtknochen durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten durch lamellären Knochen ersetzt (Nickel et al. 2004).

Zusammengefasst lassen sich nach Sinowatz und Rodler (2019) von der Epiphyse zur Diaphyse an beiden Enden des Knochens folgende Zonen bei der chondralen Ossifikation unterscheiden:

- ◆ Proliferationszone: Durch Zellteilungen kommt es zur Vermehrung der Knorpelzellen
- ◆ Säulenknorpel: Säulenförmig Anordnung der Knorpelzellen zur Längsachse des späteren Knochens
- ◆ Zone des großblasigen Knorpels: Die Chondrozyten hypertrophieren und durch die fortschreitende Mineralisierung der Intrazellulärsubstanz beginnen sie zu degenerieren
- ◆ Zone des Knorpelabbaus (Erosions- oder Eröffnungszone): Auflösung der Knorpelsubstanz durch Chondroblasten
- ◆ Zone der enchondralen Ossifikation: Anlagerung von Osteoklasten an die verbleibenden Knorpelreste und Bildung von Osteoid, welches später verkalkt und Knochenlamellen bildet.

### **2.3.4 Knochenwachstum: Modeling und Remodeling**

Jeder Knochen hat eine genetisch festgelegte Gestalt (König und Liebich 2019), die aber im Laufe seines Lebens ständig modelliert wird, um sich an sich ändernde biomechanische Kräfte anzupassen (Clarke 2008, Compston 2001, Felsenberg 2001). Außerdem wird er umgebaut, um alten, mikrobeschädigten Knochen zu entfernen und durch neuen, mechanisch stärkeren Knochen zu ersetzen, um die Knochenfestigkeit zu erhalten (Clarke

2008, Hadjidakis und Androulakis 2006, Sözen et al. 2017). Die mineralisierte Masse wird räumlich so verteilt, dass eine optimale mechanische Leistung bei möglichst geringem Gewicht gewährleistet wird (Almeida et al. 2017). Dieses Modell des Knochenbaus wurde 1960 von Harold Frost als Ergänzung zum Wolff'schen Gesetz als Mechanostat bezeichnet. Mit Ausnahme des longitudinalen Knochenwachstums sorgen zwei Mechanismen auf Gewebeebene für diese Anpassung. Die Knochenmodellierung (Modeling) und die Knochenumbildung (Remodeling), welche durch Überschreitung bestimmter Belastungsschwellenwerte/-bereiche aktiviert werden können (Frost 1997).

## MODELING

Knochenmodeling ist der Prozess, bei dem der Knochen auf physiologische Einflüsse und mechanische Kräfte reagiert und sich an diese anpasst (Clarke 2008, Frost 1997). Dabei kommt es immer zu einer makro- oder mikroskopischen Formveränderung des Knochens (Engelhardt et al. 2015). Durch bestimmte Stimuli, die von den Osteozyten und den endostalen Knochenbelegzellen detektiert werden, wird Knochenmaterial an einer bestimmte Stelle resorbiert oder formiert, also Material hinzugefügt oder weggenommen (Engelhardt et al. 2015). Dabei vergrößert und verdickt sich die kortikale Knochenhülle (Almeida et al. 2017). Dieses Wachstum tritt beim Menschen vor allem in den ersten zwei Jahrzehnten des Lebens auf und nimmt mit zunehmenden Alter wieder ab (Compston 2001). Auch im Rahmen der Frakturheilung spielt die Modellierung eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zum Remodeling sind Knochenbildung und Resorption weder räumlich noch zeitlich gekoppelt, sondern finden an unterschiedlichen Lokalisationen, zeitlich unabhängig und in verschiedenen Intensitäten statt (Compston 2001).

## REMODELING

Knochenremodeling ist ein zyklisch ablaufender Prozess (Engelhardt et al. 2015) und beschreibt das kontinuierliche Entfernen alter Knochensegmente und das Ersetzen dieser Teile durch eine neu synthetisierte proteinhaltige Matrix und die anschließende Mineralisierung zur Bildung eines neuen Knochens (Almeida et al. 2017, Clarke 2008). Es ist somit ein Prozess der Knochenerneuerung, um die mechanische Festigkeit des Knochens aufrecht zu erhalten (Clarke 2008, Mosimann und Kohler 1990). Dieser Umbau beginnt vor

der Geburt und dauert das ganze Leben lang bis zum Tod (Clarke 2008). Dadurch werden 10 % unseres Skelettsystems jährlich erneuert (Thomasius und Hadji 2019).

Mikrofrakturen treten durch ständige Verformungen und Belastungen der Knochen auf und müssen repariert werden. Dies geschieht durch das perfekte Zusammenspiel der Osteoklasten und Osteoblasten. Der gesamte Prozess des Knochenauf- und -Abbaus dauert insgesamt ca. 3-4 Monate, wobei der Knochenabbau hierbei nur einen kleinen Zeitraum von unter zwei Wochen beansprucht (Felsenberg 2001).

Es spielt auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase im Plasma (Hadjidakis und Androulakis 2006).

Da der Vorgang des Remodelings eines der Schlüssel-Phänomene in der Biologie der Knochenzellen darstellt, ist es wichtig den Kontrollmechanismus dieses Prozesses zu begreifen und somit auch die Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, wie z.B. der Osteoporose, zu verstehen (Felsenberg 2001). Die Regulation findet sowohl systemisch als auch lokal statt. Zu den wichtigsten systemischen Regulatoren zählen Parathormon, Calcitriol, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Sexualhormone, Wachstumshormone, Prostaglandine, Tumorstwachstumsfaktoren und andere Proteine und Zytokine (Hadjidakis und Androulakis 2006). Lokal spielen vor allem RANK, RANKL und OPG eine wichtige Rolle (Hadjidakis und Androulakis 2006). Auch der Östrogenrezeptor hat in diesen ganzen Prozessen eine wesentliche Bedeutung (Thomasius und Hadji 2019).

Die beiden Mechanismen, Modeling und Remodeling, benötigen und nutzen sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten um ihre Funktion zu verrichten und obwohl sie in beiden Mechanismen die gleichen Zelltypen nutzen, scheinen sie die Funktion des anderen nicht duplizieren zu können (Frost 2002).

### **2.3.5 Östrogenwirkung auf den Knochen**

Wie bereits erwähnt besitzt Östrogen eine skelettale und eine extraskelettale Wirkung, welche beide eine Auswirkung auf die Pathogenese der Osteoporose aufweisen. Die direkte skelettale Aktivität beruht auf Östrogenrezeptoren an Osteoblasten, die indirekte auf Östrogenrezeptoren bei verschiedenen anderen Zellen, wie z.B. Stromazellen oder Zellen des Immunsystems (Sipos et al. 2009). Der Wirkmechanismus von Östrogen auf den Knochen beruht darauf, dass die Anzahl von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten

moduliert wird (Thomasius und Hadji 2019). Östrogen wirkt sich positiv auf die Lebensdauer von Osteoblasten und Osteozyten aus, allerdings wirkt es apoptosefördernd auf Osteoklasten. Durch den Wegfall dieses Mechanismus bei postmenausalem Östrogenabfall kommt es daher zu einer Steigerung der Osteoklastenaktivität und dadurch zu einem vermehrten Knochenabbau (Thomasius und Hadji 2019).

Einer der wichtigsten nachgeschalteten Mediatoren der Wirkung von Östrogen auf den Knochen ist das OPG/RANKL System, welches durch seine Wirkungen auf Osteoblasten und Osteoklasten den Metabolismus von Knochengewebe reguliert (Tyrovola und Odont 2015). RANKL, das aus mesenchymalen Zellen stammt (Streicher et al. 2017) ist ein essentielles Zytokin für die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten (Bord et al. 2002, Kong 1999, Lacey 1998) und somit verantwortlich für die Regulation des Knochenumsatzes (Streicher et al. 2017). RANKL ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Ligandenfamilie (Bord et al. 2002) und wird von einer Vielzahl von Zellen wie zum Beispiel den Zellen der Stromazelllinie, T-Lymphozyten, aber auch B-Lymphozyten, produziert (Kong 1999). RANKL wirkt über seinen spezifischen Rezeptor RANK, der in der Zellmembran von Osteoklasten- und Osteoklastenvorläuferzellen zu finden ist (Li 2000). Dem entgegen wirkt OPG, ein Mitglied der Familie der TNF-Rezeptoren, als Täuschungsrezeptor für RANKL, der an RANKL bindet und so die Osteoklastogenese hemmt (Bord et al. 2002). RANKL, RANK und OPG sind somit wesentlich für die physiologische Funktion der Osteoklasten. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Osteoklasten bei RANK- bzw. RANKL-defizienten Mäusen vollständig fehlen, was zu Osteopetrose führt, wohingegen OPG-defiziente Mäuse eine übermäßige Knochenresorption und schwere Osteoporose aufweisen (Bucay 1998, Kong 1999, Li 2000).

Sexualsteroid regulieren das OPG/RANKL-System in osteoblastenähnlichen Zellen (Bord et al. 2002, Hofbauer et al. 1999). OPG wird dabei direkt durch die Sexualhormone reguliert, während die Regulation von RANKL hauptsächlich indirekt zu sein scheint (Bord et al. 2002, Hofbauer et al. 1999, Saika et al. 2001). Durch die Ovariectomie (OVX) weiblicher Ratten bzw. die Orchiectomie (ORX) männlicher Ratten konnte *in vivo* eine Erhöhung der RANKL-mRNA-Expression in Knochen nachgewiesen werden (Franklin et al. 2006, Ikeda et al. 2001). Außerdem konnte festgestellt werden, dass gegen RANKL gerichtete Antikörper den Knochenverlust bei ovariectomierten Mäusen (Pierroz et al. 2010) und bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose (McClung et al. 2006) vollständig hemmen, was wiederum

die wichtige Rolle von RANKL in Zusammenhang mit östrogenbedingtem Knochenverlust unterstreicht.

Allerdings scheint auch das Expressionsverhältnis der beiden Östrogenrezeptoren essenziell auf die Knochenformation zu sein, was wiederum auch maßgeblich von Östrogen reguliert wird (Haffner-Luntzer et al. 2015). Von verschiedenen Autoren wurde berichtet, dass eine ER $\alpha$ -Ablation in Zellen der Osteoblasten bei weiblichen Mäusen Knochenschwund induziert oder den Knochenaufbau beeinträchtigt (Almeida et al. 2013, Kondoh et al. 2014, Melville et al. 2014). Zusätzlich spielt RANKL in den Osteozyten eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Osteoklastenbildung und der Knochenhomöostase (Fujiwara et al. 2016, Nakashima et al. 2011, Xiong et al. 2015). Zusätzlich schützt Östrogen den Knochen, indem es das Überleben von Osteoklasten durch die Sekretion verschiedener anderer Faktoren reguliert (Krum et al. 2008).

Nakamura et al. (2017) fanden heraus, dass Östrogen den Knochen turnover reguliert, indem es außerdem auf hämatopoetische Zellen (z.B. Immunzellen oder Osteoklasten) wirkt. Die bedingte Inaktivierung von ER $\alpha$  in Osteoklasten schützt demnach vor OVX-induziertem Knochenverlust (Nakamura et al. 2007). Des Weiteren gibt es Studien die darauf hinweisen, dass T-Lymphozyten die Auswirkungen von Sexualsteroidmangel auf den Knochenumsatz vermitteln (Li et al. 2011). Auch B-Lymphozyten sollen eine wesentliche Rolle als Quelle für osteoklastogene Zytokine spielen.

Streicher et al. (2017) fasste zusammen, dass es somit solide Hinweise darauf gibt, dass Sexualsteroid die RANKL-OPG-Achse im Knochen regulieren, jedoch der Beitrag von aus Immunzellen stammendem RANKL im Vergleich zu aus mesenchymalen Zellen stammendem RANKL bisher schlecht definiert bleibt (Streicher et al. 2017).

### **2.3.6 Kalziumhomöostase**

Die balancierte Kalziumhomöostase ist nicht nur für die Skelettbiologie, sondern für das Leben aller Säugetiere von essenzieller Bedeutung (Amling 2015). Für zahlreiche physiologische Funktionen sowohl auf Gewebe- als auch Zellebene ist eine konstante extrazelluläre Kalziumkonzentration notwendig (Ramasamy 2006). Der menschliche Körper enthält ca. 1 kg Calcium, 99 % davon im Knochen verbunden mit Phosphat als Hydroxylapatit (Rassow et al. 2012). An der Regulation dieses Gleichgewichtes sind

verschiedene Organe (Nieren, Skelett, Darm, Nebenschilddrüse) und Hormone (Parathormon, Vitamin D, Calcitonin) beteiligt (Ramasamy 2006). Phosphat ist nicht so streng reguliert wie Calcium und kann größeren Schwankungen unterliegen (Rassow et al. 2012). Der tägliche Kalziumbedarf eines erwachsenen Menschen liegt bei 25 mmol (entspricht 1,0 g), bei einem Jugendlichen bei 30 mmol (1,2 g) (Amling 2015). Der Großteil des Kalziums wird über den Dünndarm aus der Nahrung resorbiert und von der Niere gefiltert, andererseits wird ein kleiner Teil Kalzium durch ausgeglichene Knochenbildung und -Resorption ausgetauscht (Ramasamy 2006). Bei nicht ausreichender Zufuhr dieser Menge an Kalzium kommt es zum sekundären Hyperparathyreoidismus und damit zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen. Dabei geht Knochensubstanz verloren, wodurch das Risiko für Fragilitätsfrakturen steigt und die Frakturheilung verzögert oder gestört wird. In der westlichen Welt ist meist keine Mangelernährung, sondern eine gestörte enterale Kalziumaufnahme das Hauptproblem. Ursachen dafür sind neben einem Vitamin-D-Mangel auch der Einsatz von bestimmten Medikamenten (z.B.: Protonenpumpeninhibitoren, PPI zur Verringerung der Magensäurebildung) (Amling 2015).

### **2.3.6.1 Vitamin D**

Vitamin D ist kein Vitamin im eigentlichen Sinn (Engelhardt et al. 2015), denn es wirkt im Körper als Hormon (Horn 2019). Es kann von vielen Spezies unter UV-Bestrahlung endogen aus 7-Dehydrocholesterin in der Haut gebildet werden. Normalerweise werden beim Menschen 80-90 % des Vitamin-D-Bedarfs in der Haut synthetisiert, nur ca. 10-20 % werden mit der Nahrung aufgenommen (Engelhardt et al. 2015). Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) aus pflanzlichen und Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) aus tierischen Quellen werden mit der Nahrung aufgenommen und im Darm, zusammen mit Nahrungsfetten verpackt, resorbiert. Beide Vitamine (D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub>) durchlaufen den gleichen Aktivierungsprozess (Engelhardt et al. 2015). Es gibt kaum Anhaltspunkte dafür, dass sich die aktiven Formen der Vitamine D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> in ihrer Wirkungsweise unterscheiden (Ramasamy 2006). An das Vitamin-D-bindende Protein und an Albumin gebunden wird Vitamin D im Körper transportiert. In Hepatocyten wird es zu 25-Hydroxyvitamin D (Calcidiol) und anschließend in der Niere zu 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitriol) hydroxyliert. Der letzte Schritt unterliegt dabei einer strengen Regulation durch Calcium, Phosphat, dem Parathormon und dem fibroblast growth factor-23 (FGF-23). Die Organe selbst dienen dabei nicht als Speicherort. Im Fettgewebe

gespeichertes Vitamin D sowie an das Vitamin-bindende-Protein gebundenes 25-D3 stellen die beiden wesentlichen Speicherformen von Vitamin D dar (Engelhardt et al. 2015). Calcitriol stellt das eigentlich biologisch aktive Vitamin-D dar (Engelhardt et al. 2015). Es wirkt über eine Interaktion mit intrazellulären Rezeptorproteinen, den nukleären Vitamin-D-Rezeptoren (VDR), welche in den Enterozyten des Darms vorhanden sind (Ramasamy 2006). Die physiologisch wichtigste Wirkung und Funktion von Calcitriol liegt in der Stimulation der intestinalen Calcium- und Phosphorabsorption und der tubulären Resorption von Calcium (Engelhardt et al. 2015, Rassow et al. 2012), was zu einer normalen Knochenmineralisierung führt (Ramasamy 2006). Außerdem wird auch von einer direkten Wirkung auf den Knochen ausgegangen. Einerseits besitzen Osteoblasten spezifische Rezeptoren für Calcitriol, andererseits stimuliert Calcitriol die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Synthese anderer Knochenmatrixproteine (Ramasamy 2006). Somit steigert Vitamin D nicht nur die Resorption von Calcium, sondern fördert auch den Einbau von Calcium in den Knochen (Rassow et al. 2012).

Außerdem wurde festgestellt dass Calcitriol auch andere physiologische Systeme beeinflusst, einschließlich Zellwachstum und -differenzierung, Hormonsekretion, T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion (Ramasamy 2006). Es spielt somit auch eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen, sowie Tumorprävention und –Therapie (Rassow et al. 2012).

### **2.3.6.2 Parathormon (PTH)**

PTH ist ein Polypeptid mit 84 Aminosäuren, das in den Epithelkörperchen (Nebenschilddrüsen) gebildet wird (Engelhardt et al. 2015). Es ist das wichtigste Hormon im Calciumstoffwechsel und wirkt durch Erhöhung der Plasmacalciumkonzentration (Rassow et al. 2012). Der primäre Stimulus für die Sekretion von PTH ist ein Abfall der Calciumkonzentration unter 1,2 mmol/L (Speckmann et al. 2019) im Blut, der über einen sogenannten Calcium-sensing receptor (Calciumsensorprotein) in der Membran der PTH-sezernierenden Zellen der Nebenschilddrüse erfasst wird (Ramasamy 2006). Das gleiche Calciumsensorprotein befindet sich auch in den Nieren, in Osteoblasten, Osteozyten, in der Schilddrüse und in anderen Organen (Rassow et al. 2012). An den Nieren führt PTH zu einer gesteigerten Calciumresorption und hemmt die Phosphatresorption (Engelhardt et al. 2015, Rassow et al. 2012). Außerdem stimuliert es die Hydroxylierung von Calcitriol, was wiederum indirekt die Absorption von Calcium und Phosphat im Darm stimuliert (Rassow et al. 2012).

Im Knochen aktiviert PTH den osteoklastären Knochenabbau und bewirkt eine Zunahme des Calciumausstroms über ruhende Knochenoberflächen (Engelhardt et al. 2015). Diese Aktivierung erfolgt jedoch indirekt über Osteoblasten, welche durch PTH RANKL synthetisieren, der wiederum den Rezeptor RANK auf den Osteoklasten aktiviert (Rassow et al. 2012). Bei längerer Stimulation der Knochenresorption durch PTH kommt es zur Zunahme der Osteoklastenzahl, zu einer Zunahme der Genexpression von RANKL und einer Abnahme derjenigen von OPG (Ramasamy 2006). Diese Remodeling-Aktivität bewirkt einen Anstieg der Serumkonzentration von Calcium, wohingegen das Serumphosphat gleichzeitig sinkt (Engelhardt et al. 2015).

### **2.3.6.3 Calcitonin**

Calcitonin ist ein Polypeptid mit 32 Aminosäuren, das beim Säugetier in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird (Engelhardt et al. 2015, Ramasamy 2006) und durch Senkung der Plasmacalciumkonzentration der Gegenspieler des PTH ist (Rassow et al. 2012). Dieser antagonistische Effekt tritt aber erst bei unphysiologisch hohen Dosen ein und hat somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Kalziumhomöostase (Engelhardt et al. 2015).

### **2.3.6.4 Störungen der Kalziumhomöostase**

#### **VITAMIN-D MANGEL**

Obwohl Vitamin D vom Körper selbst synthetisiert werden kann, kann es gerade im Winter bei geringer UV-Strahlung, zu einer wesentlichen Unterversorgung kommen (Rassow et al. 2012). Weltweit sind schätzungsweise 3 Mrd. Menschen von Vitamin-D-Mangel betroffen (Amling 2015). Da es vor allem bei der Knochenmineralisierung eine essenzielle Rolle spielt (Rassow et al. 2012), führt ein Mangel im wachsenden Skelett zu Rachitis (Knochenerweichung), im adulten Skelett zu Osteomalazie bzw. Osteoporose (Engelhardt et al. 2015). Bei beiden Erkrankungen liegt eine Störung der Mineralisation von neu gebildetem Knochen zugrunde (Engelhardt et al. 2015). Bei der Osteomalazie kommt es durch die mangelhafte Mineralisierung der Knochengrundsubstanz zu Deformationen, bei der Osteoporose zusätzlich noch zu Spontanfrakturen (Rassow et al. 2012). Bei der Rachitis

kommt es zu einer Störung der desmalen und enchondralen Ossifikation mit gestörtem Längenwachstum und unter mechanischer Belastung zu einer Knochendeformation (Engelhardt et al. 2015). Dies äußert sich z.B. durch Auftreibungen an der Knorpel-Knochen-Grenze der Rippen, durch X- oder O-Beine (Rassow et al. 2012).

## HYPERPARATHYREOIDISMUS

Hyperparathyreoidismus kommt beim Menschen ziemlich häufig vor (1:1000), wobei es sich in den meisten Fällen um eine primäre Überfunktion handelt (Horn 2019).

Bei der primären Überfunktion der Nebenschilddrüse liegt meist ein Adenom oder selten ein Karzinom der Nebenschilddrüsenzellen vor (Speckmann et al. 2019). Durch die übermäßige Ausschüttung von PTH kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem Knochen (Hypercalcämie) und einer gesteigerten Calcium Resorption im Darm (Engelhardt et al. 2015, Speckmann et al. 2019). Durch die Wirkungen von PTH an der Niere kommt es außerdem zur Hypophosphatämie (Speckmann et al. 2019). Hypercalciurie und Hyperphosphaturie sind die Folge, was wiederum das Entstehen von Nierensteinen und Gewebeverkalkungen der Niere und anderer innerer Organe begünstigt (Engelhardt et al. 2015).

Beim sekundären Hyperparathyreoidismus wird die gesteigerte PTH-Sekretion durch andere Störungen, die mit einem Calciummangel einhergehen, hervorgerufen. Ursachen hierfür können neben einer zu geringer Aufnahme von Kalzium über die Nahrung renale Ursachen, sowie der bereits genannte Vitamin D Mangel sein (Engelhardt et al. 2015). Durch die über einen längeren Zeitraum anhaltende Stimulation der Nebenschilddrüse kommt es zu einer Hyperplasie dieser (Speckmann et al. 2019).

Bei beiden Formen ist letztendlich eine Entmineralisierung der Knochen die Folge (Speckmann et al. 2019), was zu Knochendeformationen und –Frakturen führen kann (Engelhardt et al. 2015).

## VITAMIN-D INTOXIKATION

Durch zu hohe Aufnahmen von Vitamin D Präparaten kommt es zu einer Knochenentkalkung (Rassow et al. 2012). Die induzierte Steigerung der intestinalen Absorption von Calcium und Phosphat führt zu Hypercalcämie, Hyperphosphatämie (Engelhardt et al. 2015). Das

überschüssige Calcium und Phosphor werden über die Nieren ausgeschieden und es kommt zusätzlich zur Hypercalziurie und Hyperphosphaturie (Rassow et al. 2012). Im Blut und im Urin führen die erhöhten Calcium- und Phosphatspiegel zu Verkalkungen von Blutgefäßen, Herz, Lunge, Sehnen, Nierenparenchym, sowie Nierensteinen (Engelhardt et al. 2015).

## 2.4 Osteoporose

### 2.4.1 Definition und Epidemiologie

Die Osteoporose ist die häufigste Knochenkrankheit beim Menschen (Sözen et al. 2017) und zählt zu den 10 wichtigsten Volkskrankheiten weltweit (Bartl 2002, Bartl und Gradinger 2009). Etwa ein Drittel aller postmenopausalen Frauen ist betroffen (Bartl R. und Bartl C. 2015). Aber Osteoporose betrifft nicht nur Frauen, es sind Menschen beiderlei Geschlechts und aller Herkunftsländer betroffen (Sözen et al. 2017).

Osteoporose bezeichnet eine unzureichende Knochenfestigkeit, welche sich aus Knochendichte und Knochenqualität zusammensetzt (Gosch et al. 2018). Die World Health Organisation (WHO) definierte 1994 die Osteoporose über die Bone mineral density (BMD). Je nach Abweichung der gemessenen Knochendichte mittels X-ray absorptiometry (DXA)-Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule (LWS) und/oder am proximalen Femur gegenüber dem Durchschnittswert erfolgt die Einteilung in Osteopenie und Osteoporose. Liegt die Abweichung (T-Score) zwischen 1 und 2,5 Standardabweichungen (SD) unterhalb des Mittelwertes handelt es sich um Osteopenie. Osteoporose wird mit einer BMD mit mehr als 2,5 SD unterhalb des Mittelwertes festgelegt. Liegen zusätzlich bereits Frakturen vor handelt es sich um eine manifeste Osteoporose (Kanis 2002).

#### WHO Diagnosekriterien:

Normale Knochendichte	T-Wert > -1,0 SD
Osteopenie	T-Wert < -1,0 und > - 2,5 SD
Osteoporose	T-Wert < - 2,5 SD
Manifeste Osteoporose	T-Wert < - 2,5 SD mit Fraktur

Osteoporose ist eine systemische Erkrankung (Raisz 2005), bei der das Organ Knochen seine mechanischen Funktionen nicht mehr ausführen kann (Jakob 2005). Die Folgen sind ein Verlust der Knochenmasse und Knochenstärke, was zu einem erhöhten Risiko für Knochenfrakturen führt (Raisz 2005). Es wird geschätzt, dass Osteoporose oder Osteopenie bei etwa 55 % der Bevölkerung ab 50 Jahren auftritt und weltweit jährlich mehr als 8,9 Millionen Frakturen verursacht. Neben den Frakturen besteht allerdings auch ein erhebliches Invaliditätsrisiko aufgrund schwerwiegender medizinischer Komplikationen (Vilela und Nunes 2011). Ursachen dafür kann übermäßige Knochenresorption, Ungleichgewicht beim Knochenumbau (Compston 2001) oder das Versagen, ein Skelett mit optimaler Masse und Stärke während des Wachstums zu produzieren, sein (Raisz 2005). In allen Fällen kommt es zu einer verminderten Knochenmasse, die zu einer Veränderung der Knochenfestigkeit führt (Felsenberg 2001).

## **2.4.2 Einteilung**

Neben der Einteilung nach der Ausdehnung (lokalisierte und generalisierte Osteoporose), der Einteilung nach Grad des Knochenumbaus (niedrigem, hohem und sehr hohem Knochenumsatz) und nach Alter und Geschlecht (juvenile/idiopathische und senile Osteoporose) kann die Osteoporose auch nach der Ätiologie eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man im groben eine primäre und eine sekundäre Osteoporose (Bartl und Bartl 2011). Spricht man von der primären Osteoporose ist die Ätiologie meist unklar (Marischler 2014). Der primären Osteoporose liegt eine negative Knochenbilanz zugrunde. Es überwiegt ein gesteigerter Knochenabbau den normalen oder erniedrigten Knochenaufbau, wodurch es zum Knochenschwund kommt. Schon bei geringer Alltagsbelastung oder einfachen Stürzen kommt es dann zu Knochenfrakturen (Bartl und Bartl 2011).

Die Primäre Osteoporose ist mit Abstand die häufigste Form und lässt sich in drei Typen unterteilen (Bartl 2002).

### **2.4.2.1 Primäre Osteoporose Typ I: Postmenopausale Osteoporose**

Dieser Typ der primären Osteoporose stellt die häufigste Form dar und entsteht durch einen Östrogenmangel nach der Menopause (Marcus 1991). Daneben spielen auch genetische Faktoren für die Manifestation dieses Typs eine Rolle (Marischler 2014). Dies betrifft vor

allem Frauen zwischen 50 und 70 Jahren. Die reduzierte Knochendichte entsteht durch die Hormonumstellung und den dadurch gesteigerten osteoklastischen Knochenabbau (Bartl R. und Bartl C. 2015, Marcus 1991). Am häufigsten treten Frakturen der Wirbelkörper auf (Marischler 2014).

#### **2.4.2.2 Primäre Osteoporose Typ II: Senile Osteoporose**

Dieser Osteoporosetyp ist eng mit dem Alterungsprozess verknüpft und tritt geschlechtsunabhängig ab einem Alter von 60 Jahren auf (Bartl R. und Bartl C. 2015). Die Fähigkeit der Knochenneubildung nimmt mit zunehmenden Alter ab, wohingegen der Knochenabbau zunimmt (Marischler 2014). Es kommt zu einem Verlust der Knochenmasse, was kortikalen und spongiösen Knochen gleichermaßen betrifft (Bartl R. und Bartl C. 2015, Sözen et al. 2017). Andere Ursachen können unter anderem Bewegungsmangel, Vitamin D- oder Kalziummangel (Marischler 2014) und Veränderungen des Kollagenstoffwechsels sein, was zu einer Veränderung der Knochenqualität führt (Bartl R. und Bartl C. 2015).

#### **2.4.2.3 Primäre Osteoporose Typ III: Idiopathische juvenile Osteoporose**

Diese Form ist die seltenste Form der primären Osteoporose und kann bereits im Kindesalter entstehen (Marischler 2014). Die Ätiologie dieses Osteoporose-Typs ist nicht bekannt. Sie tritt 2-3 Jahre vor der Pubertät auf und neigt dazu, sich während der späteren Pubertätsentwicklung spontan zu bessern (Dent 1977). Die Krankheit kann relativ mild aber auch sehr schwer verlaufen (Dent und Friedman 1965). Klinisch zeigen sich anfangs Schmerzen vor allem in Gelenken (z.B. Knöchel) und der unteren Wirbelsäule bis hin zu Wirbelkörperfrakturen und Spontanfrakturen an langen Röhrenknochen (Dent 1977).

#### **2.4.2.4 Sekundäre Osteoporose**

Ursachen für die sekundäre Osteoporose sind andere Grunderkrankungen oder die Einnahme von bestimmten Medikamenten (Bartl und Bartl 2011). Einige verschiedene Autoren geben eine ähnliche Liste von möglichen Grunderkrankungen bzw. Störungen,

welche den Knochenstoffwechsel und somit die Knochenstabilität negativ beeinflussen, an. Zu diesen Ursachen zählen:

- ◆ Überschuss an Glukokortikoiden
  - ◆ Hypogonadismus
  - ◆ Primärer Hyperparathyreoidismus
  - ◆ Schilddrüsenüberfunktion
  - ◆ Lebererkrankungen
  - ◆ Morbus Cushing
  - ◆ Diabetes mellitus
  - ◆ Malabsorption
  - ◆ Osteomalazie
  - ◆ renale Insuffizienz
  - ◆ myeloproliferative Störungen
  - ◆ gastrointestinale Erkrankungen (z.B. Pankreatitis, Magenresektion, Zöliakie, Morbus Crohn)
  - ◆ Neoplasien (z.B. Adenom der Nebenschilddrüse, der Hypophyse oder der Nebennieren)
- (Bartl und Bartl 2011, Jakob 2005, Marischler 2014, Minne et al. 2002, Sözen et al. 2017, Vilela und Nunes 2011)

Primäre und sekundäre Formen können unter Umständen auch kombiniert auftreten (Marischler 2014).

### **2.4.3 Risikofaktoren**

Inzwischen sind viele genetische und erworbene Faktoren bekannt, die für die Entstehung einer Osteoporose verantwortlich sind (Bartl R. und Bartl C. 2015). Durch die Analyse der Risikofaktoren in Kombination mit der Knochendichtemessung kann das Frakturrisiko abgeschätzt werden (Marischler 2014).

#### Unbeeinflussbare Risikofaktoren:

*Familiäre Belastung:* Ca. 60-80 % morphometrischer und anatomischer Parameter des Knochens sind vererbbar (Jakob 2005, Obermayer-Pietsch 2006), ebenso wie Kalziumgehalt

und Knochengometrie (Obermayer-Pietsch 2006). Bisher gibt es noch keinen klinisch anwendbaren genetischen Test zur Beurteilung des Osteoporoserisikos. Das Auftreten einer proximalen Femurfraktur bei den Eltern gilt aber als prognostisch hinweisend bezüglich des genetischen Risikos osteoporotischer Frakturen (Bartl R. und Bartl C. 2015). Osteoporose ist jedoch keine monogenetische Krankheit, sondern eine multigenetische Krankheit, an der zahlreiche Gene beteiligt sind (Obermayer-Pietsch 2006). Bouxsein et al. (2005) fand heraus, dass die Reaktion einer OVX bei Mäusen zwischen den verschiedenen Mäusestämmen variiert, was die Hypothese stützt, dass der postmenopausale Knochenverlust teilweise genetisch reguliert wird.

*Geschlecht und Alter:* Das Alter hat einen eindeutigen Einfluss auf die Knochenfestigkeit (Haffner-Luntzer et al. 2015). Nach dem 35. Lebensjahr beginnt der genetisch festgelegte Knochenabbau. Nach der Menopause kommt es zu einem Abfall der Östrogenproduktion, wodurch bei der Frau das Osteoporose- und Frakturrisiko deutlich zunehmen. Beim Mann nimmt das Risiko für eine Fraktur besonders ab dem 75. Lebensjahr zu. Bei bereits bekannter Fraktur nach dem 45. Lebensjahr verdoppelt sich außerdem das Risiko für eine weitere Fraktur (Bartl R. und Bartl C. 2015).

#### Beeinflussbare Risikofaktoren:

*Bewegungsmangel:* Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung der Osteoporose ist mangelnde körperliche Aktivität (Bartl R. und Bartl C. 2015). Der Knochen passt sich laufend an anliegende Belastungen an, sodass eine erhöhte körperliche Aktivität zur Verbesserung der Knochenmasse beiträgt (Marcus 1991). Dazu zählen auch junge bettlägerige Patienten, die durch den Bewegungsmangel in kurzer Zeit einen großen Anteil ihrer Knochenmasse verlieren (Bartl R. und Bartl C. 2015, Kanis 2002).

*Körpergewicht:* Ab einem Body-Mass-Index (BMI) von unter 21 kg/m<sup>2</sup> erhöht sich signifikant das Risiko für Hüftfrakturen (Sözen et al. 2017) um das 2-fache (Bartl R. und Bartl C. 2015). Im Gegensatz dazu scheint die höhere Östrogenproduktion in den Fettzellen von übergewichtigen Frauen vor Osteoporose zu schützen (Bartl R. und Bartl C. 2015, Bouxsein et al. 2005)

*Knochendichte:* Durch Messung der Knochendichte an Hüfte und Wirbelsäule mittels der DXA-Methode und unter Berücksichtigung anderer Risikofaktoren ist eine sehr genaue Frakturrisikoeinschätzung möglich (Bartl R. und Bartl C. 2015, Kanis 2002).

*Depression:* Depressionen und andere psychische Erkrankungen haben einen Effekt auf den gesamten Körper und somit sekundär auch auf den Knochen. Sie gehen meist mit erhöhtem Stresshormonspiegel, Medikamenteneinnahmen, Appetitmangel, Unterernährung, geringer körperlicher Aktivität einher (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Rauchen:* Nikotin hemmt nicht nur die Östrogenproduktion und fördert den schnelleren Östrogenabbau in der Leber, sondern bewirkt auch ein früheres Eintreten der Menopause und hemmt die Osteoblasten, wodurch das Osteoporoserisiko sogar verdoppelt wird (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Alkoholismus:* Es besteht ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Frakturrisiko (Sözen et al. 2017). Außerdem sind Alkoholiker meist unterernährt und leiden unter Leberschäden, was das Osteoporoserisiko ebenfalls erheblich erhöht (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Kaffeeconsum:* Regelmäßiger Kaffeegenuss (mehr als vier Tassen täglich) kann zur Entstehung der Osteoporose beitragen (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Fehlernährung:* Durch eine eher salzreiche Ernährung und durch eine Aufnahme großer Mengen tierischen Eiweißes kommt es häufig zu einer negativen Kalziumbilanz (Jakob 2005). Ist die ausreichende Aufnahme von Kalzium mit der Nahrung nicht gewährleistet wird Kalzium über PTH aus dem Knochen mobilisiert (Bartl R. und Bartl C. 2015). Bei älteren Menschen spielt dagegen mehr die eiweißarme und die generelle Unterernährung eine große Rolle (Jakob 2005). Außerdem erhöhen auch ein Mangel an anderen Mineralien und Vitaminen, sowie eine erhöhte Aufnahme von Phosphat das Osteoporoserisiko (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Hormone:* Östrogenmangel bei der Frau und Testosteronmangel beim Mann sind wichtige Risikofaktoren der Osteoporoseentstehung (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Medikamente:* Zahlreiche Medikamente schwächen den Knochen. Die wichtigsten Medikamentengruppen sind: Glukokortikoide, Aromatasehemmer, Antidepressiva, Heparine und Phenprocoumon, Antiepileptika, Carbamazepin und Phenytoin, Immunmodulatoren, Ciclosporin und Tacrolimus, Medroxyprogesteronacetat (Depotkontrazeptivum), Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten und Protonenpumpenhemmer (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Erkrankungen:* Wie bereits erwähnt gehen viele verschiedene Erkrankungen sekundär mit Knochenschwund einher (Bartl 2002). Dazu zählen unter anderem Diabetes, Laktoseintoleranz, bestimmte chronisch entzündliche Erkrankungen, Nierenerkrankungen (Jakob 2005), vorangegangene Frakturen im Erwachsenenalter, Hüftfrakturen bei Eltern, Rheumatoide Arthritis (Marischler 2014) uvm.

*Stürze:* Nahezu ein Drittel der älteren Personen stürzt mindestens einmal im Jahr (Bartl R. und Bartl C. 2015). Ältere und gebrechliche Personen sowie Personen, die einen Schlaganfall hatten oder Medikamente einnehmen, sind besonders für Stürze prädisponiert (Sözen et al. 2017), da ihre motorische Leistung reduziert ist, sie verminderte Reaktionen, Blutdruckschwankungen oder Sehschwächen aufweisen (Marischler 2014).

*Vitamin-D Mangel:* Wie oben bereits beschrieben spielt Vitamin D eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Es kann nicht ausreichend über die Nahrung zugeführt werden und kann im höheren Alter auch nicht mehr ausreichend über die Haut synthetisiert werden (Jakob 2005).

#### **2.4.4 Klinik**

Osteoporose ist eine stille Erkrankung, bis sie durch häufig auftretende Frakturen sichtbar wird. Eine kürzlich zugezogene Fraktur an einer größeren Skelettstelle wie Wirbel (Wirbelsäule), proximalem Femur (Hüfte), distalem Unterarm (Handgelenk) oder Schulter bei Erwachsenen über 50 Jahren sollte immer eine Diagnose einer Osteoporose nach sich ziehen (Sözen et al. 2017). Diese Frakturen sind verantwortlich für dauerhafte Behinderungen, beeinträchtigte Lebensqualität und erhöhte Sterblichkeit, mit einer enormen medizinischen und personellen Belastung (Marischler 2014, Sözen et al. 2017). Weitere klinische Symptome können Funktionseinschränkungen durch bereits vorhandene Frakturen, Rückenschmerzen, Rundrücken, Größenverlust (durch Wirbelkompression), Magen-Darm-Beschwerden, Bauchschmerzen, Verstopfung und Appetitlosigkeit sein (Marischler 2014, Sözen et al. 2017). Oft werden die Schmerzen als bohrend und schneidend beschrieben (Marischler 2014). Rippenfrakturen können sekundär zu Lungenerkrankungen und Herzprobleme führen (Sözen et al. 2017). Daher sollte ein besonderes Augenmerk auf die Prävention, die frühzeitige Diagnose und die adäquate Behandlung gelegt werden (Bartl R. und Bartl C. 2015, Sözen et al. 2017).

### 2.4.5 Therapie und Prävention

In den letzten Jahren haben fortschrittliche Diagnostik und Therapie dazu geführt, die Osteoporose besser zu verstehen, leichter und schneller zu diagnostizieren und wirksamer zu behandeln (Bartl R. und Bartl C. 2015). Bei sekundären Formen sollte natürlich eine Behandlung der Grunderkrankung im Vordergrund stehen (Marischler 2014).

Beim Management der Osteoporose werden nach Bartl (2008) drei Strategien verfolgt:

- ◆ Primärprävention: Maßnahmen zur Verhinderung der Krankheitsentstehung
- ◆ Sekundärprävention: Maßnahmen zur Verhinderung von Frakturen
- ◆ Tertiärprävention: Maßnahmen zur Verhinderung von Folgefrakturen

Sözen et al. (2017) hat die Hauptziele der Therapie bei osteoporotischen Patienten zusammengefasst:

- ◆ Vorbeugung von Knochenbrüchen durch verbesserte Knochenstärke und Verringerung des Sturzrisikos
- ◆ Linderung der klinischen Symptome von Knochenbrüchen und Knochenveränderungen
- ◆ Aufrechterhaltung der normalen körperlichen Funktion

Zu den allgemeinen und einfachen präventiven Maßnahmen, die die Knochenstabilität erhöhen und somit die Frakturrate reduzieren, zählen: der Rauch- und Alkoholverzicht, regelmäßige körperliche Bewegung, die Verwendung adaptierter Hilfsmittel (Gehstützen, Hüftprotektoren), die Beseitigung von Stolperfallen im Haushalt, der empfohlenen Zufuhr von Vitamin D, die Aufnahme von täglich ausreichend Kalzium, das Vermeiden von Untergewicht (BMI < 20 kg/m<sup>2</sup>) und die Vermeidung bestimmter für den Knochen schädigende Medikamente (Bartl R. und Bartl C. 2015).

#### Basistherapie:

In allen Stadien der Osteoporose ist eine Basistherapie mit ausreichender körperlicher Bewegung, spezielle Gymnastik (z.B.: Wirbelsäulengymnastik) sowie Kalzium- und Vitamin-D-Zufuhr obligatorisch (Bartl und Gradinger 2009). Vor allem die körperlichen Aktivitäten

steigern die Knochenmasse, stärken die Muskulatur, verringern dadurch das Sturzrisiko und verbessern den physischen und psychischen Allgemeinzustand der Patienten erheblich. Die Kalziumzufuhr von mindestens 1000 mg über eine kalziumreiche Nahrung, sowie 1000-2000 IE Vitamin D und 1 g/kg KGW Protein wird empfohlen (Bartl R. und Bartl C. 2015, Marischler 2014).

#### Medikamentöse Therapie:

Für die medikamentöse Therapie der Osteoporose sind heute bereits eine Vielzahl effektiver Substanzen verfügbar. Alle haben eine Optimierung des Knochenbaus, eine Steigerung der Knochenmasse, eine Verbesserung der Knochenqualität und eine Reduktion des Frakturrisikos zum Ziel (Bartl R. und Bartl C. 2015). Welches Medikament und ab wann eine medikamentöse Therapie Sinn ergibt hängt von der genauen Analyse des Frakturrisikos in Kombination mit der Knochendichtemessung ab (Marischler 2014).

Die in der EU empfohlenen Präparate sind streng nach den Richtlinien der evidenzbasierten Medizin festgelegt worden. Als geeignetste Medikamente werden Bisphosphonate (BP), Raloxifen, Strontium-Ranelat, Peptide der PTH-Familie und selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs) angesehen (Bartl 2008, Bartl und Gradinger 2009). Medikamente wie Calzitonin, Etidronat, Vitamin-D-Derivate und Clodronat werden nur noch als zweite Wahl verwendet (Bartl und Gradinger 2009).

Bei den meisten Patienten ist eine Langzeitbehandlung von Nöten, es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass eine Kombinationsbehandlung mit zwei oder mehr verschiedenen Medikamenten oder die aufeinanderfolgende Anwendung von Therapeutika einen Nutzen zur Verringerung des Frakturrisikos hat (Sözen et al. 2017). Der Nachteil aller nachfolgenden beschriebenen Medikamente besteht darin, dass die Stimulierung bzw. Hemmung einer Zelllinie die gleichen Veränderungen in den anderen, funktionell entgegen gerichteten Zelllinien verursachen kann (Bartl 2008).

*Bisphosphonate (BP):* Die stickstoffhaltigen Bisphosphonate gelten heute als der „Goldstandard“ in der Behandlung der Osteoporose (Bartl 2008) und sind die am häufigsten verwendeten Medikamente in diesem Zusammenhang (Sözen et al. 2017). Zu ihnen zählen folgende Substanzen: Etidronat, Clodronat, Pamidronat, Alendronat, Risedronat, Ibandronat und Zoledronat (Bartl 2008). Ihre Wirkung beruht auf einer Hemmung der Osteoklastenaktivität sowie auf einer Apoptosesteigerung (Bartl 2008, Marischler 2014).

Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Knochendichte und einer Verringerung des Risikos für Frakturen (Marischler 2014). Eine jährliche Infusion mit 5 mg Zoledronat konnte über einen Zeitraum von drei Jahren eine signifikante Senkung des Frakturrisikos bei vertebrale (70 %) und extravertebrale Frakturen (bis zu 40 %) erzielen (Bartl 2008). Neben dem genannten Zoledronat gelten auch Alendronat und Risedronat als gut verträgliche Medikamente (Marischler 2014). Nebenwirkungen können u.a. gastrointestinale Beschwerden bei oraler Einnahme und die „Akute-Phase-Reaktion“ bei i.v. Gabe auftreten (Bartl, 2008).

*Raloxifen und Tamoxifen:* Raloxifen und Tamoxifen zählen zu den selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs). Sie binden sich an den Östrogenrezeptor und können dabei je nach Zielgewebe als Östrogenagonist oder –Antagonist wirken (Bartl 2008, Seidlová-Wuttke 2010). Zugelassen sind sie für Therapie der postmenopausalen Osteoporose (Marischler 2014), wo es durch die Verhinderung des Knochenverlustes und Reduzierung des vertebrale Frakturrisikos wirkt. Zusätzlich wird das Brustkrebsrisiko um etwa 60 % gesenkt (Bartl 2008). Neben der Wirkung im Knochen und der Brustdrüse, wirken die SERMs leider auch im Hypothalamus, wo sie die postmenopausalen Beschwerden verstärken können (Seidlová-Wuttke 2010).

*Peptide der PTH - Familie:* Die neueste und teuerste Therapie stellt zurzeit die Therapie mit Peptiden der PTH-Familie dar (Marischler 2014). Diese Medikamente haben einen osteoanabolen Effekt und bewirken eine Steigerung der Anzahl und Aktivität der Osteoblasten, ebenso wie eine Verbesserung der Knochenmasse und der Mikroarchitektur des Knochens (Bartl 2008). Durch die aufwendige Verabreichungsform (tägliche s. c. Injektionen) und die hohen Kosten, wird diese Behandlung nur bei Patienten mit schwerer manifester Osteoporose verwendet (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Strontium-Ranelat:* Strontium-Ranelat wirkt durch Reduktion des Knochenabbaus durch Osteoklasten und bewirkt eine Steigerung des Knochenaufbaus durch Osteoblasten (Bartl 2008, Marischler 2014). Es reduziert das Risiko für vertebrale und extravertebrale Frakturen bei postmenopausalen Frauen, unabhängig von Alter oder Schweregrad der Grunderkrankung (Sözen et al. 2017). Schwerwiegende Nebenwirkungen und die umständliche tägliche Einnahme sind Gründe, weswegen dieses Präparat nur noch als Reservemedikament verwendet wird (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Denosumab (humaner monoklonaler Antikörper gegen RANKL):* Denosumab ist zur Behandlung von postmenopausalen Frauen mit hohem Frakturrisiko, Patienten mit osteoporotischen Frakturen in der Vorgeschichte oder Patienten, die andere verfügbare Osteoporosetherapien nicht vertragen haben, zugelassen (Bartl R. und Bartl C. 2015, Sözen et al. 2017). Durch die Bindung an RANKL hemmt Denosumab die Proliferation, Funktion und das Überleben der Osteoklasten (Marischler 2014). Die Verabreichung von 60 mg erfolgt halbjährlich durch s. c. Injektionen (Bartl R. und Bartl C. 2015).

*Hormonersatztherapie (HRT):* Die Hormonersatztherapie wird bei älteren Frauen nur noch bei Vorliegen postmenopausaler Beschwerden und bei fehlendem Brustkrebsrisiko in Erwägung gezogen (Bartl 2008). Bei jüngeren Frauen mit erhöhtem Frakturrisiko kann diese Therapie zur Prävention und Therapie der Osteoporose verwendet werden (Bartl R. und Bartl C. 2015). Bei der Behandlung mit Hormonen müssen natürlich mögliche metabolische Veränderungen in Abhängigkeit von den verwendeten Substanzen, der Applikationsweise und der Dauer beachtet werden (Kuhl 1997).

## **2.5 Stammzellen**

Das Knochenmark (BM) enthält eine kleine Population von mesenchymalen Stammzellen, die sich von der Population der hämatopoetischen Stammzellen, aus denen Blutkörperchen hervorgehen, unterscheidet (Clarke 2008).

### **2.5.1 Hämatopoetische Stammzellen**

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind durch ihre Fähigkeit definiert, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren, um alle Blutzelllinien zu bilden (Hämatopoese). Diese multipotenten Zellen besetzen bestimmte Stellen in der Mikroumgebung des Knochenmarks (Birbrair und Frenette 2016). Sie tragen jedoch nicht zur physiologischen Regeneration von Muskel-, Knochen-, Knorpel- oder Epithelgewebe bei (Odörfer et al. 2011).

### 2.5.2 Mesenchymale Stammzellen

Neben HSCs enthält das Knochenmark (BM) ebenfalls mesenchymale Stammzellen (MSCs) (Bernardo et al. 2009). Mesenchymale Stammzellen sind Stromazellen, die leicht aus erwachsenem Knochenmark- und Fettgewebe, aber auch aus der Nabelschnur gewonnen werden können (Rankin 2012). Diese Zellen wurden erstmals vor mehr als 40 Jahren als eine Population adhärenter Zellen aus dem Knochenmark beschrieben, welche nicht phagozytisch waren, eine Fibroblasten-artiges Aussehen zeigten und sich *in vitro* in Knochen, Knorpel, Fettgewebe, Sehnen und Muskel differenzieren konnten (Bernardo et al. 2009, Clarke 2008). Später wurden sie auch in einer Vielzahl von anderen menschlichen Geweben, einschließlich Periost, Muskel- und Bindegewebe, Perichondrium, Fettgewebe, fötales Gewebe, Lunge, Knochenmark, Leber, Milz, Fruchtwasser und Plazenta festgestellt (Bernardo et al. 2009).

Diese sich selbst erneuernde multipotenten Vorläuferzellen werden auch Skelettstammzellen (SSC) genannt und stellen ein Reservoir knochenbildender Zellen für das Knochenwachstum während der Entwicklung, der Knochenmodellierung und dem Knochenumbau dar (Bianco und Robey 2015). Skelettstammzellen sind perivaskuläre Zellen (adventitielle Retikularzellen, ARCs), die sich an der Außenseite der Endothelauskleidung von Knochenmark-Sinusoiden befinden (Bianco und Robey 2015).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuch

##### 3.1.1. Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Verfahren in diesem Projekt wurden gemäß den geltenden Richtlinien für Tierpflege und Tierschutz durchgeführt und von den Ethikkommissionen der Veterinärmedizinischen Universität Wien und der örtlichen Behörden genehmigt.

Für den Versuch wurden ca. 120 weibliche Wildtyp (WT) und Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout-Mäuse ( $\alpha$ ERKO) C57BL/6 Mäuse verwendet. Diese wurden am Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik der Veterinärmedizinischen Universität Wien bei 22-24 °C mit einem 12 h hell/12 h dunkel-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und normalem Mausfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Alle Versuche wurden an 16 Wochen alten weiblichen Nachkommen heterozygoter Verpaarungen durchgeführt.

##### 3.1.2. Versuchsaufbau

Wie oben beschrieben, war es das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob die protektive Estrogenwirkung im Achsenskelett von Mäusen durch Estrogenrezeptoren in hämatopoetischen oder mesenchymalen Zellen vermittelt wird. Dazu wurde ein Rekonstitutionsmodell verwendet, das einen komplexen Versuchsaufbau notwendig machte. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 1 dargestellt.

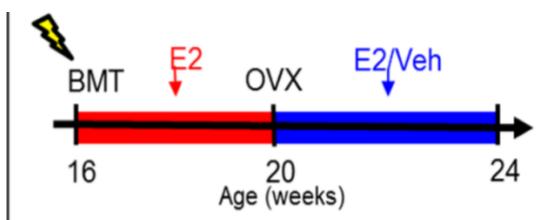


Abbildung 1. Versuchsaufbau. Alle bestrahlten Mäuse wurden mit physiologischen Dosen Estradiol (E2, 10 $\mu$ g/kg s.c. in Vehikel (Veh) 5x pro Woche) während der 4-wöchigen Erholungspause nach der Transplantation (BMT) behandelt und im Alter von 20 Wochen ovariectomiert (OVX) (Streicher et al. 2017).

Die Tiere wurden in 12 Gruppen zu je 9-10 Tieren eingeteilt. Zwei Gruppen (Gruppe 1 und 2 in Tabelle 1) von Tieren, die bereits vor der Bestrahlung bzw. Ovariectomie mit 16 Wochen

getötet wurden, dienten als Baseline Kontrolle, um einen Ausgangspunkt für alle weiteren experimentellen Maßnahmen zu haben. Im Alter von 16 Wochen wurden jeweils 2 Gruppen der weiblichen WT- und  $\alpha$ ERKO-Mäuse letal bestrahlt und Knochenmark transplantiert. Nach letaler Bestrahlung erhielten alle Mäuse eine Östrogensersatztherapie mit 17 beta ( $\beta$ )-Östradiol (E2). Nach einer Erholungsphase von vier Wochen wurden alle bestrahlten Mäuse im Alter von 20 Wochen ovariectomiert. Anschließend erhielten die Mäuse entweder nur Benzylbenzonat/Ricinusöl (B/R) Vehikel oder wieder Estradiol. Um die Auswirkungen des Ovariectomie-induzierten Estrogenmangels auf den Knochen zu testen, wurden zusätzlich Gruppen von nicht-bestrahlten WT- und  $\alpha$ ERKO-Mäusen ovariectomiert bzw. scheinoperiert und danach mit physiologischen Dosen von Estradiol substituiert. Alle Tiere wurden an den Tagen 8 und 6 vor der Sektion subkutan mit dem Fluoreszenzmarker Calcein (Sigma-Aldrich Inc., Saint-Louis, USA, 20 mg /kg KGW in 1,4 % NaHCO<sub>3</sub>) injiziert. Dieser dient zur späteren Fluoreszenzanalyse des neu gebildeten Knochens.

Gruppennummer	Empfänger	Spender	Operation/ Behandlung	VE 16w	VE24w
1	Wildtyp	-	Baseline	x	
2	$\alpha$ ERKO	-	Baseline	x	
3	Wildtyp	-	SHAM + VeH		x
4	Wildtyp	-	OVX +VeH		x
5	Wildtyp	-	OVX + E2		x
6	$\alpha$ ERKO	-	SHAM + VeH		x
7	$\alpha$ ERKO	-	OVX + VeH		x
8	$\alpha$ ERKO	-	OVX + E2		x
9	Wildtyp	$\alpha$ ERKO	OVX + VeH		x
10	Wildtyp	$\alpha$ ERKO	OVX + E2		x
11	$\alpha$ ERKO	Wildtyp	OVX + VeH		x
12	$\alpha$ ERKO	Wildtyp	OVX + E2		x

*Tabelle 1.* Gruppeneinteilung der Versuchstiere. Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout Mäuse ( $\alpha$ ERKO), scheinoperiert (SHAM), Vehikel (VeH), Ovariectomie (OVX), Östradiol (E2), Versuchsende (VE); Baseline Gruppen sind unbestrahlt und unbehandelt

Dieser komplexe Versuchsaufbau beruht auf folgenden Überlegungen: Durch die Bestrahlung mit 10 Gy kommt es zu einer weitgehenden Zerstörung von Eizellen im Ovar. Dadurch entsteht ein Östrogenmangel, der ähnlich dem einer Ovariectomie ist. Nachdem es bei der Maus ca. 4 Wochen dauert, bis sich nach einer Knochenmarkstransplantation die Hämatopoese wieder normalisiert hat, müssen die bestrahlten Tiere bis zum eigentlichen Versuchsbeginn mit 20 Wochen über 4 Wochen mit physiologischen Dosen von Estradiol supplementiert werden. Ansonsten ließen sich die Auswirkungen des Östrogenmangels auf das Skelett nicht vergleichend mit den nicht-bestrahlten Gruppen untersuchen. Die Ovariectomie auch von bestrahlten Tieren zum Zeitpunkt 20 Wochen ist deshalb notwendig, weil im Ovar – stimuliert durch die erhöhten Gonadotropinspiegel - immer noch Androgene produziert werden, die das Ergebnis verfälschen könnten. Dieser Punkt ist besonders relevant für ERKO-Mäuse, nachdem weiblichen ERKO-Mäusen aufgrund des Wegfalls der ER $\alpha$ -bedingten Feedback-Inhibition durch sehr hohe Spiegel von im Ovar produzierten Androgenen charakterisiert sind.

#### *Letale Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation (BMT)*

Die Bestrahlung und Knochenmarkstransplantationen wurden wie ausführlich in der Publikation von Streicher et al. (2017) beschrieben durchgeführt.

Kurz zusammengefasst erhielten alle Mäuse eine Einzeldosis von 10 Gray unter Verwendung eines Linearbeschleunigers (6 MV, Primus, Siemens), der an der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorhanden ist. Vier Stunden nach der Bestrahlung erhielten die Empfänger intravenös über die Schwanzvene  $4 \times 10^6$  unfraktionierte Knochenmarkszellen (BMC), die aus Femora, Tibien und Humeri von Spendertieren isoliert worden waren. Durch die letale Bestrahlung und die anschließende Rekonstitution mit unfraktioniertem Knochenmark wird das hämatopoetische System, nicht aber das mesenchymale, wiederhergestellt. In bestrahlten WT-Mäusen, die mit  $\alpha$ ERKO-Mäuseknochenmark rekonstituiert wurden, sind alle Mesenchymzellen die Zellen des Empfängers und exprimieren einen funktionierenden ER $\alpha$ , wohingegen hämatopoetische Zellen Spenderzellen sind und keinen ER $\alpha$  aufweisen. Umgekehrt exprimieren in bestrahlten  $\alpha$ ERKO-Mäuse, die mit WT-Knochenmark rekonstituiert wurden, hämatopoetische Zellen einen funktionierenden ER $\alpha$ , wohingegen mesenchymalen Zellen ER $\alpha$  fehlt (Streicher et al. 2017).

Die Antibiose wurde eine Woche nach der Bestrahlung fortgesetzt. Die Mäuse wurden jeden Tag für mindestens zehn Tage nach der Transplantation gewogen, um den Gesundheitsstatus zu kontrollieren.

#### *Isolierung von Knochenmarkszellen (BMC) zur Transplantation*

Wie bei Streicher et al. (2017) beschrieben wurden Knochenmarkszellen aus Femuren, Tibias und Humeri von Spendertieren isoliert. Nachdem die Spendertiere getötet wurden, wurden die Knochen dieser direkt präpariert. Die Knochen wurden gereinigt und in zwei Hälften geschnitten. Die Knochen wurden mit PBS (pH 7,4, Lonza) gespült, um die Knochenmarkszellen zu ernten. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4 °C mit 300 g zentrifugiert, resuspendiert, gezählt und bis zur Transplantation bei 4 °C aufbewahrt. Um den Grad des Chimärismus im Knochenmark zu analysieren, wurde im Rahmen von früheren Versuchen eine FACS (fluorescence-activated cell sorting) - Analyse der Knochenmarkszellen durchgeführt.

#### *Substitutionstherapie mit Estradiol*

Auf Grund der durch die Bestrahlung induzierten Östrogeninsuffizienz, erhielten nach der Bestrahlung alle Mäuse eine Östrogensatztherapie mit 17 beta ( $\beta$ )-Östradiol (E2, Sigma-Aldrich Inc. Saint-Louis, USA) in der Dosierung 10 Mikrogramm/kg 5-mal pro Woche in Kombination mit einem Vehikel (VeH). Als Vehikel wurde Benzylbenzoat/Ricinusöl (4 + 1 v/v, B/R) verwendet (Streicher et al. 2017). Diese Dosierung entspricht nahezu einem physiologischen Östrogensatz und dient dazu, die indirekte Wirkung der Bestrahlung auf den Knochen zu kontrollieren. Die Freisetzung von E2 aus dem B/R-Vehikel erfolgt protrahiert, so dass es durch die Behandlung 5mal pro Woche zu mehr oder weniger konstanten Hormonspiegeln kommt.

#### *Ovariectomie (OVX)*

Alle Tiere erhielten perioperativ eine Antibiotika-Prophylaxe mit Enrofloxacin (Baytril, 2,5 %, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) in der Dosierung 7,5 mg/kg KGW subkutan. Zur Schmerzausschaltung wurde eine halbe Stunde vor und fünf Stunden postoperativ

Metamizol-Natrium (Novalgine-Tropfen, Sanofi-Aventis, Wien, Österreich) in einer Dosierung von 200 mg/kg KGW beziehungsweise  $\frac{1}{2}$  bis 2 Tropfen einer 1:4 verdünnten Lösung pro Tier *per os* verabreicht. Die Allgemeinanästhesie erfolgte mittels Isofluran (Baxter GmbH, Wien, Österreich).

Die Operation wurde an der Veterinärmedizinischen Universität Wien in Bauchlage mit Zugang vom Rücken durchgeführt. Nach Entfernung des Felles und Desinfektion der Haut wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt gesetzt. Das Ovar wurde nach Vorverlagerung mittels Elektrokauter abgesetzt. Mittels zwei U-Nähten oder zwei Klammern wurde die Wunde verschlossen und mit antiseptischem Wundspray (Silver Aluminium Aerosol, Henry Schein, Inc., Melville) versorgt. Insgesamt betrug die Dauer des Eingriffes in etwa zehn Minuten pro Tier.

In früheren Versuchen wurden auch bereits männliche Tiere verwendet, dort ist es allerdings so, dass die Testosteron-Defizienz weniger ist nach der Bestrahlung, da die Leydigzellen resistenter als die Eizellen sind (Erben 02.06.2020).

#### *Scheinoperation (SHAM)*

Bei einem Teil der Tiere, welche als Kontrollgruppe dienten, wurden die Ovarien nicht entfernt. Dabei wurde das Abdomen zwar eröffnet, ein Zug an den Ovarien ausgeübt, aber jene nicht entfernt. Das restliche Prozedere wurde genau gleich wie bei den gonadektomierten Tieren durchgeführt.

Alle Tiere wurden postoperativ 24 Stunden überwacht, die Käfige wurden auf Wärmematten gestellt und die Tiere einzeln gehalten. Sieben Tage nach der Operation wurden die Nähte bzw. die Hautklammern entfernt.

### **3.1.3. Euthanasie und Probengewinnung**

Nach der doppelten Calcein-Markierung, für die spätere Fluoreszenzanalyse des neu gebildeten Knochens, wurden alle Mäuse vier Wochen nach der Ovariectomie/Scheinoperation im Alter von 24 Wochen durch Ausbluten aus der

abdominalen Vena cava unter Anästhesie mit Ketamin/Xylazin (beides Dr.E.Graeb AG, Bern, Schweiz, 67/7 mg/kg i. p.) getötet.

### **3.2 Aufbereitung der Knochen**

Die Wirbelkörper (erster Lendenwirbel) wurden entnommen und nach Entfernung der Haut, Muskeln und Sehnen in Ethanol 70 % aufbewahrt.

#### **3.2.1 Einbettung der nicht entkalkten Knochen**

Die Einbettung der Knochen wurde nach der Methode nach Erben (1997) durchgeführt. Die Fixierung erfolgte für 24 Stunden in Paraformaldehyd (PFA), danach wurden die Knochen in Histokörbchen bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung in Ethanol 70 % aufbewahrt. Im Anschluss wurden die fixierten Knochen ebenfalls bei 4 °C nach folgendem Protokoll auf einem Magnetrührer dehydriert und infiltriert:

Ethanol 96 %	4 Tage
Isopropanol 100 % I	2 Tage
Isopropanol 100 % II	2 Tage
Xylol I	3 Tage
Xylol II	4 Tage
Methylmethacrylat (MMA) I	3 Tage
MMA II	3 Tage
MMA III	4 Tage

Die MMA-Lösungen wurden nach diesem Protokoll angemischt:

MMA I

60 ml Methymethacrylat

35 ml Butylmethacrylat

5 ml Methylbenzoat

1,2 ml Polyethylenglykol 400

MMA II

MMA I - Lösung

0,4 g Benzoylperoxid (BPO)

MMA III

MMA I – Lösung

0,8 g BPO

Nach der Infiltration wurden die Knochen in Rollrandgläsern in MMA III eingebettet.

Die Polymerisationslösung bestand aus:

frisch angesetzter MMA III – Lösung

400 µl N,N-Dimethyl-p-Toluidin

Die eingebetteten Knochen wurden im Anschluss für eine Nacht in einer Klimakammer gelagert. Zur Polymerisation am darauffolgenden Tag wurde ein spezielles Temperaturprogramm abgerufen.

### **3.2.2 Trimmen der Blöcke**

Zur Vorbereitung auf das Schneiden mussten die MMA-Blöcke mit einem Hammer aus dem Glas geschlagen werden und die Blöcke anschließend getrimmt werden. Mit Hilfe einer Säge wurde der Wirbel vom restlichen Block so abgetrennt, dass er danach mit dem

Wirbelkörper nach oben so gerade wie möglich wieder angeklebt werden konnte. Nach ca. 30 min Zeit zum Trocknen wurde mittels Säge und verschiedenen feinen Feilen der Wirbel in Tropfenform (mittig mit ca. 3 mm Abstand zu jeder Seite) zurechtgeschnitten und möglichst kantenlos gefeilt.

### 3.2.3 Schneiden mittels Mikrotoms

Anschließend an das Trimmen wurden die Blöcke auf einem motorbetriebenen Hartschnitt-Schlittenmikrotom mit Hartmetallmesser (Wolframcarbid-Schneide) mit einer Schnittdicke von 3 Mikrometer frontal genau mittig des Wirbelkörpers geschnitten. Während des Schneidens wurden die Schnitte mittels Schneidflüssigkeit (0,1 % v/v wässriger Lösung von Tween 20, Sigma-Aldrich Inc. Saint-Louis, USA) feucht gehalten. Ohne die Schnitte austrocknen zu lassen wurden jeweils zwei auf einen mit 3-Aminopropyl-triethoxy-silane (APES)-beschichteten Objektträger überführt, der bereits mit Probennummer, Angabe des Knochens (L1) und einer fortlaufenden Zahl von jeweils 1-8 pro Block versehen war. Somit wurden von jedem Block acht Objektträger mit jeweils zwei Schnitten angefertigt.

Anschließend wurden die Schnitte mit 40%igem Ethanol gestreckt und mit einer Polyethylen-Folie bedeckt und mittels Objektträgerpresse bei 42 °C im Wärmeschrank für mindestens zwei Tage getrocknet. Danach wurden die Polyethylenfolien entfernt und jeweils zwei Objektträger für die Färbungen und die Fluoreszenzanalyse vorbereitet.

Protokoll für die Behandlung der Objektträger mit 3-Aminopropyl-triethoxy-silane (APES):

Reinigung der Objektträger in Aceton	10 Minuten
Leitungswasser	abspülen
in Aceton inkubieren	5 min
in APES Lösung inkubieren	5 min
mit A.dest. waschen	2x

Nach Trocknung der Objektträger im Umluftschrank bei zirka 40 °C für mindestens zwei Tage werden die behandelten Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

Protokoll zur Herstellung der APES Lösung:

4 ml APES (Sigma-Nr. A 3648)

200 ml Aceton

### **3.3 Eindecken mit Fluoromount für die Fluoreszenzanalyse**

Jeweils zwei Objektträger pro Präparat wurden mit SERVA® Fluoromount, ein nicht-fluoreszierendes Einschlussmedium für die Mikroskopie auf Polyacrylatbasis in Xylol, für die nachfolgende Fluoreszenzanalyse eingedeckt. Dabei wurden zwei kleine Tropfen der Flüssigkeit vorsichtig auf die Schnitte gegeben und anschließend mit leichtem Druck mit Hilfe eines Stabes ein Deckglas draufgedrückt. Anschließend wurde auf jeden Objektträger zum Beschweren zusätzlich ein kleiner Block gelegt. Um die Schnitte vor Licht zu schützen wurden sie unter Alufolie für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.4 Färbungen**

Die verschiedenen Zell- und Gewebelemente nehmen Farbstoffe mit unterschiedlicher Affinität auf und können dadurch besser unterschieden werden (Welsch et al. 2018).

#### **3.4.1 Von Kossa/McNeal Färbung**

Die Von-Kossa-Färbung kommt in der Histologie häufig zum Einsatz, um anomale Calciumablagerungen im Körper zu erfassen. Das Prinzip dieser Färbung basiert auf der Umwandlung von Calcium- in Silbersalze: Die mit den Phosphaten verbundenen Calciumionen werden durch Silberionen aus der Silbernitratlösung ersetzt. Durch chemische Reduktion entstehen dann metallische Silberniederschläge (braun/grau). Eine McNeal-Gegenfärbung erlaubt die Beurteilung des neu gebildeten Knochens und eine detaillierte Beurteilung zellulärer Ab- und Aufbaumechanismen.

Zwei der jeweilig angefertigten Objektträger mit den MMA-Knochenschnitte wurden mittels

der Kossa/McNeal Färbung für die Histomorphometrie gefärbt.

Zum Herauslösen des Kunststoffes wurde folgendes Protokoll verwendet:

Methyloxyethylacetat I	20 min
Methyloxyethylacetat II	20 min
Methyloxyethylacetat III	20 min
70 % Ethanol	5 min
40 % Ethanol	5 min
A.-dest.	5 min

Zum Färben der Knochenschnitte wurde anschließend folgendes Protokoll verwendet:

5 % Silbernitrat (im Dunkeln)	5-10 min
Abspülen in A.-dest.	3 x
Natriumcarbonat/Formaldehyd-Lsg.	2 min
Abspülen mit Leitungswasser	1x
Farmer`s Reducer	30 sec
Fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen in A.-dest.	1 x
5 % Tetrachrom-Lösung	20-60 min
Spülen in A.-dest.	2 x
Isopropanol	2 x kurz
Xylol	2 x 5 min

Anschließend wurden die Objektträger in DePeX (Fa. SERVA) eingedeckt.

Die jeweiligen Lösungen wurden nach folgenden Protokollen hergestellt:

*Silbernitratlösung:*

5 g	Silbernitrat
100 ml	A.dest

*Natriumcarbonat-Vorratslösung*

67 g	Natriumcarbonat
Ad 1000 ml	A.dest

*Natriumcarbonat/Formaldehyd-Gebrauchslösung*

150 ml	Natriumcarbonat-Vorratslösung
50 ml	Formaldehydlösung 38 %

*Farmer's Reducer*

200 ml	10%ige Natriumthiosulfat-Lösung
10 ml	10%ige Kaliumferricyanid-Lösung

*Tetrachrom-Stammlösung*

0,5 g	Methylenblau-Chlorid (= Methylenblau f.d. Mikroskopie, $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot H_2O$ )
0,8 g	Azur-A-Eosinat
0,1 g	Methylen Violett (Berntsen)
250 ml	Methanol z.S.
250 ml	Glycerin z.S.

Dies wurde in einer Flasche gemischt und 12 h lang bei 50 °C in den Wärmeschrank gestellt. Danach wurde die Wärme auf 37 °C reduziert und die Flasche für weitere drei Tage darin stehen gelassen.

*Tetrachrom-Gebrauchslösung (5%)*

10 ml	Tetrachrom-Stammlösung
190 ml	A.dest.

### 3.4.2 Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Färbung

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase ist ein Mannosehaltiges Metallo-Glykoprotein, welches als Zellmembrankomponente oder an intrazellulären Organellen von Osteoklasten, Leukozyten, Makrophagen, Plazentazellen sowie Erythrozyten sitzt. Außerdem wurde TRAP-Aktivität in humanen embryonalen Lungenfibroblasten nachgewiesen.

Durch zelluläre Prozesse kann die TRAP freigesetzt werden, was im Zusammenhang mit dem physiologischen Knochenumbauprozess und dem Calciumhaushalt steht.

Unter dem Mikroskop stellen sich die Osteoklasten rot/pink dar, der Rest des Knochens blau. Durch diese spezielle Färbung kann dieses Enzym in MMA-Knochenschnitten nachgewiesen werden. Somit stellt die TRAP einen Marker für Osteoklasten-abhängige Knochenresorption dar, was vor allem bei pathologischen Prozessen, wie beispielsweise der Osteoporose, eine wichtige Rolle spielt.

Zum Entplasten wurde folgendes Protokoll verwendet:

Methyloxyethylacetat I	20 min
Methyloxyethylacetat II	20 min
Methyloxyethylacetat III	20 min
Aceton	5 min
Aceton	5 min
A.-dest.	5 min

A.-dest. 5 min

Zum Färben wurde anschließend folgendes Protokoll verwendet:

Inkubation mit Acetat-Puffer 0,2M pH 5,0 20 min  
(ca. 100 ul/Schnitt) in feuchter Kammer bei RT

Inkubation mit TRAP-Reagenz (ca. 100 ul/Schnitt) 3 h  
in feuchter Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank

A.-dest. abspülen

Mit Hämatoxylin (Hämalaun) nach Mayer's gegenfärben 2-3 min

Leitungswasser spülen

Fließendes Leitungswasser 5-10 min

Eingedeckt wurden die Schnitte anschließend in Kaiser's Glyceringelatine (Merck KG, Darmstadt, Deutschland) und für ca. 24 h bei Raumtemperatur mit einem Gewicht beschwert getrocknet.

Die jeweiligen Lösungen wurden nach diesen Protokollen hergestellt:

*TRAP-Reagenz*: wurde jeweils frisch angesetzt und nur für eine Stunde verwendet.

Naphtol AS-MX phosphate disodium salt: Naphtol 0,5 mg/ml Acetat Puffer

Fast red TR salt: Fast red 1,1 mg/ml Acetat Puffer

Das Volumen des Acetat-Puffers und die Menge der Reagenzien wurden dabei jeweils neu berechnet.

*Hämatoxylin nach Mayer (Hamalaun)*:

Hamatoxylin 1 g in

A.dest. 1000 ml lösen, dann

Natrium-Jodat (NaJO <sub>3</sub> )	0,2 g	und
Kalilaun (Aluminiumkaliumsulfat x 12H <sub>2</sub> O)	50 g	hinzu und gut rühren, dann
Chloralhydrat (zur Konservierung, Lsg. Blau-violett)	50 g	dann
Zitronensäure (Lsg. Färbt sich rötlich-violett)	1 g	zugeben

Die Lösung muss filtriert werden und ist gut verschlossen lange haltbar.

*1M TRIS-Stammlösung pH 9,0:* Unter dem Abzug mit Schutzbrille ansetzen!

TRIS-Base	121 g	in ca.
A.dest.	800 ml	mit
Konzentrierte HCl	pH 9,0	einstellen, mit
A.dest.	auf 1000 ml	auffüllen

### 3.5. Auswertung

#### 3.4.1 Analyse der nach TRAP gefärbten Schnitte

Mittels eines Mikroskops der Marke Zeiss (Axioskop 2 plus) wurden die Präparate unter 20-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zeichenbrettes (Drawing Board VI, GTCO CalComp.) und des Messprogrammes Osteomeasure XP v. 2.1.0.3. (OsteoMetrics) beurteilt. Dabei wurden je nach Größe des zu messenden Knochens 4-6 Messfelder gelegt. Zuerst wurden in jedem Messfeld die trabekulären Anteile des Knochens, gefolgt von den Osteoklasten und deren Oberfläche eingezeichnet. Anschließend wurden von der Software folgende Parameter ermittelt:

- ◆ Osteoklastenoberfläche zur Knochenoberfläche (Oc.S/BS)
- ◆ Anzahl der Osteoklasten zur gesamten Messfläche (N.Oc/T.Ar)
- ◆ Anzahl der Osteoklasten zur Knochenfläche (N.Oc/B.Pm)

### 3.4.2. Analyse der nach Kossa/McNeal gefärbten Schnitte

Die Analyse der nach Kossa/McNeal gefärbten Schnitte wurde ebenfalls mittels des Mikroskops der Marke ZEISS (Axioskop 2 plus) bei 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurden in jedem Messfeld der schwarz gefärbte trabekuläre Anteil des Knochens mit Hilfe des Zeichenpads (Drawing Board VI, GTCO CalComp.) nachgefahren. Anschließend wurden die Bereiche des Osteoids, sowie die Oberfläche der Osteblasten markiert. Mit Hilfe des Messprogrammes Osteomeasure XP v. 2.1.0.3. (OsteoMetrics) konnten dadurch folgende Parameter gemessen werden:

- ◆ Gesamte Fläche des trabekulären Knochens
- ◆ Gesamter Umfang des trabekulären Knochens
- ◆ Anzahl der Knochen trabekel
- ◆ Gesamte Messfläche (T.Ar)
- ◆ Knochenfläche (B.Ar)
- ◆ Trabekelzahl (Tb.N)
- ◆ Trabekeldicke (Tb.Th)
- ◆ Trabekuläre Separation (Tb.Sp): durchschnittlicher Abstand zweier benachbarter Trabekel
- ◆ Osteoiddicke (O.Th)

Außerdem wurden folgende Verhältnisse daraus berechnet:

- ◆ BV/TV (Bone volume/total Volume)
- ◆ OV/TV (Osteoid volume/total Volume)
- ◆ OV/BV (Osteoid volume/bone volume)
- ◆ M.d.V/TV (mineralisiertes Volumen/Total volume)
- ◆ BS/TV /Bone surface/total volume)
- ◆ BS/BV (Bone surface/bone volume)

- ◆ OS/BS (Osteoid surface/bone surface)
- ◆ Ob.S/BS

### 3.4.3. Analyse der fluoreszenzmarkierten Schnitte

Um den neu gebildeten Knochen markieren zu können wurde der Fluoreszenzmarker bereits 8 und 6 Tage *ante mortem* den Mäusen subkutan injiziert. Die Doppelmarkierungen wurden mit einer Quecksilberdampflampe sichtbar gemacht. Mit einem Mikroskop (Zeiss, Axioskop 2 plus) wurden die Präparate bei 200-facher Vergrößerung mit Hilfe des bereits erwähnten Zeichenbrettes und Messprogrammes OsteoMeasure XP beurteilt. In der Mitte des Knochens mit ca. 250 µm Abstand zur Epiphysenfuge wurden die Messfelder zweireihig gelegt. In jedem Messfeld wurden zuerst die trabekulären Anteil des Knochens und danach die Calceindoppelmarkierung eingezeichnet. Folgende Parameter konnten daraus berechnet werden:

- ◆ Mineralisierte Oberfläche zu Knochenoberfläche (MS/BS)
- ◆ Mineral apposition rate (MAR, µm/d)
- ◆ Bone formation rate (BFR/BS): Anteil des pro Tag neu formierten Knochens an der Knochenoberfläche

### 3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Graphpad Prism 8 für Windows. Bei allen Gruppen, zwischen denen sich durch die ANOVA signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) ergaben, wurde anschließend, wie bei den Ergebnissen der vorangegangenen Studie von Streicher et al. (2017) ein Student-Newman-Keuls-Test (SNK) als Posthoc-Test durchgeführt. In den Tabellen und Grafiken sind alle Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  SD ersichtlich.

## 4. Ergebnisse

Der Abb. 2 kann man entnehmen, dass das Knochenvolumen (Bone volume, BV) in den WT-Gruppen bei den Tieren, welche ovariektomiert (OVX) wurden und eine Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation (Bone Marrow Transplantation, BMT) mit Knochenmark von  $\alpha$ ERKO Tieren erhielten signifikant niedriger ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (BL) und der scheinoperierten (SHAM) Gruppe. Die scheinoperierte (SHAM) Gruppe stellt in den Grafiken der Balken neben der Baseline dar. Die zusätzliche Gabe von Estradiol zeigt zwar eine geringgradige Erhöhung, die aber statistisch nicht signifikant ist. Bei den unbestrahlten WT-Tieren zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt der Ovariektomie oder der Estradiol (E2) -Substitution. Die einzelnen ovariektomierten Gruppen untereinander zeigen keinerlei Signifikanzen.

Bei den  $\alpha$ ERKO Tieren ist sowohl bei den bestrahlten und transplantierten als auch bei den nicht bestrahlten ovariektomierten Gruppen eine signifikante Erniedrigung des Knochenvolumens (BV) im Vergleich zur Baseline und zur scheinoperierten Gruppe ersichtlich. Jedoch gibt es auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschieden behandelten ovariektomierten Gruppen untereinander.

In Bezug auf die Trabekeldicke (Trabecular Thickness, T.Th) konnte weder in der WT- noch in der  $\alpha$ ERKO Gruppe signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gefunden werden (Abb. 2).

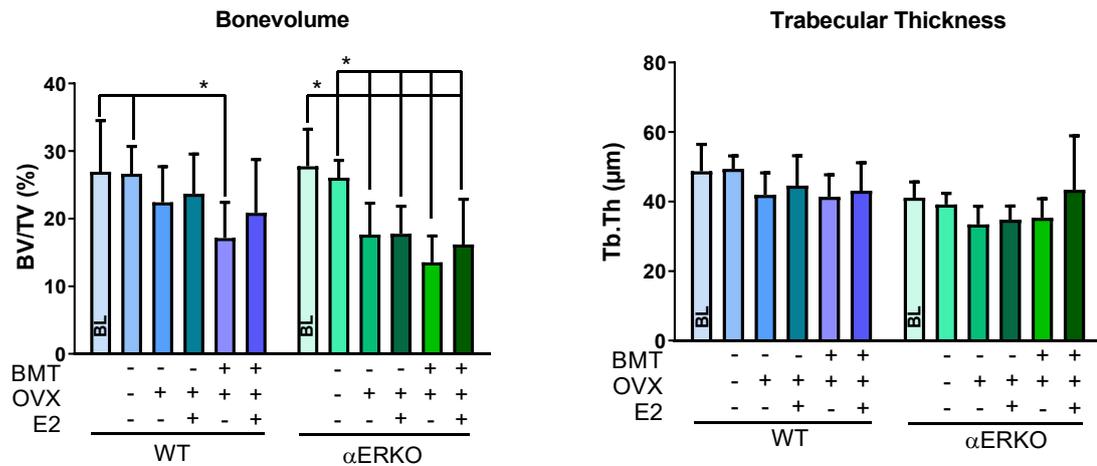
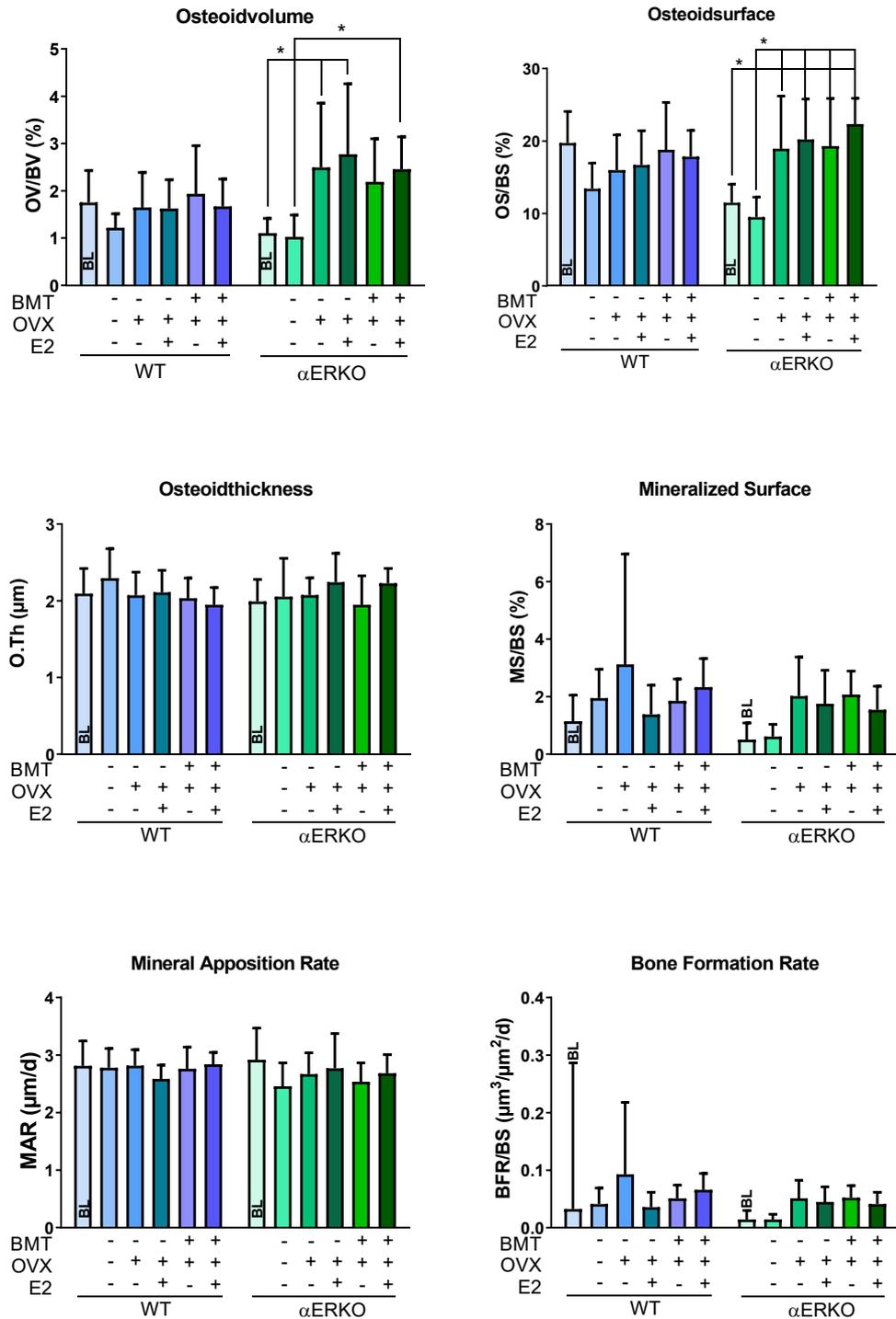


Abbildung 2. Grafische Darstellung des Bone volumes (BV) im Vergleich zum Total Volume (TV) und der Trabecular Thickness (Tb.Th) jeweils für die Wildtyp (WT)- und Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout ( $\alpha$ ERKO) Gruppen. \*  $p < 0,05$  bei einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem SNK-Test. Knochenmarkstransplantation (BMT), Ovariectomie (OVX), Estradiol (E2).

Das Osteoidvolumen (Osteoid volume, OV) und die Osteoidoberfläche (Osteoid surface, OS) zeigen in Abb. 3 bei allen WT-Tieren keine signifikanten Veränderungen. Bei den  $\alpha$ ERKO-Tieren steigen das Osteoidvolumen bei einem Teil der ovariectomierten Gruppen und die Osteoidoberfläche bei allen ovariectomierten Gruppen im Vergleich zur Baseline und zur scheinoperierten Gruppe an, unabhängig von Bestrahlung oder E2-Substitution.

Für die Dicke des Osteoids (Osteoid thickness, O.Th), die Mineralizing Surface (MS), die Mineral Apposition Rate (MAR) und die Bone Formation Rate (BFR) ergab der statistische Test keinerlei signifikanten Unterschiede. Die Abb. 3 macht dennoch sichtbar, dass sich die Mineralizing Surface und die Bone Formation Rate (BFR) bei den  $\alpha$ ERKO-Mäusen in allen ovariectomierten Gruppen im Vergleich zur Baseline und zur SHAM Gruppe erhöht, was aber statistisch nicht als signifikant aufscheint.

Bei der Mineralizing Surface und der Bone Formation Rate sind insbesondere bei manchen WT-Gruppen hohe Standardabweichungen erkennbar, was auf eine hohe Schwankung der Einzeltielergebnisse hinweist. Die hohe Varianz in manchen Gruppen kann auch aus Tabelle 2 und 3 nachvollzogen werden.



**Abbildung 3.** Grafische Darstellung des Osteoidvolumens (OV), der Osteoid surface (OS), der Osteoid thickness (O.Th), der Mineralized Surface (MS), der Mineral Apposition Rate (MAR) und der Bone Formation Rate (BFR) zur Bone Surface (BS). \*  $p < 0,05$  bei einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem SNK-Test. Knochenmarkstransplantation (BMT), Ovariectomie (OVX), Estradiol (E2), Wildtyp (WT), Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout ( $\alpha$ ERKO)

Bei Betrachtung der Osteoklastenzahl (Number of Osteoclasts, N.Oc) lässt sich bei den WT-Tieren in Abb. 4 eine signifikante Erhöhung bei BMT + OVX + E2 Tieren im Vergleich zur Baseline, der scheinoperierten und der ovariectomierten Gruppe feststellen. Auch scheint diese Gruppe im Vergleich zur BMT + OVX Gruppe erhöht. Dies ist aber nicht signifikant. Die unbestrahlte ovariectomierte Gruppe zeigt im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe keine Veränderung in der Osteoklastenzahl.

Bei den  $\alpha$ ERKO Tieren ist die Osteoklastenzahl bei allen ovariectomierten Gruppen höher im Vergleich zur Baseline und zur scheinoperierten Gruppe. Auch hier scheint die Gabe von E2 keine merklichen Auswirkungen zu haben.

In Bezug auf die Oberfläche der Osteoklasten (Osteoclast surface, Oc.S) zeigen bis auf die SHAM Tiere, alle  $\alpha$ ERKO-Gruppen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Baseline (Abb. 4). Aber auch hier lässt sich bei beiden Parametern zwischen den einzelnen Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede erkennen.

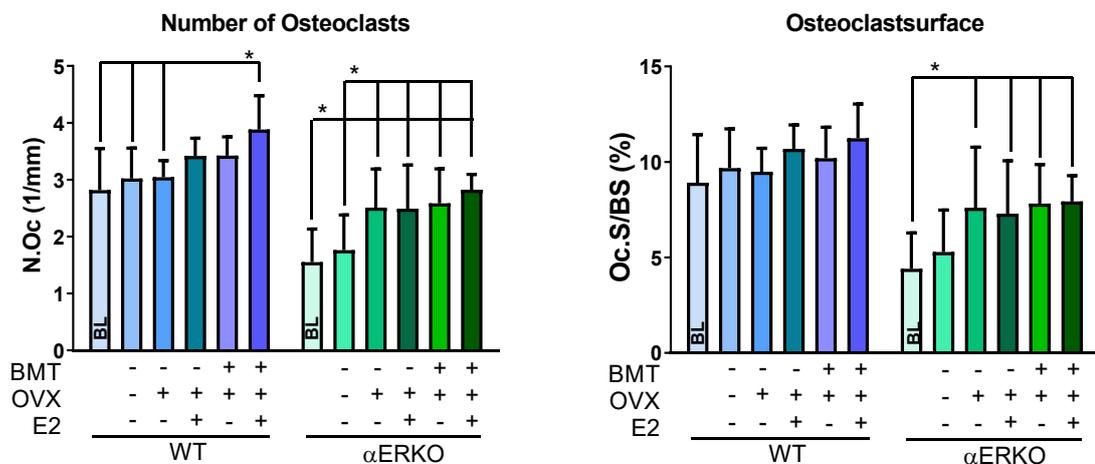


Abbildung 4. Grafische Darstellung der Osteoklastenzahl (N.Oc) und der Osteoklastenoberfläche (Oc.S) zur Bone Surface (BS). \*  $p < 0,05$  bei einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem SNK-Test. Knochenmarkstransplantation (BMT), Ovariectomie (OVX), Estradiol (E2), Wildtyp (WT), Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout ( $\alpha$ ERKO)

WT							
Behandlung Parameter	Baseline	SHAM + Veh	OVX + Veh	OVX + E2	BMT + OVX + Veh	BMT + OVX + E2	
BV/TV Mittelwert Standardabw.	26,9 7,58	26,6 4,05	22,4 5,29	23,7 5,87	17,1 5,27	20,9 7,87	
OV/BV	1,75 0,675	1,22 0,295	1,65 0,737	1,62 0,612	1,93 1,02	1,67 0,580	
OS/BS	19,7 4,35	13,4 3,53	15,59 4,88	16,7 4,72	18,8 6,54	17,8 3,62	
Tb.Th.	48,7 7,69	49,4 3,67	41,9 6,36	44,6 8,62	41,4 6,29	43,1 8,06	
MS/BS	1,14 0,909	1,49 1,01	3,12 3,83	1,38 1,02	1,85 0,757	2,33 0,989	
MAR	2,82 2,11	2,78 0,334	2,82 0,277	2,58 0,241	2,76 0,377	2,84 0,206	
BFR/BS	0,032 0,025	0,041 0,028	0,093 0,125	0,036 0,026	0,051 0,023	0,066 0,029	
OC.S/BS	8,91 2,52	9,68 2,06	9,48 1,23	10,7 1,25	10,2 1,62	11,2 1,79	
N.Oc/B.Pm	2,82 0,733	3,02 0,533	3,05 0,291	3,42 0,311	3,42 0,33	3,88 0,596	

Tabelle 2. Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Parameter nach Versuchsgruppen der Wildtyp (WT)-Gruppen geordnet. Bonevolume (BV), Total Volume (TV), Osteoidvolume (OV), Osteoidsurface (OS), Bonesurface (BS), Trabekeldicke (Tb.Th), mineralisierte Oberfläche (MS), Mineral Apposition Rate (MAR), Bone Formation Rate (BFR), Osteoklastenoberfläche (OC.S), Osteoklastenzahl (N.Oc), Knochenfläche (B.Pm), scheinoperiert (SHAM), Vehikel (Veh), Ovariectomie (OVX), Estradiol (E2), Knochenmarktransplantation (BMT)

<b>αERKO</b>							
Behandlung Parameter	Baseline	SHAM + VeH	OVX + VeH	OVX + E2	BMT + OVX + VeH	BMT + OVX + E2	
BV/TV Mittelwert Standardabw.	27,7 5,49	26,1 2,57	17,6 4,65	17,8 4,06	13,5 3,91	16,2 6,68	
OV/BV	1,10 0,311	1,03 0,462	2,49 1,360	2,77 1,490	2,19 0,914	2,46 0,684	
OS/BS	11,5 2,53	9,49 2,76	18,9 7,26	20,2 5,56	19,3 6,56	22,3 3,56	
Tb.Th.	41,1 4,56	39,1 3,23	33,4 5,24	34,8 3,92	35,3 5,52	43,4 15,54	
MS/BS	0,506 0,576	0,609 0,431	2,02 1,36	1,75 1,16	2,07 0,817	1,54 0,819	
MAR	2,92 0,551	2,46 0,409	2,67 0,371	2,77 0,604	2,54 0,329	2,68 0,325	
BFR/BS	0,014 0,016	0,014 0,009	0,051 0,031	0,045 0,026	0,052 0,021	0,041 0,021	
OC.S/BS	4,41 1,87	5,28 2,19	7,61 3,16	7,29 2,77	7,82 2,04	7,93 1,35	
N.Oc/B.Pm	1,55 0,582	1,76 0,619	2,51 0,680	2,49 0,768	2,58 0,607	2,82 0,271	

**Tabelle 3.** Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Parameter nach Versuchsgruppen der Estrogenrezeptor- $\alpha$  Knockout ( $\alpha$ ERKO)- Gruppen geordnet. Bonevolume (BV), Total Volume (TV), Osteoidvolumen (OV), Osteoidsurface (OS), Bonesurface (BS), Trabekeldicke (Tb.Th), mineralisierte Oberfläche (MS), Mineral Apposition Rate (MAR), Bone Formation Rate (BFR), Osteoklastenoberfläche (OC.S), Osteoklastenzahl (N.Oc), Knochenfläche (B.Pm), scheinoperiert (SHAM), Vehikel (VeH), Ovariectomie (OVX), Estradiol (E2), Knochenmarktransplantation (BMT)

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen einer selektiven Inaktivierung des ER $\alpha$  in hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen auf die Veränderungen des Knochenturnovers im Estrogenmangel zu untersuchen. Die jeweilige Inaktivierung dieses Rezeptors wurde in der vorliegenden Studie durch letale Bestrahlung und nachfolgende Knochenmarktransplantation (BMT) bewirkt. Durch die vorherige Bestrahlung wurden die hämatopoetischen Zellen eliminiert und anschließend durch die Knochenmarktransplantation rekonstituiert. Um eine selektive Inaktivierung des ER $\alpha$  in hämatopoetischen Zellen zu erreichen, wurde WT-Mäusen Knochenmark von  $\alpha$ ERKO-Tieren transplantiert, wodurch nur mesenchymale Zellen einen funktionierenden ER $\alpha$  exprimieren. Umgekehrt wird bei  $\alpha$ ERKO-Tieren, welche das Knochenmark von WT-Mäusen transplantiert bekamen, ein funktionierender ER $\alpha$  nur von hämatopoetischen Zellen exprimiert (Streicher et al. 2017).

Henning et al. (2014) zeigten, dass die Auswirkungen einer Östrogenbehandlung auf den trabekulären und kortikalen Knochen bei weiblichen Mäusen einen funktionierenden ER $\alpha$  in mesenchymale Zellen, jedoch nicht in hämatopoietischen Zellen erfordert. Auch Streicher et al. (2017) stellten fest, dass Östrogen den Knochenumsatz hauptsächlich durch Einwirkung auf mesenchymale Zellen reguliert. Diese Aussage konnten in dieser Arbeit weder bestätigt, noch widerlegt werden. Leider konnte in der vorliegenden Arbeit im Lendenwirbelkörper bei WT-Tieren weder ein Östrogenmangel-induzierter Knochenverlust noch ein protektiver Effekt der Estradiolsubstitution auf die trabekuläre Knochenmasse nachgewiesen werden. Bei  $\alpha$ ERKO-Mäusen kam es nach der Ovariectomie - unabhängig von Knochenmarktransplantation und Estradiol-Behandlung - zu einer Abnahme des trabekulären Knochenvolumens und zu einer Zunahme der Osteoklastenzahlen. Dieser Effekt ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass  $\alpha$ ERKO-Mäusen aufgrund fehlender Feedback-Inhibition sehr hohe Spiegel von in den Ovarien produziertem Androgen aufweisen, die nach der Ovariectomie wegfallen und dadurch einen Estradiol-unabhängigen Knochenverlust induzieren (Sims et al. 2003).

Von einigen Autoren (Almeida et al. 2017, Raisz 2005, Thomasius und Hadji 2019) wurde beschrieben, dass ein Östrogenmangel zu einem vermehrten Knochenabbau führt. Diese Aussage konnte hier nicht bestätigt werden, da das Knochenvolumen bei den WT-Tieren nach der Ovariectomie im Vergleich zur Baseline und den scheinoperierten Gruppen nicht signifikant verringert war. Eine zusätzliche Behandlung mit Estradiol zeigte zwar eine

geringgradige Erhöhung des Knochenvolumens, diese war jedoch statistisch nicht signifikant und erreichte auch das ursprüngliche Niveau der Baseline und SHAM Gruppe nicht.

Der Knochenumbau lässt sich durch das Osteoidvolumen und die Osteoidsurface tendenziell bestätigen. Zwischen den einzelnen Gruppen untereinander konnten keine Unterschiede ermittelt werden, was wiederum keine weiteren Aussagen bezüglich der ER $\alpha$  Inaktivierung zulässt.

Bei der Bone Formation Rate (BFR) lässt sich in Abb. 3 zwar eine Erhöhung bei den ovariectomierten WT und  $\alpha$ ERKO-Gruppen im Vergleich zur Baseline und der scheinoperierten Gruppe erkennen, dies konnte aber statistisch durch die sehr hohen Standardabweichungen nicht belegt werden. Streicher et al. (2017) konnten bei der Analyse des Femurs in ihrer Studie eindeutigere Ergebnisse erzielen. Dort war eine signifikante Erhöhung der Bone Formation Rate bei ovariectomierten  $\alpha$ ERKO Tieren deutlich ersichtlich. Zwischen den einzelnen Gruppen untereinander, vor allem in Bezug auf die bestrahlten und transplantierten Gruppen lässt sich jedoch keine Aussage treffen.

Der Aussage von Streicher et al. (2017), dass die Behandlung mit Estradiol die Osteoklastenzahlen bei WT-Mäusen und WT-Mäusen, die mit  $\alpha$ ERKO-Knochenmark rekonstituiert worden waren, jedoch nicht bei  $\alpha$ ERKO-Mäusen oder  $\alpha$ ERKO, die nach der Bestrahlung mit WT-Knochenmark rekonstituiert worden waren unterdrückt, konnten hier nur bedingt nachvollzogen werden. Die Ergebnisse zeigen sowohl bei WT-Mäusen als auch bei den  $\alpha$ ERKO- Mäusen in den mit Östrogen behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu den restlichen Gruppen. Die Grafiken lassen bei beiden eher auf einen Anstieg der Osteoklastenzahl in den mit Estradiol behandelten Gruppen schließen.

Bouxsein et al. (2005) untersuchte, ob genetische Faktoren den durch Östrogenmangel verursachten Knochenverlust beeinflusst. Sie kamen zu dem Schluss, dass es zwischen den verschiedenen Mausstämmen zu verschiedenen Ergebnissen kommen kann. Zum Beispiel unterscheidet sich die Wirkung einer Ovariectomie auf den trabekulären Knochen zwischen verschiedenen Mausstämmen und ist außerdem abhängig von der Lokalisation des untersuchten Knochens. Die Abhängigkeit vom untersuchten Knochen erklärt auch, dass in der Studie von Streicher et al. (2017) mit der Analyse der Femura eindeutigere Ergebnisse im Vergleich zu den hier verwendeten Wirbelkörper erzielt werden konnten. Sie stellten unter anderem eindeutige Veränderungen in der Bone Formation Rate, der trabekulären Knochendichte und des Knochenvolumens dar, was hingegen hier ohne signifikante

Unterschiede war. Auch konnte festgestellt werden, dass der Knochenverlust bei Mäusen, verglichen mit Ratten, eher milder ausfällt (Iwaniec et al. 2006). Jedoch muss man bedenken, dass es ein ideales Modell, welches für alle Studien in der Knochenforschung verwendet werden kann, nicht existiert (Klein 2008).

Ebenfalls eine Rolle spielt die angewandte Methodik der Auswertung. Streicher et al. (2017) ermittelte die Parameter mittels einer quantitativen Computertomografie (pQCT) und einer quantitativen Mikrocomputertomografie ( $\mu$ CT). Diese Messmethode bringt viel spezifischere Ergebnisse als die hier verwendete Histologie. Der limitierende Faktor in der Histologie ist, dass immer nur ein kleiner Ausschnitt des jeweiligen Wirbelkörpers gemessen und ausgewertet werden kann, wohingegen die Computertomografie den gesamten Knochen vermessen kann. Inwieweit der Faktor Mensch bei der Auswertung eine Rolle spielt ist fraglich. Gerade bei der Histologie wird jedes Präparat einzeln durch den Menschen beurteilt, was eventuell auch eine Fehlerquelle, im Gegensatz zu computerbasierten Messmethoden, darstellen kann.

In Bezug auf die postmenopausale Osteoporose beim Menschen gilt als gesichert, dass ein Wegfall von Östrogen den Knochenabbau erhöht und somit das Risiko für eine Osteoporose steigt (Compston 2001, Marcus 1991, Marischler 2014). Östrogen wirkt apoptosefördernd auf Osteoklasten, wodurch es bei einem Wegfall dieses Mechanismus zu einer Steigerung der Osteoklastenaktivität und dadurch zu einem vermehrten Knochenabbau kommt (Thomasius und Hadji 2019). Dies konnte in der vorliegenden Studie im Achsenskelett der Maus nur sehr bedingt nachvollzogen werden. Weder die Ovariectomie, noch die Gabe von Estradiol oder die Knochenmarkstransplantation hatten hier einen signifikanten Einfluss. Auch hierbei wird angenommen, dass die Lendenwirbelsäule bei Mäusen nicht die geeignetste Stelle zur Messung dieser Parameter darstellt.

Für weitere Studien zu diesem Thema wird empfohlen einerseits andere Skelettlokalisationen, wie z.B. den Femur oder die Tibia, andererseits eine aussagekräftigere Messmethodik, wie z.B. die CT Analyse zu verwenden um die hohen Standardabweichungen zu vermeiden und eindeutigere Aussagen treffen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Auswirkung einer selektiven Inaktivierung des Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen auf den Knochen turnover im Achsenskelett von ovariectomierten und Östrogen-behandelten Mäusen. Mit Hilfe von Bestrahlung und anschließender Knochenmarkstransplantationen konnte der für den Knochen turnover relevante ER $\alpha$  selektiv inaktiviert werden. Die Hypothese in diesem Projekt war, dass die protektive Östrogenwirkung am Knochen ausschließlich durch Zellen mesenchymalen Ursprungs vermittelt wird.

Dafür wurden ca. 120 weibliche Wildtyp (WT) und ER $\alpha$  Knockout ( $\alpha$ ERKO) C57BL/6 Mäuse in 12 Gruppen, zu je 9-10 Tiere eingeteilt. Im Alter von 16 Wochen wurden alle letal mit einer Einzeldosis von 10 Gray bestrahlt, um dadurch die hämatopoetischen Zellen zu zerstören. Vier Stunden nach dieser Bestrahlung bekam ein Teil der Tiere unfraktionierte Knochenmarkszellen, welche aus Knochen von Spendertieren isoliert wurden, transplantiert (BMT). Da die Bestrahlung eine Östrogeninsuffizienz hervorruft, wurden zusätzlich alle Mäuse mit 10  $\mu$ /kg 17 $\beta$ -Östradiol (E2) 5-mal pro Woche behandelt, um einen konstanten Östrogenspiegel aufrecht zu erhalten. Nach vier Wochen, im Alter von 20 Wochen, wurden die Tiere ovariectomiert (OVX) oder scheinoperiert (SHAM). Anschließend wurde ein Teil der Tiere wieder mit Estradiol, ein anderer Teil nur mit Benzylbenzoat/Ricinusöl Vehikel behandelt. Außerdem wurde allen Tieren an Tag 8 und 6 vor dem Versuchsende der Fluoreszenzmarker Calcein, für die spätere Fluoreszenzanalyse, injiziert. Mit einem Alter von 24 Wochen wurden alle Mäuse durch Ausbluten aus der abdominalen Vena cava unter Anästhesie mit Ketamin/Xylazin getötet. Ein Teil der Tiere wurde bereits mit 16 Wochen vor der Ovariectomie und Knochenmarkstransplantation getötet, welche als Baseline (BL) Kontrolle dienten. Nach der Tötung wurde jeweils der erste Lendenwirbel histomorphometrisch aufbereitet und histologisch auf Veränderungen des Knochen turnovers und der Struktur untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Lendenwirbelkörper bei WT-Tieren weder ein Östrogenmangel-induzierter Knochenverlust noch ein protektiver Effekt der Substitutionstherapie mit Estradiol auf die trabekuläre Knochenmasse nachgewiesen werden. Auch scheint die Knochenmarkstransplantation in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss zu haben. Bei  $\alpha$ ERKO-Mäusen kam es nach der Ovariectomie - unabhängig von Knochenmarkstransplantation und Estradiol-Behandlung - zu einer Abnahme des

trabekulären Knochenvolumens und zu einer Zunahme der Osteoklastenzahlen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass  $\alpha$ ERKO-Mäuse, aufgrund fehlender Feedback-Inhibition, sehr hohe Spiegel von in den Ovarien produzierten Androgenen aufweisen, welche nach der Ovariectomie wegfallen und dadurch einen Estradiol-unabhängigen Knochenverlust induzieren.

In Bezug auf das Osteoidvolumen und die Osteoidoberfläche konnten signifikante Unterschiede nur zwischen der BL bzw. der SHAM Gruppe und den anderen Gruppen, aber nicht zwischen den OVX-Gruppen ermittelt werden. Alle weiteren Parameter wie die Trabekeldicke, die Osteoiddicke, die mineralisierte Oberfläche, die Mineral Apposition Rate und die Bone Formation Rate blieben ohne signifikante Aussagen. Außerdem sind bei einigen Parametern, insbesondere bei manchen WT-Gruppen, hohe Standardabweichungen erkennbar, was auf eine hohe Schwankung der Einzeltielergebnisse hinweist.

Mehrere Faktoren spielen bei der Entstehung dieses Ergebnis eine Rolle. Einerseits ist bekannt, dass die Wirkung einer Ovariectomie auf den trabekulären Knochen zwischen verschiedenen Mausstämmen verschieden und auch abhängig von der gemessenen Skelettstelle ist, andererseits bietet auch die Histologie nur eine beschränkte Auswertung im Vergleich zu anderen Auswertungsmöglichkeiten.

Somit konnte der anfänglichen Hypothese in dieser Arbeit, aufgrund der u.a. oben genannten Gründe, weder zugestimmt noch widersprochen werden.

## 7. Summary

The aim of this work was to identify the effect of a selective inactivation of the estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in hematopoietic and mesenchymal cells on the bone turnover in the axial skeleton of ovariectomized and estrogen-treated mice. With bone marrow transplantations, it is possible to selectively inactivate the ER $\alpha$ , which is relevant for bone turnover. The hypothesis in this project was that the protective estrogen effect on the bone is only mediated by cells of mesenchymal origin.

For this study, 120 female wild type (WT) and ER $\alpha$  knockout ( $\alpha$ ERKO) C57BL/6 mice were divided into 12 groups, each with 9-10 animals. At the age of 16 weeks, some of the mice were lethally irradiated with a single dose of 10 Gray to destroy the hematopoietic cells. Four hours after the irradiation, the animals were given unfractionated bone marrow cells, which were isolated from the bones of donor animals (BMT). Because the radiation causes estrogen insufficiency all mice were treated additionally with 10 $\mu$ g/kg 17 $\beta$ -estradiol (E2) 5 times a week to maintain a constant level of estrogen. After 4 weeks, at the age of 20 weeks, the animals were ovariectomized (OVX) or sham operated (SHAM). One part of the animals was then treated again with E2, the others only with benzylbenzoate / ricinus oil vehicle (Veh). For later fluorescence analysis, 8 and 6 days before necropsy all mice were subcutaneously injected with the fluorochrome calcein. At the age of 24 weeks, all mice were killed by bleeding from the abdominal vena cava under anesthesia with ketamine / xylazine. Some mice were killed at the age of 16 weeks, before ovariectomy and BMT, serving as a baseline (BL) control. The first lumbar vertebrae were isolated and histologically processed to measure the osteoclastic bone resorption and the changes in bone formation and in bone structure by bone histomorphometry.

In this study, neither a bone loss because of an estrogen deficiency nor a protective effect of substitution therapy with estradiol had an effect on the trabecular bone mass in the lumbar vertebra in WT animals. Bone marrow transplantation also appears to have no significant impact in this study. In  $\alpha$ ERKO mice, there was a decrease in trabecular bone volume and an increase in the number of osteoclasts after ovariectomy – regardless of bone marrow transplantation and estradiol treatment. This effect is probably because  $\alpha$ ERKO mice, due to the lack of feedback inhibition, have very high levels of androgens produced in the ovaries, which disappear after the ovariectomy and thereby induce oestradiol-independent bone loss.

Regarding the osteoid volume and the osteoid surface, significant differences could only be determined between the BL or the SHAM group and the other groups, but not between the OVX groups. All other parameters such as the trabecular thickness, the osteoid thickness, the mineralized surface, the mineral apposition rate, and the bone formation rate remained without significant differences. In addition, high standard deviations can be seen in some parameters, especially in some WT groups, which indicates a high variation in the individual results of the animals.

Several factors play a role in the interpretation of this outcome. On the one hand, it is known that the effect of ovariectomy on trabecular bone differs between different mouse strains and depends on the measured skeletal site. On the other hand, histology offers only a limited evaluation in comparison to other evaluation systems

Thus, the initial hypothesis in this work, due to the reasons mentioned above, could be neither confirmed nor falsified.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikrocomputertomographie
μg	Mikrogramm
A.-dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
APES	3-Aminopropyl-triethoxy-silane
Ar	Area
ARC	adventitielle Retikularzelle
B	Bone
B/R	Benzylbenzoat/Ricinusöl
BFR	Bone Formation Rate
BM	Bone marrow, Knochenmark
BMC	Bone Marrow Cell, Knochenmarkszelle
BMD	Bone mineral density
BMI	Body-Mass-Index
BMT	Bone Marrow Transplantation
BP	Bisphosphonate
BSU	Bone structural unit
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie
d	Tag
DBD	DNA-Bindungsdomäne

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXA	Dual X-Ray Absorptiometry
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -Estradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERKO	Östrogenrezeptor-Knockout
FGF	Fibroblast growth factor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
HSC	hämatopoietische Stammzelle
HSP90	Hitzeschockprotein 90
i.p.	intraperitoneal
IE	internationale Einheiten
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L1	erster (1.) Lendenwirbel
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
Lsg.	Lösung
LWS	Lendenwirbelsäule
MAR	Mineral Apposition Rate
Md	mineralized
mg	Milligramm
min	Minute

mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
Mrd.	Milliarden
mRNA	messenger-RNA
MSC	mesenchymale Stammzelle
N	Number
NTD	aminoternale Domäne
O	Osteoid
Ob	Osteoblast
Oc	Osteoclast
OPG	Osteoprotegerin
ORX	Orchiektomie
OVX	Ovariektomie/ovariektomiert
PFA	Paraformaldehyd
Pm	Perimeter
PPI	Protonenpumpeninhibitor
pQCT	Quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
RANK	Rezeptoraktivator des NF-Kappa-B Rezeptors
RANKL	RANK – Ligand
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
S	Surface
s. c.	subcutan

SD	Standardabweichung
SERM	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren
SH	Steroidhormon
SHAM	Scheinoperiert
SNK	Student Newman Keuls Test
Sp	Separation
SSC	Skelettstammzelle
Std.	Stunde
T	total
Tab.	Tabelle
Tb	Trabecular
TGFβ	Transforming growth factor beta
Th	Thickness, Dicke
V	Volume
v /v	Verdünnung
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VeH	Vehikel
w	Wochen
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp

## 9. Literaturverzeichnis

Albright F, Smith PH, Richardson AM. 1941. Postmenopausal osteoporosis - Its clinical features. *The Journal of the American Medical Association*, 116: 2465–2474.

Almeida M, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, Onal M, Xiong J, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC. 2013. Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *The Journal of clinical investigation*, 123 (1): 394–404.

Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, Vanderschueren D, Manolagas SC. 2017. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 97 (1): 135–187.

Amling M. 2015. Kalzium und Vitamin D im Knochenstoffwechsel. Klinische Bedeutung für die Frakturbehandlung. *Der Unfallchirurg*, 118 (12): 995–999.

Arnal J, Fontaine C, Billon-Galés A, Favre J, Laurell, H. Lenfant, F. Gourdy, P. 2010. Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30 (8): 1506–1512.

Bartl C, Bartl R. 2011. Sekundäre Osteoporosen: Pathogenese, Formen, Diagnostik und Therapie. *Der Radiologe*, 51 (4): 307–324.

Bartl R. 2002. Osteoporose. *Der Internist*, 43 (12): 1529-30, 1533-43.

Bartl R. 2008. Therapie der Osteoporose nach der „European Guidance 2008“. *Internist*, 49: 1126–1136.

Bartl R, Gradinger R. 2009. Aktuelle Diagnostik und Therapie der Osteoporose auf der Basis der "European Guidance 2008". *Der Orthopade*, 38 (4): 365-380.

Bartl R., Bartl C. 2015. Aktuelle Osteoporoseprophylaxe und -therapie. *Der Internist*, (56): 1445–1457.

Beato M, Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, (3): 225–236.

Bernardo ME, Locatelli, Fibbe WE. 2009. Mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176: 101–117.

- Bianco P, Robey PG. 2015. Skeletal stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 142 (6): 1023–1027.
- Birbrair A, Frenette PS. 2016. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370 (1): 82–96.
- Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. 2002. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, (32): 136–141.
- Bouxsein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG. 2005. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *Journal of bone and mineral research*, 20 (7): 1085–1092.
- Bucay N. 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development*, 12: 1260–1268.
- Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology (CJASN)*, 3: 131-139.
- Compston JE. 2001. Sex Steroids and Bone. *Physiological Reviews*, 81: 419–447.
- Dent CE. 1977. Osteoporosis in childhood. *Postgraduate medical journal*, 53 (622): 450–457.
- Dent CE, Friedman M. 1965. Idiopathic juvenile Osteoporosis. *the Quarterly Journal of Medicine*, 34: 177–210.
- Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G, Leonhard-Marek S, Hrsg. 2015. *Physiologie der Haustiere*. Fünfte., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke, 672.
- Erben RG. 1997. Embedding of Bone Samples in Methylmethacrylate. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45: 307–313.
- Erben RG. 02.06.2020. Erläuterung Versuchsaufbau.
- Felsenberg D. 2001. Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in unserer Zeit*, 30 (6): 488–494.
- Franklin M, Bu SY, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, Lightfoot SA, Arjmandi BH, Brackett DJ, Lucas EA, Smith BJ. 2006. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone*, 39 (6): 1331–1342.

Frost HM. 1960. The Utah Paradigm of Skeletal Physiology.

Frost HM. 1997. Defining Osteopenias and Osteoporoses: Another View (With Insights From a New Paradigm). *Bone*, 20 (5): 385–391.

Frost HM. 2002. Emerging views about “osteoporosis”, bone health, strength, fragility, and their determinants. *Journal of bone and mineral metabolism*, 20: 319–325.

Fujiwara Y, Piemontese M, Liu Y, Thostenson JD, Xiong J, O'Brien CA. 2016. RANKL (Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand) Produced by Osteocytes Is Required for the Increase in B Cells and Bone Loss Caused by Estrogen Deficiency in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 291 (48): 24838–24850.

Gosch M, Stumpf U, Kammerlander C, Böcker W, Heppner HJ, Wicklein S. 2018. Management der Osteoporose nach Fragilitätsfrakturen. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 51 (1): 113–125.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. 2006. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092: 385–396.

Haffner-Luntzer M, Liedert A, Ignatius A. 2015. Mechanobiologie und Knochenstoffwechsel: Klinische Bedeutung für die Frakturbehandlung. *Der Unfallchirurg*, 118 (12): 1000–1006.

Hanstein B, Bender HG. 1998. Molekularbiologie des Östrogenrezeptors und seine Regulation durch Östrogen und Antiöstrogene. *Der Gynäkologe*, (31): 1046–1050.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. 1999. Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. *Endocrinology*, 140 (9).

Horn F, Hrsg. 2019. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Siebte., korrigierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 704.

Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K. 2001. Expression Profiles of Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand, Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B, and Osteoprotegerin Messenger RNA in Aged and Ovariectomized Rat Bones. *Journal of bone and mineral research*, 16 (8): 1416–1425.

- Iwaniec UT, Yuan D, Power RA, Wronski TJ. 2006. Strain-dependent variations in the response of cancellous bone to ovariectomy in mice. *Journal of bone and mineral research*, 21 (7): 1068–1074. DOI 10.1359/jbmr.060402.
- Jakob F. 2005. Primäre und sekundäre Osteoporose. Die wichtige Rolle des Internisten bei der Differentialdiagnostik. *Internist*, 46: 24–30.
- Kanis JA. 2002. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *The Lancet*, 359 (9321): 1929–1936.
- Klein RF. 2008. Genetics of osteoporosis – Utility of mouse models. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8 (4): 287–290.
- Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. 2014. Estrogen receptor  $\alpha$  in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*, 60: 68–77.
- Kong Y. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397: 315–323.
- König HE, Liebich H, Hrsg. 2019. *Anatomie der Haustiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Siebte., aktualisierte und erweiterte Auflage.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 853.
- Krum SA, Miranda-Carboni G, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, Brown M. 2008. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *The EMBO Journal*, 27: 535–545.
- Kuhl H. 1997. Metabolische Effekte der Östrogene und Gestagene. *Der Gynäkologe*, 30 (4): 357–369.
- Lacey DL. 1998. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 93: 165–176.
- Li J. 2000. RANK Is the Intrinsic Hematopoietic Cell Surface Receptor That Controls Osteoclastogenesis and Regulation of Bone Mass and Calcium Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 97: 1566–1571.
- Li JY, Tawfeek H, Bedi B, Yang X, Adams J, Gao KY, Zayzafoon M, Weitzmann MN, Pacifici R. 2011. Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell

receptor CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2): 768–773.

Luther J, David J-P. 2016. Knochen- und Fettgewebebildung. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 75 (7): 701–706.

Marcus R. 1991. Understanding Osteoporosis. *The western journal of medicine*, 155 (1): 53–60.

Marischler C, Hrsg. 2014. *Endokrinologie. Zweite. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer*, 142.

McClung et al. 2006. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N. Engl. J. Med.*, 354: 821–831.

Melville KM, Kelly NH, Khan SA, Schimenti JC, Ross FP, Main RP, van der Meulen, M. C. H. 2014. Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29 (2): 370–379.

Minne HW, Pfeifer M, Begerow B, Pollähne W. 2002. Osteoporose. *Der Orthopäde*, (31): 681–699.

Mosimann W, Kohler T, Hrsg. 1990. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Berlin: Verlag Paul Parey*, 342.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. 2007. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130 (5): 811–823.

Nakashima T, Hayash Mi, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Q Feng J, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner. E. F., Penninger JM, Takayanagi H. 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17 (10): 1231–1234.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Frewein J, Augsburg H, Hrsg. 2004. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band I, Bewegungsapparat. Achte., unveränd. Aufl. Stuttgart: Parey*, 626.

- Obermayer-Pietsch B. 2006. Genetics of osteoporosis. *Wiener medizinische Wochenschrift* (1946), 156 (5-6): 162–167.
- Odörfer KI, Egerbacher M, Unger NJ, Weber K, Jamnig A, Lepperdinger G, Kleiter M, Sandgren EP, Erben RG. 2011. Hematopoietic bone marrow cells participate in endothelial, but not epithelial or mesenchymal cell renewal in adult rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15 (10): 2232–2244.
- Park CJ, Chen G, Koo Y, Lin P-CP, Cacioppo JA, Prohaska H, Ko CJ. 2017. Generation and characterization of an estrogen receptor alpha-iCre knock-in mouse. *Genesis* (New York, N.Y. : 2000), 55 (12).
- Pierroz et al. 2010. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANK. *J. Biol. Chem.*, 285: 28164–28173.
- Raisz L. 2005. Pathogenesis of osteoporosis. *The Journal of clinical investigation*, (115): 3318–3325.
- Ramasamy I. 2006. Recent advances in physiological calcium homeostasis. *J Lab Med*, 30 (6): 453–491.
- Rankin S. 2012. Mesenchymal stem cells. *Thorax*, 67 (6): 565–566.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. 2012. *Biochemie. Dritte., vollst. überarb. u. erw. Aufl.* Stuttgart: Thieme, 846.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 2001. 17 $\beta$ -Estradiol Stimulates Expression of Osteoprotegerin by a Mouse Stromal Cell Line, ST-2, via Estrogen Receptor- $\alpha$ . *Endocrinology*, 142 (6): 2205–2212.
- Salomon F, Geyer H, Gille U, Hrsg. 2014. *Anatomie für die Tiermedizin. Dritte., aktualisierte und erweiterte Aufl.* Stuttgart: Enke, 912.
- Seeman E. 2008. Modeling and Remodeling. The Cellular Machinery Responsible for the Gain and Loss of Bone's Material and Structural Strength. *Principles of Bone Biology*: 1–28.
- Seidlová-Wuttke D. 2010. Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs). *Zeitschrift für Phytotherapie*, 31 (06): 282–284.

- Sims NA, Clément-Lacroix P, Minet D, Fraslon-Vanhulle C, Gaillard-Kelly M, Resche-Rigon M, Baron R. 2003. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111 (9): 1319–1327.
- Sinowatz F, Rodler D. 2019a. *Histologie in der Tiermedizin. Grundlagen, Techniken, Präparate*. Hannover: Schlütersche, 272.
- Sinowatz F, Rodler D, Hrsg. 2019b. *Histologie in der Tiermedizin. Grundlagen, Techniken, Präparate*. [S.l.]: SCHLUTERSCHE VERLAGSGESEL.
- Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kersch-Schindl K, Patsch J. 2009. Pathophysiology of osteoporosis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, (159): 230–234.
- Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. 2017. An overview and management of osteoporosis. *European journal of rheumatology*, 4 (1): 46–56.
- Speckmann E, Hescheler J, Köhling R, Hrsg. 2019. *Physiologie. Das Lehrbuch*. Siebte. Auflage, 918seiten.
- Streicher C, Heyny A, Andrukhova O, Haigl B, Slavic S, Schüler C, Kollmann K, Kantner I, Sexl V, Kleiter M, Hofbauer LC, Kostenuik PJ, Erben RG. 2017. Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells. *Scientific reports*, 7 (1): 6460.
- Thomasius F, Hadji P. 2019. Einfluss einer Hormon- oder Hormonersatztherapie auf die Knochenheilung. *Der Unfallchirurg*, 122 (7): 512–517.
- Tyrovola JB, Odont XX. 2015. The "Mechanostat Theory" of Frost and the OPG/RANKL/RANK System. *Journal of cellular biochemistry*, 116 (12): 2724–2729.
- Vilela P, Nunes T. 2011. Osteoporosis 2011. *Neuroradiology*, (53): 185–189.
- Welsch U, Kummer W, Deller T, Hrsg. 2018. *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*. Fünfte. Auflage. München: Elsevier, 734.
- Xiong J, Piemontese M, Onal M, Josh Campbell, Joseph J. Goellner, Vladimir Dusevich, Lynda Bonewald, Stavros C. Manolagas, Charles A. O'Brien, 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 // 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.

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Versuchsaufbau (Streicher et al. 2017).

Abbildung 2. Grafische Darstellung des Bonevolume (BV) und der Trabecular Thickness (Tb.Th) jeweils für die WT- und  $\alpha$ ERKO Gruppen.

Abbildung 3. Grafische Darstellung des Osteoidvolumens (OV), der Osteoidsurface (OS), der Osteoidthickness (O.Th), der Mineralized Surface (MS), der Mineral Apposition Rate (MAR) und der Bone Formation Rate (BFR).

Abbildung 4. Grafische Darstellung der Osteoklastenanzahl (N.Oc) und der Osteoklastenoberfläche (Oc.S).

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Gruppeneinteilung der Versuchstiere.

Tabelle 2. Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Parameter nach Versuchsgruppen der WT-Gruppen geordnet.

Tabelle 3. Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Parameter nach Versuchsgruppen der  $\alpha$ ERKO-Gruppen geordnet.