

Universität Ulm  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik  
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius

# **Effekte eines Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts auf den Knochenphänotyp der Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Universität Ulm

vorgelegt von  
Nikolai Maximilian Renz  
geboren in Ruit/Ostfildern

2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Huber-Lang

Tag der Promotion: 02.06.2022

# I Inhaltsverzeichnis

|           |                                                        |            |
|-----------|--------------------------------------------------------|------------|
| <b>I</b>  | <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                        | <b>I</b>   |
| <b>II</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                     | <b>III</b> |
| <b>1</b>  | <b>Einleitung .....</b>                                | <b>1</b>   |
| 1.1       | Das Komplementsystem .....                             | 1          |
| 1.2       | Knochen .....                                          | 7          |
| 1.2.1     | Knochengewebe .....                                    | 7          |
| 1.2.2     | Knochenzellen .....                                    | 8          |
| 1.2.3     | Ossifikation und Knochenwachstum .....                 | 13         |
| 1.3       | Komplement und Knochen .....                           | 15         |
| 1.3.1     | Komplement und Ossifikation .....                      | 15         |
| 1.3.2     | Einfluss des Komplementsystems auf Knochenzellen ..... | 16         |
| 1.4       | Ziele der Arbeit .....                                 | 19         |
| <b>2</b>  | <b>Material und Methoden .....</b>                     | <b>20</b>  |
| 2.1       | Material .....                                         | 20         |
| 2.1.1     | Chemikalien und Lösungen .....                         | 20         |
| 2.1.2     | Geräte und Software .....                              | 24         |
| 2.2       | Methoden .....                                         | 26         |
| 2.2.1     | Mausmodell und Studiendesign .....                     | 26         |
| 2.2.2     | Organentnahme und Probenaufbereitung .....             | 26         |
| 2.2.3     | Nicht-destruktive Dreipunktbiegung .....               | 27         |
| 2.2.4     | $\mu$ -CT .....                                        | 28         |
| 2.2.5     | Histologie .....                                       | 31         |
| 2.2.5.1   | Standardfärbungen .....                                | 31         |
| 2.2.5.2   | Auswertung histologischer Standardfärbungen .....      | 33         |
| 2.2.5.3   | Immunhistochemie .....                                 | 36         |
| 2.2.5.4   | Immunfluoreszenz-Färbungen .....                       | 38         |

---

|          |                                                      |           |
|----------|------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.6    | Statistische Auswertung .....                        | 39        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                              | <b>40</b> |
| 3.1      | Makroskopische Untersuchung des Skelettsystems ..... | 40        |
| 3.2      | Untersuchung des Längenwachstums des Femurs .....    | 41        |
| 3.3      | Untersuchung des kortikalen Knochens .....           | 42        |
| 3.3.1    | Biomechanische Charakterisierung .....               | 42        |
| 3.3.2    | Radiologische Charakterisierung .....                | 43        |
| 3.4      | Untersuchung des trabekulären Knochens .....         | 45        |
| 3.4.1    | Untersuchung des Femurs .....                        | 45        |
| 3.4.2    | Untersuchung der Wirbelkörper .....                  | 47        |
| 3.5      | Histologische Untersuchung .....                     | 49        |
| 3.6      | Etablierte histologische Färbungen .....             | 51        |
| 3.6.1    | C5aR1 Färbung .....                                  | 51        |
| 3.6.2    | C5aR1 Fluoreszenz-Färbung .....                      | 52        |
| 3.6.3    | Cathepsin K Fluoreszenz-Färbung .....                | 53        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>                              | <b>54</b> |
| 4.1      | Der Knochenphänotyp .....                            | 54        |
| 4.2      | Etablierte histologische Färbungen .....             | 62        |
| 4.3      | Schlussfolgerung und Ausblick .....                  | 63        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                         | <b>66</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                    | <b>68</b> |
| <b>7</b> | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                     | <b>79</b> |
| <b>8</b> | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                   | <b>80</b> |
|          | Danksagung .....                                     | 81        |
|          | Lebenslauf .....                                     | 82        |

## II Abkürzungsverzeichnis

|             |                                         |
|-------------|-----------------------------------------|
| (BEL)       | Belgien                                 |
| (CH)        | Schweiz                                 |
| (DE)        | Deutschland                             |
| (UK)        | United Kingdom                          |
| (US)        | United States of America                |
| μ-CT        | Mikro-Computertomograph                 |
| AK          | Antikörper                              |
| Aqua dest.  | Destilliertes Wasser                    |
| AS          | Aminosäure                              |
| ATPse       | Adenosintriphosphatase                  |
| B.Pm.       | Bone perimeter                          |
| Best.-Nr.   | Bestellnummer                           |
| BMP         | bone morphogenetic protein              |
| BS          | Knochenoberfläche                       |
| BSA         | Rinderserum Albumin                     |
| BV/TV       | Bone volume per total volume            |
| C1-C9       | Komplementfaktoren 1 bis 9              |
| C3a         | Aktivierter Komplementfaktor 3          |
| C3aR        | Komplementfaktor 3a Rezeptor            |
| C3b         | Spaltprodukt von C3                     |
| C5a         | Aktivierter Komplementfaktor 5          |
| C5a-des-Arg | C5a ohne Arginin                        |
| C5aR1       | Komplementfaktor 5a Rezeptorsubtyp 1    |
| C5aR2       | Komplementfaktor 5a Rezeptorsubtyp 2    |
| CA II       | Carboanhydrase 2                        |
| CatK        | Cathepsin K                             |
| CD          | Cluster of Differentiation              |
| Cre-        | Cre-Rekombinase negativ                 |
| Cre+        | Cre-Rekombinase positiv                 |
| CREB        | cAMP responsive element-binding protein |
| Ct. Th.     | Dicke der Kortikalis                    |
| Ct. TMD     | Gewebsmineraldichte der Kortikalis      |

---

|                  |                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| DSB              | Disulfidbrücke                                         |
| E*I <sub>x</sub> | Biegesteifigkeit                                       |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                               |
| EtOH             | Ethanol                                                |
| F                | Kraft                                                  |
| Fas              | Gen-Name                                               |
| Fc               | Fragment crystallisable                                |
| fl               | Flanked by loxP                                        |
| h                | Stunden                                                |
| H <sup>+</sup>   | Proton                                                 |
| HA               | Hydroxylapatit                                         |
| HCl              | Salzsäure                                              |
| IF               | Immunfluoreszenz                                       |
| IGF              | Insulin-like growth factor                             |
| IgG              | Immunglobulin G                                        |
| IL               | Interleukin                                            |
| INF              | Interferon                                             |
| Int-1            | Gen                                                    |
| I <sub>x</sub>   | Flächenträgheitsmoment                                 |
| LPA              | Lysophosphatidic acid                                  |
| LysM             | Lysozym M                                              |
| mAb              | monoclonal antibody                                    |
| MAPK             | Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen                    |
| MASP             | Mannose-bindendes Lektin assoziierte<br>Serinproteasen |
| MBL              | Mannose-bindendes Lektin                               |
| M-CSF            | Macrophage colony-stimulating factor                   |
| min              | Minuten                                                |
| MSC              | mesenchymalen Stammzellen                              |
| N                | Newton                                                 |
| N. Ob.           | Anzahl der Osteoblasten                                |
| N. Ob./B. Pm     | Anzahl der Osteoblasten pro<br>Knochen trabekelumfang  |

---

|                |                                                                         |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| N. Oc.         | Anzahl der Osteoklasten                                                 |
| N. Oc./B. Pm   | Anzahl der Osteoklasten pro<br>Knochen trabekelumfang                   |
| NaCl           | Natriumchlorid                                                          |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer<br>of activated B-Cells       |
| OB             | Osteoblast                                                              |
| Ob. S.         | Auflagefläche der Osteoblasten                                          |
| Ob. S./BS      | Anteil der Osteoblasten-Oberfläche an der<br>Knochen trabekeloberfläche |
| Oc. S.         | Auflagefläche der Osteoklasten                                          |
| Oc. S./BS      | Anteil der Osteoklasten-Oberfläche an der<br>Knochen trabekeloberfläche |
| OK             | Osteoklast                                                              |
| OPG            | Osteoprotegerin                                                         |
| pAb            | polyclonal antibody                                                     |
| PAK            | p21-aktivierte Kinase                                                   |
| PBMNC          | Peripheral Blood Mononuclear Cell                                       |
| PI3K           | Phosphoinositid-3-Kinase                                                |
| PTH            | Parathormon                                                             |
| RANK           | Receptor Activator of NF- $\kappa$ B                                    |
| RANKL          | Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand                             |
| RAW264.7       | Name einer Zelllinie                                                    |
| RNA            | Ribonukleinsäure                                                        |
| Runx2          | Runt-related transcription factor 2                                     |
| STAT3          | signal transducer and activator of<br>transcription 3                   |
| Tb. N.         | Trabekuläre Anzahl                                                      |
| Tb. S.         | Trabekuläre Separation                                                  |
| Tb. Th.        | Trabekuläre Dicke                                                       |
| Tb.N           | Trabecular number                                                       |
| Tb.Sp          | Trabecular separation                                                   |
| Tb.Th          | Trabecular thickness                                                    |
| TBS            | Tris-buffered saline                                                    |

---

|      |                                      |
|------|--------------------------------------|
| TCC  | Terminaler Komplement Komplex        |
| TGF  | Transforming growth factor           |
| TMD  | Knochenmineraldichte                 |
| TMD  | Gewebsmineraldichte                  |
| TNF  | Tumornekrosefaktor                   |
| TRAP | Tartrateresistente saure Phosphatase |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan       |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein entwicklungsgeschichtlich alter und hoch konservierter Teil des angeborenen Immunsystems [161]. Es besteht aus löslichen, in der Leber produzierten und ins Plasma abgegebenen Proteinen und membranständigen Rezeptoren auf Zelloberflächen. Das Komplementsystem dient der Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Parasiten und Pilzen sowie der Beseitigung apoptotischer Zellen. Darüber hinaus ist es an der Regulierung einer systemischen Inflammation beteiligt [59]. Es wirkt einerseits über die Opsonierung, dem Kenntlichmachen von Antigenen, die anschließend von Zellen des Immunsystems beseitigt werden können. Andererseits kann das Komplementsystem über die Perforation von Zellmembranen direkt zur Lyse von Zellen führen. Des Weiteren können Endprodukte der Spaltungskaskade, Anaphylatoxine genannt, durch proinflammatorische Reize diverse Entzündungsreaktionen auslösen.

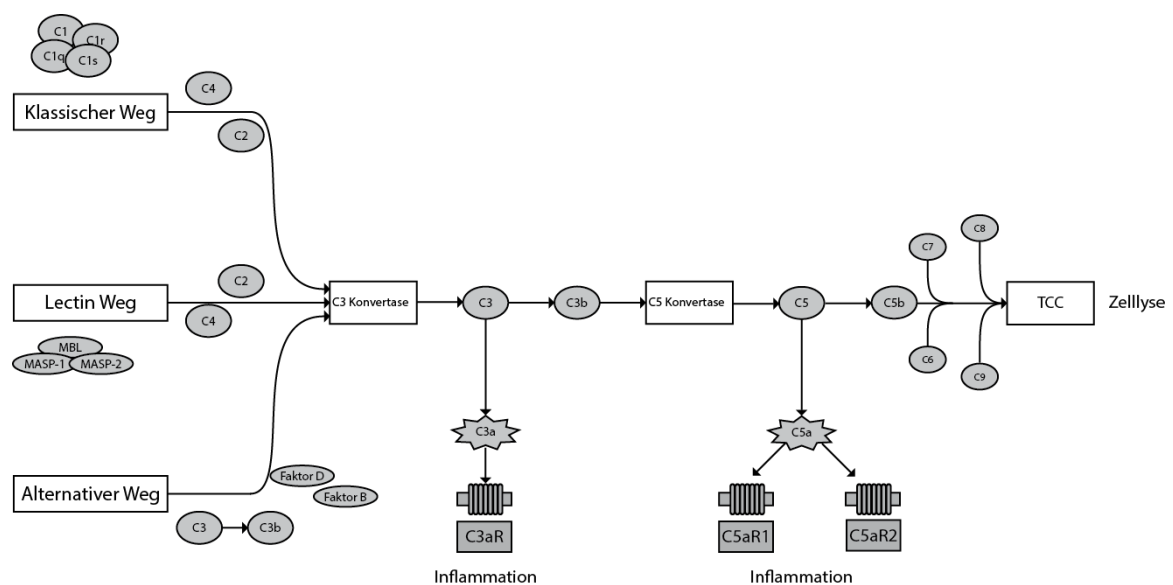
Das Komplementsystem besteht aus über 30 Proteasen, welche in einer Spaltungskaskade angeordnet sind und über drei Wege aktiviert werden können: dem klassischen, dem alternativen und dem Lektin-Weg (siehe Abb. 1).

Der klassische Weg kann durch die Bindung des Komplementfaktors C1q an IgM- oder IgG-Antikörper-Antigen-Komplexe, DNA-Fragmente, das C-Reaktive Protein sowie verschiedener Kollagene aktiviert werden [86]. Dabei befindet sich der Faktor C1q zusammen mit jeweils zwei Faktoren C1r und C1s im C1-Komplex. Bindet nun C1q ein Antigen, so führt dies zur Aktivierung der Serinproteasen C1s. Diese wiederum spaltet die Komplementfaktoren C2 und C4 in ihre jeweiligen Spaltprodukte C2a und C2b sowie C4a und C4b. Durch die Anlagerung von C4b an C2a bildet sich der C4b2a-Komplex, der als C3-Konvertase des klassischen Wegs fungiert [93] (siehe Abb. 1).

Unter physiologischen Bedingungen ist der alternative Weg ständig aktiv, wobei C3 spontan in C3a und C3b gespalten wird. Körpereigene Zellen werden dabei durch die Komplementinhibitoren H und I vor der Opsonierung mit C3b geschützt. Bindet C3b hingegen an die Oberfläche von Mikroorganismen kommt es unter Einbeziehung des Faktors Bb zur Formation des C3bBb-Komplexes, welcher als C3-Konvertase des alternativen Wegs gesehen wird [154] (Siehe Abb. 1).

Der Lektin-Weg wird durch die Bindung des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Mannose auf der Zelloberfläche von Pathogenen ausgelöst [86]. Hierbei aktiviert diese Bindung die Mannose-bindenden Lektin assoziierten Serinproteasen (MASP) -1, -2 und -3. Die MASPs lösen anschließend durch Spaltung der Komplementfaktoren C2 und C4 denselben Reaktionsweg aus, welcher bereits beim klassischen Weg beschrieben wurde (Siehe Abb. 1).

Die drei Wege enden alle mit der Bildung einer C3-Konvertase, welche zur Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b führt. C3a wirkt über Bindung an den C3a-Rezeptor (C3aR) proinflammatorisch, C3b aktiviert die C5-Konvertase und agiert als wichtiges Opsonin. Die C5-Konvertase spaltet wiederum C5 in C5a und C5b. C5b bildet zusammen mit C6, C7, C8 sowie C9 den terminalen Komplement-Komplex (TCC), welcher zur Zelllyse führen kann [86]. Das C5a Fragment wirkt über die beiden C5a-Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 regulierend auf Entzündungsreaktionen ein [38] (Siehe Abb. 1).



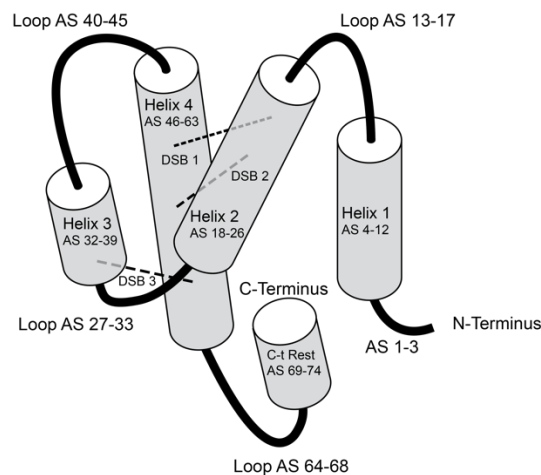
**Abb. 1 Vereinfachtes Schema des Komplementsystems**

C5 bis C9: Komplementfaktoren, TCC: terminal complement complex, MBL: Mannose-bindendes Lektin, MASP: Mannose-bindendes Lektin assoziierte Serinprotease. Eigene Darstellung in Anlehnung an Mödinger et al. [87]

### ▪ C5a/C5a-des-Arg

Das C5a-Molekül ist ein aus 74 Aminosäuren (AS) bestehendes stark positiv geladenes Polypeptid. Es besitzt vier antiparallel verlaufende  $\alpha$ -Helices (AS 4-12, 18-26, 32-39, 46-63), welche durch drei Disulfidbrücken (AS 21→47, 22→54, 34→55) stabilisiert und über drei Loop-Segmente (AS 13-17, 27-33, 40-45)

verbunden werden [91, 162]. Für das Binden des C5a-Moleküls an die C5a-Rezeptoren und das Auslösen einer biologische Funktion ist das in einer  $\alpha$ -Helix angeordnete C-terminale Ende des Peptids (AS 69-74) ausschlaggebend [96] (siehe Abb. 2). Das N-terminale Ende bindet nicht an die Rezeptoren, ist jedoch an der Regulation der Aktivität des Anaphylatoxins beteiligt [32].



**Abb. 2 Schematische Struktur des C5a Moleküls**

AS: Aminosäure Nr.; DSB: Disulfidbrücken; C-t Rest: C-terminaler Rest. Eigene Darstellung in Anlehnung an Monk et al. [91]

Neu gebildetes C5a wird innerhalb weniger Minuten zu C5a-des-Arg abgebaut. Dafür wird das am Carboxy-Terminus gelegene Arginin durch eine Carboxypeptidase abgespalten [10]. C5a-des-Arg besitzt nur noch etwa 3 - 10 % der chemotaktischen Wirkung des ursprünglichen C5a-Moleküls auf neutrophile Granulozyten und unter 1 % des spasmogenen Potentials auf Ileumgewebe. Aufgrund dieses raschen Abbaus des Moleküls ist C5a im Serum gesunder Individuen im physiologischen Gleichgewicht nahezu nicht nachweisbar ( $< 1 \text{ nM/l}$ ) [91]. Bevor das C5a Molekül die oben genannten Effekte erzielen kann, muss das C5a Molekül an einen der beiden C5a Rezeptoren binden.

#### ▪ C5aR1

Der C5a-Rezeptor Subtyp 1 (C5aR1, auch Cluster of Differentiation (CD) 88) ist ein aus 350 Aminosäuren aufgebauter G-Protein gekoppelter Transmembranrezeptor des aktivierten Komplementfaktors C5a [96]. Er besitzt dabei mindestens zwei Bindungsstellen für das C5a Molekül, wobei die Bindung eines einzelnen C5a Moleküls genügt, um den Rezeptor zu aktivieren [96, 127]. Bindet C5a an den

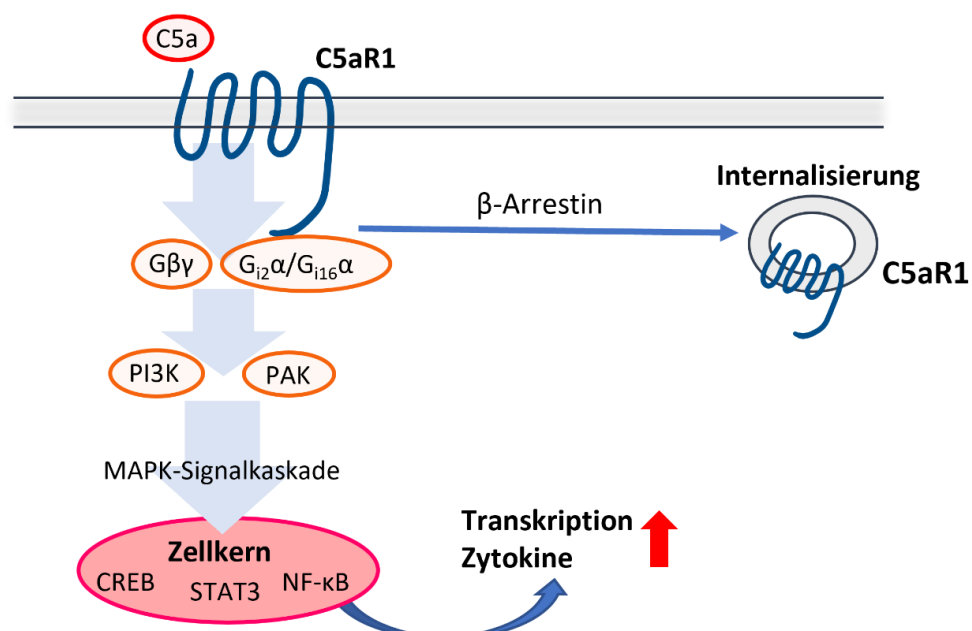
C5aR1 Rezeptor, so wird der C5a-C5aR1-Komplex rasch internalisiert. Nach Abbau des C5a wird der C5aR1 wieder an die Zelloberfläche transportiert und kann dort erneut ein C5a Molekül binden [94].

Der C5aR1 wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert: So exprimieren nahezu alle Zellen der myeloischen Linie, wie beispielsweise basophile [52], eosinophile [66] und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen [83], Kupfferzellen [76], Chondrozyten [99] und Mikroglia [91, 119, 156] den Rezeptor. Es konnte auch in CD4 positiven Lymphozyten die Anwesenheit des C5aR1-Gens nachgewiesen werden [46], wobei die Rolle und die Expression des Rezeptors in der lymphatischen Zelllinie noch nicht abschließend geklärt ist [91]. Ignatius et al. konnte 2011 zudem zeigen, dass der C5aR1 auch auf Knochenzellen, wie den Osteoblasten, Osteoklasten und osteogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) exprimiert wird [61].

Das Gen, welches für den C5aR1 Rezeptor kodiert, ist auf Chromosom 19 (q13.33) lokalisiert [40]. Die Expression des Rezeptors wird dabei von verschiedenen Zytokinen reguliert. So führt Prostaglandin E2 zu einer erhöhten Expression des C5aR1 auf dendritischen Zellen [148]. Auch konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 (IL-6) während einer Sepsis zu einer Hochregulierung des C5aR1 in mehreren Gewebetypen führt [110, 111]. Des Weiteren führt Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu einer erhöhten Expression des C5aR1 im Gehirn nach Schädeltrauma oder Listeriose [134, 135]. Durch die Erhöhung der Dichte an Rezeptoren wird die Entzündungsreaktion und somit die Bekämpfung von Pathogenen in den befallenen Geweben verstärkt [117]. Mäuse, in denen der C5aR1 Rezeptor durch einen Knockout des Gens nicht exprimiert wird, sind lebensfähig, zeigen aber eine verminderte Mukosa-assoziierte Infektabwehr [54]. Darüber hinaus zeigen die Rezeptor-defizienten Tiere einen mildereren Krankheitsverlauf in einer Reihe von immunvermittelten Pathologien, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis [63] oder diversen Hypersensitivitätsreaktionen [55, 126]. Zusammenfassend wird der C5aR1 Rezeptor auf der einen Seite zur effektiven Bekämpfung von Pathogenen benötigt, auf der anderen Seite zeigt sich der C5aR1 Rezeptor bei fehl gerichteter Immunaktivität als wesentlicher Akteur in immunvermittelter Gewebsschädigung [70]. Zur Auslösung von proinflammatorischen Effekten ist die Bindung des C5a-Moleküls an den C5aR1 Rezeptor nötig.

### ▪ C5a-C5aR1-Achse

Die intrazellulären Signalwege, die bei Bindung des C5a Moleküls an den C5aR1 Rezeptor ausgelöst werden, sind komplex und vom jeweiligen Zelltyp abhängig. So ist der C5aR1 Rezeptor vor allem an das Pertussis-Toxin-sensitive G-Protein  $G_{i2}\alpha$  gekoppelt, kann jedoch in Monozyten und Nierenzellen auch mit  $G_{i16}\alpha$  interagieren [19, 90, 129]. Über die G-Proteine kann der aktivierte C5aR1 Rezeptor wiederum mit diversen intrazellulären Proteinen interagieren. Beispielsweise führt die Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin zur Clathrin vermittelten Internalisierung des C5a-C5aR1-Komplexes [16]. Weiter kann C5aR1 über die G-Protein vermittelte Aktivierung der p21-aktivierte Kinase (PAK) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zur Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) führen [57]. Diese aktivieren wiederum die MAPK-Signalkaskade, die zu einer veränderten Aktivität nukleärer Transkriptionsfaktoren, wie dem cAMP responsive element-binding protein (CREB) [102], dem signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [78] oder dem nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) [157] führen kann (siehe Abb. 3). Darüber hinaus kann die C5a Bindung an den C5aR1 je nach Zelltyp eine Vielzahl an weiteren Transduktionswegen zur Folge haben [20, 27, 64, 94, 96].



**Abb. 3 Vereinfachtes Schema der Signaltransduktion des C5aR1 Rezeptors**

$G\beta\gamma$ : G-Protein Untereinheit  $\beta$  und  $\gamma$ ,  $G_{12}\alpha/G_{16}\alpha$ :  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_{i2}$ - bzw.  $G_{i16}$ -Proteins, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PAK: p21-aktivierte Kinase, MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, CREB: cAMP responsive element-binding protein, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells. Eigene Darstellung.

Die unterschiedlichen Signaltransduktionswege führen zu diversen Effekten der C5a-C5aR1 Interaktion. Dabei kommt es vorrangig zu proinflammatorischen Vorgängen, wie zu der Ausschüttung von Zytokinen [27, 49], der Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten und Mastzellen [39, 52, 65], der Induktion des oxidativen Burst in Monozyten [17] und der Chemotaxis von neutrophile Granulozyten und Makrophagen [49, 130]. Zudem kommt es in Folge der Ausschüttung der Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 [53, 64, 137] zur Auslösung weiterer proinflammatorischer Effekte, welche von lokal begrenzten Entzündungsreaktionen, bis zum Multiorganversagen reichen können [38].

Die Effekte der C5a-C5aR1 Interaktion sind jedoch nicht nur auf Zellen des Immunsystems beschränkt. So konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von glatten Muskelzellen mit C5a zur Kontraktion dieser Zellen führt [120, 136], C5a als Wachstumsfaktor während der Leberregeneration fungieren kann [33] und die C5a-C5aR1-Achse eine entscheidende Rolle in der Knochenhomöostase einnimmt [62, 73].

#### ▪ C5a-C5aR2-Achse

Während der C5aR1 Rezeptor relativ gut untersucht und verstanden ist, ist die Funktion des C5aR2 (auch C5CL2) Rezeptor noch unklar [158]. Der C5aR2 ist ein aus sieben Transmembranhelices bestehender Rezeptor, welcher anders als C5aR1 nicht an ein G-Protein gekoppelt ist [97]. Der C5aR2 Rezeptor bindet hauptsächlich C5a und C5a-des-arg, wobei weitere Liganden, wie C3a und C4a diskutiert werden [22]. Dabei wird bei Ligandenbindung kein klassischer Rezeptorpathway ausgelöst [97]. Eine Hypothese besteht darin, dass es sich um einen so genannten Decoyrezeptor handelt, welcher aktivierte Komplementfaktoren aus dem Extrazellularraum beseitigt [125]. Hierfür spricht, dass das Fehlen des C5aR2 Rezeptors mit einem schwereren Verlauf von allergischer Kontaktdermatitis [146] und Lipopolysaccharid-induziertem Lungenschaden [147] assoziiert werden konnte. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass C5aR2-Knockout-Mäuse mildere Symptome, geringere Inflammation sowie weniger Gewebsschaden nach experimentell allergischem Asthma [159], akutem Nierenschaden [11] und Sepsis [112] aufweisen [158]. Aktuell wird daher angenommen, dass der C5aR2 Rezeptor modulierend auf die komplementvermittelte Immunreaktion einwirkt [158].

Auch für den C5aR2 Rezeptor konnte eine Beteiligung an der Knochenhomöostase nachgewiesen werden [73].

## 1.2 Knochen

Knochen zählt wie Fett- oder Knorpelgewebe zur Grundgewebsart des Binde- und Stützgewebes. Knochen üben dabei eine Vielzahl an Funktionen aus. Sie sorgen beispielsweise für den Schutz innerer Organe, der Bildung von Blutzellen und ermöglichen zusammen mit Muskeln und Sehnen die Mobilität des Menschen. Des Weiteren dient das Knochengewebe als Mineralienspeicher und trägt dadurch zur Aufrechterhaltung des Mineralhaushalts bei.

Knochen werden auf Grund ihres Aufbaus in verschiedene Formen unterteilt. Es wird unterschieden zwischen langen, in Epi-, Meta- und Diaphyse aufgeteilte Röhrenknochen (*Ossa longa*), welche blutbildendes Knochenmark enthalten, platte marklose Knochen (*Ossa plana*), die beispielsweise einen Großteil des Schädels bilden, sowie irregulär geformte Knochen (*Ossa irregularia*), wie die Wirbelkörper der Wirbelsäule. Allen Knochenformen ist gemein, dass sie aus kortikalen und trabekulären Anteilen bestehen. Die kortikalen Anteile bilden dabei die stabile äußere Schicht des Knochens (*Substantia corticalis*), wohingegen sich die schwammartigen, trabekulären Anteile im Inneren des Knochens befinden (*Substantia spongiosa*).

Obwohl Knochen aus hartem, kalzifiziertem Material bestehen, handelt es sich um metabolisch aktives, gut durchblutetes Gewebe, das einem lebenslangen dynamischen Auf- und Abbau, dem so genannten Knochen-Remodeling, unterliegt. Hierbei wird altes oder beschädigtes Knochengewebe abgebaut und durch neues ersetzt. Weiter kann der Knochen über das Knochen-Remodeling an veränderte mechanische Ansprüche angepasst werden. So werden pro Jahr zwischen 2-5 % der kortikalen und 28 % der trabekulären Knochenmasse erneuert [44]. Durch diesen Mechanismus kann der Organismus auf veränderte mechanische Beanspruchung des Knochens reagieren und Materialermüdung entgegenwirken.

### 1.2.1 Knochengewebe

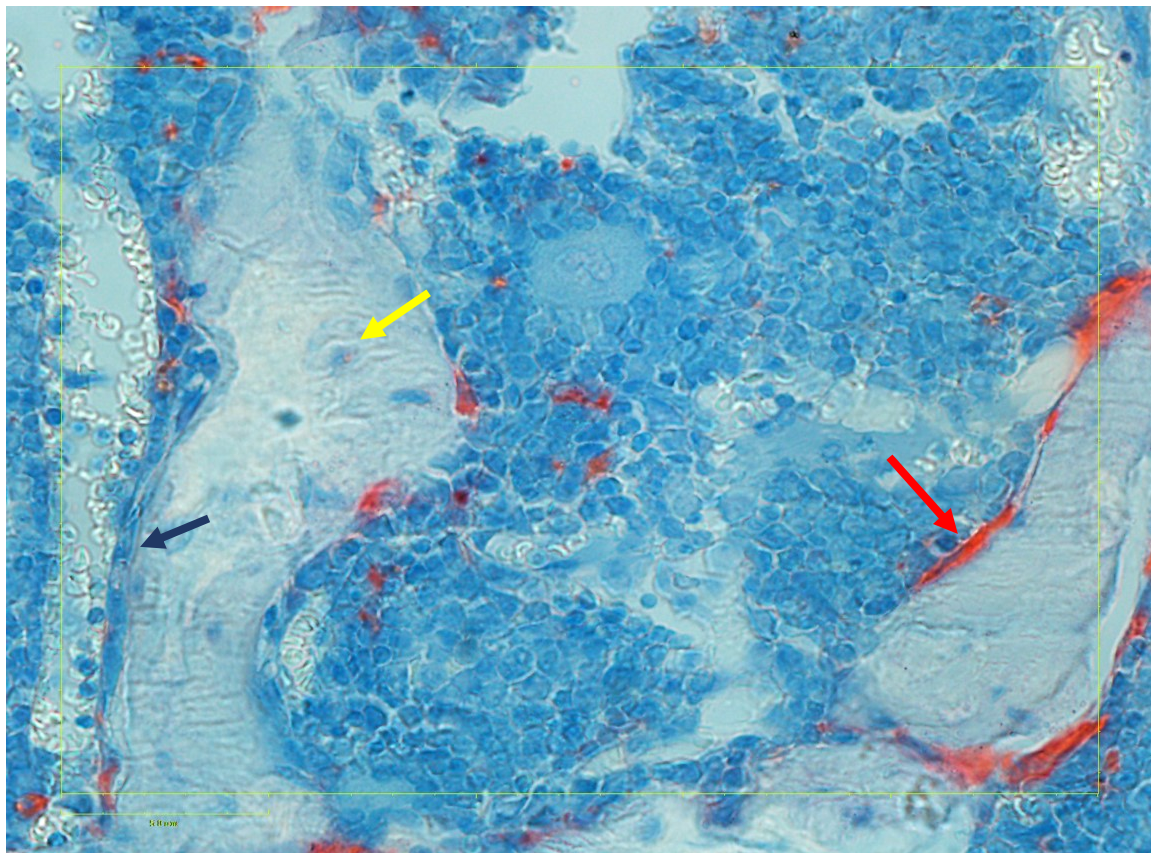
Die Extrazellulärmatrix des Knochengewebes besteht aus organischen und anorganischen Anteilen. Dabei nehmen die anorganischen Anteile etwa 60 % und

die organischen Komponenten weitere 30 % ein. Die restlichen 10 % der Extrazellulärmatrix bestehen aus Wasser.

Das organische Knochengewebe, auch Osteoid genannt, bildet die Grundsubstanz des Knochens. Es besteht zu etwa 90 % aus Kollagen Typ I, welches für die hohe Zugfestigkeit des Knochengewebes verantwortlich ist und den Hydroxylapatit-Kristallen als Leitstruktur dient [140]. Die restlichen 10 % des Osteoids werden von verschiedenen Proteinen gebildet, die unter anderem eine Rolle bei der Zelladhäsion (Osteopontin, Fibronectin, Osteoadherin) und der Regulation des Knochenumbaus (Osteocalcin, Osteonectin, Decorin) einnehmen [5]. Neben der Extrazellulärmatrix sind auch die Knochenzellen Teil des Knochengewebes.

### 1.2.2 Knochenzellen

Es gibt drei knochenspezifische Zellpopulationen: die knochenbildenden Osteoblasten, die von Knochen umgebenen Osteozyten sowie die knochenresorbierenden Osteoklasten (siehe Abb. 4).



**Abb. 4 Darstellung der Knochenzellen**

Osteoklasten (roter Pfeil), Osteoblasten (blauer Pfeil) und Osteozyten (gelber Pfeil), 400x Vergrößerung, Anfärbung mit der Tartrateresistente saure Phosphatase (TRAP)-Färbung. Eigene Darstellung.

### ▪ Osteoblasten

Osteoblasten sind einkernige Knochenzellen, die dem Aufbau und der Mineralisierung der Knochengrundsubstanz dienen. Osteoblasten entstehen während der so genannten Osteoblastogenese aus MSCs. Dabei differenzieren die MSCs zunächst unter dem Einfluss von Transkriptionsfaktoren, wie dem runt-related transcription factor 2 (Runx2) [71] und Osterix, von Wachstumsfaktoren, wie dem bone morphogenetic protein (BMP), dem fibroblast growth factor und dem epidermal growth factor sowie dem wingless Int-1-Signalweg zu Prä-Osteoblasten und schließlich zu reifen Osteoblasten [47, 58].

Reife, aktive Osteoblasten besitzen eine kubische Form und sitzen dem Osteoid, welches sie bilden und mineralisieren, einreihig auf. Hierzu sezernieren die Osteoblasten zunächst die Kollagene und Strukturproteine des Osteoids in den Interzellularraum. In diesem Prozess werden neben den stabilitätsgebenden Strukturproteinen auch eine Reihe regulatorischer Proteine freigesetzt. So bilden Osteoblasten das Peptidhormon Osteocalcin, welches die Knochenformation stimuliert, das Glykoprotein Osteopontin, welches an der Vermittlung der Verankerung der Osteoklasten an die Knochenmatrix beteiligt ist, sowie das Enzym alkalische Phosphatase [58], dessen Funktion im Knochenmetabolismus zwar noch nicht vollständig bekannt ist [150], allerdings als Marker der Osteoblastenaktivität Verwendung findet. In einem zweiten Schritt setzen die Osteoblasten Calcium- und Phosphationen per Exozytose frei, welche sich an die Proteine des zuvor gebildeten Osteoids anlagern und zu Hydroxylapatit auskristallisieren. Dieser Prozess wird auch Biomineralisation genannt und verleiht dem Knochen seine Druckstabilität.

Auf ihrer Oberfläche exprimieren Osteoblasten den receptor activator of NF- $\kappa$ B-Ligand (RANKL), welcher bei Bindung an den Rezeptor receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) auf Osteoklasten-Vorläuferzellen als potenter Stimulus für deren Differenzierung zu reifen Osteoklasten fungiert [115]. Während sich ein Großteil der Osteoblasten nach Bildung des mineralisierten Knochengewebes in Apoptose begibt, differenzieren einige zu Osteozyten.

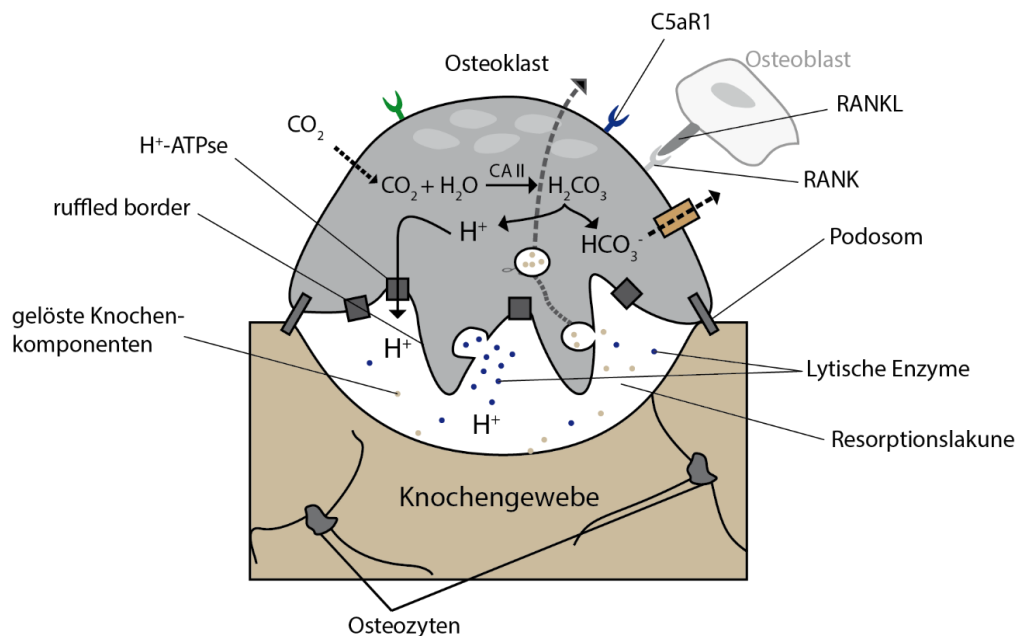
### ▪ Osteozyten

Osteozyten sind die am häufigsten vorkommenden Knochenzellen. Sie sind vollständig von mineralisiertem Knochengewebe umgebene, ausdifferenzierte Osteoblasten mit langen dendritischen Ausläufern. Über die Ausläufer stehen die einzelnen Osteozyten eines Knochens untereinander via Gap Junctions in Kontakt und bilden so ein Synzytium, das den gesamten Knochen durchzieht. Dadurch sind sie in der Lage mechanische Belastungen des Knochens zu detektieren und daraufhin regulatorisch auf das Knochengewebe einzuwirken [21]. Hierzu sezernieren Osteozyten unter anderem das Glykoprotein Sclerostin, welches das Knochen-Remodeling inhibiert. Dies hat auch zur Folge, dass in Gewebsabschnitten, in denen Osteozyten untergehen, durch das Fehlen der Sclerostin Freisetzung das Knochengewebe von Osteoklasten ab- und anschließend von Osteoblasten wieder aufgebaut wird [34].

### ▪ Osteoklasten

Osteoklasten sind aus der Fusion hämatogener Monozyten hervorgehende, mehrkernige Riesenzellen, welche Knochengewebe durch Bildung von Proteasen und saurem Milieu abbauen. Im Knochen kommen die Osteoklasten vor allem an Stellen erhöhten Umbaus, wie beispielsweise der Epiphysenfuge, vor. Im restlichen Gewebe finden sich hingegen deutlich weniger Osteoklasten [114]. Die Osteoklastogenese, d.h. die Bildung neuer Osteoklasten, wird hauptsächlich durch das Zytokin Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und dem auf Osteoblasten exprimierten Tumornekrosefaktor RANKL reguliert, wobei weitere Wachstumsfaktoren beteiligt sind [13]. Die Osteoklasten entstehen durch Verschmelzung mehrerer colony-forming unit granulocyte/monocyte Vorläuferzellen, die der Zelllinie der Monozyten/Makrophagen angehören [114]. Die so entstandenen Zellen besitzen im Schnitt sieben Zellkerne und einen Durchmesser von 50-100 µm [103]. Osteoklasten sind durch amöboide Bewegung im Stande, sich von Chemokinen wie Matrix-Metalloprotease-9, M-CSF oder RANKL geleitet [67, 133] zwischen Resorptionszonen zu bewegen. Gelangt ein Osteoklast an eine Resorptionszone, organisiert sich das Cytoskelett in einen apikalen und basalen Pol (siehe Abb. 5). Am apikalen Pol bildet sich zentral durch Auffaltung der Zellmembran die so genannte „ruffled border“ aus. Um diesen Resorptionsraum von der übrigen Extrazellulärmatrix abzugrenzen, wird in der

umgebenden sealing zone durch Integrin-haltige Podosomen ein enger Kontakt zwischen dem Osteoklasten und der Knochensubstanz hergestellt. In diese abgegrenzten Resorptionslakunen sezerniert der Osteoklast die von der intrazellulär gelegenen Carboanhydrase II (CA II) produzierten Protonen über eine  $H^+$ -Adenosintriphosphatase (ATPse) (siehe Abb. 5). Zusätzlich zu diesem chemischen Abbau der anorganischen Anteile der Knochenmatrix durch das saure Milieu, sezerniert der Osteoklast lytische Enzyme wie beispielsweise die Protease Cathepsin K und die tartrate resistente saure Phosphatase (TRAP) [45]. Während Cathepsin K der Spaltung von Kollagen Typ 1 dient [4], ist das TRAP Enzym am Abbau von Phosphoproteinen beteiligt [48]. Nachdem die einzelnen Komponenten aus der Knochenmatrix gelöst wurden, werden diese durch Transzytose in die Extrazellulärmatrix abgegeben.



**Abb. 5 Skizze Osteoklast während der Knochenresorption**

$H^+$ -ATPse:  $H^+$ -Adenosintriphosphatase,  $CO_2$ : Kohlenstoffdioxid,  $H_2O$ : Wasser, CA II: Carboanhydrase II,  $H_2CO_3$ : Kohlensäure,  $H^+$ : Proton,  $HCO_3^-$ : Hydrogencarbonat, RANK: Rezeptor activator of NF- $\kappa$ B, RANKL: RANK Ligand. Eigene Darstellung in Anlehnung an Cappariello et al. [23].

### ▪ Regulation des Knochenumsatzes

Für die Funktionalität des Knochengewebes ist das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation entscheidend. Verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der knochenresorbierenden Osteoklasten, so kann sich das Krankheitsbild der Osteoporose entwickeln. Im Gegensatz dazu führt ein Ungleichgewicht zu Gunsten des Knochenaufbaus zu Osteosklerose oder Osteopetrose [24]. Es bedarf also einer genauen Regulierung der Knochenzellen.

Diese Regulierung wird vor allem durch direkte Kommunikation der Knochenzellen miteinander erreicht [82]. Einer der Hauptakteure ist hierbei das Osteoprotegerin (OPG)-RANK-RANKL-System. Osteoblastäre Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche RANKL, Osteoklasten-Vorläuferzellen den entsprechenden Rezeptor RANK. Osteoklastogenese *in vivo* kann nur stattfinden, indem ein direkter Zell-Zell-Kontakt erfolgt [139]. In frühen Studien wurde gezeigt, dass Osteoklasten zusammen mit osteoblastären Zellen *in vitro* angezüchtet werden können, eine Osteoklastenkultur getrennt von osteoblastären Zellen jedoch nicht möglich war [138]. Später wurde dies durch Zugabe von löslichem RANKL ermöglicht [107]. Auch reife Osteoklasten benötigen zur Aufrechterhaltung der Aktivität und zur Verhinderung der Apoptose eine Stimulation mit RANKL [13]. Neben dem membranständigen RANKL exprimieren osteoblastäre Zellen den löslichen RANKL-Decoy-Rezeptor OPG, der an RANKL bindet und so die RANK-RANKL-Interaktion verhindert. Durch das OPG-RANK-RANKL-System sind osteoblastäre Zellen in der Lage, die Knochenresorption durch Osteoklasten zu regulieren [80, 113]. Viele Stimuli der Knochenresorption haben keinen direkten Einfluss auf die Bildung oder Aktivität von Osteoklasten, sondern werden erst indirekt über das OPG-RANK-RANKL-System von osteoblastären Zellen vermittelt. Beispiele hierfür sind das Parathormon, eines der Haupthormone des Calciumstoffwechsels, 1,25(OH)<sub>2</sub>-Cholecalciferol (Calcitriol/Vitamin D) oder das weibliche Sexualhormon Estradiol [51, 104, 128].

Neben dem OPG-RANK-RANKL System können Osteoblasten über weitere Signalwege, wie dem M-CSF/M-CSF-Rezeptor-, Lysophosphatidic acid (LPA)/LPA-Rezeptor- oder dem Fas-Ligand/Fas-Rezeptor-Weg Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung (M-CSF) [68], Zellfusion (LPA) [85] oder Apoptose (Fas) [145] der Osteoklasten nehmen [25].

Im Gegenzug können Osteoklasten ebenfalls die Aktivität von Osteoblasten beeinflussen. Dies erfolgt zum einen durch Expression von Signalmolekülen, wie dem Semaphorin 4D (Inhibition von Osteoblasten-Aktivität) [95] oder dem Ephrin 2 (Stimulation der Osteoblasten-Differenzierung) [160], zum anderen werden während der Resorption der Knochenmatrix die zuvor von Osteoblasten eingelagerten „coupling factors“, wie z.B. Insulin-like growth factors (IGF) I und II und dem transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), aus dem Gewebe freigesetzt und

aktiviert [56, 81]. IGF I/II und TGF- $\beta$  führen anschließend zur Stimulation der Osteoblasten und somit zum Knochenaufbau.

### 1.2.3 Ossifikation und Knochenwachstum

Wie der Knochenumsatz, ist auch die Ossifikation, also die Knochenbildung, ein komplexer Prozess, der von verschiedenen Faktoren streng reguliert wird. Dabei wird zwischen desmaler und chondraler Ossifikation unterschieden. Durch die desmale Ossifikation werden unter anderem die platten Knochen des Schädels und das Schlüsselbein gebildet. Hier wird das Knochengewebe direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe gebildet [8]. Bei der chondralen Ossifikation hingegen wird zunächst ein knorpeliges Knochenmodell gebildet, welches sekundär verknöchert. Diese Form der Ossifikation tritt in der Embryonalphase während der primären Osteogenese der langen Röhrenknochen und der Wirbelkörper auf sowie während des pubertären Längenwachstums [8].

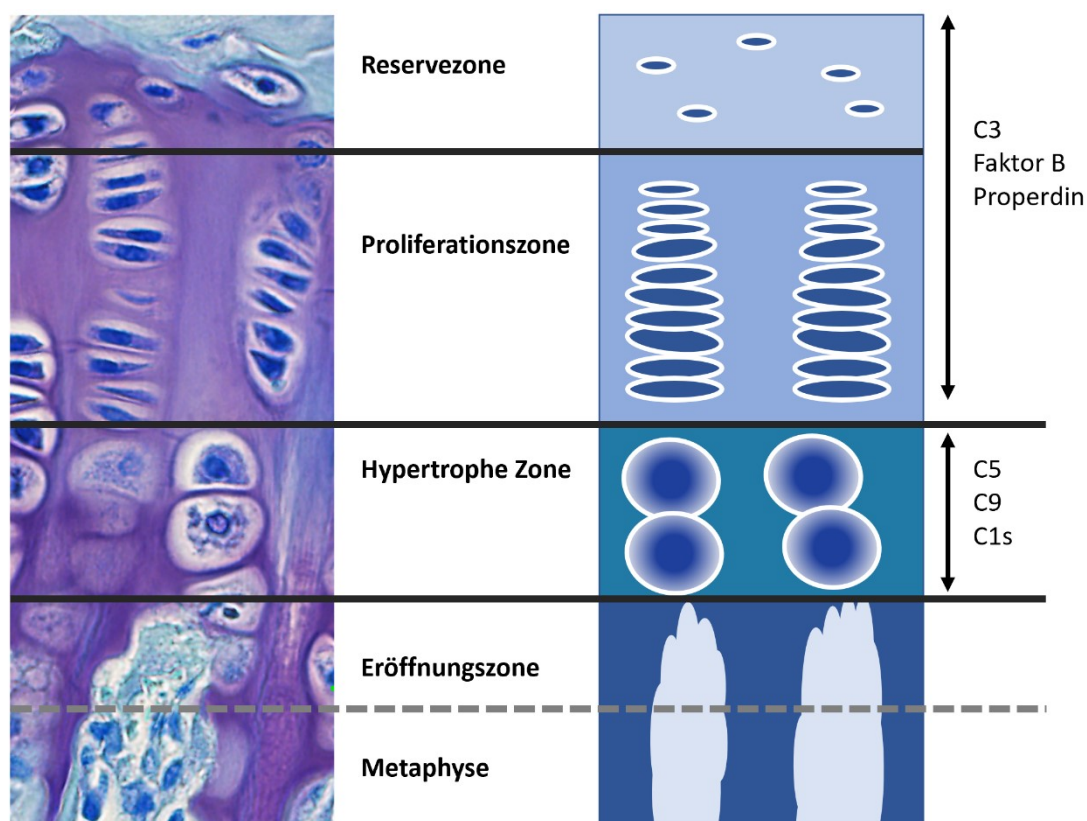
Im Bereich der Epiphysenfuge, in der das Längenwachstum des Knochens stattfindet, tritt die enchondrale Ossifikation in einer spezialisierten Form auf. Hier gliedert sich der hyaline Knorpel der Wachstumsfuge in vier Zonen. Direkt an der Epiphyse liegt die Reservezone, in der die Chondrozytenvorläuferzellen liegen. Diese differenzieren zu Chondrozyten und wandern in die Proliferationszone ein, wo sie sich in longitudinalen Chondrozytensäulen anlagern und beginnen Knorpelgewebe zu produzieren. Durch den stetigen Nachschub an Zellen aus der Reservezone werden die Chondrozyten weiter in Richtung Diaphyse gedrängt. Dabei durchlaufen die Chondrozyten die hypertrophe Zone, in der sie durch Wasseraufnahme eine Volumenzunahme erfahren, wodurch es zur weiteren Dehnung der Wachstumsfuge und somit zu einer Zunahme der Länge des Röhrenknochens kommt. An die hypertrophe Zone schließt sich die Eröffnungszone an, in der die eigentliche Ossifikation stattfindet. Hier wird der Knorpel von Chondroklasten bzw. Osteoklasten abgebaut und anschließend von Osteoblasten mit Osteoid ersetzt (siehe Abb. 6). Im letzten Schritt wird das Osteoid durch Mineralisation in Knochengewebe umgewandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Chondrozyten in Osteoblasten transformiert werden kann [155]. Der Wachstumsprozess in der Epiphysenfuge wird durch lokale und systemische Faktoren reguliert. Hauptakteure sind hier das indian hedgehog protein, welches die Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten sowie die Differenzierung der

Osteoblasten stimuliert [79], das parathormon-related protein, welches die Hypertrophie der Säulenchondrozyten inhibiert [79], sowie BMP, welche als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren fungieren und darüber hinaus Einfluss auf die Form des späteren Knochens nehmen [8, 69]. Neben diesen klassischen Mediatoren scheint bei der Ossifikation auch das Komplementsystem eine Rolle zu spielen.

## 1.3 Komplement und Knochen

### 1.3.1 Komplement und Ossifikation

Zusätzlich zu der klassischen Wirkung des Komplementsystems als Teil des angeborenen Immunsystems kann das Komplementsystem Einfluss auf das Knochengewebe haben [87, 122]. Dies wird bereits während der Knochenentwicklung deutlich, da gezeigt werden konnte, dass die Komplementfaktoren C3, C5, C9 und Faktor B während der enchondralen Ossifikation in der Epiphysenfuge zu finden sind [3]. Weiter konnte eine Zonen-spezifische Lokalisation der einzelnen Faktoren gezeigt werden. In der Reservezone und der Proliferationszone wurden vorrangig Faktor C3, Faktor B und Properdin, ein Protein, welches die Proteasen des alternativen Wegs stabilisiert, exprimiert, während in der hypertrophen Zone vor allem C5 und C9 vorhanden waren [3] (siehe Abb. 6).



**Abb. 6 Zonen-spezifische Aufteilung der Komplementfaktoren in der Epiphysenfuge**

C1s bis C9: Komplementfaktoren. Eigene Darstellung in Anlehnung an Mödinger et al. [87]

Dieses Verteilungsmuster führte zur Annahme, dass das Komplementsystem an der Regulation der Knorpel-Knochen-Transformation beteiligt ist [3, 87]. Ebenfalls

konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten in der Lage sind C1s, C2, C3 und C4 zu bilden und somit Einfluss auf die lokale Komplementaktivität zu nehmen [15]. C1s ist dabei an der Spaltung von Kollagen Typ I und II beteiligt und wird zunehmend während der Differenzierung der Chondrozyten exprimiert, wobei im hypertrophen Chondrozyt am meisten C1s exprimiert wird [141]. Ebenfalls scheinen C3 und C5 einen Einfluss auf die Knorpel-Knochen-Transformation in der Wachstumsfuge zu besitzen, da Mäuse, welche diese Faktoren nicht exprimieren, zwar einen makroskopisch unauffälligen Knochenphänotyp aufweisen, jedoch eine signifikant verbreiterte Epiphysenfuge besitzen [36].

### **1.3.2 Einfluss des Komplementsystems auf Knochenzellen**

Das Komplementsystem ist auch an der Regulierung der Differenzierung von verschiedenen Knochenzellen beteiligt, wodurch es Einfluss auf die Knochenhomöostase nimmt. Zahlreiche Studien zeigten, dass das Komplementsystem die Osteoklastogenese positiv beeinflusst [122]. Zunächst wurde gezeigt, dass für eine effiziente Osteoklastogenese die Aktivierung durch lokale Komplementfaktoren benötigt wird [118, 142]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Knochenmarkszellen, die defizient für den Faktor C3 sind, weniger RANKL und IL-6 exprimieren, was zu einer Verringerung der Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten führt [142]. Ebenso führt das Fehlen der Rezeptoren C3aR und C5aR1 auf Knochenmarkszellen zu einer Beeinträchtigung der Osteoklastogenese [142]. Diese Ergebnisse bestätigend wurden in späteren Studien die C3aR, C5aR1 und C5aR2 Rezeptoren auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen nachgewiesen [61, 62, 122]. Weiter zeigte sich, dass eine Stimulation dieser Rezeptoren auf peripheren Mononukleären Blutzellen mit C3a und C5a zu einer signifikanten Steigerung der Osteoklastogenese führt [62]. Ob es sich dabei um direkte oder indirekte, durch Osteoblasten vermittelte Effekte handelt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, da auch MSCs, Osteoblasten und Osteozyten C3aR, C5aR1 und C5aR2 auf ihrer Oberfläche exprimieren [73, 123]. Während der Differenzierung von MSCs zu reifen Osteoblasten exprimieren MSCs vermehrt C3aR und C5aR [62]. Zudem führt die Stimulation von MSCs mit C3a und C5a zu einer beschleunigten Osteoblasten-Differenzierung [124]. Da MSCs selbst in der Lage sind bei Zugabe von Blutserum C3a und C5a zu bilden [89], wird eine

Beteiligung der beiden Anaphylatoxine an der Differenzierung von MSCs über einen autokrinen Signalweg vermutet [87].

Werden C3aR und C5aR1 auf Osteoblasten mittels IL- $\beta$  und des jeweiligen Anaphylatoxins stimuliert, führt dies zur Produktion von IL-6 und IL-8 [62]. IL-6 führt dabei über die Erhöhung der RANKL Expression zu einer gesteigerten Osteoklastogenese [153]. Da es sich dabei um proinflammatorische Zytokine handelt, wird angenommen, dass die Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer Immunreaktion in den Zellen führt und das Komplementsystem besonders in entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle im Knochenmetabolismus einnimmt [73]. Übereinstimmend mit diesen Vermutungen konnte gezeigt werden, dass C3aR und C5aR defiziente Mäuse gegen eine Antikörper-induzierte Arthritis resistent sind [6]. Ebenso sind C5aR defiziente Mäuse gegen den Verlust von Knochenmasse durch Parodontitis geschützt [77]. Während der inflammatorischen Phase der Frakturheilung wird der C5aR1 Rezeptor verstärkt auf Osteoblasten exprimiert, wodurch vermehrt Osteoblasten rekrutiert werden können [61]. Besonders während der Frakturheilung scheint dabei die genaue Regulierung der Aktivität der C5a-C5aR1-Achse entscheidend zu sein. Es zeigte sich, dass eine Überexpression des C5aR1 Rezeptors auf Osteoblasten die Frakturheilung signifikant beeinträchtigt [9]. Beispielsweise zeigte sich im frakturierten Knochen eine signifikant geringere Knochenmasse, eine geringere Knochenmineraldichte sowie eine verringerte Biegesteifigkeit im Vergleich zu Kontrolltieren. Hierbei wurde vermutet, dass dies die Folge eines veränderten RANKL/OPG Verhältnisses ist, welches in einer sekundär erhöhten Resorption durch Osteoklasten resultiert [9]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines C5aR1 Antagonisten die Beeinträchtigung der Frakturheilung durch eine systemische Inflammation verhindern kann [109]. Demnach scheint sich einerseits eine zu hohe Aktivität der C5a-C5aR1-Achse und andererseits die komplette Abwesenheit des Komplementfaktors C5 negativ auf die Frakturheilung auszuwirken [36], wonach eine ausgeglichene C5a-C5aR Aktivität für eine erfolgreiche Frakturheilung nötig ist. Dabei könnte die Beeinflussung der Migration von Osteoblasten und MSCs sowie von regulatorischen Zytokinen durch das Komplementsystems eine entscheidende Rolle spielen [122].

Um die Mechanismen und die Effekte der beiden C5a-Rezeptoren auf die Knochenhomöostase besser zu verstehen, wurden Mäuse mit globalen C5aR1 bzw.

C5aR2 Knockout auf ihre Knochenphänotypen hin untersucht [73]. Die Untersuchung der C5aR2-defizienten Tiere ergab eine signifikant erhöhte Knochenmasse, wobei Marker des Knochenauf- und abbaus nicht signifikant verändert waren. Auf zellulärer Ebene zeigte sich keine Veränderung in der Anzahl an Osteoklasten, die Anzahl an Osteoblasten war allerdings signifikant erhöht [73]. Die Autoren vermuteten daher, dass die erhöhte Knochenmasse in diesen Tieren durch die erhöhte Anzahl an Osteoblasten zu begründen ist [73]

Die C5aR1-defizienten Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte Knochenmasse, kortikale Dicke und Biegesteifigkeit des Femurs, wobei diese Effekte deutlich stärker ausgeprägt waren, als im C5aR2 Knockout. Ebenso zeigten sich im trabekulären Knochen eine höhere Anzahl und Dicke der Trabekel im Vergleich zu den Kontrolltieren. Histologisch konnte eine reduzierte Anzahl an Osteoklasten festgestellt werden, wobei der Serumspiegel des C-terminale Telozeptids, welches als Aktivitätsmarker des Knochenabbaus und somit indirekt als Marker der Aktivität der Osteoklasten dient, nicht signifikant verringert waren. Die Marker des Knochenaufbaus (Procollagen Typ 1 N-terminale Propeptide) sowie die Knochenbildungsrate waren signifikant erhöht. In *in vitro* Versuchen mit C5aR1-defizienten Osteoklasten-Vorläuferzellen, welche aus dem Knochenmark der langen Röhrenknochen isoliert wurden, zeigte sich anhand einer signifikant verringerten Generierung TRAP-positiver Zellen eine deutlich gestörte Osteoklastogenese. In Folge dessen zeigte sich eine verringerte Anzahl an reifen Osteoklasten. Die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten war hingegen nicht signifikant beeinflusst [73]. Zusammenfassend deuten die Daten des globalen C5aR1 Knockouts darauf hin, dass die erhöhte Knochenmasse in C5aR1 defizienten Mäuse die Folge einer verringerten Knochenresorption und nicht eines erhöhten Knochenaufbaus ist. Dabei scheint die Knochenresorption durch die Beeinträchtigung der Osteoklastogenese verringert zu sein. Ob es sich dabei um direkte Einflüsse des Komplementsystems, insbesondere des C5aR1, auf die Osteoklasten handelt oder um indirekte Effekte über Osteoblasten oder andere Zellen des Immunsystems konnte bisher noch nicht geklärt werden.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die aktuelle Studienlage weist auf eine komplexe Rolle des Komplementsystems, insbesondere der C5a-C5aR1-Achse in der Knochenhomöostase hin. Mäuse, die einen globalen C5aR1 Knockout besitzen weisen eine erhöhte Knochenmasse, eine erhöhte Biegesteifigkeit ihrer Femora sowie eine signifikant verringerte Anzahl an Osteoklasten auf [73]. Da in diesem globalen C5aR1 Knockout jedoch alle Zelltypen des Knochens betroffen sind, konnten bisher nur begrenzt Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bzw. die Effektor-Zellpopulationen gezogen werden. Zur Aufklärung zugrundeliegender zellulärer Mechanismen ist die Differenzierung von direkten Effekten des Komplementsystems auf Osteoklasten und indirekten, beispielsweise über Osteoblasten und Osteozyten vermittelten Effekten nötig. Um diese Differenzierung vornehmen zu können, bedarf es Zell-spezifische Knockoutmodelle. Hier setzt die vorliegende Arbeit an und untersucht erstmalig den Knochenphänotyp eines Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockout in der Maus. Dazu wurden Knochen von weiblichen und männlichen C5aR1-GFP-fl/fl-Lysozym M (LysM)-Cre Mäusen sowie deren Kontroll-Geschwistertieren untersucht. Hierbei wurden die Wirbelkörper und Femora der Tiere mittels nicht-destruktiver Dreipunktbiegung, micro-computertomographischer ( $\mu$ -CT), immunhistochemischer und histologischer Analysen charakterisiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungen

| Tabelle 1 Liste der verwendeten Chemikalien und Kits |                                             |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Bezeichnung                                          | Hersteller/Vertrieb, Ort                    |
| Aqua destillata                                      | Apotheke Universitäts-klinikum, Ulm (DE)    |
| Aquatex                                              | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Avidin-Biotin blocking Kit                           | Vector Laboratories LTD., Peterborough (UK) |
| Citronensäure-Monohydrat                             | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Dinatriumtetraborat Decahydrat                       | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| EDTA                                                 | VWR International GmbH, Darmstadt (DE)      |
| Ethanol (unvergällt)                                 | Apotheke Universitäts-klinikum, Ulm (DE)    |
| Fast-Red-TR-Salz                                     | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| Fluoromount                                          | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)      |
| Formaldehyd (37%)                                    | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Hämatoxylin                                          | Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (DE)         |
| HCl                                                  | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)      |
| Hoechst 33342                                        | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)      |
| Isofluran                                            | Baxter GmbH, Unterschleißheim (DE)          |
| Isofluran                                            | Abbott Biotechnology GmbH, Wiesbaden (DE)   |

---

|                                            |                                             |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| L(+)-Weinsäure                             | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Mayers Hämaunlösung                        | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| NaCl 0,9%                                  | Braun AG, Melsungen (DE)                    |
| Naphthol-AS-MX-phosphat-dinatrium Salz     | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| Natrium-Acetat                             | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| Natriumcarbonat                            | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat              | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| NovaRed Substrat Kit                       | Vector Laboratories LTD., Peterborough (UK) |
| Pyronin G                                  | Merk Chemicals GmbH, Saarbrücken (DE)       |
| Silbernitrat                               | Serva, Heidelberg (DE)                      |
| Toluidinblau                               | Waldeck, Münster (DE)                       |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat                 | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| TRIS                                       | ATLAS Biolabs GmbH, Berlin (DE)             |
| Triton X 100                               | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| Vectastain Avidin-Biotin-Komplex Elite Kit | Vector Laboratories LTD., Peterborough (UK) |
| Vitro-Clud                                 | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)      |
| Wasserstoffperoxid                         | Sigma-Aldrich, St. Louis (US)               |
| Xylol                                      | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)      |

Tabelle 2 Liste der angesetzten Lösungen und Puffer

| <b>Bezeichnung</b>                 | <b>Zusammensetzung</b>                                                                                                          |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,1M Citronensäure                 | 5,25 g Citronensäure-Monohydrat<br>ad 250 ml Aqua dest.                                                                         |
| 0,1M Natriumcitrat                 | 14,7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat<br>ad 500 ml Aqua dest.                                                                       |
| 10x TBS Stock-Lösung               | 60,55 g TRIS<br>88,00 g NaCl<br>ad 1 l Aqua dest.<br>pH mit 25 % HCl auf 7,6 einstellen                                         |
| 1x TBS Gebrauchslösung             | 100ml 10x TBS<br>ad 1 l Aqua dest.<br>pH überprüfen und ggf. auf 7,6<br>einstellen                                              |
| Ammoniakwasser                     | 13,8 ml 25 % Ammoniak<br>ad 500 ml Aqua dest.                                                                                   |
| BSA Serumblock                     |                                                                                                                                 |
| Citratpuffer                       | 5,4 ml 0,1M Citronensäure<br>24,6 ml 0,1M Natriumcitrat<br>ad 300 ml Aqua dest.<br>pH überprüfen und ggf. auf 6,0<br>einstellen |
| Hämatoxylin Ulm                    | Hämatoxylin 1:5 Verdünnung in Aqua<br>dest.                                                                                     |
| Mayers Hämalan Verdünnung          | 1:5 Verdünnung mit Aqua dest.                                                                                                   |
| Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung | 10 g Natriumcarbonat<br>50 ml Formaldehyd (37%)<br>150 ml Aqua dest.                                                            |
| Natriumthiosulfat                  | 10 g in 200 ml Aqua dest.                                                                                                       |
| Peroxidase-Block                   | 10 ml 30% Wasserstoffperoxid<br>ad 100ml Aqua dest.                                                                             |
| Pikro-Fuchsin-Färbelösung          | 1:10 Verdünnung mit Aqua dest.                                                                                                  |
| Silbernitratlösung                 | 6 g Silbernitrat in 200 ml Aqua dest.                                                                                           |

|                            |                                                                                                                                                            |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TBS-T                      | 0,1% Tween20 in TBS                                                                                                                                        |
| Toluidinblau-Färbelösung A | 1,6 g Dinatriumtetraborat Decahydrat<br>1,6 g Toluidinblau<br>ad 160 ml Aqua dest.<br>+ 0,4 g Pyronin G ad 40 ml A. dest                                   |
| Toluidinblau-Färbelösung B | 1,36 g Natriumacetat ad 100 ml Aqua dest.<br>+ 0,1 g Toluidinblau                                                                                          |
| TRAP-Färbelösung           | 1,64 g Natriumacetat<br>0,75 g L(+)-Weinsäure 50 mM<br>ad. 100 ml Aqua dest.<br>0,05 g Naphtol-AS-MX phosphat<br>Dinatrium-Salz<br>0,11 g Fast-Red-TR-Salz |
| TTBS                       | 0,1% Triton X 100 in TBS                                                                                                                                   |

Tabelle 3 Liste der Primärantikörper

| Bezeichnung                | Artikelnummer | Hersteller/Vertrieb, Ort                |
|----------------------------|---------------|-----------------------------------------|
| <b>Primär Antikörper</b>   |               |                                         |
| Kaninchen anti C5aR/CD88   | #AP06508PU-N  | OriGene Technologies GmbH, Herford (DE) |
| Kaninchen anti Cathepsin K | #ab19027      | Abcam, Cambridge (UK)                   |

Tabelle 4 Liste der Sekundärantikörper

| Sekundär-Antikörper                  | Artikelnummer | Hersteller/Vertrieb, Ort               |
|--------------------------------------|---------------|----------------------------------------|
| Alexa Fluor® 488 Esel anti-Kaninchen | #A21206       | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) |
| Alexa Fluor® 594 Esel anti-Kaninchen | #A21207       | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) |
| Ziege anti-Kaninchen biotinyliert    | #B2770        | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) |

Tabelle 5 Liste der Seren

| <b>Seren</b>        | <b>Artikelnummer</b> | <b>Hersteller/Vertrieb, Ort</b>               |
|---------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
| Normal Goat Serum   | #005-000-121         | Jackson<br>ImmunoResearch<br>Europe, Ely (UK) |
| Normal Rabbit Serum | #011-000-120         | Jackson<br>ImmunoResearch<br>Europe, Ely (UK) |

### 2.1.2 Geräte und Software

Tabelle 6 Verwendete Geräte

| <b>Bezeichnung</b>                   | <b>Hersteller/Vertrieb, Ort</b>                      |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| μ-CT Skyscan 1172                    | Skyscan, Heerbrugg (CH)                              |
| Elektrische Pipettierhilfe „Pipetus“ | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (DE) |
| Fettstift DAKO-Pen                   | Agilent Technologies, Santa Clara (US)               |
| Kompositzement iCem self adhesive    | Kulzer GmbH, Hanau (DE)                              |
| Kraftsensor 20 N                     | ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm (DE)                   |
| Kühlschrank                          | Liebherr, Biberach (DE)                              |
| Magnetrührer MAG RCT-B               | IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen (DE)                |
| Materialprüfmaschine Z10             | ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm (DE)                   |
| Mikro-Computertomograph Skyscan 1172 | Bruker Corporation, Billerica (US)                   |
| Mikroskop Axiphot 451887             | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (DE)                |
| Mikroskop Leica DMI6000B             | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DE)                |
| Mikroskop Zeiss 095711               | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (DE)                |
| Röntgenkammer Faxitron MX-20         | Faxitron Bioptics, Tuscon (US)                       |

|                   |                                              |
|-------------------|----------------------------------------------|
| Waage 440-47      | KERN & SOHN GmbH, Balingen-<br>Frommern (DE) |
| Wärmeschrank 37°C | Heraeus Holding GmbH, Hanau (DE)             |
| Wärmeschrank 60°C | Heraeus Holding GmbH, Hanau (DE)             |
| Wasserbad VWB6    | VWR International, Radnor (US)               |

Tabelle 7      Verwendete Software

| <b>Software</b>                             | <b>Entwickler</b>                      |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|
| μ-CT Bild Konvertierungs Programm<br>NRecon | Skyscan, Kontrich (BEL)                |
| μ-CT Skyscan 1172 Kontrollprogramm          | Skyscan, Kontrich (BEL)                |
| Ct-Analyse                                  | Skyscan, Kontrich (BEL)                |
| CT-Bild Rotationssoftware DataViewer        | Skyscan, Kontrich (BEL)                |
| EndNote                                     | Clarivate analytics, Philadelphia (US) |
| Graphpad Prism                              | GraphPad Software, La Jolla (US)       |
| LAS X                                       | Leica, Heerbrugg (CH)                  |
| Osteomeasure                                | Osteometrics, Decatur (US)             |
| testXpert II                                | Zwick, Ulm (DE)                        |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Mausmodell und Studiendesign**

Für die Untersuchung der Auswirkung eines Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts wurden 9 weibliche und 7 männliche C5aR1-GFP-fl/fl-LysM-Cre Mäuse im Alter von 12 Wochen verwendet. Der Knockout auf den Osteoklasten wurde durch den Einsatz des Cre/loxP-Systems erzielt. Hierfür wurden vor und hinter den Genabschnitt, der die Informationen des C5aR1 Rezeptors kodiert, loxP Stellen eingefügt. Die mit den loxP Stellen versehenen Tiere (C5aR1-GFP-fl/fl, zur Verfügung gestellt von Prof. Köhl, Universität Lübeck) wurden mit Tieren, die eine in das LysM Gen, welches spezifisch für Osteoklasten und deren Vorläuferzellen ist, integrierte Cre-Rekombinase (LysM-Cre, zur Verfügung gestellt von Prof. Tuckermann, Universität Ulm) exprimieren, verpaart. Die zellspezifische Cre-Rekombinase bindet an die loxP Stellen und schneidet den C5aR1 Rezeptor spezifisch auf Osteoklasten aus. Als Kontrollgruppe dienten 8 weibliche bzw. 9 männliche C5aR1-GFP-fl/fl-LysM-Cre-negative Geschwistertiere.

Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierforschungszentrum der Universität Ulm in klimatisierten Räumen mit einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden. Hierbei waren bis zu 5 Tiere zusammen in Käfigen mit einer Grundfläche von 370 cm<sup>2</sup> untergebracht und erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum.

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Knockouts auf den Knochenphänotyp der Mäuse wurden die Wirbelkörper und Femora der Tiere mittels nicht-destruktiver Dreipunktbiegung, micro-computertomographischer ( $\mu$ -CT), immunhistochemischer und histologischer Analysen charakterisiert und anschließend mit den Knochen der Kontrolltiere verglichen.

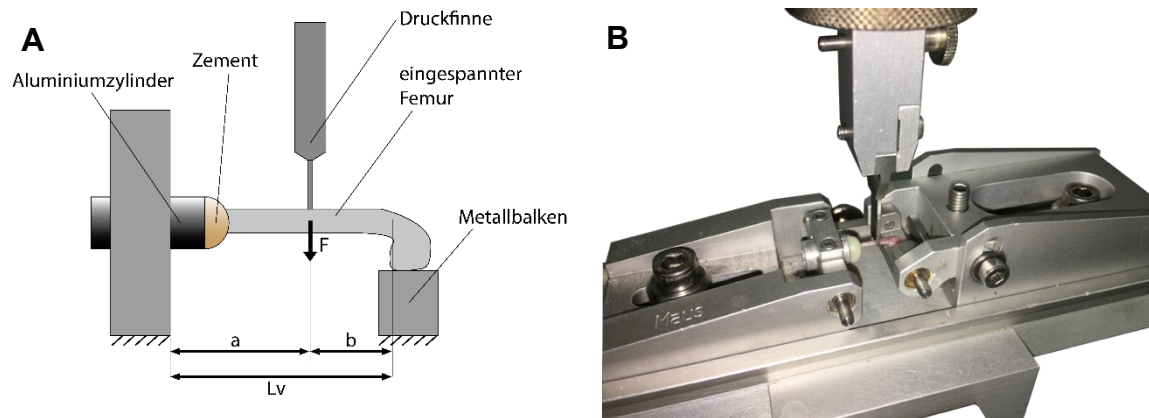
### **2.2.2 Organentnahme und Probenaufbereitung**

Die Organentnahme wurde von der lokalen Behörde (Regierungspräsidium Tübingen) genehmigt (Mitteilung nach §4 Abs. 3 des TierSchG, o.135-6.) und unter Achtung internationaler Vorschriften durchgeführt. Die Mäuse wurden mittels einer Überdosierung des Narkosegases Isofluran und anschließender intrakardialen Blutentnahme getötet. Das Gewicht der Mäuse wurde gemessen. Vor Organentnahme wurden Ganzkörper-Röntgenaufnahmen der Tiere in einer Röntgenkammer (Faxitron MX-20) aufgenommen. Für die Untersuchung des Knochenphänotyps wurden das linke Femur und die Wirbelsäule entnommen.

Anschließend wurden die Femora bis zur biomechanischen Testung in 0,9 % Kochsalzlösung aufbewahrt. Die Wirbelsäulen wurden für zwei Wochen in Formaldehyd fixiert. Nach Ablauf der zwei Wochen wurden die lumbalen Wirbelkörper aus den Wirbelsäulen heraus präpariert und mittels aufsteigender Alkoholreihe (Leitungswasser., 40 % Ethanol, 70 % Ethanol) entwässert.

### 2.2.3 Nicht-destruktive Dreipunktbiegung

Zur Untersuchung der Biegesteifigkeit wurden die Femora am Tag der Tötung einer nicht-destruktiven maschinellen Dreipunktbiegung unterzogen. Hierzu wurden die Knochen zunächst von Muskel- und Sehnenresten befreit, mittels eines Messschiebers ihre Länge gemessen und anschließend an der proximalen Seite mittels Kompositzement in einen Aluminiumzylinder zementiert. Die fixierten Knochen wurden so in die Materialprüfmaschine eingespannt, dass die posterioren Anteile der Femurkondylen einem Metallbalken frei auflagen. Anschließend wurde die Druckfinne der Materialprüfmaschine mittig und orthogonal zum Femur positioniert (siehe Abb. 7 A, B).



**Abb. 7 Versuchsaufbau der nicht-destruktiven Dreipunktbiegung**

**A** Skizze der Biegesteifigkeitstestung an der Materialprüfmaschine.  $F$ : Kraft,  $a$ : Strecke proximale Fixierung-Druckfinne,  $b$ : Strecke Druckfinne-Auflagepunkt Femur,  $L_v$ : Strecke proximale Fixierung-Auflagepunkt Femur, **B** Fotografie des Versuchsaufbaus. Eigene Darstellungen

Die Druckfinne war an einer 20 N Kraftmessdose befestigt und es wurde eine Kraft von maximal 4 N mittig auf die Diaphyse des Femurs aufgebracht. Die Materialprüfmaschine zeichnete dabei die von der jeweiligen Kraft abhängige Verformung des Femurs in einem Kraft-Verformungs-Diagramm auf. Die Messung wurde pro Knochen dreimal durchgeführt, wobei die dritte Messung zur Auswertung

der Biegesteifigkeit ( $E \cdot I_x$ ) verwendet wurde. Hierzu wurde die Steigung ( $k$ ) der Messkurve, die Strecke zwischen proximaler Fixierung und Druckfinne ( $a$ ), die Strecke zwischen Druckfinne und Auflagepunkt des Femurs auf dem Metallbalken ( $b$ ) sowie die gesamte Strecke zwischen proximaler Fixierung und Auflagepunkt ( $L_v$ ) zur Ermittlung der Biegesteifigkeit gemäß folgender Formel verwendet.

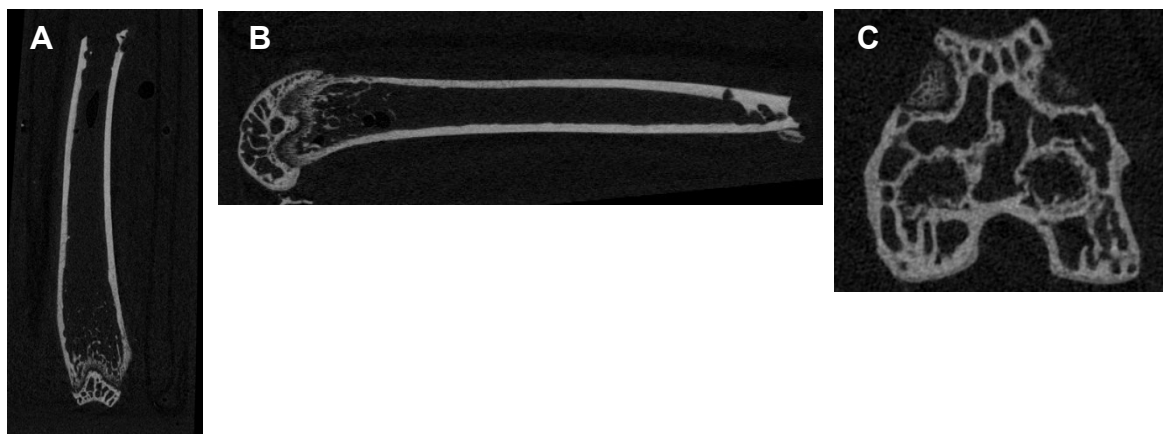
|                              |                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------|
| Formel der Biegesteifigkeit: | $E \cdot I_x = k \frac{a^2 b^2}{3 L_v}$ |
|------------------------------|-----------------------------------------|

Nach Abschluss der biomechanischen Testung wurden die Femora für 48 h in Formaldehyd fixiert und mittels  $\mu$ -CT untersucht.

#### 2.2.4 $\mu$ -CT

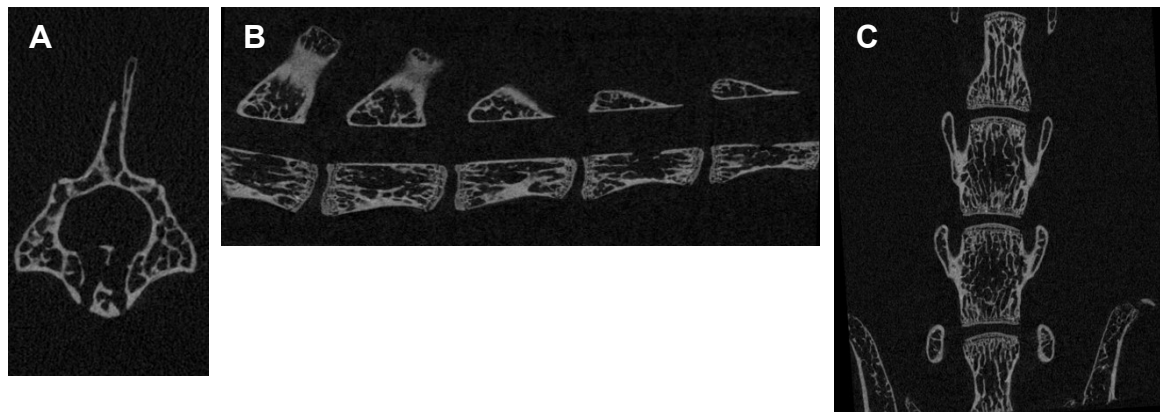
Um mögliche Einflüsse des C5aR1 Knockouts auf die strukturellen Knochenparameter zu erfassen, wurden die Femora mit Hilfe eines Mikro-Computertomographen ( $\mu$ -CT Skyscan 1172) untersucht. Die  $\mu$ -CT-Aufnahmen wurden bei 50 kV und 200  $\mu$ A bei einer räumlichen Auflösung von 8  $\mu$ m erstellt. Die Proben wurden zusammen mit zwei Hydroxylapatit-Phantomen der definierten Knochenmineraldichte von 250 mg HA/cm<sup>3</sup> bzw. 750 mg HA/cm<sup>3</sup> gescannt.

Die Wirbelkörper wurden in 70 % Ethanol, die Femora in 4 % Formaldehyd gescannt. Nach der Erstellung der CT-Aufnahmen, wurden die einzelnen Schnittbilder mithilfe des Programms NRecon in ein Dataset rekonstruiert. Anschließend wurden die Proben im Programm Dataviewer einheitlich im Raum ausgerichtet (siehe Abb. 8 und Abb. 9)



**Abb. 8 Ausrichtung der Femora im Raum**

**A** Frontalebene, **B** Sagittalebene, **C** Horizontalebene. Eigene Darstellungen



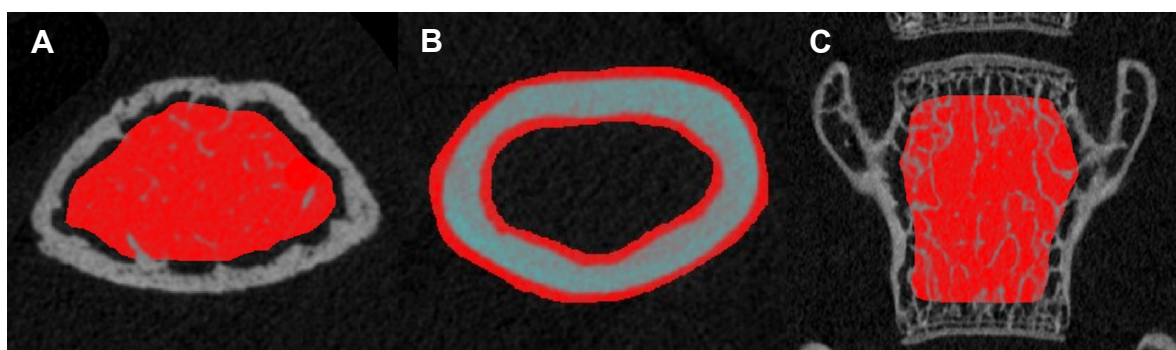
**Abb. 9 Ausrichtung der Wirbelsäulen im Raum**

**A** Frontalebene, **B** Sagitalebene, **C** Horizontalebene. Eigene Darstellungen

Die Analyse der aufbereiteten CT-Aufnahmen erfolgte im Programm CT-Analyser. Dabei wurde als erster Schritt eine Kalibrierung der Knochenmineraldichte durch die Röntgenstrahlungsabsorption beider Referenzproben vorgenommen.

Für die Untersuchung der Femora wurden zwei Auswertungsbereiche festgelegt: ein trabekulärer in der Metaphyse und ein kortikaler Bereich in der Diaphyse (siehe Abb. 10 A, B). Der trabekuläre Bereich begann 360  $\mu\text{m}$  proximal der Epiphysenfuge und endet nach weiteren 280  $\mu\text{m}$  proximal davon. Der kortikale Bereich begann am distalen Ende des Trochanter major und endete 160  $\mu\text{m}$  distal davon.

Für die Messung in der Wirbelsäule wurde der trabekuläre Bereich im 5. - 6. Lumbalwirbel über eine Schichtdicke von 160  $\mu\text{m}$  ausgewertet. Die nach proximal und distal bzw. ventral und dorsal definierten Auswertungsbereiche wurden anschließend in ihrer Ausbreitung in der Horizontalebene begrenzt (siehe Abb. 10 C).



**Abb. 10 Lage der Auswertungsbereiche in Femur und Wirbelkörper**

**A** Auswertungsbereich im trabekulären und **B** im kortikalen Bereich des Femurs. **C** Auswertungsbereich im Lendenwirbelkörper. Eigene Darstellungen.

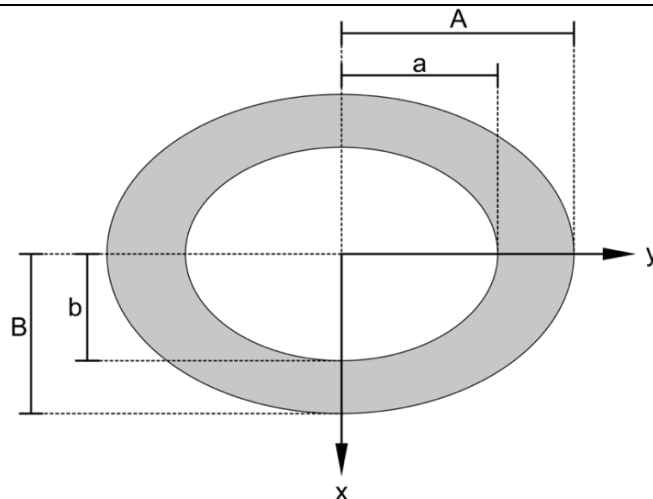
Um zwischen nicht-mineralisiertem und mineralisiertem Gewebe unterscheiden zu können, wurden Grenzwerte für die Gewebsmineraldichte von 394 mg HA/cm<sup>3</sup> für den trabekulären Bereich und von 642 mg HA/cm<sup>3</sup> für den kortikalen Bereich festgelegt [92].

Als trabekuläre Messparameter des Femurs und der Wirbelsäule wurden die Knochenmineraldichte (TMD in mg HA/cm<sup>3</sup>), der Anteil des Knochenvolumen am Gesamtvolumen (BV/TV in %), die Anzahl (Tb. N. in 1/mm) sowie die Dicke der Trabekel (Tb. Th. in mm) und der Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln (Tb. Sp. in mm) erfasst. Für den kortikalen Bereich der Diaphyse wurden die TMD, die kortikale Dicke (C. Th. in mm) sowie das Flächenträgheitsmoment ( $I_x$  in mm<sup>4</sup>) bestimmt. Die im  $\mu$ -CT ermittelten Parameter wurden gemäß der „American society of bone and mineral research“ erfasst [12].

Das Flächenträgheitsmoment  $I_x$  wurde dabei näherungsweise mithilfe der Formel des axialen Flächenträgheitsmoments 2. Grades für Ellipsenringe errechnet. Dabei entspricht die Richtung x des Flächenträgheitsmoments  $I_x$  der Richtung der in der Materialprüfmaschine aufgebrachten Kraft F (siehe Abb. 11).

Formel des x-axialen Flächenträgheitsmoments des Ellipsenrings:

$$I_x = \frac{\pi}{4} \times (A^3 \times B - a^3 \times b)$$



**Abb. 11 Skizze Berechnung des axialen Flächenträgheitsmoment im Ellipsenring**

Buchstaben A, a, B und b: Zur Berechnung des Flächenträgheitsmoments benötigte Maße. Buchstaben x und y: mögliche Richtungen der Krafteinwirkung. Eigene Darstellung.

Nach der radiologischen Analyse wurden die Femora für 12 Tage mittels EDTA entkalkt. Die Wirbelkörper wurden in 70 % Ethanol gelagert und anschließend in Methacrylat eingebettet.

### 2.2.5 Histologie

#### ▪ Histologische Aufarbeitung der Femora

Nach der Entkalkung in EDTA wurden die Femora durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90%, 3 x 100 % je 2 h) entwässert und anschließend in Xylol gegeben (2x 100 % Xylol für je 2 h). Danach wurden die Knochen mittels eines Vakuum-Gewebeeinbettautomaten in 60° C warmes Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in Schnitte von 6-7 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

Um die in Paraffin eingebetteten Schnitte für die Färbungen zugänglich zu machen, wurden diese über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert und anschließend das Paraffin bei 60 °C im Wärmeschrank geschmolzen. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte nun in histologischen Glasküvetten in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (EtOH 100 %, EtOH 90 %, EtOH80 %, EtOH 70 %, EtOH 50 %, je 5 min) rehydriert und anschließend für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Es folgten die Toluidinblau-Färbung sowie die immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen.

#### ▪ Histologische Aufarbeitung der Wirbelsäulen

Nach der Lagerung in 70 % Ethanol wurden die Wirbelsäulen für 8-14 Tage mit einer Lösung aus entstabilisiertem Methacrylsäuremethylester, Benzoylperoxid und Nonylphenyl-Pokyethylenglycolacetat infiltriert. Anschließend wurde die Lösung neu angesetzt und zusätzlich Dimethyl-p-Toluidin hinzugefügt, was zu einem Aushärten des Kunststoffs führt. Der ausgehärtete Kunststoff wurde mit Hilfe eines Hartschnittmikrotoms in 6-7 µm dicke Schnitte geschnitten, welche über Nacht bei 50 °C im Wärmeschrank gepresst und anschließend abgekühlt wurden.

Unmittelbar vor der Färbung der Schnitte wurden diese 10 min mittels 2-Methoxyethyl-acetat vom Kunststoff befreit und in Aqua dest. gewaschen. Es folgten die TRAP-, Toluidinblau- und von-Kossa/van-Gieson-Färbungen.

#### 2.2.5.1 Standardfärbungen

##### ▪ TRAP Färbung

In der TRAP Färbung wird die Tartrate-resistente saure Phosphatase, die von Osteoklasten und Makrophagen exprimiert wird, rot angefärbt. Durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wird das restliche Gewebe blau gefärbt.

Die entplasteten Wirbelsäulen wurden bei 37 °C für 45 min in TRAP-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zur Beendigung der Färbereaktion in Aqua dest. gewaschen. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin Ulm für 1,5 min und das Bläuen mittels Ammoniakwassers. Die Schnitte wurden anschließend mit Aquatex und Deckgläsern eingedeckt.

#### ▪ **Toluidinblau Färbung**

Die Toluidinblau Färbung färbt saure Moleküle, wie RNA und DNA, an. Dadurch erscheinen Zellkerne, Plasma und Kollagen blau, Knorpelmatrix und die Mineralisierungszone rotviolett. Osteoblasten werden hellblau angefärbt und können unter Einbeziehung weiterer Kriterien quantifiziert werden.

Hierzu wurden die entparafinierten und rehydrierten Femoraschnitte für 10 min in der Toluidinblau-Färbelösung A inkubiert und anschließend dreimal in Aqua dest. gewaschen. Die Wirbelsäulenschnitte wurden für 4 min in der Toluidinblau-Färbelösung B inkubiert und dreimal in Aqua dest. gewaschen. Es folgte in beiden Fällen die aufsteigende Alkoholreihe (70 % EtOH für 10-15 min, 90 % EtOH, 2x 100 % EtOH, 2x Xylol je 5 min) und das Eindecken der Schnitte mit Vitro-Clud und Deckgläsern.

#### ▪ **Versilberung nach von Kossa mit van-Gieson-Färbung**

Durch die Versilberung nach von Kossa wurden die mineralisierten Knochengewebsanteile der Wirbelsäulen schwarz angefärbt. Zur Gegenfärbung wurde eine Pikro-Fuchsin Färbung nach van-Gieson durchgeführt, welche Kollagen und Bindegewebe rot und die Muskulatur gelb-orange anfärbt.

Zur Durchführung der Färbung wurden die entplasteten Metacrylatschnitte aus dem Aqua dest. für 5 min in Silbernitratlösung gegeben. Danach wurden die Schnitte dreimal in Aqua dest. gespült, für 2 min in Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung geschwärzt und anschließend für 10 min in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Proben in Natriumthiosulfat fixiert und für 10 min in Leitungswasser gewaschen. Nach dem Waschen der Schnitte in Aqua dest. folgte die van-Gieson Färbung für 10 min mittels Pikro-Fuchsin-Färbelösung. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen, der aufsteigenden Alkoholreihe (90 % EtOH, 2x 100 % EtOH, 2x Xylol je 5 min) unterzogen und mit Vitro-Clud und Deckgläsern eingedeckt.

### 2.2.5.2 Auswertung histologischer Standardfärbungen

Zur Betrachtung der Standardfärbungen wurde das Lichtmikroskop Axiophot der Firma Zeiss verwendet. Für die Auswertung der histologischen Schnitte wurde das Programm Osteomeasure verwendet.

#### ▪ Quantifizierung der Breite der Epiphysenfuge

Die mit Toluidinblau gefärbten Längsschnitte des Femurs wurden bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Die Länge der blau-violett gefärbten Epiphysenfuge wurde an drei Stellen gemessen: median, medial und lateral im Femur. Gemessen wurde die Länge einer vollständigen Chondrozytensäule (siehe Abb. 12). Aus den erhobenen Werten wurde anschließend der Mittelwert berechnet. Zudem wurde die Anzahl der in den gemessenen Chondrozytensäulen vorhandenen Knorpelzellen ermittelt.

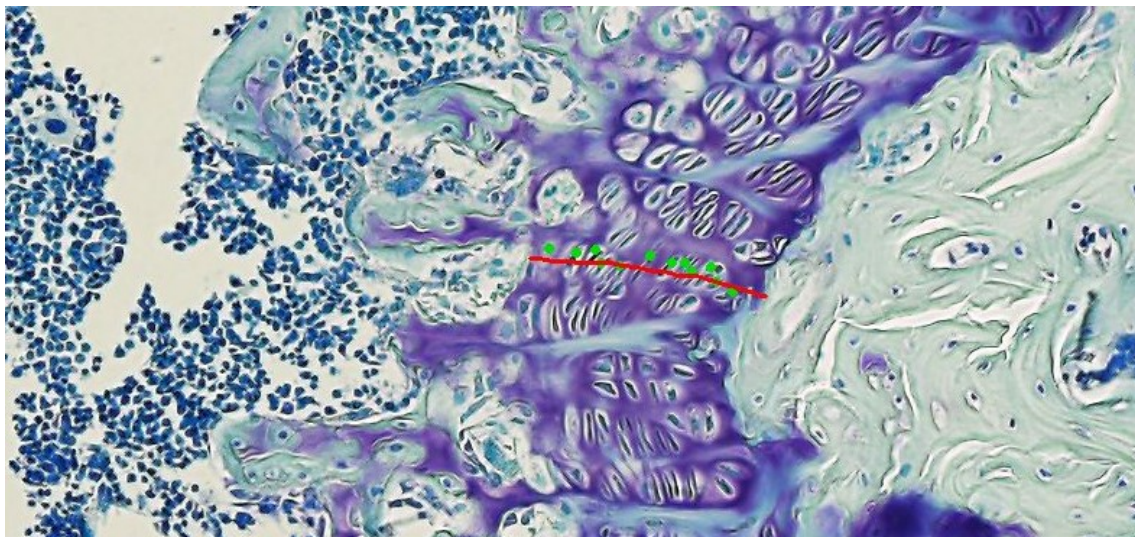


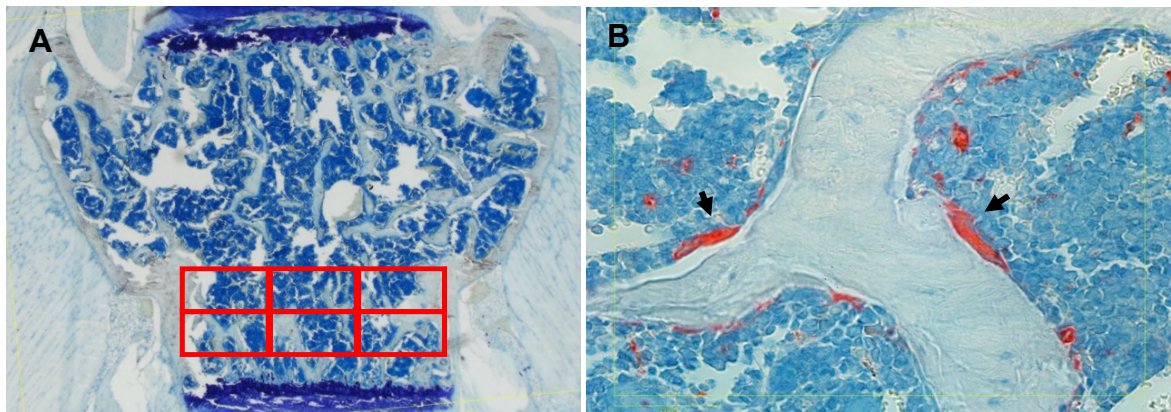
Abb. 12 Messung der Länge der Epiphysenfuge im Femur und Zählung der Chondrozyten bzw. Chondroblasten

100x Vergrößerung, Toluidinblau, Eigene Darstellung.

#### ▪ Quantifizierung der Anzahl und Aktivität der Knochenzellen

Zur Erhebung der Anzahl und der Aktivität der Osteoklasten wurden die histologischen Schnitte der Wirbelsäulen mit der TRAP-Färbung gefärbt und bei 200-facher Vergrößerung betrachtet. Es wurden im trabekulären Bereich des Wirbelkörpers insgesamt 6 Gesichtsfelder mit den Maßen 500  $\mu\text{m}$  x 350  $\mu\text{m}$  im Abstand von 250  $\mu\text{m}$  zur Grundplatte ausgewertet (siehe Abb. 13 A). Es wurde die Anzahl der Osteoklasten (N. Oc.), die Auflagefläche der Osteoklasten auf den

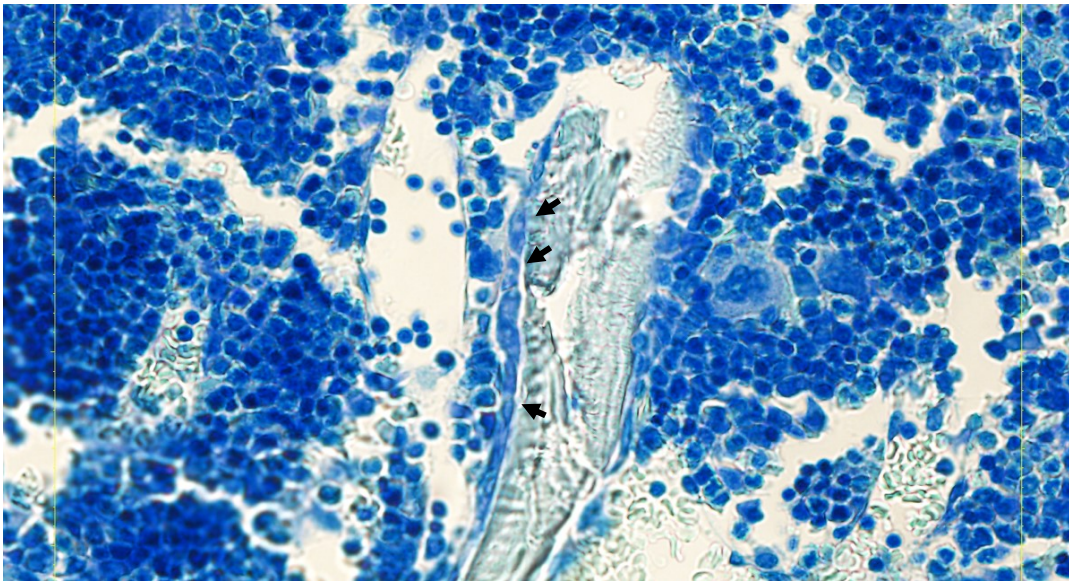
Knochen trabekeln (Oc. S. [ $\text{mm}^2$ ]) sowie der Umfang der Trabekel (B.Pm. [ $\text{mm}$ ]) ermittelt. Osteoklasten wurden dabei definiert als rot angefärbte, mehrkernige Zellen, welche den Trabekeln direkt aufliegen (siehe Abb. 13 B). Daraus wurde die Anzahl der Osteoklasten pro Trabekelumfang (N. Oc./B. Pm. [ $1/\text{mm}$ ]) und das Verhältnis der Auflagefläche der Osteoklasten zur Trabekeloberfläche (Oc. S./BS [%]) ermittelt.



**Abb. 13 Auswertungsbereich und Zählung der Osteoklasten**

**A** Auswertungsbereich der Zählung der Osteoblasten und Osteoklasten, 50x Vergrößerung, Toluidinblau, **B** Osteoklasten (Pfeile), 400x Vergrößerung, Anfärbung mit der Tartrateresistente saure Phosphatase (TRAP)-Färbung. Eigene Darstellung.

Die Zählung der Osteoblasten erfolgte im selben Auswertungsbereich und bei selber Vergrößerung wie die Zählung der Osteoklasten. Hierfür wurde die Toluidinblau-Färbung verwendet, in der sich die Osteoblasten als hellblau angefärbte, kubische Zellen, die der Trabekeloberfläche aufliegen darstellen (siehe Abb. 14). Es wurde die Anzahl der Osteoblasten (N. Ob.), die Auflagefläche der Osteoblasten auf den Knochen trabekeln (Ob. S. [ $\text{mm}^2$ ]), und der Trabekelumfang (B. Pm. [ $\text{mm}$ ]) erhoben. Dabei wurde die Anzahl an Osteoblasten pro Trabekelumfang (N. Ob./B. Pm. [ $1/\text{mm}$ ]) sowie das Verhältnis der Auflagefläche der Osteoblasten zur Trabekeloberfläche (Ob. S./BS [%]) ermittelt.



**Abb. 14 Zählung der Osteoblasten**

Osteoblasten (Pfeile) an Trabekeloberfläche, 400x Vergrößerung, Toluidinblau. Eigene Darstellung

Die mittels von-Kossa/van-Gieson gefärbten Schnitte wurden als repräsentative Übersichtsaufnahmen des Verknöcherungsgrads der Wirbelkörper verwendet. Dabei stellten sich die mineralisierten Anteile des Knochens schwarz dar (siehe Abb. 15). Das Muskelgewebe und das Knochenmark wurde rot-orange angefärbt. Es erfolgte keine quantitative Auswertung der Schnitte.



**Abb. 15 Färbung eines Wirbelkörpers mit von-Kossa/van-Gieson-Färbung**

50x Vergrößerung, von-Kossa/van-Gieson-Färbung. Eigene Darstellung

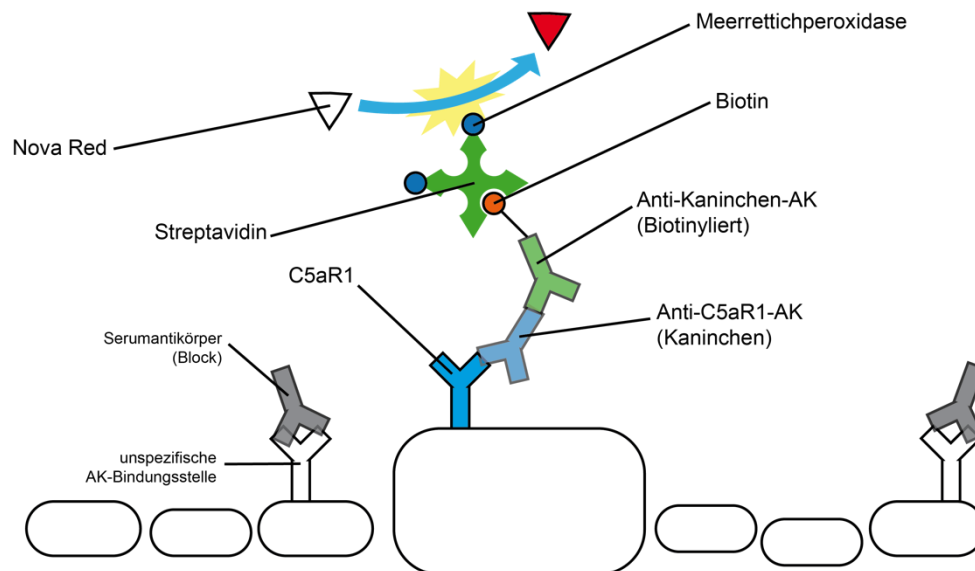
### 2.2.5.3 Immunhistochemie

#### ▪ C5aR1 Färbung

Die C5aR1 (CD88) Färbung dient dem Anfärben der C5aR1 Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin färbte das übrige Gewebe blau an. Aufgrund unspezifischer Färbung des C5aR1 im bereits vorhandenen Protokoll, wurde dieses optimiert. Hierbei führte die Verwendung von 5 % Rinderserum Albumin (BSA) in TBS-T im Block-Schritt bei 37 °C für 30 min zu einer Etablierung eines neuen Protokolls.

Die Femora wurden nach der absteigenden Alkoholreihe und dem Waschen in Aqua dest. mit Hilfe des Heat-induced Epitope Retrieval demaskiert. Dazu wurden die Proben für 20 min in 10 mM Citratpuffer (pH 6) im Wasserbad bei 95 °C inkubiert und anschließend für weitere 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in 3 % Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes abgeschwächt wird. Es folgte ein Waschschrift für 5 min in TBS-T. Die Fc-Rezeptoren und unspezifischen Antikörperbindstellen wurden mit 5 % BSA für 30 min bei 37 °C blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Kaninchen  $\alpha$  C5aR (Acris #AP06508PU-N, 1mg/ml, polyclonal) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-T bei 4 °C über Nacht. Als negativ Kontrolle wurde unspezifisches Kaninchen IgG (Santa Cruz, sc-2027) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-T verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben dreimal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege  $\alpha$  Kaninchen (Thermo Fisher Scientific, #B2770) in 1:100 Verdünnung in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschrift für jeweils 5 min in TBS-T wurde der Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Avidin-Biotin-Komplex enthält das an Streptavidin gebundene Enzym Meerrettichperoxidase und bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper. Nach drei weiteren Waschsritten für jeweils 5 min in TBS-T folgte die durch Meerrettichperoxidase katalysierte Färbereaktion durch das Substrat NovaRed (siehe Abb. 16). Das Substrat inkubierte dabei für 2-6 min während es unter dem Lichtmikroskop beobachtet wurde, um eine optimale Rotfärbung zu erzielen. Nach der Inkubation folgte die Spülung in Aqua dest. für 5 min und die anschließende Kernfärbung mittels Hämatoxylin Ulm für 50 Sekunden.

Die Schnitte wurden anschließend unter fließendem Leitungswasser für 5 min gebläut. Als letzter Schritt folgte die aufsteigende Alkoholreihe (90 % EtOH, 100 % EtOH je 1 min, 2x Xylol je 5 min) und das Eindecken der Schnitte mit Vitro-Clud und einem Deckglas.

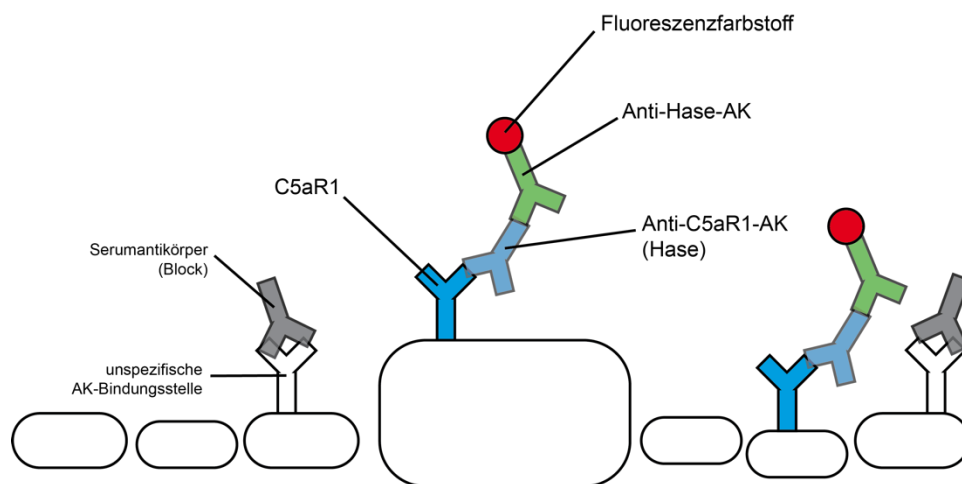


**Abb. 16 Skizze des Prinzips der ABC-Immunhistochemie am Beispiel der C5aR1 Färbung**

AK: Antikörper. Eigene Darstellung.

#### 2.2.5.4 Immunfluoreszenz-Färbungen

Immunfluoreszenz-Färbungen bieten den Vorteil, dass in einem Schnitt mehr als ein Protein angefärbt werden kann. Dadurch können beispielsweise gleichzeitig spezifische Zell-Markerproteine und der C5aR1 Rezeptor angefärbt und so das spezifische Vorkommen des Rezeptors auf verschiedenen Zellpopulationen untersucht werden. In den verwendeten Fluoreszenzfärbungen wurde ein indirektes Färbeverfahren angewandt, wobei das zu färbende Epitop zunächst von einem nicht fluoreszenzmarkierten Primärantikörper gebunden und erst durch die Bindung eines fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper indirekt angefärbt wurde (siehe Abb. 17). In der vorliegenden Arbeit wurden die Protokolle zur Immunfluoreszenz-Färbung des C5aR1 sowie von Cathepsin K etabliert.



**Abb. 17 Skizze des Prinzips der indirekten Fluoreszenzfärbung am Beispiel C5aR1 Färbung**

AK: Antikörper. Eigene Darstellung.

#### ▪ C5aR1 und Cathepsin K Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe der C5aR1 Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen, die den C5aR1 Rezeptor im Knochen exprimieren, mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die Cathepsin K Färbung färbt das vor allem in den Osteoklasten vorkommende Enzym Cathepsin K mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff an. Bei beiden Färbungen erfolgte zusätzlich eine Blaufärbung der Zellkerne mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342.

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte bei 95 °C für 20 min in 10 mM Citratpuffer demaskiert und anschließend

für 20 min im Puffer bei Raumtemperatur abgekühlt. Für die Cathepsin K Färbung wurde dem 10 mM Citratpuffer zusätzlich 0,1 % des Detergens Tween20 hinzugegeben. Anschließend wurden die Schnitte für je 5 min in Aqua dest. und TBS-T gewaschen. Es folgte der Serumblock je nach Färbung entweder mit 5% (C5aR1) oder 2,5% (CatK) BSA in TBS-T für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die jeweiligen Primärantikörper aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die C5aR1 Färbung wurden polyklonale Kaninchen anti-C5aR Antikörper (Acris, #AP06508PU-N, 1 mg/ml) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-T verwendet. Für die Cathepsin K Färbung wurden polyklonale Kaninchen anti-Cathepsin K Antikörper (Abcam, #ab19027, 0,5 mg/ml) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-T verwendet. Als Negativkontrolle wurde in beiden Färbungen unspezifisches Kaninchen IgG (Santa Cruz, sc-2027, 0,4 mg/ml) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-T verwendet. Es folgten drei Waschschrte für je 5 min in TBS-T und die Inkubation des jeweiligen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Hierfür wurden für die C5aR1 Färbung polyklonale Alexa Fluor® 594 gekoppelte Esel anti-Kaninchen Antikörper (ThermoFisher, #A-21207, 2 mg/ml) in einer 1:200 Verdünnung in TBS-T verwendet. Für die Cathepsin K Färbung wurden polyklonale Alexa Fluor® 488 gelabelte anti-Kaninchen Antikörper (ThermoFisher, #A-21206, 2 mg/ml) in einer 1:400 Verdünnung verwendet. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte für je 5 min in TBS-T. Es folgte die Kernfärbung mit einer Hoechst 1:200 Verdünnung für 1 min und ein letzter Waschschrte in TBS für 5 min. Die Schnitte wurden mit Fluoromount und Deckgläsern eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

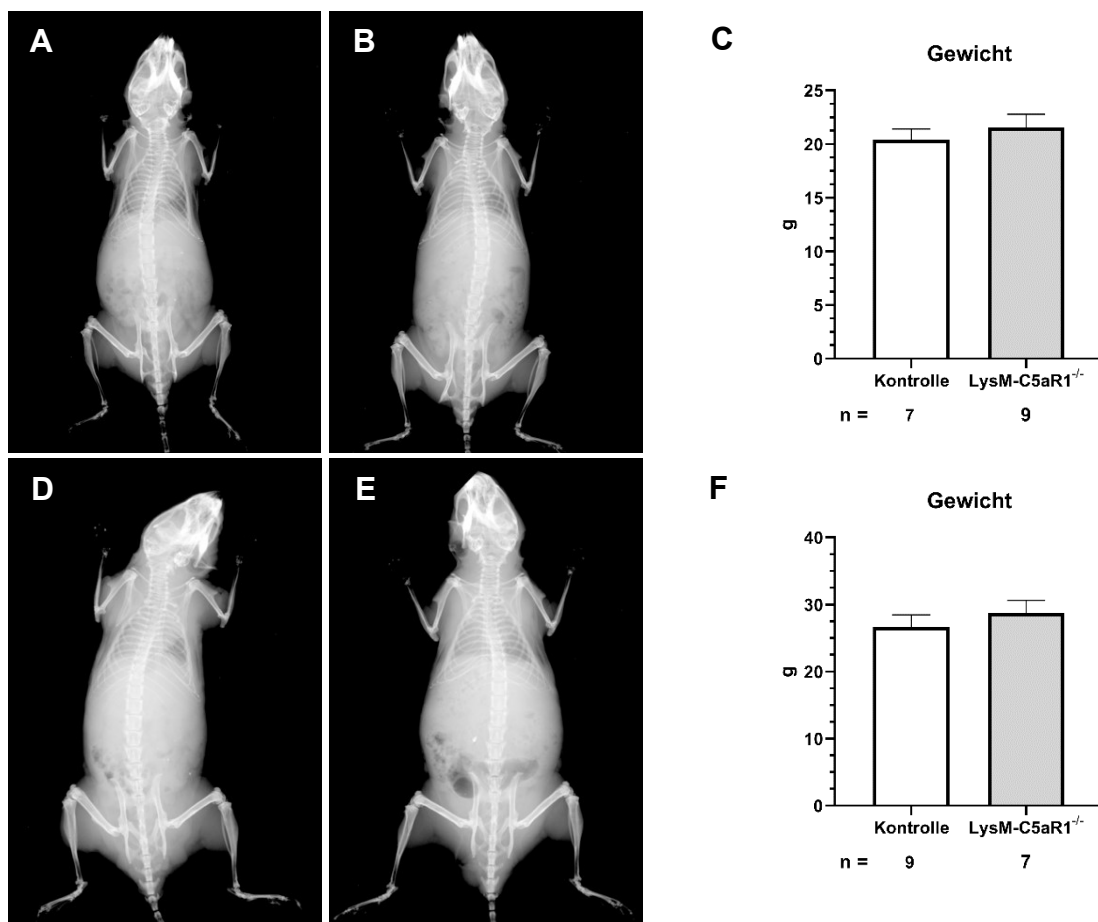
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Die einzelnen Gruppen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet und anschließend bei Vorliegen einer Normalverteilung mittels Student's t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

Die Mittelwerte der Gruppen wurden graphisch als Balkendiagramme mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen zwei Gruppen wurden mit einem Asterisk (\*) gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Makroskopische Untersuchung des Skelettsystems

Im Vergleich der Ganzkörper-Röntgenaufnahmen der Kontrolltiere und der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten sich im Alter von 12 Wochen weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren signifikante makroskopische Unterschiede des Skelettsystems (siehe Abb. 18 A, B, D, E). Weiter zeigten sich in beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Gewicht der Kontroll- und der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere (Abb. 18 C und F).



**Abb. 18 Röntgenaufnahmen und Gewicht 12 Wochen alter Tiere**

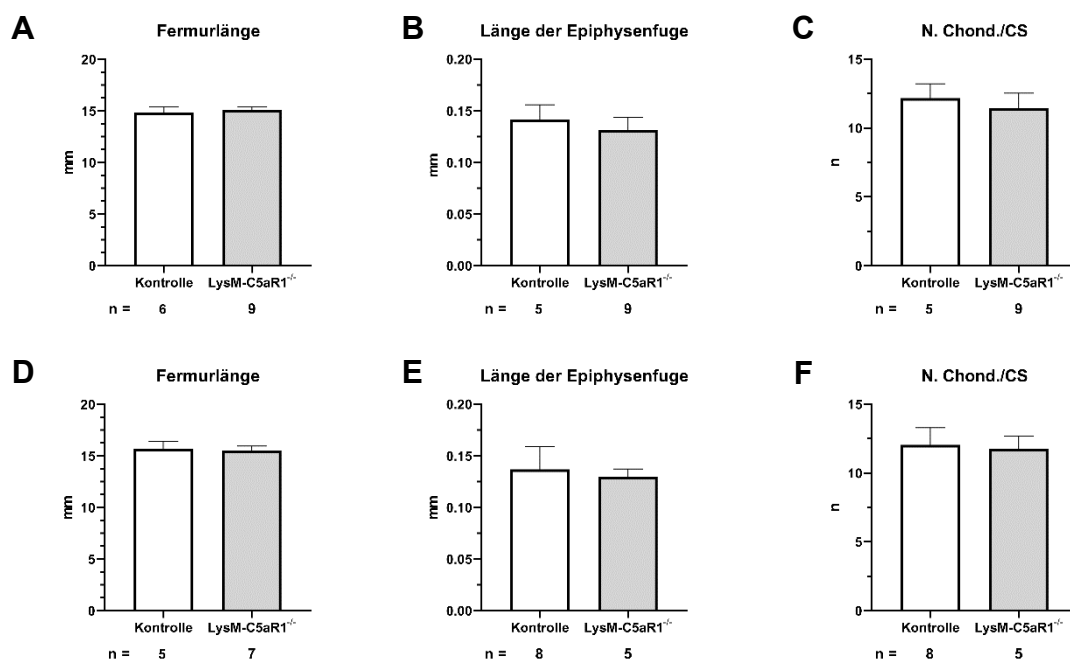
Röntgenaufnahmen **A** weibliches Kontroll- und **B** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tier sowie **C** Gewicht der weiblichen Tiere. Röntgenaufnahmen **D** männliches Kontroll- und **E** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tier sowie **F** Gewicht der männlichen Tiere. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

Zusammenfassend konnten weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Tieren signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren in Bezug auf die Skelettgröße und -gestalt sowie das Gewicht gezeigt werden.

### 3.2 Untersuchung des Längenwachstums des Femurs

Der Einfluss des C5aR1 Knockout auf das Längenwachstum wurde im Femur untersucht. Dabei ergaben sich bei den weiblichen Tieren keine Unterschiede in Bezug auf die Länge des Femurs und der Epiphysenfuge sowie kein Unterschied in der Anzahl der Chondrozyten pro Chondrozytensäule (N.Chond./CS) zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 19 A bis C).

Auch bei den männlichen Tieren zeigten sich hinsichtlich dieser Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 19 D bis F).



**Abb. 19 Charakterisierung des Längenwachstums der Femora**

**A** Femurlänge, **B** Länge der Epiphysenfuge und **C** Chondrozytenanzahl pro Chondrozytensäule (N.Chond./CS) in der Epiphysenfuge weiblicher Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere. **D** Femurlänge, **E** Länge der Epiphysenfuge und **F** Chondrozytenanzahl pro Chondrozytensäule in der Epiphysenfuge männlicher Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere. Mittelwert ± Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

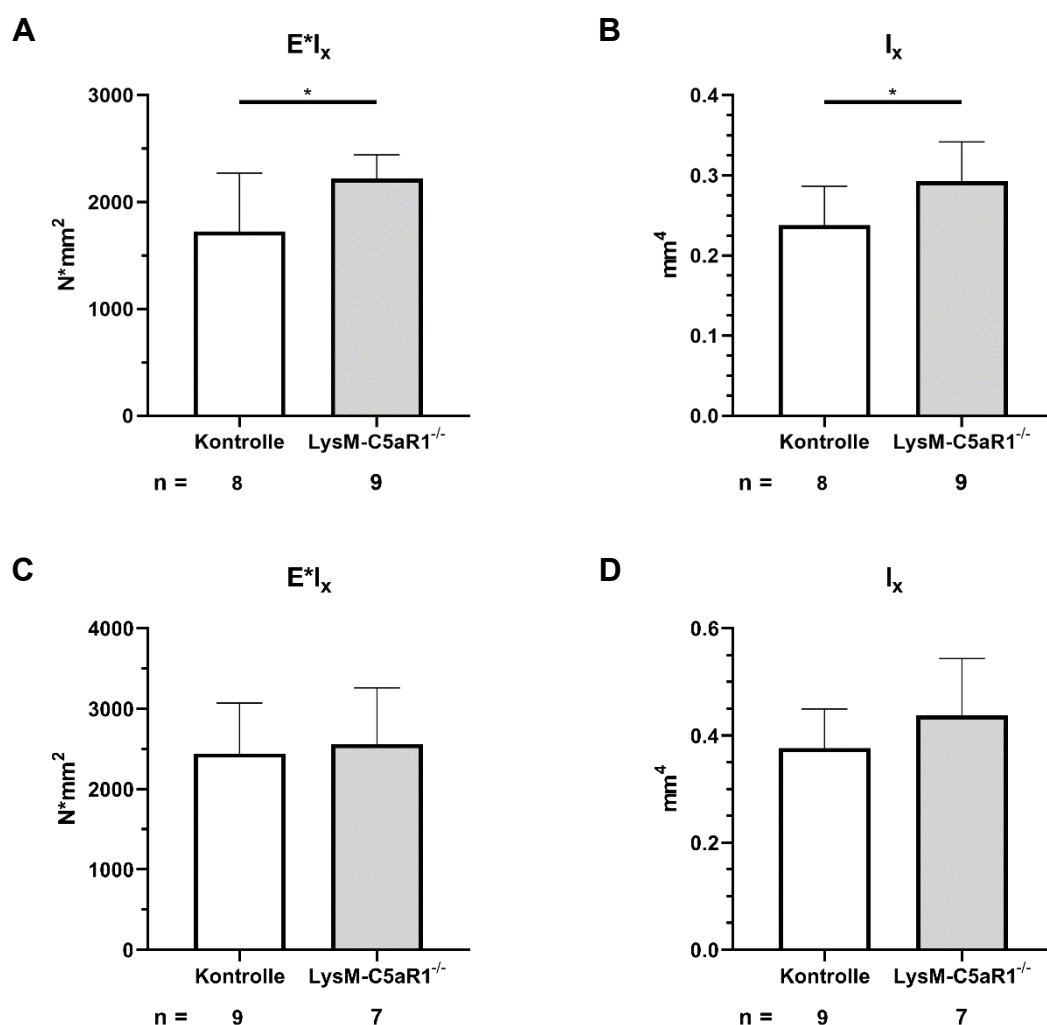
Zusammenfassend konnten weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Tieren signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren in Bezug auf das Längenwachstum des Femurs nachgewiesen werden.

### 3.3 Untersuchung des kortikalen Knochens

#### 3.3.1 Biomechanische Charakterisierung

Die biomechanische Charakterisierung der Femora zeigte in den weiblichen Tieren eine signifikante ( $p = 0,0248$ ) Erhöhung der Biegesteifigkeit ( $E^*I_x$ ) sowie eine signifikante ( $p = 0,0357$ ) Erhöhung des Flächenträgheitsmoments ( $I_x$ ) der Kortikalis der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 20. A und B).

Bei den männlichen Tieren zeigten sich hingegen weder in  $E^*I_x$  (Abb. 20 C), noch in  $I_x$  (Abb. 20 D) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

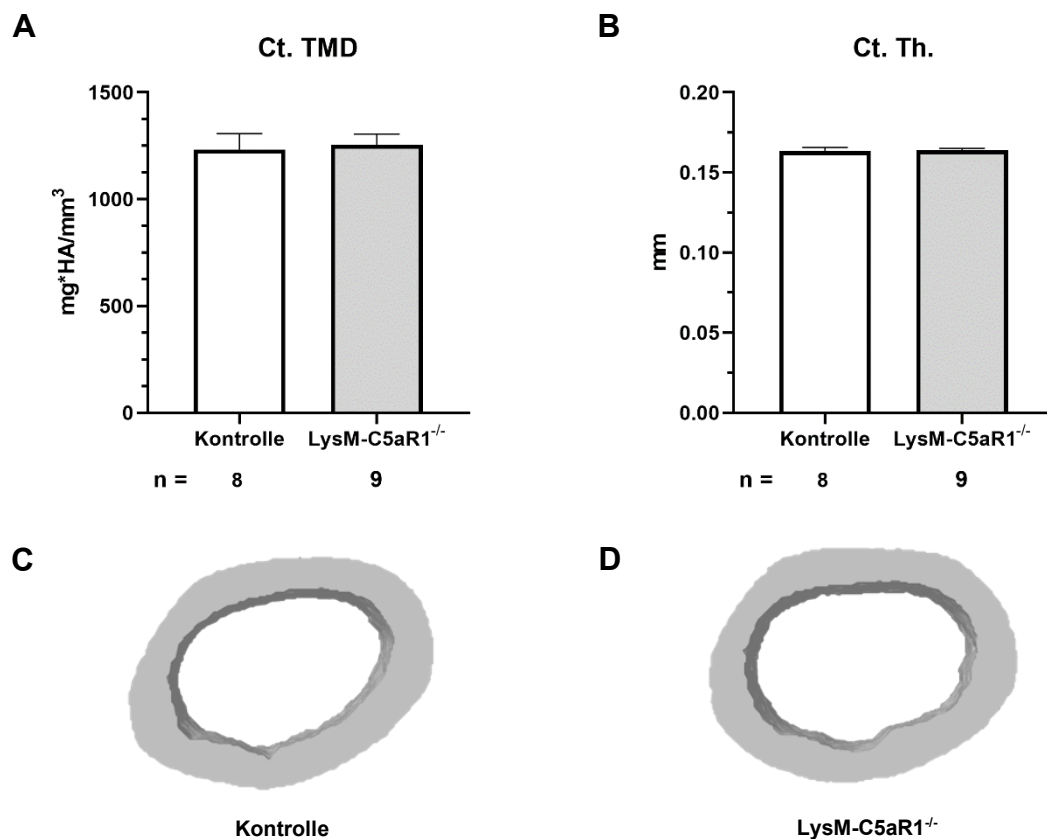


**Abb. 20 Biomechanische Charakterisierung der Femora**

**A** Biegesteifigkeit ( $E^*I_x$ ) und **B** Flächenträgheitsmoment ( $I_x$ ) der weiblichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere. **C** Biegesteifigkeit und **D** Flächenträgheitsmoment der männlichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere; \*:  $p < 0,05$ .

### 3.3.2 Radiologische Charakterisierung

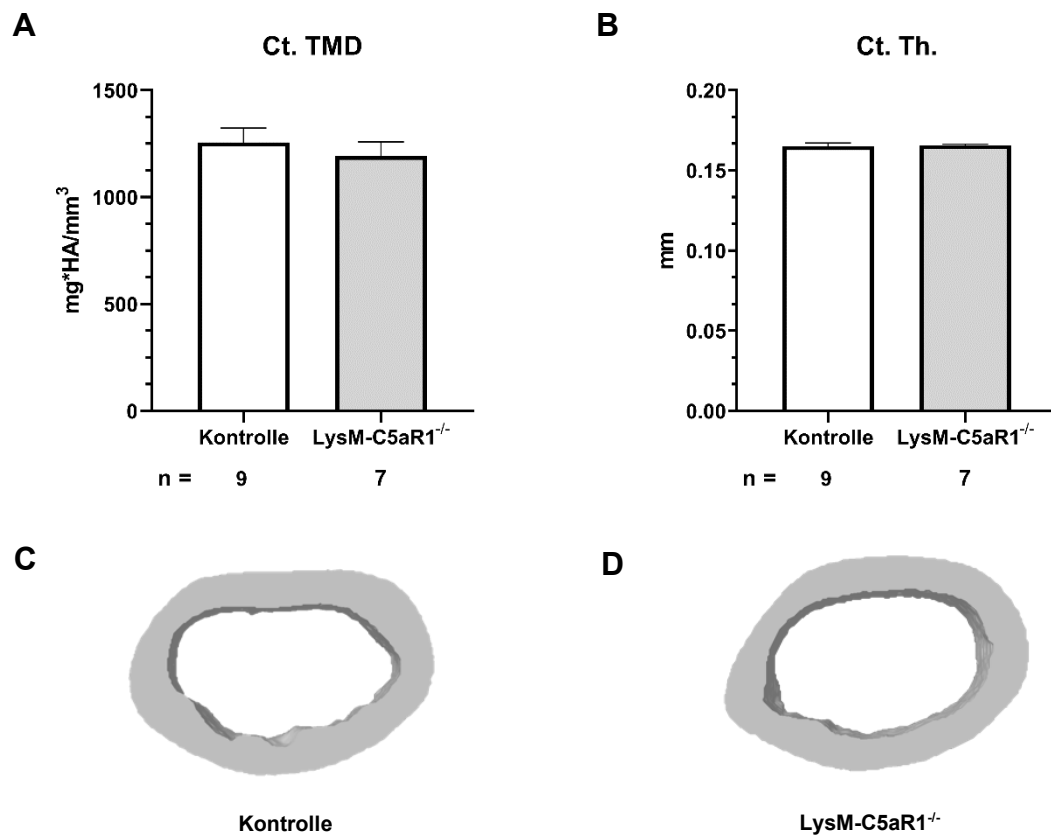
Zur Untersuchung der Mikroarchitektur wurde der kortikale Bereich der Femora mittels des  $\mu$ -CTs auf die Gewebsmineraldichte (Ct. TMD) und die Dicke der Kortikalis (Ct. Th.) untersucht. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Ct. TMD und in Ct. Th. zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 23 A und B). Dies ist auch in den repräsentativen 3D-Rekonstruktionen der  $\mu$ -CT-Schnittbilder zu erkennen (Abb. 23 C bis F).



**Abb. 21 Analyse der kortikalen Knochenparameter in der Diaphyse der Femora der Weibchen**

**A** Gewebsmineraldichte der Kortikalis (Ct. TMD) und **B** Dicke der Kortikalis (Ct. Th.) von weiblichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere. 3D-Rekonstruktion der Diaphyse eines **C** Kontroll- und **D** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

Bei den männlichen Tieren konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Ct. TMD und der Ct. Th. zwischen den Gruppen gezeigt werden (Abb. 22 A und B), was auch an den repräsentativen 3D-Rekonstruktionen der  $\mu$ -CT-Schnittbilder zu sehen ist (Abb. 22 C bis F).



**Abb. 22 Analyse der kortikalen Knochenparameter in der Diaphyse der Femora der Männchen**

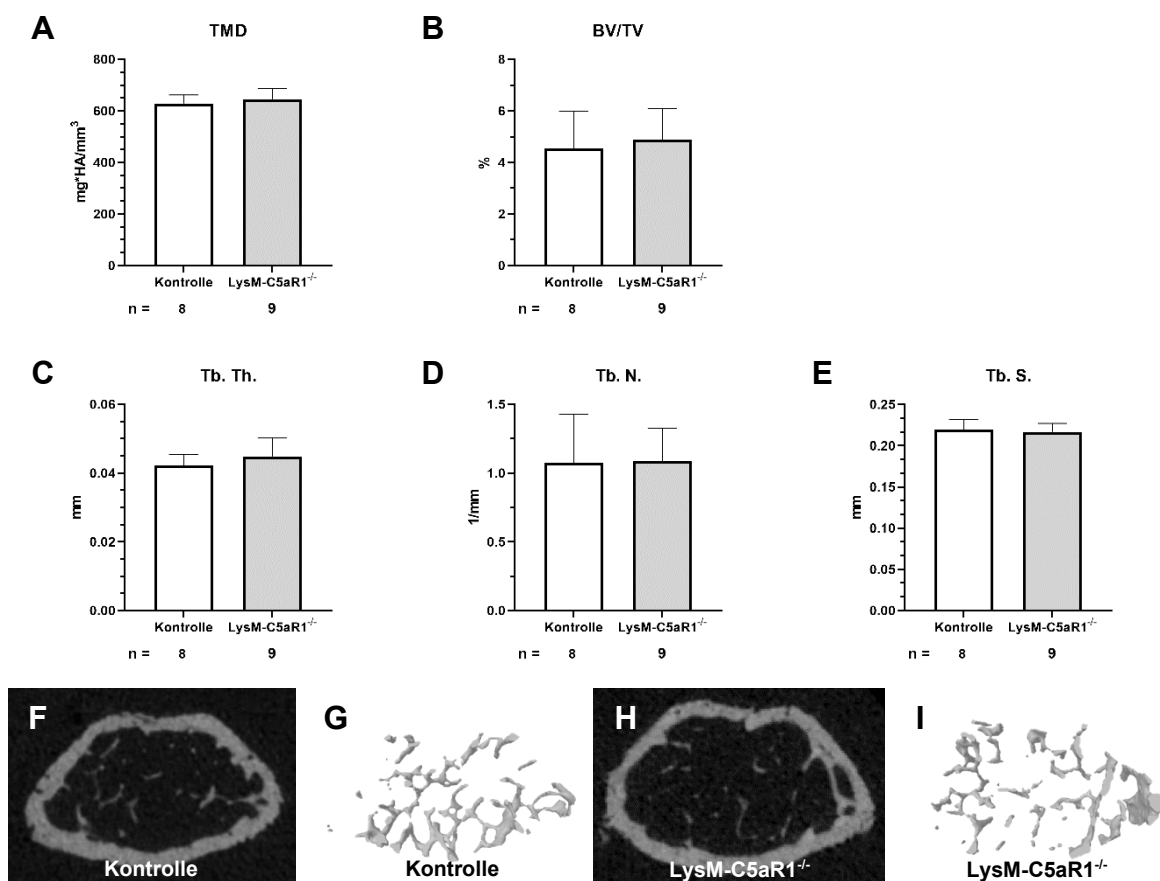
**A** Gewebsmineraldichte der Kortikalis (Ct. TMD) und **B** Dicke der Kortikalis (Ct. Th.) von männlichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere. 3D-Rekonstruktion der Diaphyse eines **C** Kontroll- und **D** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

Zusammenfassend konnten weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Tieren Auswirkungen des Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts auf den kortikalen Knochenphänotyp gezeigt werden.

### 3.4 Untersuchung des trabekulären Knochens

#### 3.4.1 Untersuchung des Femurs

Zur Untersuchung des trabekulären Knochens wurde zunächst die Metaphyse des Femurs radiologisch charakterisiert. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren hinsichtlich der Gewebsmineraldichte (TMD), dem Knochenvolumen (BV/TV) sowie der Trabekel-Anzahl (Tb. N.), -Dichte (Tb. Th.) und deren Abstand zueinander (Tb. S.) (Abb. 23 A bis E). Dies ist auch in den repräsentativen  $\mu$ -CT-Schnittbilder und deren 3D-Rekonstruktionen erkennbar (Abb. 23 F bis I).

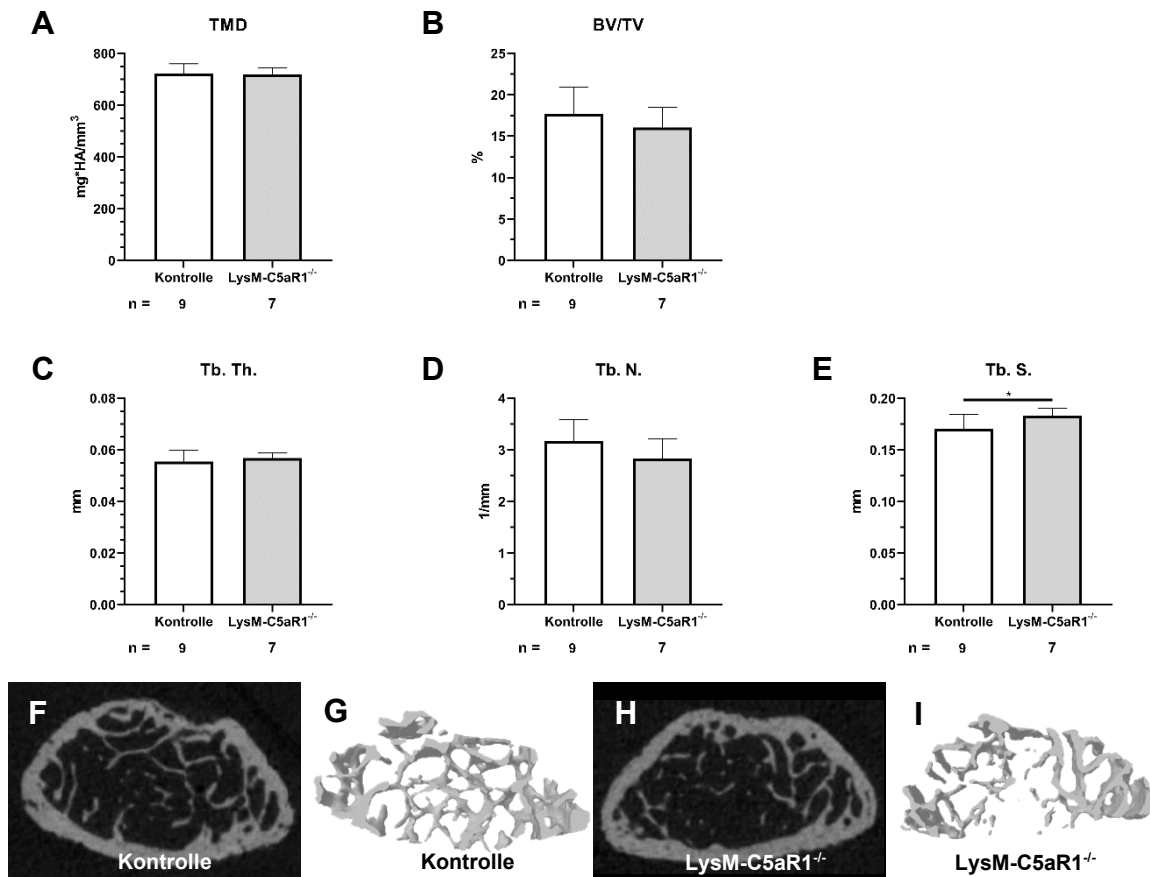


**Abb. 23 Analyse der trabekulären Knochenparameter in der Metaphyse des Femurs der Weibchen**

**A** Gewebsmineraldichte (TMD), **B** %-Anteil des Knochenvolumen am Gesamtvolumen (BV/TV), **C** Trabekel-Dicke (Tb. Th.), **D** -Anzahl (Tb. N.), **E** -Abstand zueinander (Tb. S.) von weiblichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere. Repräsentative  $\mu$ -CT-Axialaufnahme eines **F** Kontroll- und **H** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres. 3D-Rekonstruktion der Metaphyse eines **G** Kontroll- und **I** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

Bei den männlichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der TMD und im BV/TV zwischen den beiden Gruppen (Abb. 24 A bis D). Auch die

Tb. N. und Tb. Th. unterschieden sich nicht signifikant, jedoch war in der Tb. S. eine signifikante ( $p = 0,0415$ ) Erhöhung in den LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (Abb. 24 E, I).

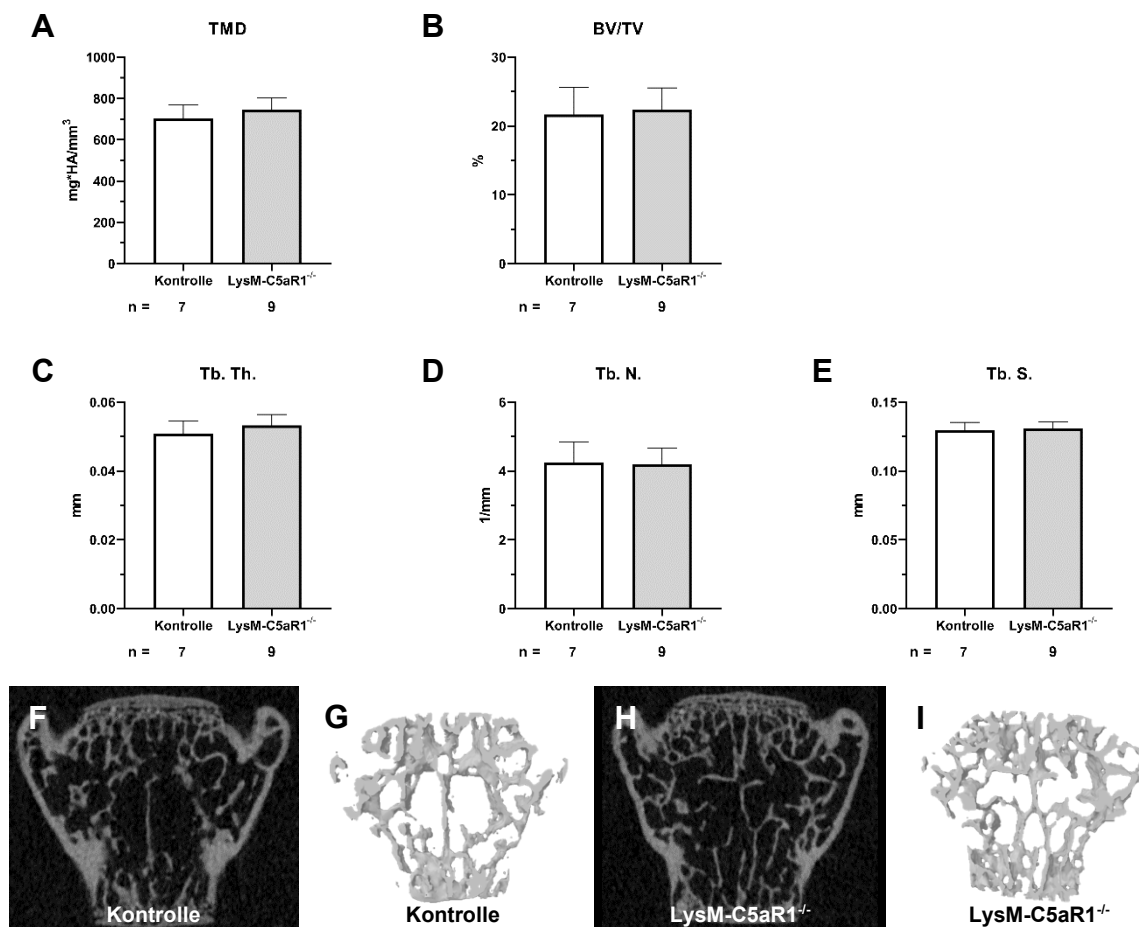


**Abb. 24 Analyse der trabekulären Knochenparameter in der Metaphyse des Femurs der Männchen**

**A** Gewebsmineraldichte (TMD), **B** %-Anteil des Knochenvolumen am Gesamtvolumen (BV/TV), **C** Trabekel-Dicke (Tb. Th.), **D** -Anzahl (Tb. N.), **E** -Abstand zueinander (Tb. S.) von männlichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert ± Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere; \*:  $p < 0,05$ . Repräsentatives  $\mu$ -CT-Schnittbild eines **F** Kontroll- und **H** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres. 3D-Rekonstruktion der Metaphyse eines **G** Kontroll- und **I** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

### 3.4.2 Untersuchung der Wirbelkörper

Des Weiteren wurde der trabekuläre Knochen im Bereich der Wirbelkörper radiologisch untersucht. Dabei zeigten sich bei den weiblichen Tieren keine signifikanten Unterschiede in der TMD, dem BV/TV, der Tb. Th., der Tb. N. sowie der Tb. S. zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 25 A bis E). In den repräsentativen  $\mu$ -CT-Schnittbildern und deren 3D-Rekonstruktionen lassen sich übereinstimmend keine signifikanten Unterschiede in der Trabekelstruktur erkennen (Abb. 25. F bis I)

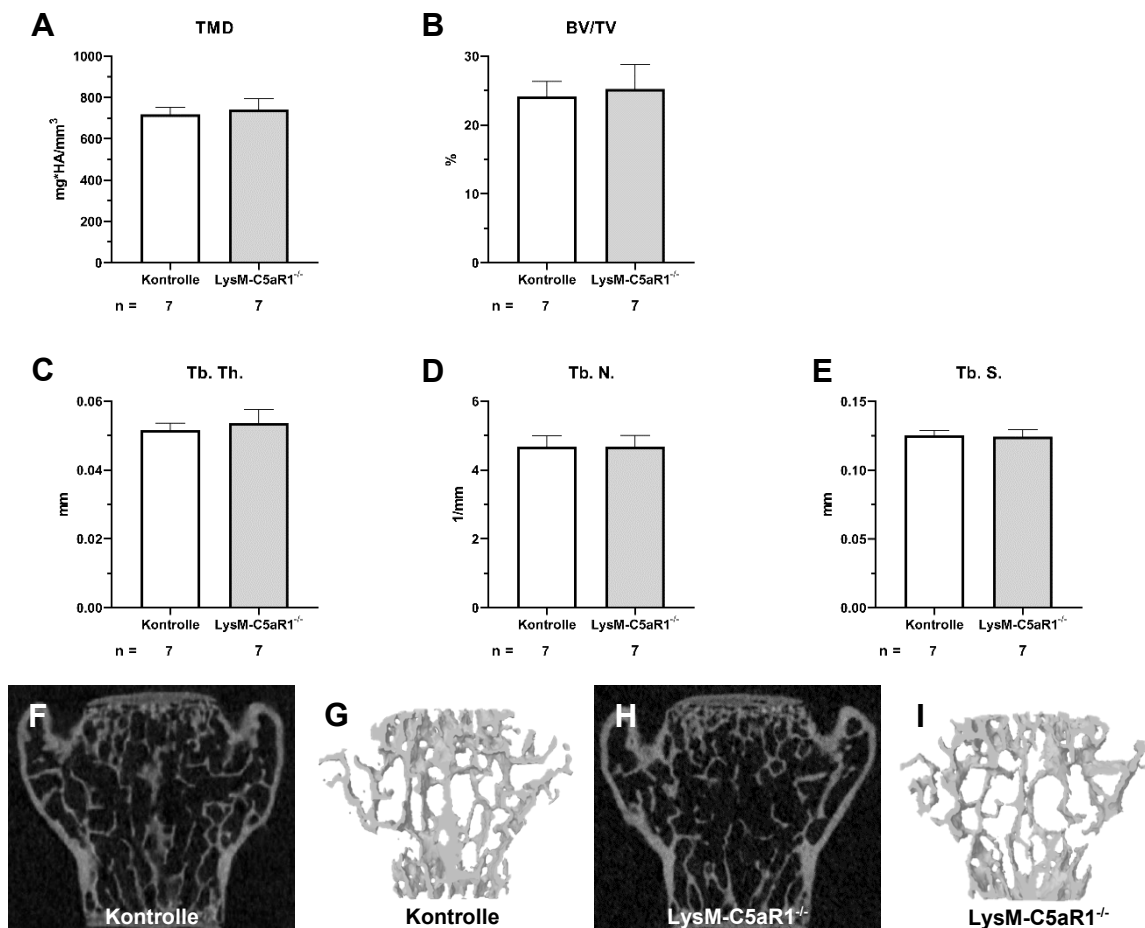


**Abb. 25 Analyse der trabekulären Knochenparameter im Wirbelkörper der Weibchen**

**A** Gewebsmineraldichte (TMD), **B** %-Anteil des Knochenvolumen am Gesamtvolumen (BV/TV), **C** Trabekel-Dicke (Tb. Th.), **D** -Anzahl (Tb. N.), **E** -Abstand zueinander (Tb. S.) von weiblichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

Repräsentatives  $\mu$ -CT-Schnittbild eines **F** Kontroll- und **H** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres. 3D-Rekonstruktion des Wirbelkörpers eines **G** Kontroll- und **I** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

In den Wirbelkörpern der männlichen Tiere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der TMD und im BV/TV sowie den trabekulären Parametern (Abb. 26 A bis E). In den repräsentativen  $\mu$ -CT-Schnittbildern und 3D-Rekonstruktionen lassen sich ebenfalls keine Unterschiede im trabekulären Knochen zwischen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren erkennen (Abb. 26 F bis I).



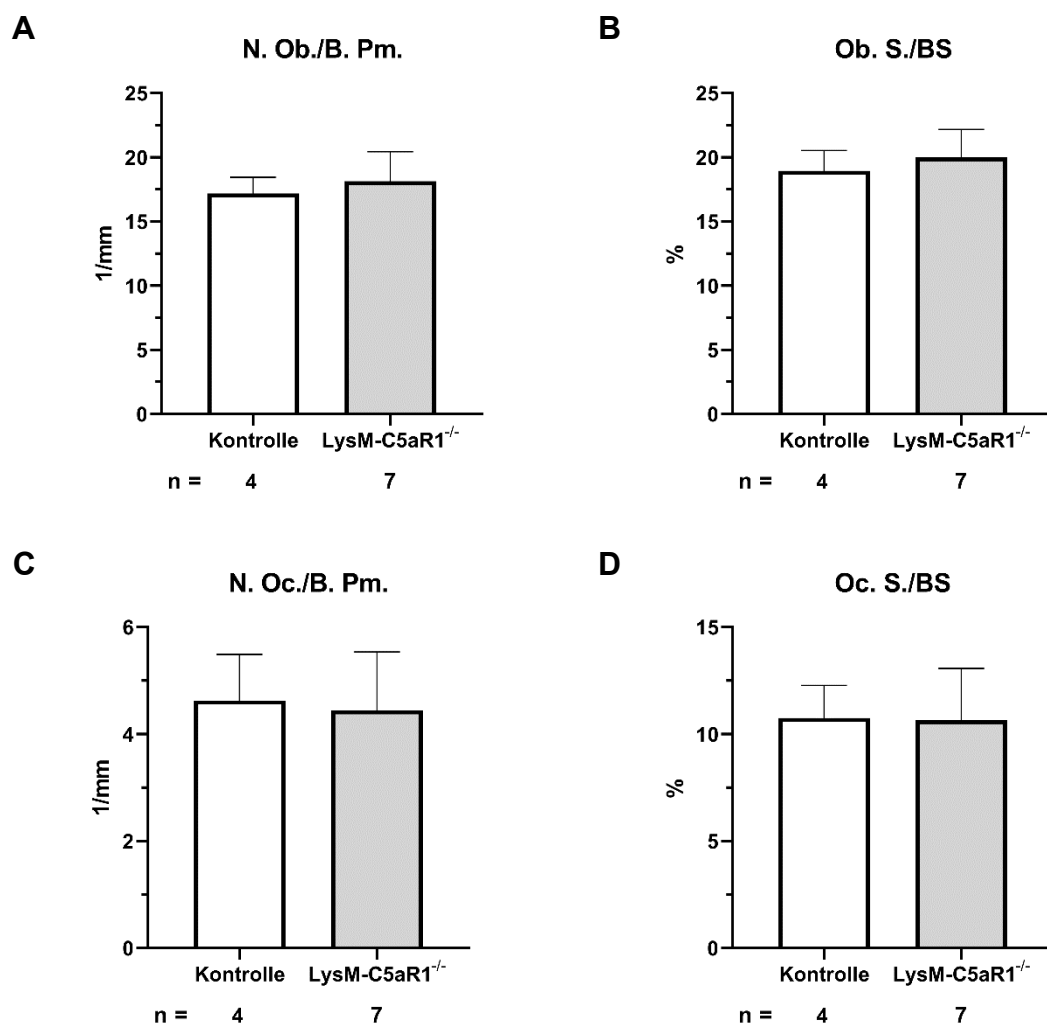
**Abb. 26 Analyse der trabekulären Knochenparameter im Wirbelkörper der Männchen**

**A** Gewebsmineraldichte (TMD), **B** %-Anteil des Knochenvolumen am Gesamtvolumen (BV/TV), **C** Trabekel-Dicke (Tb. Th.), **D** -Anzahl (Tb. N.), **E** -Abstand zueinander (Tb. S.) von männlichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere. Repräsentatives  $\mu$ -CT-Schnittbild eines **F** Kontroll- und **H** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres. 3D-Rekonstruktion des Wirbelkörpers eines **G** Kontroll- und **I** LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieres.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass der Osteoklasten-spezifische C5aR1 Knockout weder in weiblichen noch in männlichen Tieren deutliche Effekte auf den trabekulären Knochenphänotyp hat.

### 3.5 Histologische Untersuchung

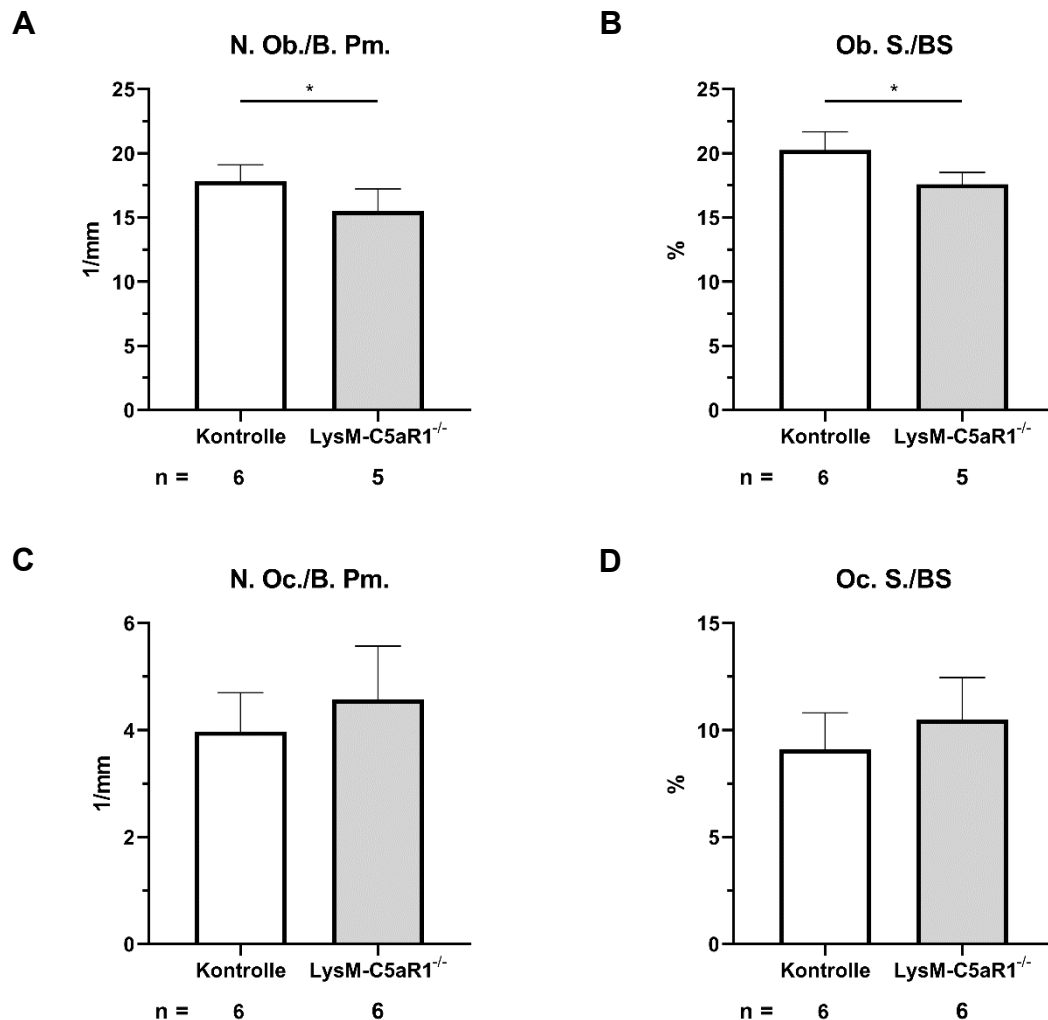
Mittels histologischer Untersuchungen wurden die zellulären Parameter im Wirbelkörper der Mäuse bestimmt. Dabei ergaben sich für die weiblichen Tiere weder in der Anzahl der Osteoblasten pro Knochentrabekelumfang (N. Ob./B. Pm) und dem Anteil der Osteoblasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Ob. S./BS), noch in der Anzahl der Osteoklasten pro Knochentrabekelumfang (N. Oc./B. Pm.) und Anteil der Osteoklasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Oc. S./BS) signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und den LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 27 A bis D).



**Abb. 27 Histologische Analyse des trabekulären Bereichs der Wirbelkörper der Weibchen**

**A** Anzahl der Osteoblasten pro Knochentrabekelumfang (N. Ob./B. Pm), **B** Anteil der Osteoblasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Ob. S./BS), **C** Anzahl der Osteoklasten pro Knochentrabekelumfang (N. Oc./B. Pm) und **D** Anteil der Osteoklasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Ob. S./BS) von weiblichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert ± Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

In der histologischen Untersuchung der männlichen Tiere zeigte sich bei den LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren eine signifikante ( $p = 0,0296$ ) Erniedrigung der N. Ob./B. Pm. sowie ein signifikant ( $p = 0,0061$ ) verringerte Ob. S./BS (Abb. 28 A und B). Hingegen ergaben sich keine Unterschiede in der N. Oc./B. Pm. und der Oc. S./BS zwischen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren.



**Abb. 28 Histologische Analyse des trabekulären Bereichs der Wirbelkörper der Männchen**

**A** Anzahl der Osteoblasten pro Knochentrabekelumfang (N. Ob./B. Pm), **B** Anteil der Osteoblasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Ob. S./BS), **C** Anzahl der Osteoklasten pro Knochentrabekelumfang (N. Oc./B. Pm) und **D** Anteil der Osteoklasten-Oberfläche an der Knochentrabekeloberfläche (Ob. S./BS) von männlichen Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der untersuchten Tiere; \*:  $p < 0,05$ .

Zusammenfassend wurden in den weiblichen Tieren keine Veränderungen der zellulären Parameter durch den C5aR1 Knockout auf Osteoklasten beobachtet. Die männlichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen leicht verringerte Osteoblasten-Parameter auf.

### 3.6 Etablierte histologische Färbungen

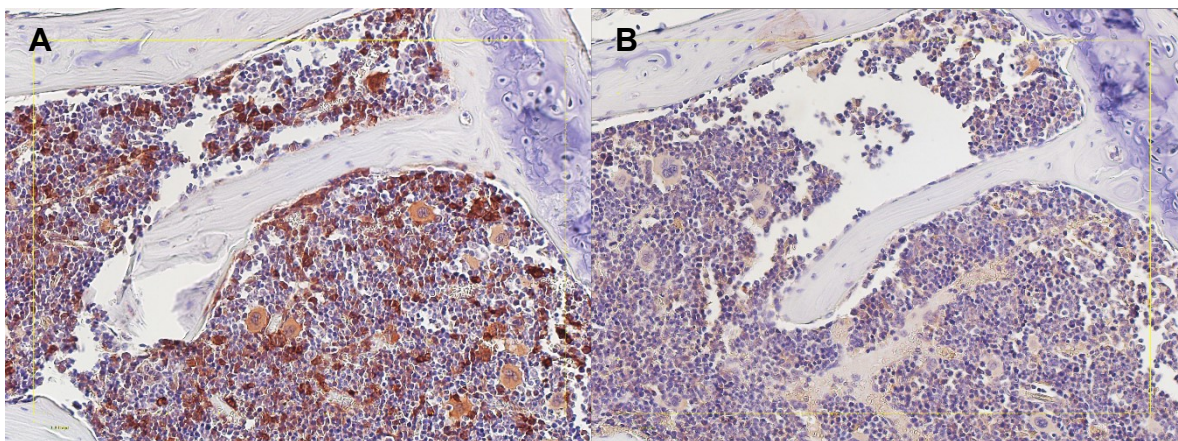
Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden drei immunhistochemische Färbungen etabliert. Dabei sollte zum einen der C5aR1-Rezeptor und zum anderen das Osteoklasten-spezifische Cathepsin K Protein angefärbt werden.

Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um Wildtyp-Tiere. Die etablierten Färbungen sollen in weiteren Projekten zur Etablierung von Doppelfärbungen eingesetzt werden, wobei auch der Osteoklasten-spezifische Knockout der LysM-Tiere verifiziert werden soll.

#### 3.6.1 C5aR1 Färbung

Mittels eines Anti-C5aR1-Antikörpers wurde der C5aR1 Rezeptor im trabekulären Bereich des Femurs angefärbt. Hierbei zeigten sich die C5aR1 positiven Zellen rotbraun, das umgebene Knochenmarksgewebe bläulich-violett sowie das Knorpelgewebe violett. Knochengewebe wurde hellblau angefärbt (siehe Abb. 29 A). In der IgG Kontrolle war keine Färbung erkennbar (siehe Abb. 29 B), weshalb die Färbung mit dem Anti-C5aR1-Antikörper spezifisch erfolgte.

Der C5aR1 Rezeptor wird gemäß der Färbung vor allem auf Knochenmarkszellen exprimiert. Allerdings exprimieren auch Zellen, die den Knochentrabekeln direkt aufsitzen den C5aR1 Rezeptor. Aufgrund derer Morphologie handelt es sich hierbei sowohl um Osteoblasten als auch Osteoklasten.



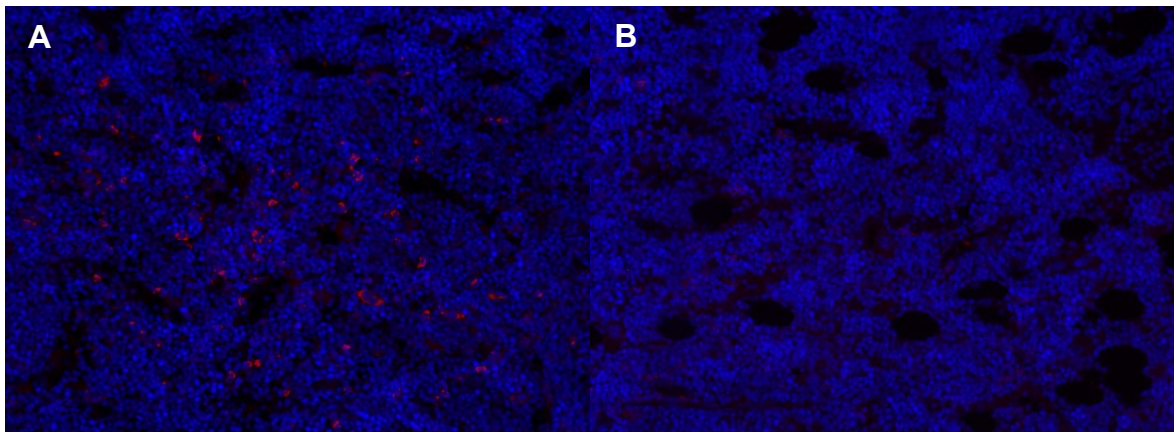
**Abb. 29 Anti-C5aR1 Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus**

**A** Immunhistochemische Färbung mit Anti- C5aR1-Antikörper des Femurs (Epiphysenfugen naher Trabekel). C5aR1 positive Zellen sind rotbraun, Knochenmarkszellen blau-violett, Knorpelgewebe violett und Knochengewebe hellblau angefärbt. **B** IgG-Kontrolle der Färbung. 200x Vergrößerung.

### 3.6.2 C5aR1 Fluoreszenz-Färbung

Zur späteren Etablierung von Doppelfärbungen, wurde der C5aR1 im Femur auch mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Hierbei stellten sich die C5aR1 positiven Zellen rot dar, da der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594 gekoppelt war. Die Zellkerne des übrigen Gewebes wurden mit einer Hoechst-Färbung blau angefärbt. Knochengewebe wurde nicht angefärbt und zeigt sich schwarz (Siehe Abb. 30 A). In der IgG-Kontrolle war keine Färbung erkennbar (Siehe Abb. 30 B), was auf eine spezifische Färbung mit dem Anti-C5aR1-Antikörper hindeutet.

Der C5aR1 Rezeptor wird gemäß dieser Färbung vor allem auf Knochenmarkszellen exprimiert.



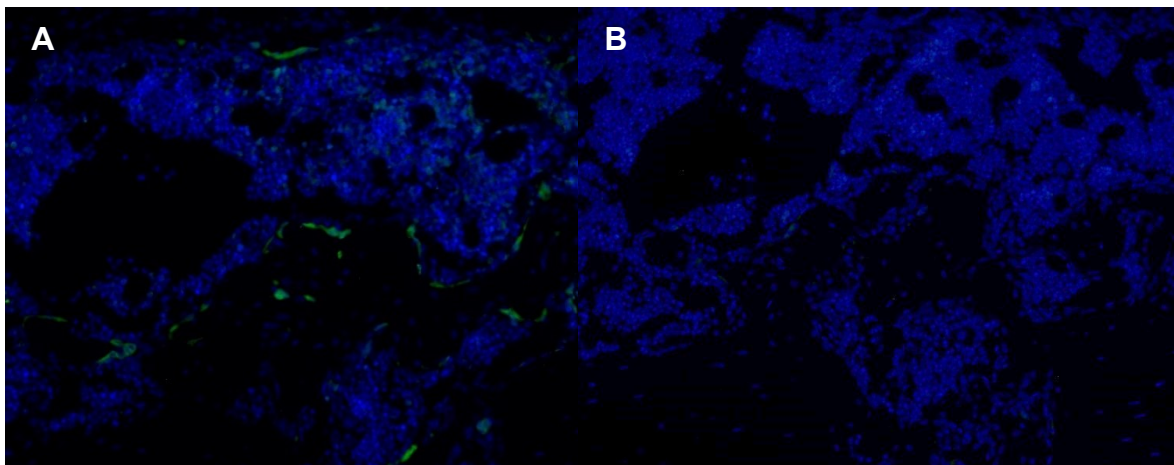
**Abb. 30 Anti-C5aR1 Fluoreszenz-Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus**

**A** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-C5aR1-Antikörper im Femur (Metaphyse). C5aR1 positive Zellen sind rot und Zellkerne blau dargestellt. **B** IgG-Kontrolle der Färbung. Beide 200x Vergrößerung.

### 3.6.3 Cathepsin K Fluoreszenz-Färbung

Mittels eines Anti-Cathepsin K-Antikörpers wurden spezifisch Osteoklasten im Femur angefärbt. Dabei stellten sich durch die Verwendung eines mit Alexa Fluor® 488 gekoppelten sekundären Antikörpers die Osteoklasten in grün dar. Die Zellkerne des übrigen Gewebes wurde mittels einer Hoechst-Färbung blau gegengefärbt. Knochengewebe wurde nicht angefärbt und zeigt sich schwarz (siehe Abb. 31 A). In der IgG-Kontrolle der Färbung ist keine grüne Färbung zu erkennen (siehe Abb. 31 B). Die Färbung erfolgte somit Anti-Cathepsin K-Antikörper spezifisch.

Die Färbung zeigt, wie die gefärbten Zellen den Knochentrabekeln direkt aufliegen. Im Knochenmark sind keine angefärbten Zellen zu erkennen.



**Abb. 31 Anti-Cathepsin K Fluoreszenz-Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus**

**A** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Cathepsin K-Antikörper im Femur (Metaphyse). Cathepsin K positive Zellen sind rot und Zellkerne blau dargestellt. **B** IgG-Kontrolle der Färbung. Beide 200x Vergrößerung.

## 4 Diskussion

Immer mehr Studien weisen auf regulatorische Verbindungen zwischen dem Immunsystem und dem Knochengewebe hin [7, 26, 41, 42, 98, 131, 149]. Auch das Komplementsystem, ein Teil des angeborenen Immunsystems, scheint Einfluss auf die Knochenentwicklung, das Knochen-Remodeling sowie auf die Frakturheilung zu besitzen [3, 9, 36, 61, 73, 87, 109, 122, 142, 149]. Speziell der C5aR1 Rezeptor könnte dabei eine zentrale Rolle einnehmen [9, 61, 73, 88, 109, 122]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein globaler C5aR1 Knockout zu einer signifikanten Erhöhung der Knochenmasse führt [73]. Da die bisherigen Untersuchungen jedoch keine Rückschlüsse auf die Effektor-Zellpopulation erlauben, soll in weiteren Studien das Zell-spezifische Fehlen des C5aR1 Rezeptors auf verschiedenen Knochenzelltypen untersucht werden. Die vorliegende Arbeit hat sich mit der Untersuchung der Effekte eines Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockout auf den Knochenphänotyp befasst. Hierfür wurde der trabekuläre und kortikale Knochen von insgesamt 33 zwölf Wochen alten Mäusen mittels mechanischer, radiologischer und histologischer Analysen untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Osteoklasten-spezifisches Fehlen des C5aR1 keine wesentlichen Effekte auf den Knochenphänotyp der Maus hat.

### 4.1 Der Knochenphänotyp

Die deskriptive Auswertung der Röntgenbilder der Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der makroskopischen Skelettstruktur der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Mäuse und der Kontrolltiere. Dieses Ergebnis konnte auch in der Untersuchung des globalen C5aR1 Knockouts gezeigt werden [73]. Dies zeigt, dass das Fehlen des C5aR1 Rezeptors auf Osteoklasten zu keinen schwerwiegenden Störungen in der Knochenentwicklung führt. Auch im Vergleich des Gesamtgewichts der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere und der Kontrolltiere zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der Anteil des Skeletts am Gesamtgewicht der Maus lediglich 3-4 % beträgt [105] und somit geringe Veränderungen des Knochengewichts nicht zuverlässig durch Wiegen der Tiere erfasst werden können.

Um Auswirkungen des Knockouts auf das Längenwachstum der Knochen zu ermitteln, wurde die Länge der Femora bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Femurlängen der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>- und der Kontrollmäuse. Auch die Anzahl an Chondrozyten pro Chondrozytensäule in der Epiphysenfuge sowie die Breite der Epiphysenfuge waren nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse bestätigen die röntgenologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

In einer Studie an C5-defiziente Mäusen konnten jedoch signifikant breitere Wachstumsfugen beobachtet werden, was auf eine Verzögerung der enchondralen Ossifikation hinweist [36]. Auch andere Autoren bestätigen, dass das Komplementsystem eine regulatorische Rolle in der enchondralen Ossifikation spielen könnte, wie beispielsweise im Abbau von Kollagenen sowie im Einwachsen von Gefäßen in die Epiphysenfuge [87, 116]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen aber darauf hin, dass der osteoklastäre C5aR1 Rezeptor daran nicht beteiligt ist (vgl. Abb. 19). Die zugrundeliegenden Effekte scheinen über andere Mechanismen oder Zelltypen vermittelt zu werden.

Im globalen C5aR1 Knockout konnte eine gestörten Knorpel-zu-Knochen-Transformation im Frakturkallus während der Frakturheilung beobachtet werden [73]. Die Autoren beobachteten einen erhöhten Knorpelanteil im Frakturkallus nach 14 Tagen infolge einer verringerten Resorption des Knorpels durch Osteoklasten [73]. Im Gegensatz zur Wachstumsfuge wird jedoch nach einer Fraktur das Komplementsystem lokal stark aktiviert und viel C5a gebildet, was zu einer Aktivierung des C5aR1 führen kann. Es wurde zudem gezeigt, dass der C5aR1 im Frakturkallus sowohl auf Osteoblasten als auch auf Osteoklasten vermehrt exprimiert wird [61]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass im Falle der Frakturheilung der C5aR1 auf Osteoklasten eine regulatorische Funktion bei der enchondralen Ossifikation besitzt. Dies sollte in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich auch die mechanischen Knocheneigenschaften der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere nicht oder nur gering von den Kontrolltieren. Bei den männlichen Mäusen waren keine signifikante Veränderung zu beobachten, wohingegen die Biegesteifigkeit der Femora der weiblichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere geringfügig, aber signifikant erhöht war. Dabei hängt die

Biegesteifigkeit im Wesentlichen von der Ct. Th. und Ct. TMD sowie von der Form der Kortex ab. Die geometrische Form der Kortex wird wiederum durch das Flächenträgheitsmoment  $I_x$  beschrieben [37], welches im  $\mu$ -CT bestimmt wurde. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich weder in Ct. Th., noch in Ct. TMD signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Das Flächenträgheitsmoment  $I_x$  war hingegen in den LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant erhöht. Hierdurch kann die erhöhte Biegesteifigkeit bei den weiblichen Tieren erklärt werden. Bei den männlichen Tieren zeigten sich übereinstimmend mit der unveränderten Biegesteifigkeit keine Unterschiede in Ct. Th., Ct. TMD sowie im Flächenträgheitsmoment  $I_x$  zwischen den Kontroll- und LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren. Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der vorliegenden Arbeit könnten auf Unterschiede im Hormonhaushalt der Tiere, beispielsweise im Östrogenspiegel, zurückzuführen sein. Um dies zu bewerten sind jedoch vergleichbare Studien an weiblichen Tieren nötig. Die Ergebnisse der biomechanischen Testung bestätigen die fehlenden Unterschiede in den strukturellen Knochenanalysen, die nachfolgend diskutiert werden.

Sowohl die Knochenmineraldichte als auch die kortikalen und trabekulären Knochenparameter in Femur und Wirbelsäule von LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren waren unverändert. Dies wird durch die weitgehend unveränderten zellulären Parameter bestätigt. Hier zeigten sich die osteoklastären Parameter sowohl in den weiblichen als auch in den männlichen Tieren unverändert. Auch die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten der weiblichen Tiere zeigte sich in Übereinstimmung mit der unveränderten Knochenmasse unverändert. Lediglich die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten der männlichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere zeigte sich geringfügig, aber signifikant verringert. Dabei ist einschränkend zu beachten, dass in der histologischen Untersuchung der Knochenzellen versuchsbedingt weniger Tiere untersucht wurden als in der radiologischen Analyse.

Zusammenfassend zeigte sich eine unveränderte Knochenmasse und -struktur der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere, die durch eine unveränderte Anzahl und Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten bestätigt wird. Konsekutiv zeigten sich auch die biomechanischen Eigenschaften der untersuchten Knochen weitgehend unverändert. Der Osteoklasten-spezifische C5aR1 Knockout hat somit keinen Einfluss auf den physiologischen Knochenphänotyp der Maus.

Im Gegensatz zum Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockout zeigten sich im globalen C5aR1 Knockout eine erhöhte kortikale und trabekuläre Knochenmasse sowie eine signifikante Erhöhung der Biegesteifigkeit der Femora [73]. Dabei zeigte sich die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unverändert. Die Anzahl der Osteoklasten der C5aR1-defizienten Tiere war hingegen signifikant verringert [73]. Diese reduzierte Anzahl an Osteoklasten bestätigte sich weiter in den *in vitro* Untersuchungen an primären Osteoklasten. Hierbei wiesen die C5aR1-defizienten Zellen eine verringerte Osteoklastogenese auf [73]. Zudem zeigte sich bei den C5aR1-defizienten Osteoklasten eine gesteigerte Apoptose, was zur geringeren Osteoklasten-Anzahl der C5aR1-defizienten Tiere beitragen könnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte Knochenmasse im globalen C5aR1 Knockout aus einer verringerten Anzahl an Osteoklasten resultiert. Die Autoren vermuteten daher, dass im physiologischen Zustand C5a direkt und indirekt, über die C5aR1 vermittelte Verstärkung der Expression von RANKL in Osteoblasten, die Osteoklastogenese stimulieren kann [73]. Da im Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockout jedoch keine Veränderung des Knochenphänotyps zu beobachten war, kann gefolgert werden, dass die erhöhte Knochenmasse im globalen C5aR1 Knockout nicht direkt über den C5aR1 auf Osteoklasten, sondern indirekt, über den C5aR1 auf Osteoblasten oder auf Zellen des Immunsystems, vermittelt werden könnte.

Diese Hypothese wird von einer Untersuchung an isolierten Osteoklasten aus LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren unterstützt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass primäre Osteoklasten aus LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren trotz des Fehlens des C5aR1 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine signifikant veränderte Anzahl an reifen Osteoklasten hervorbringen. Auch die Expression der Osteoklasten-spezifischen Gene Trap und Cathepsin K war nicht signifikant verändert (Ulm: unpub. Bachelorarbeit 2019). Dies deutet auf eine unveränderte Osteoklastogenese und Aktivität der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Osteoklasten hin, was die *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen. Der C5aR1 scheint gemäß dieser Daten keinen direkten Einfluss auf den physiologischen Knochenphänotyp zu besitzen.

Im Gegensatz dazu konnte eine Studie an isolierten Osteoklasten-ähnlichen Zellen (mittels RANKL differenzierte RAW264.7 Zellen) zeigen, dass nach Zugabe eines

pharmakologischen C5aR1-Antagonisten signifikant weniger osteoklastogene Marker wie Cathepsin K, Matrix-Metallo-Protease-9 und TRAP exprimiert werden [31]. Weiter zeigte sich die Knochenresorption dieser Zellen unter C5aR1 Antagonismus um 25% reduziert [31]. Der C5aR1 Rezeptor scheint also auf diesen isolierten Osteoklasten-ähnlichen Zellen eine Rolle in der Reifung und der Aktivität der Zellen zu spielen. Jedoch weisen RAW264.7-Osteoklasten eine Reihe an Unterschieden zu natürlichen Osteoklasten auf, wie beispielsweise die Expression abweichender Oberflächenrezeptoren und intrazellulärer Proteine [28, 72]. Um direkte Auswirkungen des C5aR1 auf die Osteoklasten *in vitro* weiter zu untersuchen, könnte die Aktivität von isolierten C5aR1-defizienten Osteoklasten beispielsweise durch Resorptionsassays bestimmt werden.

Die Hypothese, dass der C5aR1 ausgeprägte indirekte Effekte auf die Osteoklastogenese besitzt, bestätigt eine Studie, in der murine Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur isoliert und *in vitro* mit C5a stimuliert wurden [142]. Dabei wurden die Zellüberstände hinsichtlich osteoklastogener Effekte untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von Knochenmarkszellen mit C5a, C3a und C5a + C3a zu einer Erhöhung der Anzahl an TRAP-positiven Zellen führt. Dies zeigt, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Regulation der Osteoklastogenese einnehmen könnte. Jedoch konnte hier nicht unterschieden werden, ob es sich um direkte oder indirekte Effekte auf die Osteoklasten handelt. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt untersucht, welche Auswirkung das Fehlen der Rezeptoren C5aR1 und C3aR auf die Zytokinexpression der Knochenmarkszellen besitzt. Hier zeigte sich, dass C3aR<sup>-/-</sup>-C5aR1<sup>-/-</sup>-Knochenmarkszellen signifikant weniger IL-6 produzieren als Zellen aus Wildtyp-Kontrolltieren. Dies deutet darauf hin, dass C3a und C5a zu einem Anstieg der IL-6 Expression in Knochenmarkszellen führen. In einem dritten Schritt wurden nun die Auswirkungen von IL-6 auf die Osteoklastogenese anhand der Zählung von TRAP-positiven Zellen nach Stimulation untersucht. Hierzu wurde einerseits gezeigt, dass eine Beeinträchtigung der Osteoklastogenese in C3-defizienten Knochenmarkszellen durch die Zugabe von IL-6 aufgehoben werden kann. Andererseits konnte die anfangs beobachtete Erhöhung der Osteoklastogenese durch die Zugabe von C5a und C3a auf Knochenmarkszellen durch Zugabe eines IL-6-Antagonisten auf den Ausgangswert unbehandelter Knochenmarkszellen

gesenkt werden [142]. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Anaphylatoxine, insbesondere C5a, über den C5aR1 Rezeptor auf Knochenmarkszellen zu einer erhöhten Expression von Botenstoffen, wie IL-6 führen. Diese Botenstoffe können wiederum die Osteoklastogenese positiv beeinflussen [142]. Dies bestätigend konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass IL-6 nach C5a Stimulation vermehrt von Knochenzellen exprimiert wird und die Osteoklastogenese beeinflussen kann [62, 74, 84, 143, 153]. Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für die Zytokine IL-1, IL-7, IL-17A, TGF- $\beta$  und INF $\gamma$  gezeigt werden [74, 149]. Weiter konnte für den klassischen Differenzierungsfaktor der Osteoklastogenese RANKL gezeigt werden, dass dieser bei Überexpression des C5aR1 auf Osteoblasten signifikant stärker exprimiert wird [9].

Aufgrund der starken Vernetzung des Komplementsystems mit dem Immunsystem gibt es zahlreiche weitere Zelltypen die C5a-C5aR1-vermittelt Zytokine oder andere Botenstoffe exprimieren und somit Einfluss auf den Knochenmetabolismus und insbesondere auf die Osteoklastogenese nehmen können. Beispielsweise kann C5a in Mastzellen, neutrophilen und basophilen Granulozyten zur Ausschüttung von Interleukinen und Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-8 und IL-6 führen [43]. Weiter kommt es in mit Influenza A infizierten C5aR1-defizienten Mäusen zu einer signifikant verringerten Ausschüttung von IL-6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  aus T-Zellen und Endothelzellen als in Wildtyp-Kontrolltiere [132]. IL-6, TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  können wiederum Einfluss auf die Osteoklastogenese nehmen [2, 74].

Zusammenfassend deuten die genannten Studien in Kombination mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der C5aR1 auf Osteoklasten keine direkten Auswirkungen auf die physiologische Osteoklastogenese und Aktivität der Zellen zu haben scheint. Allerdings zeigt die Literatur, dass die Bindung von C5a an den C5aR1 auf Osteoblasten und auf einer Vielzahl von Immunzellen zur Ausschüttung von osteoklastogenen Faktoren führt. Bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die indirekte Stimulation der Osteoklasten über den C5aR1 auf Osteoblasten weiterhin intakt bleiben könnte. Dadurch könnte der unveränderte Knochenphänotyp, insbesondere im Vergleich mit dem globalen C5aR1 Knockout, erklärt werden. Um die indirekte Stimulierung der Osteoklastogenese genauer zu untersuchen, könnte die Expression von lokalen

und systemischen Zytokinen sowie von RANKL in LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren und Tieren des globalen C5aR1 Knockouts verglichen werden.

Auf diese indirekte Stimulierung der Osteoklasten durch den C5aR1 auf Osteoblasten weist auch eine Studie hin, in der eine Osteoblasten-spezifische Überexpression des C5aR1 untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass es im physiologischen Zustand dieser Tiere zu keinem veränderten Knochenphänotyp kommt. Untersuchungen von Frakturen der Tiere zeigten jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl an Osteoklasten im Bereich der Fraktur im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und eine signifikant beeinträchtigte Frakturheilung [9]. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass im physiologischen Zustand C5a rasch abgebaut wird und so die Aktivität der C5a-C5aR1-Achse nicht durch die Anzahl der Rezeptoren, sondern durch die Anzahl der C5a-Moleküle limitiert ist [10, 91]. Im Bereich der Fraktur steigt die C5a Konzentration auf den etwa siebenfachen Wert der Normalkonzentration an [9]. Dadurch könnten die zusätzlichen C5aR1 aktiviert werden und zu einer verstärkten Ausschüttung osteoklastogener Faktoren führen. Die geringe Konzentration an C5a im physiologischen Zustand wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben von Effekten in der vorliegenden Arbeit.

Möglicherweise zeigen sich Effekte des Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts daher erst unter erhöhten lokalen oder systemischen C5a Konzentrationen, wie beispielsweise während Inflammationsprozessen [9, 73, 87]. Hier könnte die erhöhte C5a Konzentration die C5a-C5aR1-Achse in den Kontroll-Osteoklasten stärker aktivieren und so eine größere Differenz zu den C5aR1-defizienten Zellen zur Folge haben. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass das globale Fehlen des C5aR1 zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Frakturheilung führt [73]. Um das Osteoklasten-spezifische Fehlen des C5aR1 in Inflammationsprozessen zu untersuchen, könnten *in vitro* Untersuchungen an LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Osteoklasten unter Zugabe von hohen Dosen C5a weitere Ergebnisse in Hinblick auf Aktivität und Anzahl der Osteoklasten liefern. Außerdem könnten *in vivo* LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere unter inflammatorischen Bedingungen, wie beispielsweise bei der Kombination von Fraktur und Thoraxtrauma, untersucht werden, da hier ebenfalls mit einer erhöhten C5a Konzentration zu rechnen ist [59]. Des Weiteren könnten durch eine experimentell induzierte Osteomyelitis die

Auswirkungen einer lokal gesteigerten C5a Konzentration im Knochen untersucht werden [87]. Unter diesen inflammatorischen Bedingungen könnte der C5aR auf Osteoklasten wichtige regulatorische Funktionen übernehmen, wie z.B. die Migration der Zellen steuern.

Für Makrophagen, die aus der gleichen Zellpopulation wie Osteoklasten hervorgehen, wurde bereits gezeigt, dass die C5a-C5aR1-Achse die Migration bei Entzündungsprozessen steuert [144]. Auch wurde gezeigt, dass Osteoblasten und MSCs einem C5a Gradienten folgen [61]. Ein C5a Gradient tritt auch bei Knochenfrakturen auf [60], bei welchen es im Frakturhämatom früh zu einer Komplementaktivierung mit der Freisetzung von C3a und C5a kommt [121]. Allerdings war im globalen C5aR1 Knockout die Anzahl an Osteoklasten im Frakturareal nicht signifikant verändert. Jedoch vermuteten die Autoren, dass die unveränderte Osteoklastenanzahl auf kompensatorische Mechanismen, wie beispielsweise eine stärkere lokale Stimulation der Osteoklastogenese, zurückzuführen sein könnte [73].

Einen weiteren Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung könnte das verwendete Modell haben. Zur Generierung des Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts wurde das Lysozym M Gen als Marker für die Osteoklasten verwendet. LysM eignet sich, da es von anderen Knochenzellen, wie Osteoblasten und Osteozyten nicht exprimiert wird [29]. LysM wird jedoch nicht exklusiv in Osteoklasten exprimiert, sondern auch in einigen anderen Zellen, z.B. Myeloblasten, Microglia und Makrophagen [29, 100]. Der C5aR1 Knockout ist daher vermutlich nicht völlig spezifisch. Ob weitere Zellen vom C5aR1 Knockout betroffen sind und inwieweit sie Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nehmen, kann bisher nicht abschließend geklärt werden [14]. Der Einsatz verschiedener Doppelfärbungen in LysM-C5aR1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Tieren, die sowohl den C5aR1 als auch den jeweiligen Zelltypus anfärben, könnten hierbei aufschlussreich sein.

Obwohl LysM auch von wenigen anderen Zellen exprimiert wird, findet LysM als Osteoklasten-Marker breite Anwendung in Osteoklasten-spezifischen Knockoutmodellen [18, 75, 108]. Alternativ könnte das Cathepsin K kodierende Gen CtsK verwendet werden, das jedoch erst spät in reifen Osteoklasten exprimiert wird [30]. Dadurch könnte der Einfluss des C5aR1 Rezeptors auf die Osteoklastogenese nicht untersucht werden.

## 4.2 Etablierte histologische Färbungen

Zusätzlich zur Charakterisierung des Knochenphänotyps des Osteoklastenspezifischen C5aR1 Knockouts wurden in der vorliegenden Arbeit drei immunhistologische Färbungen etabliert. Diese sollen in späteren Untersuchungen zur spezifischen Detektion des C5aR1 Rezeptors auf unterschiedlichen Zellpopulationen dienen. Hierfür wurde zunächst eine Färbung des C5aR1 im Knochen mittels Meerrettich-Peroxidase in Wildtyp-Tieren etabliert. Dabei färbten sich vor allem Zellen im Knochenmark rot an. Hierbei könnte es sich um verschiedene Immunzellen, wie beispielsweise Granulozyten und Mastzellen handeln, für die gezeigt werden konnte, dass diese Knochenmarkszellen den C5aR1 Rezeptor exprimieren [91]. Bei den Zellen, die den Trabekeln direkt aufliegen und rot angefärbt wurden, könnte es sich sowohl um Osteoblasten als auch Osteoklasten handeln. Für beide Zelltypen konnte die Expression des C5aR1 Rezeptors bereits gezeigt werden [87]. Zudem weist die typische Morphologie auf beide Zelltypen hin. Aktive Osteoblasten nehmen eine kubische Form an und sitzen den Trabekeln einreihig auf. Osteoklasten besitzen mehrere Zellkerne, liegen dem Knochen länglich auf und sind wesentlich größer als die Zellen des übrigen Knochen- und Markgewebes. Beide Zellformen wurden in der Färbung rot angefärbt (siehe Abb. 29).

In einem zweiten Schritt sollte die C5aR1 Färbung im Knochen nun auch mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs etabliert werden, da mit dieser Technik eine Doppelfärbung mit weiteren Zellmarkern, wie dem Runx2 für Osteoblasten oder Cathepsin K für Osteoklasten durchgeführt werden kann. In dieser C5aR1 Fluoreszenz-Färbung zeigte sich die stärkste Anfärbung wieder im Knochenmark. Auch hier waren Zellen nahe dem Knochen rot angefärbt, wobei es sich vermutlich ebenfalls um Osteoblasten und Osteoklasten handelt. Jedoch liefert hier erst eine Doppelfärbung mit weiteren zellspezifischen Markern Aufschluss über die genaue C5aR1 Expression im Knochen.

Mit der Cathepsin K Färbung sollte diese zweite Färbung spezifisch für Osteoklasten etabliert werden. Hier waren lediglich einzelne längliche Zellen, welche dem Knochen direkt auflagen, grün angefärbt (siehe Abb. 31). Da es sich bei Cathepsin K um ein Protein handelt, welches im Knochen nahezu ausschließlich in Osteoklasten exprimiert wird [35, 101], und die Form der angefärbten Zellen mit

derer von Osteoklasten übereinstimmt, kann angenommen werden, dass es sich hier um Osteoklasten handelt. Die Färbung kann zukünftig zur Etablierung einer Doppelfärbung von C5aR und Cathepsin K eingesetzt werden. Mit einer solchen Doppelfärbung könnte das Fehlen des C5aR1 Rezeptors auf den Osteoklasten überprüft und somit das Knockoutmodell verifiziert werden. Auch eine Kombination der C5aR1 Färbung mit einer Anfärbung anderer Zellmarker, wie Runx2 für Osteoblasten oder CD68 für Makrophagen, wären denkbar. Damit ließe sich das Vorhandensein des C5aR1 auf verschiedenen Zellpopulationen und mögliche Veränderungen im Knockoutmodell untersuchen.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der Osteoklasten-spezifische C5aR1 Knockout keinen wesentlich veränderten Knochenphänotyp zur Folge hat. Insbesondere die Aktivität und die Anzahl der Osteoklasten ist unverändert. Die Veränderungen der Anzahl und der Aktivität der Osteoklasten, wie sie im globalen C5aR1 Knockout beobachtet wurden, scheinen daher indirekt über andere Zellen, wie beispielsweise Osteoblasten oder Immunzellen, vermittelt zu werden und nicht direkte Folge des Fehlens des C5aR1 Rezeptors auf Osteoklasten zu sein.

Für die weitere Untersuchung der Rolle des C5aR1 Rezeptors im Osteoklasten könnten weitere Experimente durchgeführt werden. Zunächst sollte eine Untersuchung der systemischen und lokalen Zytokinexpression der LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich mit Tieren des globalen C5aR1 Knockouts erfolgen. Besonders Zytokine, wie IL-6, TNF- $\alpha$  oder INF- $\beta$  sollten untersucht werden, da diese die Osteoklastogenese beeinflussen und in Abhängigkeit von C5a exprimiert werden können [2, 64, 74].

Neben *in vivo* Versuchen sind für das Aufdecken molekularer Mechanismen *in vitro* Untersuchungen nötig. Hier könnte die Zytokinexpression, insbesondere von Interleukinen, sowie die Resorptionskapazität von isolierten LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Osteoklasten quantifiziert werden. Anschließend sollte die Rolle des C5aR1 auf den Osteoklasten in inflammatorischen Zuständen untersucht werden, da hier mit erhöhten lokalen und systemischen C5a Konzentrationen zu rechnen ist [9]. Dazu könnten die Effekte des Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts auf die Frakturheilung und während systemischer Inflammation untersucht werden. Hier zeigte sich im globalen Knockout eine signifikante Beeinträchtigung durch das

Fehlen des C5aR1 [73]. Weiter ist im Frakturareal die C5a-Konzentration um ein Vielfaches höher als im gesunden Knochen [9]. Möglicherweise hat das Fehlen des C5aR1 auf Osteoklasten unter diesen inflammatorischen Bedingungen einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus und die Knochenregeneration im Verlauf der Frakturheilung.

Als nächsten Schritt sollte die *in vivo* Untersuchung eines Osteoblasten-spezifischen C5aR1 Knockouts (Runx2) erfolgen. Hier können analog zur vorliegenden Arbeit der Knochenphänotyp charakterisiert und konsekutiv *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden. Dadurch kann gezeigt werden, ob die verringerte Knochenmasse in Tieren mit globalen C5aR1 Knockout durch den C5aR1 Rezeptor auf den Osteoblasten vermittelt wird, oder ob andere Zellen für diesen Phänotyp verantwortlich sind [73]. Außerdem kann so zwischen direkten Effekten des C5aR1 auf Osteoklasten und indirekten, über Osteoblasten vermittelten Effekten, unterschieden werden.

In Bezug auf die etablierten Färbungen können nun Fluoreszenz-Doppelfärbungen etabliert werden, welche beispielsweise zugleich Osteoblasten (Runx2) oder Osteoklasten (Cathepsin K) und den C5aR1 anfärben können. Letztere Doppelfärbung ist für den Nachweis einer Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Deletion notwendig. Zudem kann überprüft werden, ob auch andere Zellen, welche das LysM-Gen tragen, von der C5aR1 Deletion betroffen sind.

Das Komplementsystem nimmt eine wichtige Rolle im Knochenmetabolismus ein [9, 31, 36, 59-62, 73, 87, 109, 122, 142], jedoch sind die molekularen Mechanismen und Zielzellen noch nicht eindeutig identifiziert. Die Aufdeckung dieser Mechanismen und der Effektor-Zellpopulationen ist relevant, um mögliche Targets für neue pharmakologische oder biotechnologische Therapien zu identifizieren. Diesbezüglich wurde bereits tierexperimentell gezeigt, dass eine Antagonisierung des C5aR1 die Beeinträchtigung der Frakturheilung durch ein zusätzliches Thoraxtrauma verhindern kann [109]. Dies könnte bei der Versorgung polytraumatisierter Patienten wichtig sein. Ebenso konnte an Mäusen gezeigt werden, dass eine Antagonisierung des C5aR1 Rezeptors während Parodontitis vor Entzündungs-bedingtem Verlust von Knochenmasse schützt [1]. Auch bei Gelenkserkrankungen mit Knochenbeteiligung, wie der rheumatoiden Arthritis, konnte an Ratten gezeigt werden, dass sich der Krankheitsverlauf durch Inhibition

von C5a positiv beeinflussen lässt [151]. Darüber hinaus sind über 20 weitere Inhibitoren der C5-C5a-Achse in der Entwicklung, welche zur Behandlung von rheumatischen, hämatologischen sowie diverser neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden sollen [106, 152]. Der erste zugelassene C5-Antikörper Eculizumab wird bereits in der Klinik zur Hemmung des Komplementsystems bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie eingesetzt [50]. Aus diesen klinischen Beispielen wird ersichtlich, dass die Erforschung des Komplementsystems, insbesondere der C5a-C5aR1-Achse, höchst relevant ist und mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein kleiner Teil zum weiteren Verständnis des Komplementsystems beigetragen wurde.

## 5 Zusammenfassung

In immer mehr Studien wird eine wichtige Rolle des Komplementsystems in der Regulation des Knochengewebes beschrieben. Besonders der Rezeptor des aktivierten Komplementfaktors 5, C5aR1 genannt, scheint hierbei eine zentrale Stellung einzunehmen. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass das globale Fehlen des C5aR1 in Mäusen zu einer signifikant erhöhten Knochenmasse führt, welche mit einer geringeren Anzahl an Osteoklasten verbunden war. Allerdings konnte bisher nur wenig auf die molekularen Mechanismen und auf die Effektor-Zellpopulationen des C5aR1 im Knochen zurückgeschlossen werden. Hierfür werden Zell-spezifische Modelle benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Osteoklasten-spezifische C5aR1 Knockoutmäuse (C5aR1-GFP-fl/fl-LysM-Cre, Cre-Rekombinase-positiv; im Folgenden als LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere bezeichnet) auf ihren Knochenphänotyp hin untersucht und mit ihren Geschwistertieren, welche weiterhin den C5aR1 auf den Osteoklasten exprimierten (C5aR1-GFP-fl/fl-LysM-Cre, Cre-Rekombinase-negativ; im Folgenden als Kontrolltiere bezeichnet) verglichen. Hierzu wurden die Femora und Wirbelsäulen von insgesamt 33 männliche und weibliche Mäuse im Alter von 12 Wochen entnommen. Anschließend wurden die Femora auf ihr Längenwachstum untersucht und ihre biomechanischen Eigenschaften mittels nicht-destruktiver Dreipunktbiegung bestimmt. Die Femora und Wirbelkörper wurden mit Hilfe eines Mikro-Computertomographen auf ihre Gewebsmineraldichte sowie auf die dreidimensionale Mikroarchitektur der Kortex und des trabekulären Bereichs untersucht. Im letzten Schritt wurden die Anzahl und die Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten in den Wirbelkörpern und Femora histologisch bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten in beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede im Längenwachstum der Femora zwischen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>- und Kontrolltieren. Ebenfalls waren die biomechanischen Parameter der Femora der männlichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tiere nicht signifikant verändert. Bei den weiblichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten sich eine gering erhöhte Biegesteifigkeit, die auf ein erhöhtes Flächenträgheitsmoment zurückzuführen war. In beiden Geschlechtern zeigte die radiologische Analyse der Femora und der Wirbelkörper keine signifikanten Unterschiede in den kortikalen und trabekulären Parametern zwischen den LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>- und Kontrolltieren. In der histologischen Untersuchung zeigte sich bei den

männlichen LysM-C5aR1<sup>-/-</sup>-Tieren eine leicht erhöhte Anzahl an Osteoblasten in den Wirbelkörpern. Die Untersuchung der Wirbelkörper der weiblichen Tiere zeigte weder bei den Osteoblasten noch bei den Osteoklasten signifikante Unterschiede in Anzahl oder Aktivität der Zellen zwischen den beiden Gruppen. Zusammenfassend führte der Osteoklasten-spezifische C5aR1 Knockout zu keinem wesentlich veränderten Knochenphänotyp.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte Knochenmasse im globalen C5aR1 Knockout nicht die direkte Folge des Fehlens des C5aR1 Rezeptors auf Osteoklasten ist. Da im globalen C5aR1 Knockout keine Körperzelle den C5aR1 exprimiert, könnten die beobachteten Effekte auf den Knochenphänotyp und die Osteoklasten indirekt über das Fehlen des C5aR1 Rezeptors auf Osteoblasten, Immunzellen oder weiteren Zellen vermittelt werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, könnte konsekutiv in einem Osteoblasten-spezifischen C5aR1 Knockout der Knochenphänotyp charakterisiert werden. Weiter könnte die lokale und systemische Zytokinexpression des Osteoklasten- und Osteoblasten-spezifischen C5aR1 Knockout *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Zudem könnten die Effekte des Osteoklasten-spezifischen C5aR1 Knockouts unter inflammatorischen Bedingungen untersucht werden, da sich die dort erhöhte C5a Konzentrationen wesentlich auf den Knochenmetabolismus auswirken könnten.

Diese Erforschung und Beeinflussung des Komplementsystems, könnte die Grundlage für zukünftige, klinische Therapiemöglichkeiten beispielsweise von Frakturen, Osteomyelitis oder rheumatischen Erkrankungen bringen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abe T, Hosur KB, Hajishengallis E, Reis ES, Ricklin D, Lambris JD, Hajishengallis G: Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof-of-concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. *J Immunol* 189: 5442-5448 (2012)
2. Agas D, Gusmao Silva G, Laus F, Marchegiani A, Capitani M, Vullo C, Catone G, Lacava G, Concetti A, Marchetti L, Sabbieti MG: INF-gamma encoding plasmid administration triggers bone loss and disrupts bone marrow microenvironment. *J Endocrinol* 232: 309-321 (2017)
3. Andrades JA, Nimni ME, Becerra J, Eisenstein R, Davis M, Sorgente N: Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Exp Cell Res* 227: 208-213 (1996)
4. Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, Eyre DR: Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone* 26: 241-247 (2000)
5. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D: Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci* 1409: 79-84 (2017)
6. Banda NK, Hyatt S, Antonioli AH, White JT, Glogowska M, Takahashi K, Merkel TJ, Stahl GL, Mueller-Ortiz S, Wetsel R, Arend WP, Holers VM: Role of C3a receptors, C5a receptors, and complement protein C6 deficiency in collagen antibody-induced arthritis in mice. *J Immunol* 188: 1469-1478 (2012)
7. Bar-Shavit Z: The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 102: 1130-1139 (2007)
8. Berendsen AD, Olsen BR: Bone development. *Bone* 80: 14-18 (2015)
9. Bergdolt S, Kovtun A, Hagele Y, Liedert A, Schinke T, Amling M, Huber-Lang M, Ignatius A: Osteoblast-specific overexpression of complement receptor C5aR1 impairs fracture healing. *PLoS One* 12: e0179512 (2017)
10. Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ: Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 49: 2427-2436 (1970)
11. Bosmann M, Grailer JJ, Ruemmler R, Russkamp NF, Zetoune FS, Sarma JV, Standiford TJ, Ward PA: Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. *FASEB J* 27: 5010-5021 (2013)
12. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25: 1468-1486 (2010)
13. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342 (2003)
14. Bozec A, Soulat D: Latest perspectives on macrophages in bone homeostasis. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 469: 517-525 (2017)

15. Bradley K, North J, Saunders D, Schwaeble W, Jeziorska M, Woolley DE, Whaley K: Synthesis of classical pathway complement components by chondrocytes. *Immunology* 88: 648-656 (1996)
16. Braun L, Christophe T, Boulay F: Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* 278: 4277-4285 (2003)
17. Brekke OL, Christiansen D, Fure H, Fung M, Mollnes TE: The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in *E. coli*-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. *J Leukoc Biol* 81: 1404-1413 (2007)
18. Broege A, Pham L, Jensen ED, Emery A, Huang TH, Stemig M, Beppu H, Petryk A, O'Connor M, Mansky K, Gopalakrishnan R: Bone Morphogenetic Proteins Signal Via SMAD and Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Pathways at Distinct Times during Osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 288: 37230-37240 (2013)
19. Buhl AM, Eisfelder BJ, Worthen GS, Johnson GL, Russell M: Selective coupling of the human anaphylatoxin C5a receptor and alpha 16 in human kidney 293 cells. *FEBS Lett* 323: 132-134 (1993)
20. Buhl AM, Avdi N, Worthen GS, Johnson GL: Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9190-9194 (1994)
21. Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH: Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech* 36: 1453-1459 (2003)
22. Cain SA, Monk PN: The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem* 277: 7165-7169 (2002)
23. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys* 558: 70-78 (2014)
24. Charles JF, Aliprantis AO: Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med* 20: 449-459 (2014)
25. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C: Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* 59: 99-107 (2018)
26. Claes L, Recknagel S, Ignatius A: Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8: 133-143 (2012)
27. Clark JD, Qiao Y, Li X, Shi X, Angst MS, Yeomans DC: Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression. *Anesthesiology* 104: 1274-1282 (2006)
28. Collin-Osdoby P, Osdoby P: RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Biol* 816: 187-202 (2012)
29. Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, Renkawitz R: Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6232-6236 (1988)
30. Csete D, Simon E, Alatshan A, Aradi P, Dobo-Nagy C, Jakus Z, Benko S, Gyori DS, Mocsai A: Hematopoietic or Osteoclast-Specific Deletion of Syk Leads to Increased Bone Mass in Experimental Mice. *Front Immunol* 10: 937 (2019)

31. D'Angelo R, Mangini M, Fonderico J, Fulle S, Mayo E, Aramini A, Mariggio S: Inhibition of osteoclast activity by complement regulation with DF3016A, a novel small-molecular-weight C5aR inhibitor. *Biomed Pharmacother* 123: 109764 (2020)
32. Damerau B, Zimmermann B, Czorniak K, Wustefeld H, Vogt W: Role of the N-terminal regions of hog C3a, C5a and C5a-desArg in their biological activities. *Mol Immunol* 23: 433-440 (1986)
33. Daveau M, Benard M, Scotte M, Schouft MT, Hiron M, Francois A, Salier JP, Fontaine M: Expression of a functional C5a receptor in regenerating hepatocytes and its involvement in a proliferative signaling pathway in rat. *J Immunol* 173: 3418-3424 (2004)
34. Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T: Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone* 96: 29-37 (2017)
35. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, LeeRykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M: Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 271: 12511-12516 (1996)
36. Ehrnthaller C, Huber-Lang M, Nilsson P, Bindl R, Redeker S, Recknagel S, Rapp A, Mollnes T, Amling M, Gebhard F, Ignatius A: Complement C3 and C5 deficiency affects fracture healing. *PLoS One* 8: e81341 (2013)
37. Endo B, Takahashi H: Various Methods for Measuring the Geometrical Properties of the Long-Bone Cross-Section with Respect to Mechanics. *Journal of the Anthropological Society of Nippon* 90: 1-15 (1982)
38. Flierl MA, Schreiber H, Huber-Lang MS: The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J Invest Surg* 19: 255-265 (2006)
39. Fureder W, Agis H, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, Muller MR, Czerwenka K, Radaszkiewicz T, Butterfield JH, Klappacher GW, Sperr WR, Oppermann M, Lechner K, Valent P: Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol* 155: 3152-3160 (1995)
40. Gerard NP, Bao L, Xiao-Ping H, Eddy RL, Jr., Shows TB, Gerard C: Human chemotaxis receptor genes cluster at 19q13.3-13.4. Characterization of the human C5a receptor gene. *Biochemistry* 32: 1243-1250 (1993)
41. Grassi F, Piacentini A, Cristino S, Toneguzzi S, Cavallo C, Facchini A, Lisignoli G: Human osteoclasts express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL10 and CXCL12. *Histochem Cell Biol* 120: 391-400 (2003)
42. Guder C, Gravius S, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA: Osteoimmunology: A Current Update of the Interplay Between Bone and the Immune System. *Front Immunol* 11: 58 (2020)
43. Haas PJ, van Strijp J: Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res* 37: 161-175 (2007)
44. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092: 385-396 (2006)
45. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 52: 499-509 (2006)

46. Hansen CB, Willer A, Bayarri-Olmos R, Kemper C, Garred P: Expression of complement C3, C5, C3aR and C5aR1 genes in resting and activated CD4(+) T cells. *Immunobiology* (2018)
47. Harada S, Rodan GA: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355 (2003)
48. Hayman AR: Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41: 218-223 (2008)
49. Haynes DR, Harkin DG, Bignold LP, Hutchens MJ, Taylor SM, Fairlie DP: Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production in vitro by a new C5a receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 60: 729-733 (2000)
50. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, Roth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP, Luzzatto L: The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 355: 1233-1243 (2006)
51. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL: Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140: 4367-4370 (1999)
52. Hook WA, Siraganian RP, Wahl SM: Complement-induced histamine release from human basophils. I. Generation of activity in human serum. *J Immunol* 114: 1185-1190 (1975)
53. Hopken U, Mohr M, Struber A, Montz H, Burchardi H, Gotze O, Oppermann M: Inhibition of interleukin-6 synthesis in an animal model of septic shock by anti-C5a monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 26: 1103-1109 (1996)
54. Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C: The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 383: 86-89 (1996)
55. Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C: Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 186: 749-756 (1997)
56. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JI, Baylink DJ: Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3204-3208 (1981)
57. Huang R, Lian JP, Robinson D, Badwey JA: Neutrophils stimulated with a variety of chemoattractants exhibit rapid activation of p21-activated kinases (Paks): separate signals are required for activation and inactivation of paks. *Mol Cell Biol* 18: 7130-7138 (1998)
58. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP: Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 12: 3068-3092 (2007)
59. Huber-Lang M, Kovtun A, Ignatius A: The role of complement in trauma and fracture healing. *Semin Immunol* 25: 73-78 (2013)
60. Huber-Lang M, Ignatius A, Brenner RE: Role of Complement on Broken Surfaces After Trauma. *Adv Exp Med Biol* 865: 43-55 (2015)
61. Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, Kreja L, Schoengraf P, Lisson P, Blakytyn R, Recknagel S, Claes L, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M: The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma* 71: 952-960 (2011)

62. Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M: Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1beta. *J Cell Biochem* 112: 2594-2605 (2011)
63. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D: Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16: 157-168 (2002)
64. Ji M, Lu Y, Zhao C, Gao W, He F, Zhang J, Zhao D, Qiu W, Wang Y: C5a Induces the Synthesis of IL-6 and TNF-alpha in Rat Glomerular Mesangial Cells through MAPK Signaling Pathways. *PLoS One* 11: e0161867 (2016)
65. Johnson AR, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ: Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology* 28: 1067-1080 (1975)
66. Kay AB, Shin HS, Austen KF: Selective attraction of eosinophils and synergism between eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) and a fragment cleaved from the fifth component of complement (C5a). *Immunology* 24: 969-976 (1973)
67. Kikuta J, Ishii M: Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 52: 226-234 (2013)
68. Kim JH, Kim N: Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J* 52: 12-17 (2016)
69. Kingsley DM: What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 10: 16-21 (1994)
70. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J: The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46: 2753-2766 (2009)
71. Komori T: Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* 658: 43-49 (2010)
72. Kong L, Smith W, Hao D: Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med* 23: 3077-3087 (2019)
73. Kovtun A, Bergdolt S, Hagele Y, Matthes R, Lambris JD, Huber-Lang M, Ignatius A: Complement receptors C5aR1 and C5aR2 act differentially during the early immune response after bone fracture but are similarly involved in bone repair. *Sci Rep* 7: 14061 (2017)
74. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y: IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 49-60 (2004)
75. Kwon OC, Choi B, Lee EJ, Park JE, Lee EJ, Kim EY, Kim SM, Shin MK, Kim TH, Hong S, Lee CK, Yoo B, Robinson WH, Kim YG, Chang EJ: Negative Regulation of Osteoclast Commitment by Intracellular Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A. *Arthritis & Rheumatology* 72: 750-760 (2020)
76. Laskin DL, Pilaro AM: Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 86: 204-215 (1986)
77. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, Li F, Tzekou A, Lambris JD, Hajishengallis G: The C5a receptor impairs IL-12-dependent

clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol* 186: 869-877 (2011)

78. Lo RK, Cheung H, Wong YH: Constitutively active Galpha16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278: 52154-52165 (2003)

79. Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y: Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 135: 1947-1956 (2008)

80. Martin TJ: Paracrine regulation of osteoclast formation and activity: milestones in discovery. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4: 243-253 (2004)

81. Martin TJ, Sims NA: Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 11: 76-81 (2005)

82. Matsuo K, Irie N: Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473: 201-209 (2008)

83. McCarthy K, Henson PM: Induction of lysosomal enzyme secretion by alveolar macrophages in response to the purified complement fragments C5a and C5a des-arg. *J Immunol* 123: 2511-2517 (1979)

84. McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, Crimeen-Irwin B, Ho PWM, Gooi JH, Martin TJ, Sims NA: IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 294: 7850-7863 (2019)

85. McMichael BK, Meyer SM, Lee BS: c-Src-mediated phosphorylation of thyroid hormone receptor-interacting protein 6 (TRIP6) promotes osteoclast sealing zone formation. *J Biol Chem* 285: 26641-26651 (2010)

86. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT: Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 6: 262 (2015)

87. Modinger Y, Loffler B, Huber-Lang M, Ignatius A: Complement involvement in bone homeostasis and bone disorders. *Semin Immunol* 37: 53-65 (2018)

88. Modinger Y, Rapp A, Pazmandi J, Vikman A, Holzmann K, Haffner-Luntzer M, Huber-Lang M, Ignatius A: C5aR1 interacts with TLR2 in osteoblasts and stimulates the osteoclast-inducing chemokine CXCL10. *J Cell Mol Med* 22: 6002-6014 (2018)

89. Moll G, Jitschin R, von Bahr L, Rasmusson-Duprez I, Sundberg B, Lonnie L, Elgue G, Nilsson-Ekdahl K, Mougiakakos D, Lambris JD, Ringden O, Le Blanc K, Nilsson B: Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses. *PLoS One* 6: e21703 (2011)

90. Monk PN, Partridge LJ: Characterization of a complement-fragment-C5a-stimulated calcium-influx mechanism in U937 monocytic cells. *Biochem J* 295 ( Pt 3): 679-684 (1993)

91. Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP: Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152: 429-448 (2007)

92. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC: Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44: 335-344 (2009)

93. Mortensen S, Jensen JK, Andersen GR: Solution Structures of Complement C2 and Its C4 Complexes Propose Pathway-specific Mechanisms for Control and Activation of the Complement Proconvertases. *J Biol Chem* 291: 16494-16507 (2016)
94. Naik N, Giannini E, Brouchon L, Boulay F: Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J Cell Sci* 110 ( Pt 19): 2381-2390 (1997)
95. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H: Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17: 1473-1480 (2011)
96. Nikiforovich GV, Marshall GR, Baranski TJ: Modeling molecular mechanisms of binding of the anaphylatoxin C5a to the C5a receptor. *Biochemistry* 47: 3117-3130 (2008)
97. Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, Gerard C: C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42: 9406-9415 (2003)
98. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T: RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen* 40: 2 (2020)
99. Onuma H, Masuko-Hongo K, Yuan G, Sakata M, Nakamura H, Kato T, Aoki H, Nishioka K: Expression of the anaphylatoxin receptor C5aR (CD88) by human articular chondrocytes. *Rheumatol Int* 22: 52-55 (2002)
100. Orthgiess J, Gericke M, Immig K, Schulz A, Hirrlinger J, Bechmann I, Eilers J: Neurons exhibit *Lyz2* promoter activity in vivo: Implications for using *LysM-Cre* mice in myeloid cell research. *Eur J Immunol* 46: 1529-1532 (2016)
101. Park JK, Rosen A, Saffitz JE, Asimaki A, Litovsky SH, Mackey-Bojack SM, Halushka MK: Expression of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase is not confined to osteoclasts but is a general feature of multinucleated giant cells: systematic analysis. *Rheumatology* 52: 1529-1533 (2013)
102. Perianayagam MC, Madias NE, Pereira BJ, Jaber BL: CREB transcription factor modulates *Bcl2* transcription in response to C5a in HL-60-derived neutrophils. *Eur J Clin Invest* 36: 353-361 (2006)
103. Piper K, Boyde A, Jones SJ: The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 186: 291-299 (1992)
104. Piri F, Khosravi A, Moayeri A, Moradipour A, Derakhshan S: The Effects of Dietary Supplements of Calcium, Vitamin D and Estrogen Hormone on Serum Levels of OPG and RANKL Cytokines and their Relationship with Increased Bone Density in Rats. *J Clin Diagn Res* 10: AF01-AF04 (2016)
105. Podbregar N, Lohmann D: Im Fokus: Strategien der Evolution: Geniale Anpassungen und folgenreiche Fehltritte. Springer-Verlag, (2012)
106. Proctor LM, Woodruff TM, Taylor SM: Recent developments in C5/C5a inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 16: 445-458 (2006)
107. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ: A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 139: 4424-4427 (1998)

108. Ramaswamy G, Fong J, Brewer N, Kim H, Zhang D, Choi Y, Kaplan FS, Shore EM: Ablation of Gsalpha signaling in osteoclast progenitor cells adversely affects skeletal bone maintenance. *Bone* 109: 86-90 (2018)
109. Recknagel S, Bindl R, Kurz J, Wehner T, Schoengraf P, Ehrnthaller C, Qu H, Gebhard F, Huber-Lang M, Lambris JD, Claes L, Ignatius A: C5aR-antagonist significantly reduces the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing. *J Orthop Res* 30: 581-586 (2012)
110. Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA: Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* 110: 101-108 (2002)
111. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA: Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol* 170: 503-507 (2003)
112. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14: 551-557 (2008)
113. Rodan GA, Martin TJ: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 34: 311 (1982)
114. Roodman GD: Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17: 308-332 (1996)
115. Roodman GD: Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 100-109 (2006)
116. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT: The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res* 59: 897-905 (2010)
117. Sallusto F, Mackay CR: Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Current Opinion in Immunology* 16: 724-731 (2004)
118. Sato T, Abe E, Jin CH, Hong MH, Katagiri T, Kinoshita T, Amizuka N, Ozawa H, Suda T: The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. *Endocrinology* 133: 397-404 (1993)
119. Sayah S, Patte C, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Vaudry H, Fontaine M: Characterization of rat C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): cloning of rat C5aR cDNA and study of C5aR expression by rat astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 215-222 (1997)
120. Scheid CR, Webster RO, Henson PM, Findlay SR: Direct effect of complement factor C5a on the contractile state of isolated smooth muscle cells. *J Immunol* 130: 1997-1999 (1983)
121. Schmal H, Salzmann GM, Niemeyer P, Langenmair E, Guo R, Schneider C, Habel M, Riedemann N: Early intra-articular complement activation in ankle fractures. *Biomed Res Int* 2014: 426893 (2014)
122. Schoengraf P, Lambris JD, Recknagel S, Kreja L, Liedert A, Brenner RE, Huber-Lang M, Ignatius A: Does complement play a role in bone development and regeneration? *Immunobiology* 218: 1-9 (2013)
123. Schraufstatter IU, Discipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK: C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol* 182: 3827-3836 (2009)

124. Schraufstatter IU, Khaldoyanidi SK, DiScipio RG: Complement activation in the context of stem cells and tissue repair. *World J Stem Cells* 7: 1090-1108 (2015)
125. Scola AM, Johswich KO, Morgan BP, Klos A, Monk PN: The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol* 46: 1149-1162 (2009)
126. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JE: C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* 110: 1823-1830 (2002)
127. Siciliano SJ, Rollins TE, DeMartino J, Konteatis Z, Malkowitz L, Van Riper G, Bondy S, Rosen H, Springer MS: Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1214-1218 (1994)
128. Silva BC, Bilezikian JP: Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol* 22: 41-50 (2015)
129. Skokowa J, Ali SR, Felda O, Kumar V, Konrad S, Shushakova N, Schmidt RE, Piekorz RP, Nurnberg B, Spicher K, Birnbaumer L, Zwirner J, Claassens JW, Verbeek JS, van Rooijen N, Kohl J, Gessner JE: Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through Gαi2 activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J Immunol* 174: 3041-3050 (2005)
130. Snyderman R, Pike MC, McCarley D, Lang L: Quantification of mouse macrophage chemotaxis in vitro: role of C5 for the production of chemotactic activity. *Infect Immun* 11: 488-492 (1975)
131. Song M, Lin X, Zhao J, Wang X, Jiao H, Li H, Sun S, Lin H: High frequency vaccination-induced immune stress reduces bone strength with the involvement of activated osteoclastogenesis in layer pullets. *Poult Sci* 99: 734-743 (2020)
132. Song NP, Li P, Jiang YT, Sun H, Cui J, Zhao GY, Li D, Guo Y, Chen YH, Gao JM, Sun SH, Zhou YS: C5a receptor1 inhibition alleviates influenza virus-induced acute lung injury. *International Immunopharmacology* 59: 12-20 (2018)
133. Spessotto P, Rossi FM, Degan M, Di Francia R, Perris R, Colombatti A, Gattei V: Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol* 158: 1133-1144 (2002)
134. Stahel PF, Frei K, Eugster HP, Fontana A, Hummel KM, Wetsel RA, Ames RS, Barnum SR: TNF-α-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria meningoenzephalitis*. *J Immunol* 159: 861-869 (1997)
135. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, Barnum SR, Eugster H, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC: Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-α following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* 109: 164-172 (2000)
136. Stimler-Gerard NP, Galli SJ: Mast cells are not required for anaphylatoxin-induced ileal smooth muscle contraction. *J Immunol* 138: 1908-1913 (1987)
137. Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, Chensue SW, Kunkel SL: Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol* 141: 397-407 (1992)

138. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123: 2600-2602 (1988)
139. Tamma R, Zallone A: Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to Ephrin. *Inflamm Allergy Drug Targets* 11: 196-200 (2012)
140. Tomoaia G, Pasca RD: On the Collagen Mineralization. A Review. *Clujul Med* 88: 15-22 (2015)
141. Toyoguchi T, Yamaguchi K, Nakagawa K, Fukusawa T, Moriya H, Sakiyama H: Change of complement C1s synthesis during development of hamster cartilage. *Cell Tissue Res* 285: 199-204 (1996)
142. Tu Z, Bu H, Dennis JE, Lin F: Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood* 116: 4456-4463 (2010)
143. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T: Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 182: 1461-1468 (1995)
144. Wang HA, Lee JD, Lee KM, Woodruff TM, Noakes PG: Complement C5a-C5aR1 signalling drives skeletal muscle macrophage recruitment in the hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Skelet Muscle* 7: 10 (2017)
145. Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Shi S, Jin Y: Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ* 22: 1654-1664 (2015)
146. Wang R, Lu B, Gerard C, Gerard NP: Disruption of the complement anaphylatoxin receptor C5L2 exacerbates inflammation in allergic contact dermatitis. *J Immunol* 191: 4001-4009 (2013)
147. Wang R, Lu B, Gerard C, Gerard NP: C5L2, the Second C5a Anaphylatoxin Receptor, Suppresses LPS-Induced Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55: 657-666 (2016)
148. Weinmann O, Gutzmer R, Zwirner J, Wittmann M, Langer K, Lisewski M, Mommert S, Kapp A, Werfel T: Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. *Immunology* 110: 458-465 (2003)
149. Weitzmann MN: Bone and the Immune System. *Toxicol Pathol* 45: 911-924 (2017)
150. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millan JL: Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 15: 1879-1888 (2000)
151. Woodruff TM, Strachan AJ, Dryburgh N, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM: Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis and Rheumatism* 46: 2476-2485 (2002)
152. Woodruff TM, Nandakumar KS, Tedesco F: Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol* 48: 1631-1642 (2011)
153. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F: IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro. *Cell Physiol Biochem* 41: 1360-1369 (2017)

154. Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE: Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev* 180: 123-135 (2001)
155. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KSE: Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 12097-12102 (2014)
156. Yao J, Harvath L, Gilbert DL, Colton CA: Chemotaxis by a CNS macrophage, the microglia. *J Neurosci Res* 27: 36-42 (1990)
157. Zhang K, Li GQ, He QH, Li Y, Tang M, Zheng QY, Xu GL, Zhang KQ: C5a/C5aR pathway accelerates renal ischemia-reperfusion injury by downregulating PGRN expression. *Int Immunopharmacol* 53: 17-23 (2017)
158. Zhang T, Garstka MA, Li K: The Controversial C5a Receptor C5aR2: Its Role in Health and Disease. *J Immunol Res* 2017: 8193932 (2017)
159. Zhang X, Schmutte I, Laumonnier Y, Pandey MK, Clark JR, Konig P, Gerard NP, Gerard C, Wills-Karp M, Kohl J: A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *J Immunol* 185: 6741-6752 (2010)
160. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K: Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4: 111-121 (2006)
161. Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL: The ancient origin of the complement system. *EMBO J* 24: 382-394 (2005)
162. Zuiderweg ER, Nettesheim DG, Mollison KW, Carter GW: Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry* 28: 172-185 (1989)

## 7 Tabellenverzeichnis

|           |                                                 |    |
|-----------|-------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1 | Liste der verwendeten Chemikalien und Kits..... | 20 |
| Tabelle 2 | Liste der angesetzten Lösungen und Puffer ..... | 22 |
| Tabelle 3 | Liste der Primärantikörper .....                | 23 |
| Tabelle 4 | Liste der Sekundärantikörper .....              | 23 |
| Tabelle 5 | Liste der Seren .....                           | 24 |
| Tabelle 6 | Verwendete Geräte .....                         | 24 |
| Tabelle 7 | Verwendete Software.....                        | 25 |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1 Vereinfachtes Schema des Komplementsystems .....                                                        | 2  |
| Abb. 2 Schematische Struktur des C5a Moleküls .....                                                            | 3  |
| Abb. 3 Vereinfachtes Schema der Signaltransduktion des C5aR1 Rezeptors.....                                    | 5  |
| Abb. 4 Darstellung der Knochenzellen .....                                                                     | 8  |
| Abb. 5 Skizze Osteoklast während der Knochenresorption .....                                                   | 11 |
| Abb. 6 Zonen-spezifische Aufteilung der Komplementfaktoren in der Epiphysenfuge...                             | 15 |
| Abb. 7 Versuchsaufbau der nicht-destruktiven Dreipunktbiegung .....                                            | 27 |
| Abb. 8 Ausrichtung der Femora im Raum .....                                                                    | 28 |
| Abb. 9 Ausrichtung der Wirbelsäulen im Raum .....                                                              | 29 |
| Abb. 10 Lage der Auswertungsbereiche in Femur und Wirbelkörper .....                                           | 29 |
| Abb. 11 Skizze Berechnung des axialen Flächenträgheitsmoment im Ellipsenring .....                             | 30 |
| Abb. 12 Messung der Länge der Epiphysenfuge im Femur und Zählung der Chondrozyten<br>bzw. Chondroblasten ..... | 33 |
| Abb. 13 Auswertungsbereich und Zählung der Osteoklasten.....                                                   | 34 |
| Abb. 14 Zählung der Osteoblasten .....                                                                         | 35 |
| Abb. 15 Färbung eines Wirbelkörpers mit von-Kossa/van-Gieson-Färbung.....                                      | 35 |
| Abb. 16 Skizze des Prinzips der ABC-Immunhistochemie am Beispiel der C5aR1 Färbung<br>.....                    | 37 |
| Abb. 17 Skizze des Prinzips der indirekten Fluoreszenzfärbung am Beispiel C5aR1<br>Färbung.....                | 38 |
| Abb. 18 Röntgenaufnahmen und Gewicht 12 Wochen alter Tiere .....                                               | 40 |
| Abb. 19 Charakterisierung des Längenwachstums der Femora.....                                                  | 41 |
| Abb. 20 Biomechanische Charakterisierung der Femora .....                                                      | 42 |
| Abb. 21 Analyse der kortikalen Knochenparameter in der Diaphyse der Femora der<br>Weibchen .....               | 43 |
| Abb. 22 Analyse der kortikalen Knochenparameter in der Diaphyse der Femora der<br>Männchen .....               | 44 |
| Abb. 23 Analyse der trabekulären Knochenparameter in der Metaphyse des Femurs der<br>Weibchen .....            | 45 |
| Abb. 24 Analyse der trabekulären Knochenparameter in der Metaphyse des Femurs der<br>Männchen .....            | 46 |
| Abb. 25 Analyse der trabekulären Knochenparameter im Wirbelkörper der Weibchen                                 | 47 |
| Abb. 26 Analyse der trabekulären Knochenparameter im Wirbelkörper der Männchen                                 | 48 |
| Abb. 27 Histologische Analyse des trabekulären Bereichs der Wirbelkörper der<br>Weibchen .....                 | 49 |
| Abb. 28 Histologische Analyse des trabekulären Bereichs der Wirbelkörper der<br>Männchen .....                 | 50 |
| Abb. 29 Anti-C5aR1 Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus.....                                          | 51 |
| Abb. 30 Anti-C5aR1 Fluoreszenz-Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus .....                             | 52 |
| Abb. 31 Anti-Cathepsin K Fluoreszenz-Färbung und IgG-Kontrolle des Femurs der Maus<br>.....                    | 53 |

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Verfassung meiner Dissertation ermöglicht und mich während des Prozesses begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius, Direktorin des Instituts für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm, für die Möglichkeit diese experimentelle Doktorarbeit in einem solch spannenden Themengebiet anfertigen zu dürfen. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Verena Fischer für die herausragende Betreuung und umfassende Hilfestellung, die weit über das Übliche hinaus ging, bedanken. Ohne ihre Unterstützung und Geduld wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Weiter möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Knochenbiologie“ für die Unterstützung der Versuche bedanken. Dies gilt insbesondere für Jasmin Wehrstein, Benjamin Krüger, Marion Tomo, Kristina Diepold, Bettina Herde und Chèrise Grieser.

Auch möchte ich mich bei der medizinischen Fakultät der Universität Ulm für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen des Promotionsstipendiums „experimentelle Medizin“ bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich in meinem bisherigen Leben ausnahmslos unterstützt und mir somit mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben. Dieser Dank gilt auch meiner Partnerin Laura und meinen Freunden, die mir stets mit Witz und Verständnis geholfen haben immer neue Motivation zu finden.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| Name        | Nikolai Maximilian Renz |
| Geburtsjahr | 1996                    |
| Geburtsort  | Ruit/Ostfildern         |

### Schul Ausbildung

|           |                                              |
|-----------|----------------------------------------------|
| 2006-2014 | Robert-Bosch-Gymnasium, Wendlingen am Neckar |
| 2014      | Abitur                                       |

### Hochschulausbildung

|         |                                                                                                          |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ab 2015 | Studium der Humanmedizin, Universität Ulm                                                                |
| 2017    | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)                                                       |
| Ab 2019 | Beginn der Promotion am Institut für unfallchirurgische<br>Forschung und Biomechanik der Universität Ulm |

### Stipendien

|      |                                                                                       |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 2019 | Stipendium „Experimentelle Medizin“ der medizinischen<br>Fakultät der Universität Ulm |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|