

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
Julius Wolff Institut  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

# **Frakturheilung bei Immuninsuffizienz**

Eine Untersuchung der lymphozytendefekten RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Tilman Frisch

aus Korbach

Gutachter: 1. Prof. Dr.-Ing. D. N. Duda  
2. Prof. Dr. med. T. Mittelmeier  
3. Prof. Dr. med. vet. A. Ignatius

Datum der Promotion: 3.6.2012

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS .....	X
1. EINLEITUNG .....	1
2. STAND DES WISSENS.....	2
2.1 Knochengewebe .....	2
2.2 Immunsystem.....	4
2.3 Osteoimmunologie und Physiologie des Knochens .....	5
2.3.1 Einfluss der Lymphozyten auf den Knochenstoffwechsel .....	7
2.4 Immunologie der Heilung .....	11
2.5 Die RAG-1 <sup>(-/-)</sup> -Maus: ein Lymphozytendefektmodell.....	13
2.5.1 Angeborene Immundefizienz beim Menschen .....	16
2.6 Zielsetzung und Hypothese.....	17
3. MATERIAL UND METHODEN .....	18
3.1 Studiendesign .....	18
3.2 Tiere und Tierhaltung .....	18
3.3 Histologie der nativen Knochen .....	19
3.3.1 Anfertigung der Schnitte .....	19
3.3.2 Auswertung der histologischen Schnitte .....	21
3.3.3 Histomorphometrische Auswertung .....	22
3.4 Frakturmodell .....	23
3.4.1 Detaillierte Operationsbeschreibung .....	24
3.5 Mikro-Computertomograph .....	26
3.5.1 Evaluation der Knochen .....	27
3.5.2 Bestimmung des Thresholds.....	28
3.6 Biomechanische Testung.....	30
3.7 Statistische Auswertung.....	32
4. ERGEBNISSE .....	34
4.1 Unfrakturierte Knochen .....	34
4.1.1 Histologische Ergebnisse.....	34
4.1.2 Biomechanische Testung.....	37

4.1.3 <i>μCT der nativen Knochen</i> .....	39
4.2 Verlaufparameter Gewicht.....	40
4.3 Radiologie .....	41
4.4 Ergebnisse des <i>μCT</i> .....	42
4.5 Ergebnisse der biomechanischen Testung .....	47
5. DISKUSSION .....	50
5.1 Material und Methoden .....	50
5.1.1 <i>Tiermodell</i> .....	50
5.1.2 <i>Histologische Auswertung</i> .....	51
5.1.3 <i>Frakturmodell und biomechanische Testung</i> .....	52
5.1.4 <i>Mikro-Computertomograph</i> .....	55
5.2 Ergebnisse .....	55
5.2.1 <i>Native Mäuseknochen</i> .....	56
5.2.2 <i>Heilungsverläufe</i> .....	57
5.2.2.1 <i>Mikro-Computertomograph</i> .....	57
5.2.2.2 <i>Biomechanische Testung</i> .....	59
5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick.....	59
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6.1 Abstract.....	64
LITERATURVERZEICHNIS.....	XI
DANKSAGUNG .....	XVII
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XVIII

## **Abkürzungsverzeichnis**

BA	Knochenfläche
BA/TA	Knochenfläche/Totale Fläche
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BV/TV	Knochenvolumen/Totales Volumen (relativer Knochenanteil)
CRP	C-Reaktives Protein
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclo-Oxygenase
CT	Computertomograph
DNA	Desoxyribonucleotid Acid
EtOH	Ethylalkohol
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor
HU	Hounsfield Units
IGF	Insulin Like Growth Factor
IL	Interleukin
KO	Knock-Out
M-CSF	Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PAX	Paired Box
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
ODF	Osteoclast Differentiating Factor (=RANKL)
OPG	Osteoprotegerin
OPL	Osteoprotegerin Ligand
OS	Omenn-Syndrom
RAG	Recombination Activating Gene
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ -B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ -B Ligand
ROI	Region of Interest

RSS	Recombination Signal Sequences
SCID	Severe-Combined-Immunodeficiency
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TA	Totale Fläche
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like-Receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRANC	TNF Related Activation Induced Cytokine
WT	Wildtyp
$\mu$	mikro [ $10^{-6}$ ]
$\mu$ MT	Defizient für IgM transmembran Exon

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Immunsystem .....	5
Abb. 2:	Prozess der somatischen Rekombination .....	14
Abb. 3:	Region of Interest (ROI) in der distalen Metaphyse .....	22
Abb. 4:	Formel zur Bestimmung der Trabekeldicke .....	22
Abb. 5:	Segmentieren der histologischen Region of Interest .....	23
Abb. 6:	Frakturmaschine .....	23
Abb. 7:	Rasieren und Desinfizieren des Operationsgebietes .....	24
Abb. 8:	Anstechen des Femurs und Einbringen des intramedullären Pins ....	24
Abb. 9:	Vernähen der Wunde und Setzen der 3-Punkt-Biege-Fraktur .....	25
Abb. 10:	Bestimmung der ROI bei einem frakturierten Knochen .....	26
Abb. 11:	Bestimmung der ROI bei einem kontralateralen Knochen .....	26
Abb. 12:	Einzeichnen der Äußeren und Inneren Kalluskontur .....	27
Abb. 13:	Histogramme zur Thresholdbestimmung .....	29
Abb. 14:	Knochen vor der biomechanischen Testung .....	30
Abb. 15:	Einbettung der Knochen und eingebetteter Knochen .....	31
Abb. 16:	Formel zur Bestimmung der Versagensenergie .....	32
Abb. 17:	Boxplot .....	33
Abb. 18:	Bild eines nativen Knochen in Movat-Pentachrom-Färbung .....	34
Abb. 19:	BA/TA [%] native Knochen .....	35
Abb. 20:	Relative Trabekelanzahl .....	36
Abb. 21:	Trabekeldicke .....	36
Abb. 22:	Biomechanische Testung der nativen Wildtyp-Knochen .....	38
Abb. 23:	Biomechanische Testung der nativen RAG-1 <sup>(-/-)</sup> -Knochen .....	38
Abb. 24:	Mineralisierungsdichte (native Knochen) .....	39
Abb. 25:	Knochendichte (native Knochen) .....	39
Abb. 26:	Röntgenergebnisse über den gesamten Zeitverlauf .....	41
Abb. 27:	3D-Bilder der frakturierten Knochen .....	42
Abb. 28:	Totales Kallusvolumen .....	43
Abb. 29:	Knöchernes Kallusvolumen .....	43
Abb. 30:	Kallus - BV/TV [%] .....	44
Abb. 31:	Mittlere Mineralisierungsdichte des Kallus .....	45

Abb. 32:	Mittlere Mineralisierungsdichte des knöchernen Kallus .....	45
Abb. 33:	Erzeugung eines Torsionsbruchs durch den Kallus.....	47
Abb. 34:	Biomechanische Testung der frakturierten Wildtyp-Knochen .....	47
Abb. 35:	Biomechanische Testung der RAG-1 <sup>(-/)</sup> -Knochen.....	48
Abb. 36:	Maximales Torsionsmoment.....	48
Abb. 37:	Relative Torsionssteifigkeit .....	49

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Untersuchungsgruppen .....	18
Tabelle 2: Histologie Ergebnisse: BA, TA, BA/TA .....	34
Tabelle 3: Histologie Ergebnisse: Trabekelanzahl und Trabekeldicke .....	35
Tabelle 4: Daten der biomechanischen Testung (native Knochen) .....	37
Tabelle 5: Analyse der nativen Knochen im $\mu$ CT .....	40
Tabelle 6: Gewichte der Tiere während des Experiments .....	40
Tabelle 7: Ergebnisse des $\mu$ CT .....	46
Tabelle 8: Ergebnisse der biomechanischen Testung.....	49

### **1. Einleitung**

Die Heilung eines Knochenbruchs ist ein komplexer Vorgang. Folgen von Frakturen und deren Behandlung bestimmen den Alltag der Unfall- und orthopädischen Chirurgie. Das Knochengewebe ist nach einer Verletzung in der Lage, vollständig zum Ausgangszustand zurückzukehren. Man spricht dann von einer restitutio ad integrum. Es ist für einen Organismus lebenswichtig, dass nach einem Trauma der Knochen ohne wesentliche Funktionseinschränkungen verheilt. Treten Störungen bei der Heilung auf, so sind die Folgen Immobilisation, geringere Belastbarkeit und eine Einschränkung der Lebensqualität<sup>1</sup>. Jedes Jahr entstehen in Deutschland als Folge von Verkehrsunfällen Kosten in Höhe von 30 Milliarden Euro. Die Kosten für alle Unfälle zusammengenommen betragen sogar 120 Milliarden Euro<sup>2,3</sup>. So gilt es auch aus sozioökonomischer Sichtweise, die Kosten für Behandlung, Arbeitsausfall, Rehabilitation und Folgeschäden gering zu halten.

Die schnelle Knochenheilung eines immuninsuffizienten Patienten ist eine besondere Herausforderung für den Unfallchirurgen. Viele Patienten leiden aufgrund von Krebserkrankungen, fortgeschrittenem Alter, Autoimmunerkrankungen oder HIV-Infektionen an einem insuffizienten Immunsystem. Sind diese Patienten nun zusätzlich von Frakturen betroffen, gilt es auch hier, eine optimale Heilung zu gewährleisten und den Besonderheiten eines geschwächten Immunsystems Sorge zu tragen.

Die Heilung eines Knochenbruchs wird begleitet von einer entzündlichen Reaktion. Im Frakturspalt wird eine Vielzahl von Zytokinen freigesetzt und es finden sich vermehrt Lymphozyten im Frakturhämatom<sup>4</sup>. Da das muskuloskeletale Trauma demnach immer mit einer Inflammation verbunden ist, spielen immunologische Prozesse bei der Frakturheilung eine entscheidende Rolle. Genaue Abläufe der Inflammation sind derzeit nur ansatzweise verstanden. Das Ziel der Zukunft ist es, die Immunantwort so zu modulieren, dass bei allen Verletzungen eine optimale Heilung erreicht werden kann.

Die Aufgabe dieser Studie ist somit, die Heilung eines Knochenbruchs bei Abwesenheit des adaptiven Immunsystems zu analysieren. Mit diesem Wissen ergeben sich Rückschlüsse darauf, wie eine Beeinflussung der inflammatorischen Reaktion eines Knochenbruchs möglich ist.

## **2. Stand des Wissens**

### **2.1 Knochengewebe**

Das Knochengewebe besteht aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter Extrazellulärmatrix, deren Hauptkomponenten Kollagenfibrillen und anorganische Hydroxylapatitkristalle sind. Das Knochengewebe setzt sich zu 45% aus anorganischem Material, zu 30% aus organischem Material und zu 25% aus Wasser zusammen<sup>5</sup>.

Lange Röhrenknochen bestehen aus einem langen Mittelstück, der Diaphyse, und zwei verdickten Endstücken, den Epiphysen. Während des Wachstums befindet sich zwischen beiden Bereichen die Epiphysenfuge, ein knorpeliger Abschnitt, der für das Längenwachstum der Knochen verantwortlich ist. Auch nach dem Abschluss des Wachstums ist noch eine Epiphysenlinie erkennbar. Hieran grenzt ein verdickter Teil der Diaphyse, die sogenannte Metaphyse<sup>6</sup>. Die Innenräume der Epiphyse und Metaphyse an beiden gelenknahen Enden des Knochens bestehen aus einem feinen schwammartigen Werk, der Spongiosa. Die Spongiosa enthält viele einzelne Knochen trabekel, die nach dem Prinzip der trajektorialen Bauweise angeordnet sind. Das heißt, dass die Trabekel sich in Richtung der größten Druck- und Zugspannung ausrichten und dadurch Knochenmaterial an wenig belasteten Stellen eingespart wird. Dieses Phänomen wurde erstmals von Julius Wolff beschrieben und deshalb als Wolffsches Gesetz bezeichnet<sup>7</sup>. Im Bereich der Diaphyse ist der Knochen aus Kompakta aufgebaut. Diese ist im Gegensatz zu der Spongiosa nicht aus einzelnen Trabekeln aufgebaut, sondern besitzt eine dicht gepackte Knochenstruktur. Das Osteon, welches von Haverskanälen durchzogen wird, stellt das Grundelement der Kompakta dar. Die Kompakta umfasst die gesamte äußere Schicht des Knochens und wird auch als Kortikalis bezeichnet<sup>8</sup>. Umgeben wird der Knochen außen von einer bindegewebigen Schicht, dem Periost. Die inneren Knochenoberflächen, wie die Markhöhle und die Knochen trabekel, werden von einem dünnen Häutchen, dem Endost, überzogen.

Die Zellen des Knochens sind die Osteoblasten (Knochenaufbau) und Osteoklasten (Knochenabbau)<sup>9</sup>. Osteoblasten, welche sich in die Knochen substanz eingemauert haben, differenzieren zu Osteozyten. Knochengewebe unterliegt einem belastungsabhängigen Umbau, der zeitlebens stattfindet. Dieser Prozess wird als

Remodelling bezeichnet. Dabei haben das Endost und das Periost die Fähigkeit, osteogenetisches Potential zu entwickeln. Die Osteoklasten und Osteoblasten fungieren als Antagonisten im Wechselspiel des Knochenaufbaus und -abbaus. Im Falle einer Fraktur ist dieses System in der Lage, sein osteogenetisches Potential enorm zu steigern<sup>10</sup>. Hier kann zwischen primärer Knochenheilung (ohne Bildung eines Kallus) und sekundärer oder indirekter Knochenheilung (mit Kallusbildung) unterschieden werden. Zu sekundärer Knochenheilung kommt es, wenn die Frakturfragmente gegeneinander beweglich sind oder aber die Fragmente nicht in direktem Kontakt stehen. Aus diesem Grund wird ein größerer Kallus nötig, um die Fraktur auf natürlichem Weg zu stabilisieren. Bei der chirurgischen Osteosynthese hingegen wird mittels Implantaten, wie z.B. Marknägeln oder Kompressionsplatten, die Beweglichkeit der Fragmente verringert und somit die Kallusbildung vermindert. Kommt es beim Menschen durch eine Fraktur zur vollständigen Kontinuitätsunterbrechung des Knochens, sind vier Komponenten direkt an dem Trauma beteiligt: die Kortikalis, das Periost, das Knochenmark und das umliegende Weichgewebe. Da all diese Strukturen reichlich vaskularisiert sind, bildet sich zunächst ein Frakturhämatom. Dies wird als Initialphase der Heilung bezeichnet (1-3 Tage). Danach wandern Fibroblasten (Bindegewebszellen) in das Hämatom ein, und es entwickelt sich ein weicher Kallus aus Bindegewebe und einzelnen Inseln aus hyalinem Knorpel (3-14 Tage nach der Fraktur). Darauf folgt die Phase der Kallushärtung. Es erscheint vermehrt Osteoid im Kallus und somit beginnt die Produktion von anorganischer Knochenmatrix. Der Kallus wird anschließend komplett mit Geflechtknochen durchbaut (Wochen bis Monate). In der Phase des Kallusremodellings wird dann der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt und überschüssiges Knochenmaterial wird abgebaut (1-2 Jahre)<sup>8,10</sup>.

Die Maus hat sich in der Vergangenheit als Versuchstier in der experimentellen Frakturforschung etabliert<sup>11</sup>. Die Heilungsvorgänge laufen im Vergleich zum Menschen oder größeren Versuchstieren beschleunigt ab. So zeigt sich bei der Maus bei einer Biegefraktur des Femurs bereits nach 10 Tagen das größte Kallusvolumen, nach 3 Wochen ist der Großteil des Kallus mineralisiert, und es beginnt das Remodelling<sup>12</sup>.

Im Zuge einer Fraktur sind auf zellulärer Ebene komplexe Signalkaskaden erforderlich, um die beschriebene Heilung zu initiieren und schließlich zu einem funktional optimalen Ergebnis zu führen. Ein Beispiel hierfür wäre die Apoptose

(programmierter Zelltod), die die Chondrozyten (Knorpelzellen) eingehen müssen, welche an der enchondralen Ossifikation beteiligt sind<sup>13</sup>. Hierbei wandelt sich der hyaline Knorpel zunächst in hypertrophen Knorpel um, und die Zwischenzellschubstanz beginnt zu kalzifizieren<sup>14</sup>. Die Bereiche der Fraktur, die von Periost (Knochenhaut) umgeben sind, mineralisieren nach dem Mechanismus der intramembranösen (direkten) Ossifikation ohne eine vorherige Anlage eines Knorpelgerüsts. Dieser Prozess findet ebenfalls in der Markhöhle statt, mit Bildung eines endostalen Kallus<sup>15</sup>. Zwei Tage nach dem Setzen einer Biegefraktur kann bei einer Maus die inflammatorische Reaktion beobachtet werden. Sie macht sich durch eine Gewebeschwellung und eine Überwärmung bemerkbar. Histologisch findet sich ein Untergang von Muskelfasern<sup>12</sup>. Die hierbei ablaufenden immunologischen Prozesse sind bis jetzt nur unzureichend verstanden<sup>16</sup>.

### 2.2 Immunsystem

Unser Immunsystem kann in einen angeborenen und adaptiven Teil unterschieden werden (Abb. 1). Der angeborene Teil („innate immunity“) hat sich evolutionär sehr früh entwickelt<sup>17</sup>. Dazu zählen natürliche Barrieren wie Epithelien, zellvermittelte Abwehr durch Phagozyten, sowie die humorale Komponente, das Komplementsystem. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch die Bekämpfung von Erregern aus, ohne dass der Organismus vorher mit diesen Kontakt hatte. Gelingt es einem Erreger die Epithelbarriere zu überwinden, so besitzen neutrophile Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die Fähigkeit, pathogene Keime anhand ihrer Rezeptoren zu erkennen und von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Zu diesen Rezeptoren gehören zum Beispiel die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Diese Rezeptoren stellen eine Rezeptorfamilie dar, die Bestandteile von Bakterien erkennen und an diese binden können (Pathogen assoziierte molekulare Muster, PAMPs)<sup>18</sup>.

Die Faktoren des Komplementsystems liegen im Blutplasma gelöst vor und können an Bakterien, Parasiten und Pilze binden und so Keime markieren (opsonieren) oder über Bildung eines Membran-Angriffkomplexes eine Zellyse herbeiführen<sup>19</sup>.

Der adaptive Teil unseres Immunsystems setzt sich zusammen aus Lymphozyten, dendritischen Zellen und den von B-Lymphozyten produzierten Antikörpern. Diese Zellen weisen eine hohe Anpassungsfähigkeit gegenüber Krankheitserregern auf. Die adaptive Immunabwehr entwickelt sich lebenslang und passt sich an neue

Krankheitserreger an. T-Lymphozyten gewährleisten die zellvermittelte Abwehr und unterstützen die B-Lymphozyten, indem sie sie aktivieren und ihnen Antigene präsentieren können. Die B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die den humoralen Anteil des adaptiven Immunsystems präsentieren. Damit stellen die Lymphozyten den wesentlichen Anteil des adaptiven Immunsystems dar. Sie ermöglichen durch ihre Vielzahl an polyklonalen Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren eine adäquate Reaktion auf Krankheitserreger<sup>20</sup>. Die T-Zellen lassen sich weiter unterteilen in CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen. Die verschiedenen Oberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation) sind hierbei ein Unterscheidungsmarker und Rezeptorbestandteil zugleich. CD4+ Zellen binden, nachdem ihnen Antigene präsentiert wurden, an B-Zellen und stimulieren diese zur Antikörperproduktion. CD8+ Zellen sind in der Lage in infizierten Zellen den programmierten Zelltod auszulösen. Weitere Untergruppen der T-Zellen sind z.B. die regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>), NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Jede dieser Gruppen kann für sich in weitere Subtypen unterschieden werden<sup>21</sup>.

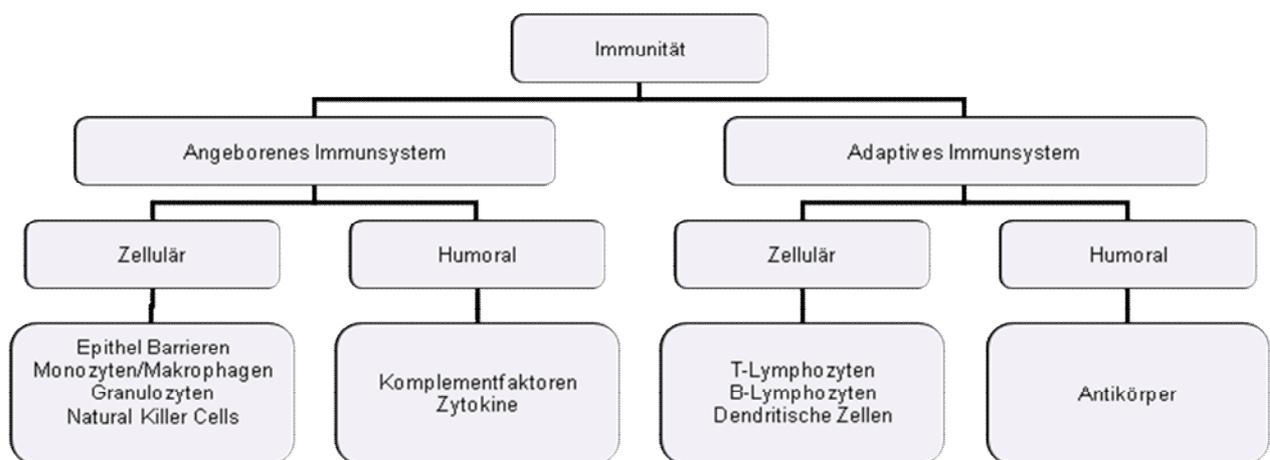


Abbildung 1: Immunsystem

### 2.3 Osteoimmunologie und Physiologie des Knochens

Die Osteoimmunologie beschäftigt sich mit den molekularen Wechselwirkungen zwischen Knochenbiologie und Immunologie. Knochengewebe zählt zu den Binde- und Stützgeweben und ist für den Organismus in erster Linie für seine Halte- und Stützfunktion bedeutsam. Das Knochengewebe hat jedoch viele weitere Aufgaben: Es ist ein Kalziumspeicher und beherbergt das Knochenmark. Dieses ist

Ursprungsort fast sämtlicher Zellen des Blutes. Die Zellen des Immunsystems, zum Beispiel Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten, zirkulieren im Blut und leiten sich von hämatopoetischen Stammzellen ab. Die Zellen des Knochengewebes leiten sich ebenfalls von Vorläuferzellen ab, die teilweise identisch mit denen des Immunsystems sind<sup>22</sup>. So entstehen Osteoklasten aus Zellen mit hämatopoetischer Herkunft. Sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Makrophagen-Monozytensystems. Ihre Differenzierung wird durch den Makrophagen Kolonie-stimulierender-Faktor (M-CSF) gesteuert<sup>23</sup>.

Dies ist ein Makrophagen-Wachstumsfaktor, der ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf Osteoklasten hat. Ein Knock-Out (KO) des M-CSF-Gens führt zu einem Defekt in der Differenzierung von Osteoklasten und Makrophagen und zur Osteopetrose, einer pathologischen Vermehrung der Knochenmasse mit Neigung zu Spontanfrakturen<sup>24</sup>. Ein anderes bedeutendes Steuerungssystem für die Osteoklastenentwicklung ist der Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B und dessen Ligand (RANK/RANKL). Diese befinden sich auf der Zelloberfläche (RANK) und können im Falle einer Aktivierung zur Differenzierung von Osklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten führen. Als Ligand fungiert RANKL, welches an den RANK-Rezeptor bindet und auch als TNF Related Activation Induced Cytokine (TRANCE), Osteoprotegerin-Ligand (OPGL) oder Osteoclast Differentiating Factor (ODF) bekannt ist. Es wird u.a. von Osteoblasten exprimiert. Kommt es zur Bindung von RANK an RANKL, nachdem die Expression auf den Osteoblasten gesteigert wurde, so sind Osteoklasten in der Lage, den Knochenabbau zu induzieren. Sie bilden in den Erosionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen, Wasserstoff- und Chloridionen und lösen dadurch die Knochenminerale auf. Lysosomale Proteinase bauen danach die Kollagenmatrix ab<sup>25</sup>. Interessant ist die Beobachtung, dass ein RANK-KO auch die Lymphozytenentwicklung beeinträchtigt. Jedoch scheint sich die Störung bei der Entwicklung des Immunsystems in diesem Mausmodell auf die B-Zellen zu beschränken, die T-Zell-Funktion wird von dem Knock-out nicht beeinträchtigt<sup>26</sup>. Gleiches lässt sich ebenfalls bei der RANKL-KO Maus beobachten. Dort liegen ähnliche Phänomene vor, mit Ausnahme einer zusätzlich gestörten T-Zell-Aktivierung<sup>27</sup>.

RANKL wird zusätzlich von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Lymphozyten können somit ebenfalls den Knochenstoffwechsel zu Gunsten eines Knochenabbaus beeinflussen<sup>28,29</sup>. Dies ist bekanntermaßen einer der Mechanismen, mit dem T-Zellen

bei Autoimmunerkrankungen und metastatischen Knochenveränderungen Osteolysen herbeiführen. Am Beispiel der rheumatoiden Arthritis wird die destruktive Rolle des Immunsystems deutlich. Hier führt eine immunvermittelte übermäßige Aktivierung von Osteoklasten zu Osteolysen<sup>30</sup>. Auch bei dem multiplen Myelom lassen sich ausgedehnte Osteolysen beobachten, die durch entartete Lymphozytenvorläufer ausgelöst werden<sup>31-33</sup>. Bekannt für die Produktion von RANKL sind die Th1-Zellen, welche ebenfalls Interferon- $\gamma$  produzieren. Die Bedeutung von Interferon- $\gamma$  für den Knochen wurde bereits erforscht, seine Wirkung ist jedoch vielfältig. Einerseits forciert es *in vitro* eine Unterdrückung der Osteoklastendifferenzierung, andererseits kann es *in vivo* über eine T-Zell-Aktivierung einen Knochenabbau auslösen<sup>34,35</sup>.

Ein weiterer Mechanismus der RANKL-Interaktion ist bekannt: RANKL bindet nicht nur an RANK, sondern auch an Osteoprotegerin (OPG), einen Hemmstoff des Knochenabbaus. OPG wird von Osteoblasten, dendritischen Zellen, B-Zellen und T-Zellen gebildet<sup>36,37</sup>. Durch die Bindung an Osteoprotegerin wird die RANKL-Wirkung inhibiert. Damit können die genannten Zellen, je nachdem, welches Signal sie erhalten, den Knochen ebenso konservieren.

Insgesamt sind folgende immunologische Zytokine, welche die Osteoklastenaktivität erhöhen, bekannt: Interleukin-1 (IL-1), -6, -11, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>38,39</sup>. Sie werden nicht ausschließlich von immunkompetenten Zellen gebildet, sondern teilweise auch von Osteoblasten<sup>40</sup>. Diese stehen damit am Anfang von Signalkaskaden des Knochenabbaus, obwohl sie eigentlich die klassischen Zellen des Knochenaufbaus sind. Im ersten Moment mag dies paradox wirken, verdeutlicht jedoch wie vielfältig die Signale sind, die Osteoblasten und Immunzellen untereinander austauschen. Die Osteoblasten bilden zugleich auch Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und IGF-2. Diese Mediatoren bewirken autokrin eine gegenseitige Stimulation und in der Folge einen Knochenaufbau<sup>25</sup>. Die einzigen Stoffe, welche eine ektopische Knochenbildung induzieren können, sind die sogenannten Bone Morphogenetic Proteins (BMP-2, -4, -6, -7)<sup>41</sup>. BMP-2 und -7 finden heute Anwendung in der Pseudarthrosebehandlung und werden lokal operativ in den Frakturspalt eingebracht.

Anhand der oben genannten Beispiele wird ersichtlich, wie eng diese Moleküle, insbesondere Interleukine, TNF- $\alpha$ , RANKL und M-CSF, mit dem Knochengewebe

interagieren, und dass sie von Zellen hämatopoetischer und mesenchymaler Herkunft gebildet werden. Es gibt demnach Hinweise für die zahlreichen Zusammenhänge und Interaktionen zwischen Knochengewebe und Immunsystem.

### 2.3.1 Einfluss der Lymphozyten auf den Knochenstoffwechsel

Der Einfluss von Lymphozyten auf den Knochenstoffwechsel ist noch wenig erforscht, und ihre Wirkung ist von vielen äußeren Faktoren abhängig. 2007 haben Li et al. die Wirkung von Lymphozyten auf die Knochenregulation *in vivo* ausführlich beschrieben<sup>36</sup>. Demzufolge sind Zellen der B-Linie für 64% der OPG-Produktion verantwortlich, 45% stammt von reifen B-Zellen. B-Zell-KO Mäuse leiden deshalb unter Osteoporose. Auch die T-Zellen haben eine eher knochenkonservierende Wirkung. Sie erhöhen indirekt die OPG-Produktion, indem sie B-Zellen anregen, mehr Osteoprotegerin zu produzieren. Dies ist möglich, nachdem die gegenseitige Bindung über den Cluster of Differentiation 40 und dessen Ligand (CD40/CD40L) erfolgt ist. So ist es verständlich, dass die T-Zell-KO Mäuse (Nacktmäuse) im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine verminderte Knochenmasse zeigen<sup>36</sup>. Eine andere Literaturquelle gibt hingegen an, dass die Knochendichten (BMD) bei jungen Nacktmäusen im Alter von 8 Wochen sich nicht von denen des Wildtyps unterscheiden<sup>42</sup>. Erst im Alter von 12 Wochen hat der Wildtyp eine signifikant erhöhte BMD. Hier kann vermutet werden, dass T-Lymphozyten eine knochenprotektive Wirkung bei Alterungsprozessen haben. Eine andere Möglichkeit ist, dass die T-Lymphozyten bei der Knochenentwicklung in diesem speziellen Zeitraum (zwischen 8-12 Wochen) besonders wichtig sind.

Untersuchungen über die Folgen eines B-Zell-Arrests auf der Stufe der Prä-B-Lymphozyten verschiedener Mutanten-Stämme auf die Knochenentwicklung haben gezeigt, dass es nicht alleine entscheidend ist, welche Zelllinie an der Ausreifung gehindert wird, sondern auch der Mechanismus eine entscheidende Rolle spielt<sup>43</sup>. Die Pax5<sup>(-/-)</sup> und die  $\mu$ MT Maus verfügen beide nicht über reife B-Lymphozyten. Der Mechanismus hierfür ist aber unterschiedlich. Pax5 ist für die Transkription eines wichtigen Faktors in der B-Zell-Entwicklung essentiell, während  $\mu$ MT für eine Störung in der Ausbildung von Exons für transmembranäres IgM steht und so die B-Zell-Entwicklung auf der gleichen Differenzierungsstufe wie bei der Pax5<sup>(-/-)</sup> Maus abbricht. Die Pax5<sup>(-/-)</sup> Maus verfügt über eine hochgradige Osteopenie mit einer

massiven Osteoklastenüberaktivität bei normaler Osteoblastenfunktion. Die  $\mu$ MT-Maus hingegen unterscheidet sich in keinem der erhobenen Parameter von den Wildtypen. Als Vergleichsgruppe wurde ebenfalls die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus untersucht. Auch sie unterscheidet sich 2 Wochen nach der Geburt in Knochenstruktur und Entwicklung in keinem der erhobenen Parameter von der  $\mu$ MT-Maus oder dem Wildtyp. Daher wurde die Vermutung geäußert, dass gerade die gleichzeitige Abwesenheit von B- und T-Zellen der Grund dafür ist, dass die Knochenstruktur und -heranreifung sich nicht vom Wildtyp unterscheidet<sup>43</sup>. Dies ist eine sehr wichtige Aussage im Hinblick auf den hier vorliegenden Vergleich von RAG-1<sup>(-/-)</sup>- und Wildtyp-Maus.

Bei einer postmenopausalen Osteoporose treten die T-Lymphozyten als Hauptlieferant von TNF- $\alpha$  und RANKL auf<sup>44,45</sup>. Hier führen sie durch eine immunologische Überreaktion zu einem Knochenabbau. Diese Reaktion ist IL-7 vermittelt<sup>42,46,47</sup>. In einem Mausmodell nach Ovariectomie steigt IL-7 an und führt über diesen Mechanismus zu Osteoporose<sup>48,49</sup>. IL-7 ist ein Zytokin, welches die Lymphopoese induziert und vor allem T-Lymphozyten aktiviert. Bei der rheumatoiden Arthritis wird IL-7 ebenfalls eine knochendestruktive Wirkung zugeschrieben<sup>50</sup>. Dieses Zytokin ist in der Lage einer Zellpopulation, den B220<sup>+</sup>-Zellen, das Signal zu geben, sich in Osteoklasten zu differenzieren. Die B220<sup>+</sup>-Zellen stellen ebenfalls Vorläuferzellen der B-Lymphozyten dar<sup>51</sup>. Somit ist dieses Interleukin als ein für den Knochen besonders schädliches Interleukin identifiziert worden. Nur eine einzige Quelle ist bekannt, welche die osteoprotektiven Eigenschaften von IL-7 beschreibt. Demnach ist IL-7 in Zellkulturen ein Hemmstoff für die Osteoklastenreifung<sup>52</sup>.

B-Zellen und Osteoklasten beeinflussen sich in der frühen Phase ihrer Entwicklung deutlich, und diese Interaktionen sind für die Knochenhomöostase physiologisch notwendig. In diesem Zusammenhang ist auch die Wichtigkeit der T-Lymphozyten zu unterstreichen, denn die oben beschriebene Wirkung von IL-7 läuft T-Zell-vermittelt ab. Die T-Zellen schütten nach einer IL-7-Stimulation TNF- $\alpha$  und RANKL aus und treiben auf diesem Weg die Osteoklastenaktivität an<sup>53</sup>. Ließe sich bei einer schlecht heilenden Fraktur eine hohe IL-7-Expression messen, wäre die verzögerte Heilung immunologisch erklärbar. Die Zusammenhänge sind aber bis jetzt noch nicht bekannt. Dieses Beispiel verdeutlicht die besondere Relevanz osteoimmunologischer Forschung.

In anderen Untersuchungen wurde im Gegensatz dazu der knochenprotektive Effekt von T-Lymphozyten beschrieben: Ohne CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen *in vivo* steigert sich die Vitamin-D-vermittelte Osteoklastenaktivierung, und die Osteoprotegrinproduktion fällt ab<sup>47</sup>. Damit haben die T-Zellen auch knochenerhaltende Eigenschaften. Einen Hinweis auf eine ähnliche Wirkung liefert die Arbeitsgruppe um Choi Y. et al. (2005). Hier wurde gezeigt, dass *in vitro* aktivierte CD8<sup>+</sup> Lymphozyten die Osteoklastogenese unterdrücken können (Knochenprotektion), während aktivierte B-Zellen und ihre Zytokine einen besonders schädigenden Einfluss auf den Knochen aufwiesen<sup>54</sup>. Zusätzlich zu dem oben bereits erwähnten Interferon- $\gamma$  hat auch IL-4 knochenerhaltende Eigenschaften. Es ist als antiinflammatorisches Zytokin (ebenso IL-10) bekannt und wird von Th2- Zellen und Mastzellen gebildet<sup>32</sup>. Diese Zytokine der T-Helfer-Zellen konnten in Untersuchungen die knochenkonservierenden Eigenschaften der Th2-Lymphozyten erklären. Die Th2-Zellen sind eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und aktivieren verstärkt das B-Zell-System, während die Th1-Zellen eher zu einer Makrophagenaktivierung führen<sup>55</sup>.

Eine andere Subpopulation der T-Lymphozyten ist bis jetzt außer Acht gelassen worden: Der Subtyp der Th17-Zellen hat nachweislich einen schädlichen Einfluss auf den Knochen. Bei vielen Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises schüttet diese Zellpopulation große Mengen von IL-17 aus, welches in der Lage ist Osteoklasten direkt zu aktivieren und den Knochen zu zerstören<sup>29,32</sup>.

All diese Beispiele heben die gegensätzlichen Wirkungen der Lymphozyten auf den Knochenstoffwechsel hervor. Die Rolle der Lymphozyten ist wichtig für die physiologische Entwicklung des Knochens. Erstens durch die örtliche Nähe des Knochenmarks, zweitens durch die zahlreichen Signale, welche die unterschiedlichen Zelllinien während ihrer Differenzierung geben. Normalerweise halten sich die schützenden und die destruierenden Eigenschaften der Lymphozyten die Waage. Kommt es jedoch zu einer überschießenden Reaktion des Immunsystems, treten inflammatorische Zytokine der Lymphozyten und die Zell-Zell-Interaktionen als schädlicher Einfluss hervor, der zu einer übermäßigen Osteoklastenaktivierung und Knochendestruktion führt.

Die meisten Erfahrungen, in Bezug auf Wechselwirkungen zwischen Knochenzellen und Lymphozyten, beziehen sich somit auf Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises, auf maligne Erkrankungen und auf die Osteoporose. Wenig ist über die immunologischen Prozesse während einer Fraktur bekannt und noch weniger über

die dortige Rolle der Lymphozyten bzw. deren Beeinflussung der Frakturheilung. An dieser Stelle ist erneut zu betonen, dass am Anfang eines jeden Traumas eine inflammatorische Reaktion steht. Bei einer Fraktur ist es essentiell, dass einerseits die Heilung durch diese Reaktion eingeleitet wird und alle nachfolgenden Vorgänge gebahnt werden. Andererseits ist zu hinterfragen, inwieweit diese Reaktion adäquat ist. Eine überschießende Immunreaktion kann, wie oben bereits beschrieben, schädigende Einflüsse haben. Zu klären ist, ob Lymphozyten generell einen heilungsfördernden Einfluss ausüben oder ob sie eventuell die Heilung verzögern oder gar durch eine zu ausgeprägte inflammatorische Antwort ein Scheitern der Heilung forcieren können.

### **2.4 Immunologie der Heilung**

Ist ein Organismus von einer Fraktur betroffen, lässt sich eine systemische Inflammation anhand erhöhter Zytokinspiegel im Blut nachweisen<sup>56</sup>. Die Verletzung äußert sich vor allem in einem Anstieg des von der Leber gebildeten C-Reaktiven Proteins (CRP) und IL-6. Beide Stoffe sind Akut-Phase-Proteine, welche auch nach einer Fraktur vermehrt produziert werden<sup>57</sup>.

Die Serumspiegel von IL-6 bleiben bis 7 Tage nach der Fraktur erhöht und die gemessenen Werte korrelieren hierbei mit der Schwere und Komplexität der Fraktur<sup>58</sup>. Dies spiegelt die Aktivierung und Alarmbereitschaft des Immunsystems wieder, die sich nach einem Knochenbruch abspielen. IL-6 aktiviert Granulozyten und fördert die Makrophagen- und Lymphozytendifferenzierung. Auf T-Lymphozyten wirkt es antiapoptotisch und erhöht die Immunglobulin-G Produktion der B-Zellen<sup>59</sup>. Es findet somit eine gezielte Aktivitätserhöhung und Rekrutierung von Lymphozyten statt.

Ebenfalls beobachten lässt sich im Verlauf der Heilung ein Wechsel von proinflammatorischen Th1- zu antiinflammatorischen Th2-Zellen (Unterformen der T-Helfer Zellen)<sup>60</sup>. Dieser Wechsel ist vermutlich notwendig, um die Inflammation nach dem Trauma an einem gewissen Punkt zu limitieren, allerdings werden dadurch Infektionen begünstigt. Es muss demzufolge eine Balance zwischen Inflammation und Antiinflammation vorliegen, damit eine Heilung optimal abläuft und keine Komplikationen entstehen.

Mit der Bildung des Frakturhämatoms wird der Prozess der Frakturheilung initiiert. Hieran sind verschiedene Schlüsselmoleküle beteiligt. Diese können in vier Gruppen

eingeteilt werden: die TGF- $\beta$ -Superfamilie, Metalloproteinasen, angiogenetische Faktoren und die proinflammatorischen Zytokine<sup>61</sup>. Letztere Gruppe ist verantwortlich für die immunologische Modulation der Frakturheilung. So wurde 1995 von Einhorn und Horowitz et al. IL-1, IL-6 und Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF) in der Frühphase der Heilung nachgewiesen<sup>62</sup>. Die höchsten Spiegel wurden dabei im Gewebe einen Tag nach der Fraktur gemessen. Am dritten Tag nach der Fraktur ist nahezu der Normwert wieder erreicht. Die Zellen, welche an der lokalen Entzündung beteiligt sind, wurden ebenfalls zu diesem Zeitpunkt beschrieben<sup>63</sup>. Den  $\alpha/\beta$ -T-Lymphozyten werden hierbei osteoinduktive Eigenschaften zugeschrieben, denn sie schütten nachweislich IL-2 aus. Dabei wird vermutet, dass über diesen Mechanismus die Zellmigration im Frakturhämatom gefördert wird und somit das weitere Voranschreiten der Heilung intensiviert wird<sup>64,65</sup>. Das oben beschriebene Interleukin-6 ist ein Aktivator der Lymphozyten und wird von Makrophagen gebildet. Damit wird eine inflammatorische Reaktion weiter getriggert. Ohne IL-6 heilen Frakturen deutlich schlechter<sup>66</sup>.

Der Botenstoff TNF- $\alpha$ , welcher hauptsächlich von Makrophagen gebildet wird, ist klassischerweise das Zytokin, welches die Signale der Inflammation setzt. Er führt im Gewebe zu Rötung, Schwellung, Schmerzen und kann in hohen Konzentrationen eine Schocksymptomatik auslösen. Fehlt die Signalverarbeitung dieses Botenstoffes, so sind die Knorpelbildung und anschließend die Aktivierung von Phagozyten im Kallus gestört. Dadurch heilt ohne die TNF- $\alpha$ -Signalübertragung der Knochen verlangsamt<sup>67</sup>. TNF- $\alpha$  wird ebenfalls von aktivierten Lymphozyten ausgeschüttet. Bei dem Vergleich der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus mit dem Wildtyp gilt es, diesen Punkt zu berücksichtigen.

Lymphozyten beeinflussen viele Heilungsprozesse im Körper. So ist bereits der Einfluss auf die Wundheilung der Haut beschrieben worden: Barbul et al. haben festgestellt, dass eine selektive Hemmung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer verbesserten Wundheilung führt. Die alleinige Hemmung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Wundheilung<sup>68,69</sup>. Stützen lassen sich diese Beobachtungen durch athymische Nacktmäuse mit einem T-Zell-Defekt, bei denen sich eine phänotypisch gestörte Wundheilung durch eine T-Zellrekonstruktion mit Milzlymphozyten verbessern lässt<sup>70</sup>.

Die Lymphozyten haben nicht nur Einfluss auf die Heilung von Wunden, sie verbessern auch die Regeneration nach einem arteriellen Trauma. Schädigt man die

Gefäßwand einer RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus, so lässt sich in der Heilung eine überschießende Intimaproliferation beobachten. Nach einem adoptiven B-Zell-Transfer nimmt diese überschießende Proliferation wieder ab<sup>71</sup>.

Die initiale inflammatorische Kaskade ist ein kritischer Punkt, der einer sehr kontrollierten Regulation bedarf. Wird in diesen Prozess medikamentös eingegriffen, hat dies meist eine verzögerte Heilung zur Folge. Ein Aspekt, der etwas ausführlicher untersucht wurde, ist, dass nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) die Frakturheilung negativ beeinflussen. Wird im Tierexperiment täglich eine hohe Dosis von Indometacin oder Ibuprofen verabreicht, wird die Ausbildung eines Kallus gestört<sup>72</sup>. Andere antiinflammatorische Medikamente weisen eine ähnliche Wirkung auf und verschlechtern die Knochenheilung<sup>73</sup>. Besonders wichtig ist vor allem die Wirkung der Cyclooxygenase 2 (COX-2). Ein Knock-Out oder eine selektive Hemmung unterdrückt die inflammatorische Reaktion und führt zu sehr schlechten Heilungsergebnissen im Tierexperiment<sup>74</sup>.

Es gibt bereits laborexperimentelle Vorarbeiten zur Frakturheilung unter pharmakologischer Immunsuppression. Verabreicht man Mäusen Rapamycin, welches die Interleukin-2-vermittelte T-Zell-Aktivierung hemmt, so wird die Ausbildung eines Kallus und die Konsolidierung der Fraktur verhindert<sup>75</sup>. Rapamycin hat allerdings auch antiangiogenetische Eigenschaften, die ebenfalls bei diesem Prozess nicht zu vernachlässigen sind. Behandelt man adulte Ratten mit dem Immunsuppressivum FK506 und setzt danach ein tibiale Fraktur, so ergeben sich keine Unterschiede bei der Heilung und die Konsolidierung bleibt unbeeinträchtigt<sup>76</sup>. FK506 ist besser bekannt als Tacrolimus, es greift in den Zellstoffwechsel von T-Zellen ein und hemmt sie. Dadurch sind alle Zytokine, welche klassischerweise von T-Zellen ausgeschüttet werden, nur noch in verminderter Konzentration messbar. Dadurch stellt der fehlende Effekt auf die Frakturheilung eindeutig ein überraschendes Ergebnis dar; zumal bekannt ist, dass FK506 osteoinduktive Eigenschaften aufweist<sup>77</sup>.

### **2.5 Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus: ein Lymphozytendefektmodell**

Die Vielfalt an Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren wird durch den Prozess der somatischen Rekombination ermöglicht. Dieser Vorgang ist essentiell für das Ausreifen immunkompetenter Lymphozyten, mit Ausnahme der NK-Zellen. Während der Differenzierung der T- und B-Zellen ist es nötig, die auf der Keimbahn

vorhandenen Gene für den T-Zell-Rezeptor und für die von B-Zellen sezernierten Antikörper neu zu arrangieren. So wird die Vielfalt von theoretisch  $10^{13}$  verschiedenen Antikörpern und  $10^{18}$  verschiedenen T-Zell-Rezeptoren realisiert<sup>78</sup>. Im codierenden DNA-Abschnitt finden sich jeweils mehrere unterschiedliche V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Segmente (Abb. 2). Sie sind jeweils hintereinander auf verschiedenen Genloci angeordnet. Diese Segmente müssen neu sortiert werden, wobei von jeder Gruppe ein Segment benötigt wird. Dies gilt sowohl für den T-Zell-Rezeptor, als auch für die Antikörper der B-Zellen. Die Keimbahnstränge besitzen konservierte Signalsequenzen, an die spezialisierte Enzyme binden und die Genabschnitte ausschneiden können. Die Seiten der VDJ-Segmente sind mit sogenannten RSS (Recombination Signal Sequences) flankiert. An diesen Stellen binden die Enzyme RAG-1 und RAG-2 (Recombination Activating Gene) und induzieren unter Ausbildung einer Haarnadelschleife in der DNA einen Strangbruch. Anschließend lagern sich die beiden neu entstandenen Enden einander an. Bei dem Prozess werden die Fragmente zufällig zusammengeführt.

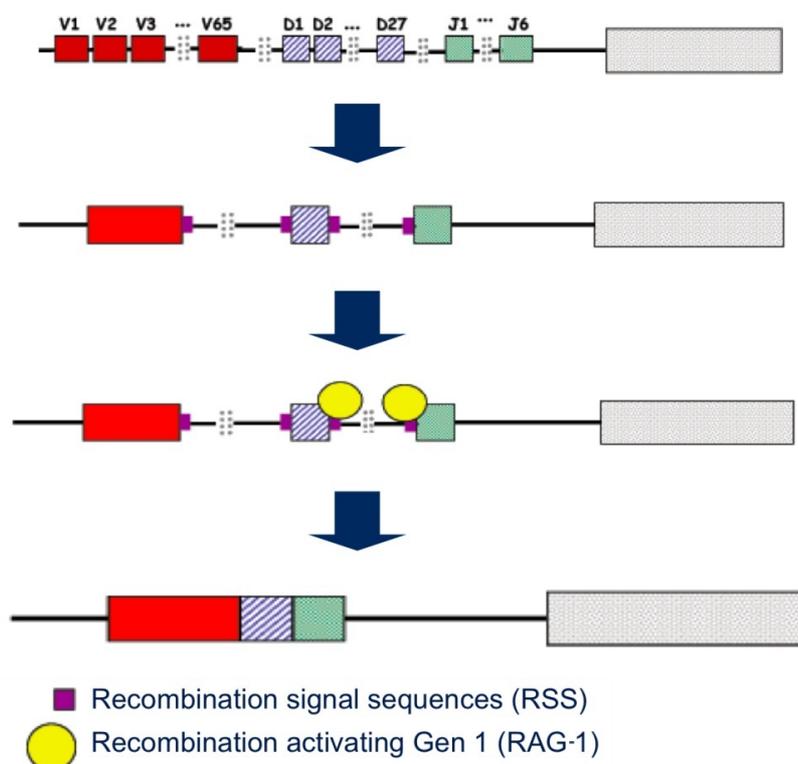


Abbildung 2: Prozess der somatischen Rekombination

Aus [http://www.righthealth.com/topic/Recombination\\_activating\\_gene/Images](http://www.righthealth.com/topic/Recombination_activating_gene/Images)

Es entsteht somit ein neues rekombiniertes Gen, dessen Transkript für den variablen Teil eines Antikörpers oder T-Zell-Rezeptors kodiert. Die RAG-1/2-Gene sind dabei lymphozytenspezifisch und werden bis auf wenige Ausnahmen nur während der Lymphozytendifferenzierung exprimiert. Es wurde eine Aktivität des RAG-1-Gens im zentralen Nervensystem der Maus gefunden<sup>79</sup>. Ansonsten wird außerhalb der Lymphozytenentwicklung keines der beiden Gene exprimiert.

Nach der Teilung einer Stammzelle entsteht die sogenannte frühe Pro-B-Zelle. Auf dieser Entwicklungsstufe findet bereits eine VDJ-Neuordnung statt und beide RAG-Enzyme werden exprimiert. Eine Expression wird ein zweites Mal in der Entwicklung nötig, wenn sich die große Prä-B-Zelle zur kleinen Prä-B-Zelle differenziert.

Die Ausreifung der T-Zellen beginnt im Knochenmark, verlagert sich dann jedoch in den Thymus. Auch bei der T-Zelle vollzieht sich die VDJ-Rekombination in einem sehr frühen Entwicklungsschritt. Die frühe doppelt negative T-Zelle besitzt weder den Oberflächenmarker CD4 noch CD8. Auf dieser Entwicklungsstufe erfolgt in ihr die RAG-Expression und die Rekombination der Gene für den T-Zell-Rezeptor<sup>80</sup>. Bei fehlender RAG-1-Aktivität bleiben die Lymphozyten deshalb auf der Stufe der frühen Pro-B-Zelle und frühen doppelt negativen T-Zelle stehen, und es kommt nicht zum Ausreifen von immunkompetenten Lymphozyten<sup>81</sup>. Ein Knock-Out von RAG-1 oder RAG-2 führt zum vollständigen Fehlen von immunkompetenten Lymphozyten und damit zur Abwesenheit des adaptiven Immunsystems. Untersucht man mittels eines Southernblots die kultivierten Zellen aus Thymus und Knochenmark, so sind alle T-Zell-Rezeptoren und Immunglobulingenloci in der ursprünglichen Konfiguration verblieben. Hieraus wird ersichtlich, dass RAG-1 essentiell ist, um die VDJ-Rekombination zu initiieren. Nur die NK-Zellen können noch heranreifen. Ihre Anzahl ist in der RAG-1-defizienten Maus sogar erhöht<sup>82</sup>. Genauso wie RAG-1 ist auch RAG-2 für die VDJ-Rekombination notwendig<sup>83</sup>.

Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus wurde in der Literatur erstmals 1992 erwähnt, hier gelang es der Arbeitsgruppe um Mombaerts et al. erstmals, einen Knock-Out des RAG-1-Gens durchzuführen und den Phänotyp der Maus zu beschreiben<sup>81</sup>. Für den Knock-Out wurden hierbei Mäuse des C57/Bl6-Stammes verwendet. Auch heute ist dies noch der Stamm der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus. Dabei sind diese Mäuse vom Wildtyp mit dem bloßen Auge nicht zu unterscheiden. Sie sind fortpflanzungsfähig und haben die gleiche Lebenserwartung. Es gibt keine makro- oder mikroskopischen Veränderungen im ZNS der Mäuse, obwohl sich die Expression von RAG-1 in

Neuronen des Wildtyps im Hippocampus und in der limbischen Region nachweisen lässt. Eine Untersuchung aus dem Jahre 2003 hat allerdings gezeigt, dass die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus ein verändertes Sozialverhalten besitzt. Die Mäuse unterscheiden sich vom Wildtyp nicht in ihrem Lernverhalten, sondern weisen eine verminderte Furcht in Stresssituationen sowie einen erhöhten Bewegungsdrang auf<sup>84</sup>. In Untersuchungen fielen deutlich verkleinerte lymphatische Organe auf. Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus ist heute ein sehr etabliertes Modell in der immunologischen und onkologischen Forschung. Aufgrund des fehlenden adaptiven Immunsystems lassen sich Tumorzellen und Lymphozyten von Mensch und Maus transplantieren, ohne dass es zu einer Abstoßungsreaktion kommt. Die Maus ist dabei gewissermaßen ein „Gefäß“ für Spenderzellen und Gewebe, die in ihr angezüchtet werden können. Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus ist bei vielen Anbietern verfügbar, und ihr Stamm wird weltweit zu Forschungszwecken vertrieben. Das Versuchstier besitzt zwar einen schweren Immundefekt, doch schränkt dieser den Gesundheitszustand der Mäuse nicht ein, solange die Mäuse von übertragbaren Krankheiten abgeschottet werden.

Der „Vorgänger“ der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus ist die SCID-Maus. Diese Maus kann noch zu einem sehr geringen Anteil reife B- und T-Lymphozyten ausbilden, und dies auch nur im fortgeschrittenem Alter. Hier liegt ein anderer Mechanismus der Störung vor: Aufgrund fehlender DNA-Reparaturmechanismen läuft die somatische Rekombination nicht ab, eine sehr geringe Restaktivität ist jedoch vorhanden<sup>85</sup>. Ihren Namen verdankt die Maus der auch beim Menschen vorkommenden genetischen Erkrankung, dem Severe-Combined-Immuno-Deficiency Syndrom. Aus diesem Grund findet man in der Literatur auch die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus gelegentlich unter dem Namen „non-leaky SCID Mouse“.

### 2.5.1 Angeborene Immundefizienz beim Menschen

Beim Menschen ist SCID eine Sammelbezeichnung für ein Syndrom, das als Gemeinsamkeit eine angeborene schwere Störung des Immunsystems aufweist. Typisch ist für alle SCID-Formen eine Fehlfunktion oder ein Mangel an T-Lymphozyten. Dadurch ist eine Störung der zellulären Immunantwort bei allen SCID-Formen bedingt. Je nach SCID-Form ist auch die Funktion oder Anzahl von B-Lymphozyten und NK-Zellen fehlerhaft. Dementsprechend kann auch die humorale Immunität beeinträchtigt sein. Die Häufigkeit von SCID wird auf 1:50000 bis 1:100000 Neugeborene geschätzt<sup>86</sup>. Damit handelt sich um eine seltene angeborene

Erkrankung des Immunsystems. Auch finden sich unter den Erkrankten Menschen, die einen Defekt des RAG-1-Gens besitzen. Diese Erkrankung wird dann genauer als Omenn-Syndrom (OS) bezeichnet, wobei es sich dabei meistens um genetische Mosaik handelt. Diese sehr seltene Form der völligen RAG-1-Defizienz wird als T<sup>-</sup>B<sup>-</sup> SCID bezeichnet<sup>87</sup>. Patienten mit OS sterben normalerweise an schweren Infekten im ersten Lebensjahr, es sei denn, sie erhalten eine Knochenmarkstransplantation. Mit einer immunsuppressiven Therapie kombiniert mit Infektionsprophylaxe können diese Patienten heute allerdings eine normale B- und T-Zell-Zahl entwickeln und sich immunologisch und klinisch erholen<sup>44</sup>. Somit ist zu sagen, dass der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Defekt ebenfalls beim Menschen vorkommt, diese Erkrankung jedoch heute keine nennenswerte klinische Relevanz besitzt. Bei den Betroffenen stehen zumeist andere Probleme als eine gestörte Frakturheilung im Vordergrund.

### 2.6 Zielsetzung und Hypothese

Bei eingehender Betrachtung der beschriebenen vielfältigen Effekte von Lymphozyten auf das Skelettsystem und die am Knochenaufbau und -umbau beteiligten Zellen ist wenig über das Zusammenspiel von Lymphozyten und Knochengewebe während der Frakturheilung bekannt.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist, zu beweisen, dass sich die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus und der Wildtyp in ihrer nativen Knochenstruktur nicht unterscheiden. Hierfür gibt es in der Literatur bereits Hinweise.

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht in der Beantwortung der Frage, inwiefern die Abwesenheit von Lymphozyten die Knochenheilung verringert. Arbeitsgrundlage und Annahme lauten daher folgendermaßen: Durch das Fehlen der Lymphozyten wird die inflammatorische Reaktion abgeschwächt und wichtige Signalkaskaden der Immun- und Knochenzellen laufen gestört ab. Aus diesem Grund wird die Heilung nicht richtig initiiert. Der Kallus wird sich bei der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus deshalb mit einer Verzögerung ausbilden und nicht die gleiche mechanische und strukturelle Qualität erreichen wie der Kallus des Wildtyps.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign**

Als Versuchstiere wurden männliche C57/Bl6 Wildtyp- und C57/Bl6 RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Mäuse verwendet. Die Mäuse vom Wildtyp wurden von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité oder der Firma Charles River geliefert. Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Mäuse stammten von dem Bundesministerium für Risikobewertung (BfR). Bei der Untersuchung der nativen Mäuseknochen gab es 2 Gruppen à 8 Tiere. Diese Untersuchungen dienten dazu, mögliche phänotypische Unterschiede der Knochen zwischen RAG-1<sup>(-/-)</sup> und Wildtyp zu bestimmen.

Den restlichen Tieren wurde jeweils unter Vollnarkose eine 3-Punkt-Biege-Fraktur des linken Femurs gesetzt. Anschließend wurden die Mäuse nach 7, 14, 21 und 28 Tagen getötet. Die Tötung der Tiere erfolgte wiederum unter Vollnarkose mit Einleitung von CO<sub>2</sub> in einen luftdichten Käfig. Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen sah wie folgt aus:

Tabelle 1: Untersuchungsgruppen

		nativ	7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
μCT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	8	8	8	8	8
	WT	8	8	16	16	8
Biomechanik	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	-	-	8	8	8
	WT	-	-	8	8	8

Die erste biomechanische Testung ließ sich 14 Tagen post Fraktur realisieren. Für die Untersuchung mit dem μCT standen zu den Messzeitpunkten 14 und 21 Tage in der WT-Gruppe 16 Tiere zur Verfügung. Um die statistische Aussagefähigkeit zu erhöhen, wurden diese Tiere mit eingeschlossen. Es ist anzumerken, dass nach der Tötung die Knochen zunächst mit dem μCT gescannt wurden und anschließend die biomechanische Testung erfolgte.

#### **3.2 Tiere und Tierhaltung**

Insgesamt wurden 56 männliche Wildtyp Mäuse und 40 männliche RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Mäuse, ebenfalls des Bl6/C57-Stammes im Alter von 8-10 Wochen und mit einem Gewicht von 22-28g verwendet. Es wurden 8 RAG-1<sup>(-/-)</sup>- und 8 WT-Tiere für die

Untersuchung der nativen Knochen verwendet. Hierbei wurde jeweils das linke Femur für die Untersuchung mit dem  $\mu$ CT und die biomechanische Testung verwendet. Das rechte Femur wurde für die histologische Auswertung benutzt. Die restlichen 32 RAG-1<sup>(-/-)</sup>- und 48 WT- Tiere gingen in die  $\mu$ CT- und biomechanische Untersuchung nach Frakturprozedere ein. Die Versuchstiere wurden während der gesamten Dauer in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum gehalten und versorgt. Die Genehmigung (G 206/08) des Tierversuchsvorhabens wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales.

Die Tiere wurden ihrem Sozialverhalten entsprechend in Macrolon Typ 3 Käfigen in Gruppen von 4 Tieren und in Macrolon Typ 4 Käfigen in Gruppen von 10 Tieren gehalten. Die Haltungsbedingungen entsprachen den Richtlinien der European Convention ETS 123 und der Gesellschaft für Tierversuchskunde GV SOLAS. Die Fütterung erfolgte mit Nagetierfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH) sowie Wasser ad libitum. Gestanzte Löcher an den Ohren dienten als Markierung der Tiere. In den Räumen wurde das Licht entsprechend eines 12 stündigen Tag/Nacht Rhythmus geregelt, die Temperatur lag bei 18-20°C. Nach den Operationen konnten die Tiere weiterhin in Gruppen von 4 Tieren gehalten werden, da die Operationswunden chirurgisch verschlossen wurden.

## 3.3 Histologie der nativen Knochen

### 3.3.1 Anfertigung der Schnitte

Für die histologische Begutachtung der nativen Knochen wurden die Tiere im Alter von 8 Wochen getötet und das linke Femur entnommen. Danach wurden die Knochen exartikuliert und von Weichteilgewebe befreit. Die Knochen wurden anschließend umgehend in eine Fixierlösung überführt, um biologische Zerfallsprozesse zu stoppen. Die Fixierlösung bestand aus 37% Formaldehyd, 100% Ethylalkohol, 0,1molarer Barbitol-Natrium-Puffer (pH 7,3) und Glukose (Herstellung: 324ml Formaldehyd, 550ml EtOH, 130ml Puffer, 6g Glucose). Nach der folgenden Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe [(70% Ethanol (7 Tage), 80% Ethanol (7 Tage), 96% Ethanol (2x7 Tage), 100% Ethanol (3x7 Tage)] wurden die Femora für 4 Stunden in Xylol (90-100%, Hersteller: J.T. Baker) überführt. Das Xylol verdrängt dabei den Alkohol und wird danach wiederum durch das Einbettungsmedium verdrängt. Die Präparate wurden vor der Kunststoffeinhüllung

für 48 Stunden in einer Präinfiltrationslösung bei Raumtemperatur und anschließend für 2x7 Tage in einer Infiltrationslösung bei 4°C gelagert. Weiterhin wurden die Knochen in Polymethylmetacrylat (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) überführt. So konnten die Knochen für die Anfertigung histologischer Schnitte schneidbar gemacht werden.

Nach der Aushärtung wurden die PMMA-Blöcke angeschliffen und an dem Mikrotom (Leica SM 2500S, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) 6 µm Frontalschnitte der Präparate entnommen. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit dem Lichtmikroskop daraufhin kontrolliert, ob die Metaphysen der Knochen intakt waren. Die Movat-Pentachrom Färbung der Schnitte entsprach folgendem Schema:

1. Entplasten mit MEA (2-Methoxyethyl-Acetat) ..... 3 x 30 Minuten
2. absteigende Alkoholreihe..... je 2 Minuten
3. destilliertes Wasser..... eintauchen
4. Alcianblau ..... 10 Minuten
5. mit Leitungswasser spülen..... 5 Minuten
6. 100% Ethylalkohol ..... 1 Stunde
7. mit Leitungswasser spülen ..... 10 Minuten
8. destilliertes Wasser..... eintauchen
9. Weigert's Eisenhämatoxylin..... 10 Minuten
10. destilliertes Wasser..... eintauchen
11. mit Leitungswasser spülen..... 15 Minuten
12. Brilliant Crocein-Säurefuchsin..... 15 Minuten
13. 0,5% Essigsäure ..... kurz spülen
14. 5% Phosphorwolframsäure ..... 20 Minuten
15. 0,5% Essigsäure ..... 2 Minuten bewegen
16. 100% Ethylalkohol ..... 3 x 5 Minuten
17. Saffron du Gâtinais ..... 1 Stunde
18. 100% Ethylalkohol ..... 3 x spülen
19. 90-100% Xylol ..... 2 x 5 Minuten
20. Eindecken mit Eukitt (Vitro-Clud®)

#### Färbelösungen:

- Alcianblau: 1% Alcianblau (8GS Chroma 1A288), 1ml Eisessig, 100ml H<sub>2</sub>O
- Weigert's Eisenhämatoxylin Lösungen A+B (Chroma A:2E032, B:2E052)
- Brillant Crocein-Säurefuchsin:
  - o Lösung A: 0,1g Brillant Crocein R (Chroma 1B109) in 99,5ml a.d. + 0,5ml Eisessig
  - o Lösung B: 0,1g Säurefuchsin (Chroma 1B525) in 99,5ml a.d. + 0,5ml Eisessig
  - o Gebrauchslösung: 4 Teile A mit einem Teil B
- 5% Phosphorwolframsäure: (PWS): 5g PWS in 100ml a.d. lösen (Chroma 3D092)
- Saffron du Gâtinais: 6g Saffron du Gâtinais (Chroma 5A394) in 100ml 100% EtOH lösen (Vor Gebrauch in luftdicht verschlossener Flasche für 48h bei 50°C im Brutschrank extrahieren, nur unter Luftabschluss haltbar)

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit dem Lichtmikroskop auf Färbefehler untersucht. Hierbei war zu beurteilen, ob die Schnitte für die weitere Auswertung verwendet werden konnten. Bei der korrekten Movat-Pentachrom Färbung erscheint mineralisiertes Gewebe und Kollagen leuchtend gelb, Knorpel blau-grün, Osteoid dunkelrot und Knochenmark rot bis lila. Die Zellkerne erscheinen blauschwarz.

#### **3.3.2 Auswertung der histologischen Schnitte**

Bei der Auswertung der histologischen Schnitte musste zunächst eine Region of Interest (ROI) festgelegt werden. Da es sich bei der Studie um Untersuchungen der Frakturheilungen am Femur handelt, wurde eine ROI, die distale Metaphyse des Femurs, bestimmt. Die ROI wurde wie folgt definiert: Es wurde der proximal gelegene Bereich der Wachstumsfuge aufgesucht. Von hier wurde im Abstand von 0,25mm von der Wachstumsfuge eine Senkrechte zur Kortikalis gezogen. Danach wurde weiter proximal der Übergang Diaphyse/Metaphyse bestimmt. Die Festlegung dieses Punktes erfolgte, indem ein Bereich aufgesucht wurde, in dem keine trabekulären Strukturen mehr zu sehen waren, wie es in der Metaphyse der Fall ist. Auch hier wurde eine Linie senkrecht zur Kortikalis gezogen. Die beiden Linien wurden an den Kortikalisgrenzen miteinander verbunden, sodass ein Rechteck entstand. Wurde dabei ein Bereich der Kortikalis eingeschlossen, so wurde der Kortikalisanteil in der späteren Auswertung abgezogen. So ergab sich ein in der Metaphyse gelegenes Rechteck (Abb. 3).

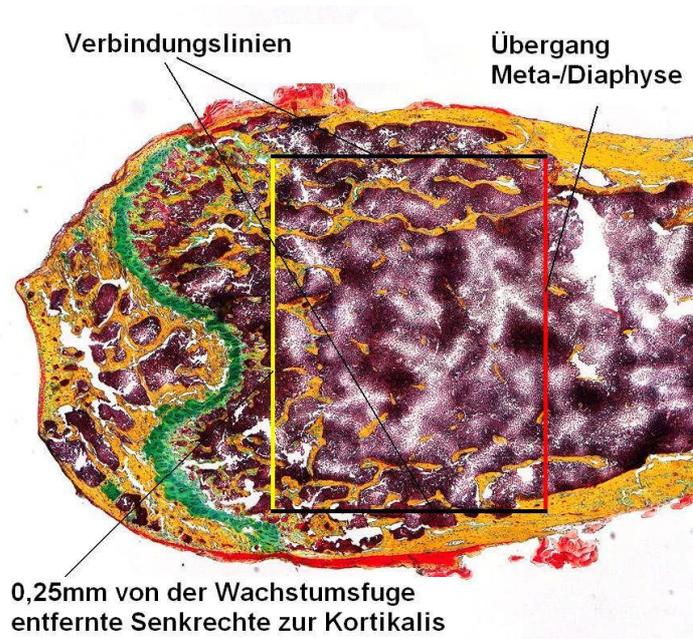


Abbildung 3: Region of Interest (ROI) in der distalen Metaphyse

#### 3.3.3 Histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit der Analyse-Software der Firma AxioVision Rel. 4.7.2 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, 2005). Das Computerprogramm ist in der Lage, nachdem die Schnitte in 40-facher Vergrößerung aufgenommen wurden (Mikroskop: Leica DMRB und dem Kamerakit: AxioCam MRc, Zeiss), jeden einzelnen Pixel anhand der Farbe zu unterscheiden. Das Computerprogramm wurde dabei so modifiziert, dass es für die verwendete Färbung und den zu ermittelnden Parameter die Strukturen sequenzieren konnte. Hierbei kann das Programm die Knochenanteile von dem Markraum unterscheiden. Anhand der spezifischen gelben Farbe lässt sich so Knochen von den restlichen Strukturen segmentieren (Abb. 5). Anhand der Form und Größe ist es auch möglich, Aussagen über die Struktur und Anzahl der Knochen trabekel zu treffen. Es wurden histologisch folgende Parameter erhoben: Totale Fläche (TA), Knochenfläche (BA), Knochenanteil (BA/TA [%]), und Trabekelanzahl (alle Parameter wurden auf die Fläche der ROI normalisiert). Dazu wurde die Trabekeldicke mit Hilfe einer Formel bestimmt:

$$\text{Trabekeldicke [mm]} = \frac{2 \times \text{TA [mm}^2\text{]}}{\text{Trabekelumfang [mm]}}$$

Abbildung 4: Formel zur Bestimmung der Trabekeldicke

Unter der Annahme, dass es sich bei den Trabekeln um dünne Plättchen handelt, kann mit der Formel die durchschnittliche Dicke eines Trabekels beschrieben werden<sup>88</sup>.

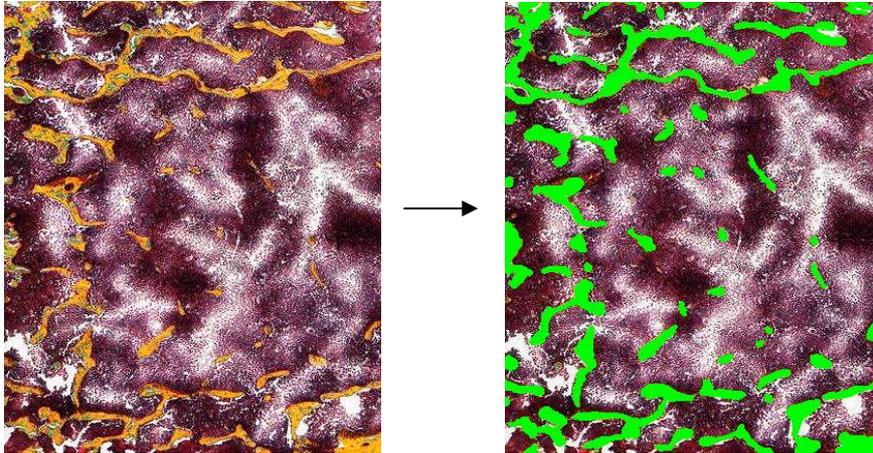


Abbildung 5: Segmentieren der histologischen Strukturen in der Region of Interest, links die Nativaufnahme

### 3.4 Frakturmodell

Es kam das Frakturmodell nach Kakar et al. zur Anwendung<sup>89</sup>. Nach dem Einbringen eines Marknagels in das linke Femur wurde eine 3-Punkt-Biege-Fraktur mittels einer eigens dafür konstruierten Frakturmaschine gesetzt:

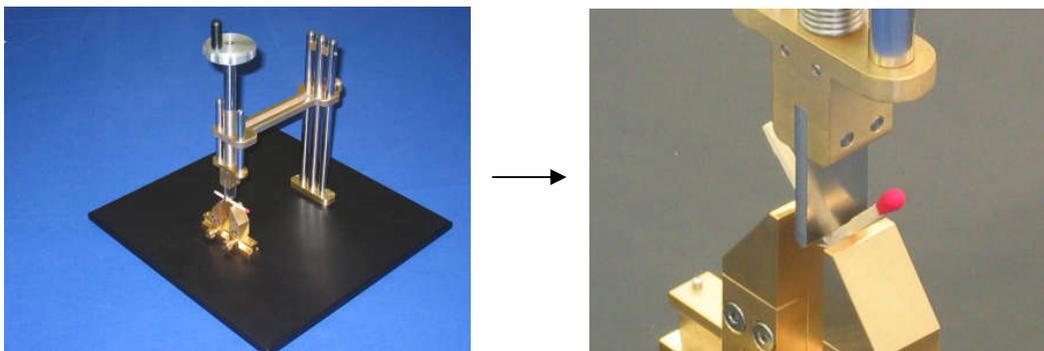


Abbildung 6: Frakturmaschine

Die Operation an sich erfolgte unter einer Isofluran/O<sub>2</sub>-Narkose (Konzentrationen 3%) und gleichzeitiger Analgesie mit Temgesic<sup>®</sup> (Buprenorphin 1mg/kg Körpergewicht), welches subkutan injiziert wurde. Nach Gewichtskontrolle wurde die Operation durchgeführt.

#### 3.4.1 Detaillierte Operationsbeschreibung und Tötung

Nachdem die Maus sich in tiefer Narkose befand, erfolgte die Analgesie. Das linke Knie wurde mit einem Einwegrasierer von Fell befreit.



Abbildung 7: Rasieren und Desinfizieren des Operationsgebietes (links) und Eröffnen des Kniegelenks (rechts)

Anschließend wurde die Patella lateralisiert und das distale Ende des Femurs freigelegt. Danach wurde das Femur mit einer Kanüle (1,20 x 40mm) vorgebohrt. Nun wurde der Marknagel eingeführt, wobei es sich um eine Spinalkanüle mit den Maßen 0,72 x 0,90mm handelte (Abb.8). Der Überstand wurde mit einer Zange auf Höhe der Femurkondylen abgeschnitten.

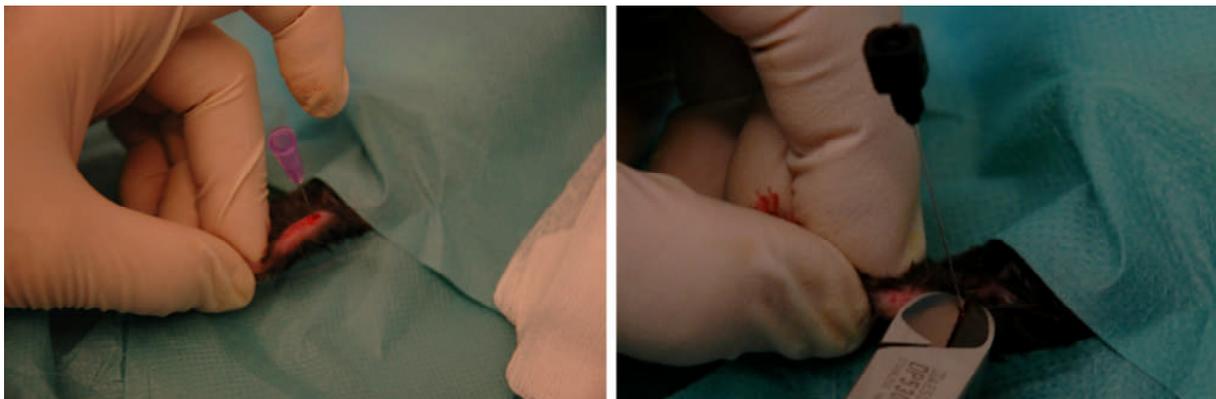


Abbildung 8: Anstechen des Femurs (links) und Einbringen des intramedullären Pins (rechts)

Die Wunde wurde anschließend mit einer Einzelknopfnahrt (nicht resorbierbares Nahtmaterial, 3.0 Metric) versorgt. Nachdem der Knochen auf diese Art stabilisiert war, wurde das Femur mittig in der Frakturmaschine platziert. Mit der Frakturmaschine wurde kontinuierlich Druck auf den Mittelpunkt des Femurs mit einem Schraubstockmechanismus ausgeübt, bis der Operateur das Brechen des

Knochens bemerkte (Abb. 9). Um zu gewährleisten, dass der Marknagel die Fraktur stabilisierte, wurden Röntgenkontrollen angefertigt (Röntgenfilm: Kodak DF58, 3x4cm).



Abbildung 9: Vernähen der Wunde (links) und setzen der 3-Punkt-Biege-Fraktur (rechts)

Die Tötung erfolgte nach dem oben beschriebenen Messzeitpunkt, nachdem die Fraktur teilweise verheilt war. Hierbei wurde die narkotisierte Maus solange in dem luftdichten Käfig mit CO<sub>2</sub>-Einleitung gehalten, bis sichtbar die Atmung aussetzte. Dann wurde palpatorisch der Herzstillstand kontrolliert und der Tod der Maus festgestellt. Im Anschluss wurden erneut Röntgenbilder angefertigt und das Körpergewicht notiert. Nun wurde sorgsam mit einem Skalpell und einer scharfen Schere das Femur in Hüft- und Kniegelenk exartikuliert. Der Oberschenkelknochen wurde vorsichtig von Muskelresten und Bändern befreit und der intramedulläre Marknagel mit einer spitzen Zange gezogen. Hierbei wurde äußerst sorgsam mit dem Knochen umgegangen, um ihn nicht zu beschädigen. Der Knochen wurde dann mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchtet, nachdem er in etwas Zellstoff eingewickelt worden war. Anschließend wurde er in einem verschließbaren Eppendorf-Röhrchen gelagert. Dieses wurde dann bis zur nächsten Testung in einem -20°C kalten Kühlraum tiefgefroren. Vor der Testung wurde der Knochen eine Stunde lang aufgetaut, bevor er mit dem  $\mu$ CT untersucht wurde. Danach wurde er erneut eingefroren, bevor dann die biomechanische Testung erfolgte und das Femur hierfür erneut eine Stunde vorher aufgetaut werden musste.

## 3.5 Mikro-Computertomograph

### 3.5.1 Evaluation der Knochen

Die Untersuchungen mit dem  $\mu$ CT erfolgten mit dem  $\mu$ CT der Firma Scanco Medical AG (8303 Bassersdorf, Schweiz). Die Analysen wurden mit einer Schichtdicke von

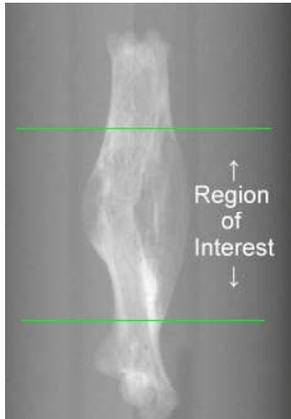


Abbildung 10: Bestimmung der Region of Interest (ROI) anhand eines Scout-Views bei einem frakturierten Knochen



Abbildung 11: Bestimmung der Region of Interest (ROI) anhand eines Scout-Views bei einem kontralateralen Knochen

10,5 $\mu$ m und einer Spannung von 70kV und einer Stromstärke vom 114mA durchgeführt. Die Evaluation und 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Software der zugehörigen Linux-basierten Software der Firma Scanco. Das Femur wurde dabei in einer Plastikpipette fixiert, welche wiederum in einem Plastikreagenzglas mit Drehverschluss platziert wurde. Damit der Knochen nicht austrocknete, wurde das Gefäß mit 0,9% NaCl-Lösung gefüllt. Hierbei musste sehr genau darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen in dem Gefäß bildeten, da dies sonst zu Artefakten im  $\mu$ CT-Bild geführt hätte. Nachdem die Knochen korrekt im  $\mu$ CT platziert waren, wurde zunächst ein Scout-View angefertigt. Dies ist ein Übersichtsröntgenbild, welches dazu diente, die ROI des jeweiligen Knochens zu definieren, welche dann hochauflösend gescannt werden konnten. Als ROI wurde hierbei folgendes definiert: Es wurde anhand des Röntgenbildes die Mitte des Kallus aufgesucht. Hier wurde ein Bereich gewählt, der mindestens 630 Schnitte umfasst und den Kallus komplett einschließt. Dabei wurde großzügig auch das obere und untere Ende des Kallus mit ausgewählt (Abb.10).

Nachdem die 2D-Transversalschnitte vorlagen, wurde auf den einzelnen Slices ein Bereich gesucht, in dem sicher kein Kallus mehr zu erkennen war. Ab diesem Bereich wurde dann die Evaluation des Kallus begonnen. Somit schließt die ROI den gesamten Kallus ein und es wurden alle Bereiche des Kallus in der strukturellen Analyse berücksichtigt.

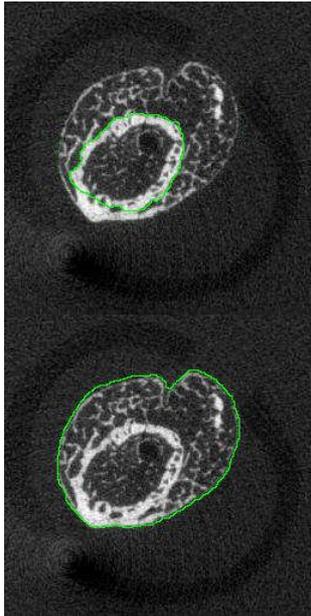


Abbildung 12: Einzeichnen der äußeren und inneren Kalluskontur

Bei der Evaluierung der Knochen lag ein besonderes Augenmerk auf der ausschließlichen Erfassung des Kallus. Aus diesem Grund musste der Knochen konturiert werden. Hierbei war es wichtig, den Knochen zunächst komplett zu umranden. Dies wurde bei allen Schnitten, die in die Auswertung mit einbezogen wurden, realisiert. Einerseits wurde manuell ein Kreis gegen den Uhrzeigersinn gezeichnet, andererseits konnten auch die „Iterate“ und „Morph“ Funktion des  $\mu$ CT genutzt werden. Es handelt sich dabei um Konturierungsalgorithmen des  $\mu$ CT-Programms, die das Konturieren der Knochen erheblich erleichtern. Jedes dadurch entstandene Bild musste jedoch zusätzlich sorgfältig kontrolliert werden. Anschließend wurde ein Kreis im Uhrzeigersinn um die innere Grenze Kallus/Kortex gezeichnet. Fusionierte man nun beide Konturen miteinander, so ließ sich der perikortikale Kallus evaluieren (Abb.12). Schwierig gestaltete sich dies allerdings im Frakturspalt, da hier stets mehrere Bruchfragmente vorhanden sind. Diese mussten, da sie zur Kortikalis gehören, ausgeschlossen werden, da nur der Kallus evaluiert werden sollte.

Bei den unfrakturierten Knochen wurde ein 200-210 Slices breiter Bereich in der Mitte der Diaphyse gewählt (Abb.11). Hier wurde ausschließlich der Kortex evaluiert nach dem gleichen Prinzip wie die frakturierten Knochen. Für die Evaluation wurde ein Grenzwert/Threshold von 190 Einheiten bestimmt (auf einer Skala 0-1000, wobei 0 für den dunkelsten Punkt steht, z.B Luft, und 1000 für den hellsten Punkt, z.B. Blei). In Vorversuchen wurden die 190 Einheiten ermittelt. Eine genaue Erklärung findet sich weiter unten. Per Definition gilt dann alles unter 190 Einheiten als Weichgewebe, alles über 190 wird dem Knochen zugerechnet. Die Parameter, die in den Analysen erhoben wurden, sind:

- Knochenvolumen,  $BV [mm^3]$
- totales Kallusvolumen,  $TV [mm^3]$
- Knochenvolumen geteilt durch totales Kallusvolumen,  $BV/TV [\%]$
- mittlere Kallusdichte,  $TMD [mgHA/cm^3]$
- mittlere Knochendichte,  $BMD [mgHA/cm^3]$

Bei den unfrakturierten Knochen wurden folgende Werte bestimmt:

- Gesamtdichte des Kortex, *TMD* [ $\text{mgHA}/\text{cm}^3$ ]
- mittlere Knochendichte, *BMD* [ $\text{mgHA}/\text{cm}^3$ ]

Der Unterschied zwischen den Werten BMD und TMD erklärt sich durch den gewählten Threshold. Die TMD beschreibt die mittlere Dichte des Knochens mit allen Dichtewerten zwischen 0 und 1000, die BMD die mittlere Dichte zwischen 190 und 1000.

Zusätzlich ließen sich mittels des  $\mu\text{CT}$  3D-Bilder des Kallus anfertigen, welche zwar keine statistischen Ergebnisse lieferten, aber dafür eine optische Begutachtung des Kallus und Aussagen über den Reifegrad des Kallus ermöglichten.

#### 3.5.2 Bestimmung des Thresholds

Bei der Bestimmung des Thresholds wurden im Vorfeld die Diaphysen von 8 unfrakturierten RAG-1<sup>(-/-)</sup>- und 8 WT-Knochen gescannt, um zu ermitteln, wie sich ihre Röntgendichten im  $\mu\text{CT}$  verhalten. Dies war nötig um die Grenze zwischen der Bezeichnung der Bildpunkte als Knochen und der Zurechnung zum Weichgewebe zu ziehen. Aus diesem Grund wurden im Zuge des Experiments 16 Diaphysen von intakten Femora analysiert. Hierzu wurden Histogramme erstellt, welche die Dichteverteilung von 0-1000 in der gescannten Probe darstellten. Von diesen 2x8 Histogrammen wurden die Werte gemittelt, so dass sich zwei Histogramme ergaben. In diesen Histogrammen lassen sich 2 Maxima erkennen (Abb. 13), wobei das erste Maximum bei einer Dichte von 95 liegt, das zweite Maximum bei einer Dichte von 415 (gerundete Werte). Das erste Maximum stellt dabei das gescannte Weichgewebe dar, das zweite Maximum die Dichte, welche die Mehrheit des diaphysalen Knochengewebes besitzt. Bei Analysen mit dem  $\mu\text{CT}$  ist es eine häufig angewandte Methode, ab einem Grenzwert, der bei 45% der Dichte des intakten kontralateralen kortikalen Knochens liegt, von Knochengewebe auszugehen<sup>90</sup>. In diesem Fall ist die Berechnung somit:  $415 \times 0,45 = 186,75$ . Die Berechnung ist daher für beide Gruppen identisch. Aus diesem Grund wurde ein Threshold von 190 benutzt, um das Weichgewebe von mineralisiertem Knochen im Kallus zu unterscheiden. Hier zeigte sich, dass sich die Knochen der beiden Gruppen in dieser Voruntersuchung nicht phänotypisch unterscheiden. Dies ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit bei den späteren Untersuchungen der frakturierten Knochen.

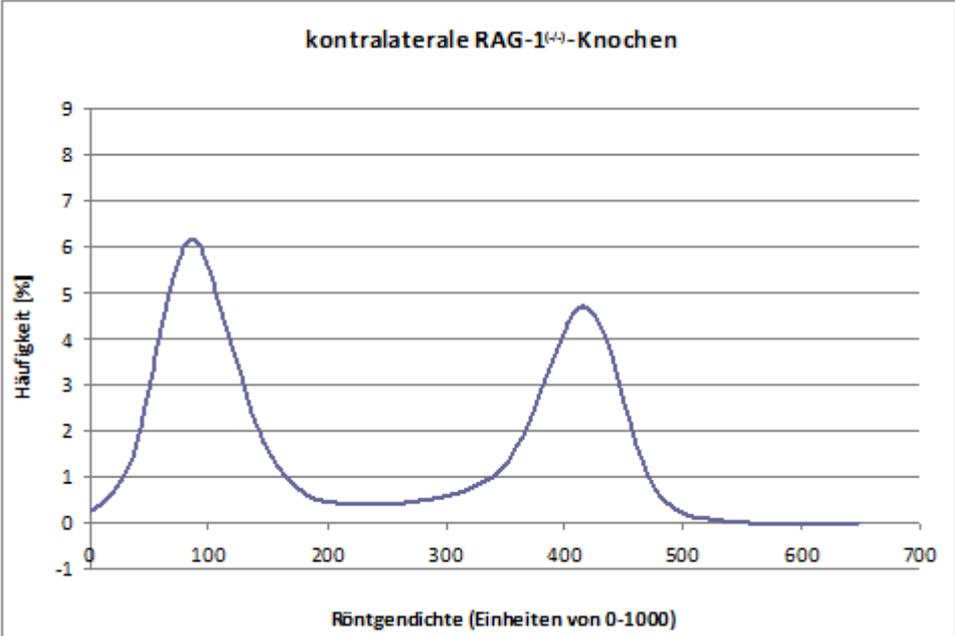
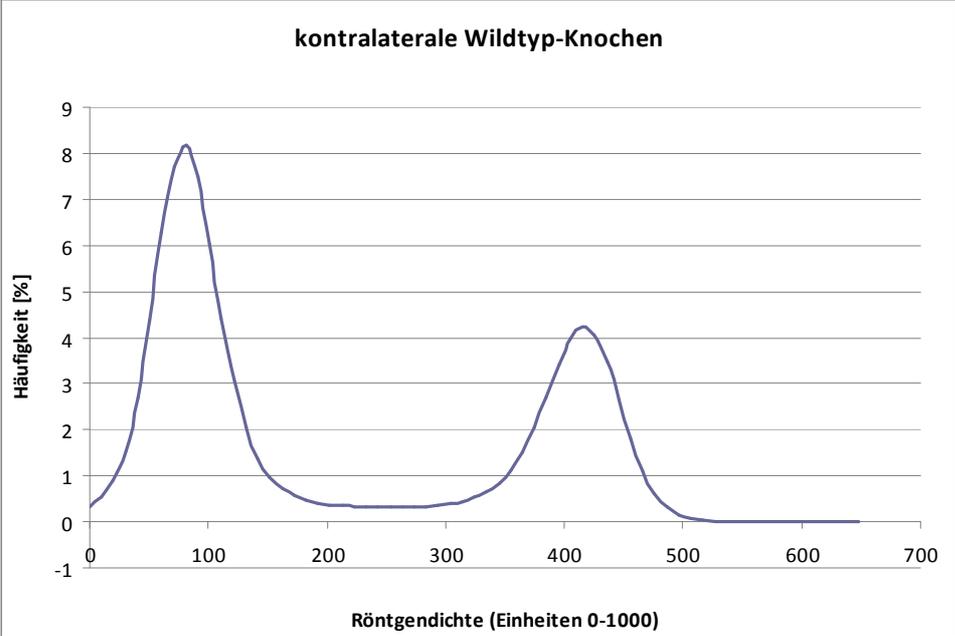


Abbildung 13: Dichteverteilungs-Histogramm von jeweils 8 kontralateralen Knochen zur Thresholdbestimmung

### 3.6 Biomechanische Testung

Nachdem die Knochen für circa eine Stunde aufgetaut wurden, wurden die frakturierten Knochen und die kontralateralen intakten Femora in kleine Plastiktöpfe (Abb. 15) eingebettet. Davor wurden die Knochen von restlichem Kapselgewebe und

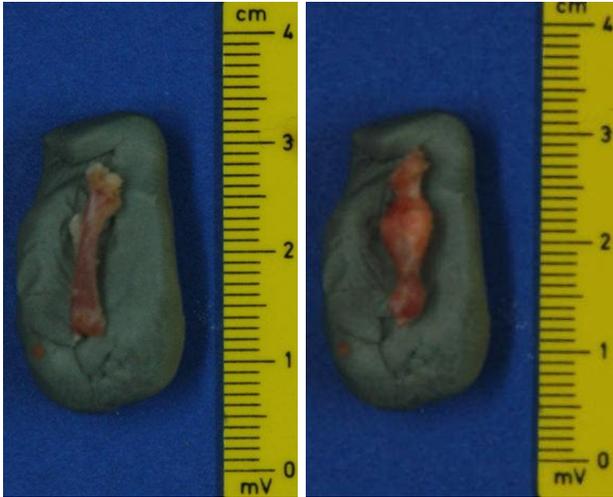


Abbildung 14: links der kontralaterale, rechts der frakturierte Knochen vor der biomechanischen Testung

Muskeln mit einem scharfen Skalpell befreit, gewogen und fotografiert (Abb.14). Anschließend wurden die Proben in eine biomechanische Prüfmaschine der Firma Bose (BOSE Electroforce 3200 Test System) eingespannt. Hierbei war es nötig, die Femora zunächst am proximalen Ende mit einem Stativ zu fixieren und das distale Ende in Polymethylacrylat einzubetten. Die Knochen wurden

dabei mit einem Winkel lotrecht ausgerichtet. Das Polymethylacrylat benötigt 10 Minuten zur Aushärtung und erreicht dabei Temperaturen um 90°C. Deshalb ist es von entscheidender Wichtigkeit, die Knochen vor dem Austrocknen zu schützen. Hierzu müssen die Knochen während der gesamten Messung feucht gehalten werden. Dies gelang, indem sie mit 0,9% NaCl-Lösung besprüht oder in feuchte Gaze eingewickelt wurden. Anschließend wurden die Knochen um 180° gedreht, um das proximale Ende ebenfalls einzubetten. Es wurde dabei sehr genau darauf geachtet, dass die beiden Enden zu gleichen Teilen in dem Polymethylacrylat eintauchten. Die Töpfe, in denen das Polymethylacrylat aushärtete, mussten vorher mit PTFE-Paste eingefettet werden, damit das Plastik später wieder herausgelöst werden konnte.

Beim Anrühren des Kunststoffes wurde ein 2-Komponenten-System verwendet (Technovit 3040 von Heraeus Kulzer). Zuerst wurde die flüssige Phase in einen Plastikbecher gegeben und anschließend so viel von der festen Phase hinzugegeben, bis der flüssige Kunststoff fadenartig von einem Stab abtropfte. Es musste dabei vermieden werden, dass die Masse beim Polymerisieren aufquillt und den Kallus möglicherweise benetzt. Aus diesem Grund musste eine möglichst feste Mischung gewählt werden und der Einschluss von Luftblasen verhindert werden.

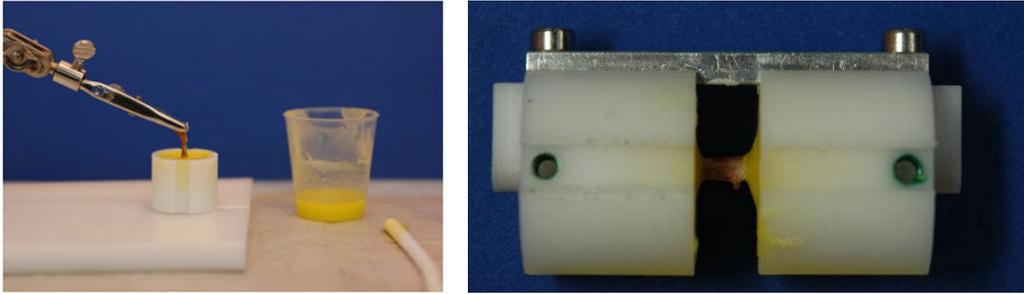


Abbildung 15: Einbettung der Mäuseknochen und eingebetteter Mäuseknochen in der Haltevorrichtung

Der Abstand der beiden Plastiktöpfe, in denen die Knochen eingebettet wurden, konnte durch einen kleinen Metallbügel an der Seite sichergestellt werden. Dieser war in einer Kerbe an der Seite der Töpfe eingelassen und mit jeweils 2 kleinen Gewindeschrauben an den Töpfen befestigt. Die Länge des Bügels betrug 45mm und der Abstand zwischen den Töpfen 6mm. Damit wurde exakt die Mitte eines Mäuseknochens der biomechanischen Testung unterzogen. Der gesamte Kallus lag somit bei jeder Messung in der Mitte zwischen den beiden Kunststoffeinhaltungen. Die Rotationsachse des Knochens entsprach der Längsachse des Knochens. So wurde der Knochen in die Testmaschine eingespannt. Nachdem alle Kräfte an beiden Enden der Probe manuell auf null justiert wurden, wurde der Metallbügel entfernt und die Messung gestartet.

Der Knochen wurde kontinuierlich mit einer axialen Vorlast von 0,3 Newton belastet. Nachdem diese Vorlast erreicht war, startete nach 30 Sekunden die eigentliche Messung. Bei dieser Messung verdrehte sich das eine Ende des Knochens kontinuierlich mit 0,5 Grad pro Sekunde. Die axiale Vorlast war nötig, um die bei der torsionalen Testung auftretenden Zugbelastungen, die aus der Verkürzung resultieren, zu minimieren. Dabei wurden zu jedem Messzeitpunkt das Torsionsmoment und der Winkelgrad erfasst. Es wurde alle 0,75 Sekunden ein Messwert erhoben. Als Endpunkt jeder Messung wurde das maximal erreichte Torsionsmoment definiert. Die Messung wurde abgebrochen, wenn ein deutlicher Abfall im Torsionsmoment um mehr als die Hälfte zu sehen war. Gab es während einer Messung einen deutlichen Abfall im Torsionsmoment und anschließend wieder einen Anstieg, so wurde die Messung nach dem ersten Abfall abgebrochen, wenn das Torsionsmoment um 15% des Maximalwertes abfiel, da dann von einem Bruch des Knochens ausgegangen werden musste. Die so gewonnenen Rohdaten wurden in eine Excel-Tabelle (Microsoft®) importiert und dort weiter verarbeitet.

Es wurden daraufhin die Parameter maximales Torsionsmoment, Torsionssteifigkeit und die Versagensenergie ermittelt. Diese Werte wurden alle als relative Werte bestimmt, um die individuellen Besonderheiten der Tiere mit einzubeziehen. Es wurde stets auch eine biomechanische Messung der kontralateralen Seite vollzogen und dieselben Parameter erhoben. Die erreichten Werte der frakturierten Knochen wurden durch die Werte der unversehrten Seite geteilt und so normalisiert. Die Steifigkeit gibt den Widerstand eines Materials gegen Verformung an. Stellt man die Testung als einen Graphen dar, wobei das Torsionsmoment auf der Ordinate und die dazugehörige Gradzahl auf der Abszisse dargestellt werden, so ist die Steifigkeit die Steigung der Kurve. Die Versagensenergie ist die Fläche unter der Kurve: Sie stellt die Energie dar, welche der Knochen vor dem Torsionsbruch aufgenommen hat. Bei der Berechnung der durch die Knochen absorbierten Versagensenergie wurde die Vorspannung, welche vor Beginn der eigentlichen Messung durch die Knochen aufgenommen wurde, nicht in die Berechnung einbezogen. Diese Energie ist bei beiden Gruppen identisch und verglichen mit der Energie, die durch die Torsionskräfte aufgenommen wird, verschwindend gering.

Das maximale Torsionsmoment hat die Einheit Nmm, die Steifigkeit Nmm/Grad und die Versagensenergie wird dementsprechend in Millijoule angegeben. Die Steifigkeit ergab sich aus der Steigung der an den Beginn der Kurve gelegten Graden. Die Versagensenergie wurde mit Hilfe eines Summationsintegrals aller Messwerte bestimmt:

$$\text{Energie [mj]} = \sum \frac{\text{Torsionsmoment [Nmm]} \cdot \Delta^\circ}{180^\circ \cdot \pi}$$

Abbildung 16: Formel zur Bestimmung der Versagensenergie

Die Messwerte der frakturierten Seite wurden auch hier auf die gesunde Seite bezogen und verglichen.

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogrammes SPSS 18.0 für Windows (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland). In tabellarischer Form wurden sowohl der Median-, die Perzentilen als auch der p-Wert angegeben.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots benutzt. Ein Boxplot besteht aus einer Box und „2 Whisker“ (Abb. 17). Der schwarze Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die untere Grenze der Box stellt das 25% Perzentil dar, die obere Box das 75% Perzentil. Dies bedeutet, dass innerhalb der Boxen 50% der mittleren Werte liegen. Die Whisker liegen über bzw. unter den Boxen und sind maximal so lang wie die 1,5-fache Boxenbreite. Das Ende der Whisker wird mit Querstrichen markiert. Sie stellen den kleinsten bzw. größten Wert dar, allerdings ohne Ausreißer und Extremwerte. Ausreißer werden als Kreis dargestellt. Ein Messwert wird als Ausreißer betrachtet, wenn er mehr als die 1,5-fache Länge, und weniger als die 3-fache Länge vom 25% bzw. 75% Perzentilpunkt entfernt liegt. Extremwerte sind mehr als 3 Boxenlängen von der Begrenzung des Boxenkörpers entfernt und werden als Stern dargestellt.

Bei den Messwerten der frakturierten Knochen wurde nicht von einer Normalverteilung ausgegangen. Es wurde mit einem Kolmogorow-Smirnow eine Normalverteilung ausgeschlossen. Die beiden Versuchsgruppen waren voneinander unabhängig. Aus diesem Grund erfolgte der Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Hierbei handelt es sich um einen nichtparametrischen Test, der 2 Stichproben miteinander vergleicht und keine Normalverteilung voraussetzt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt und somit eine Irrtumswahrscheinlichkeit mit  $\alpha = 0,05$  angenommen.

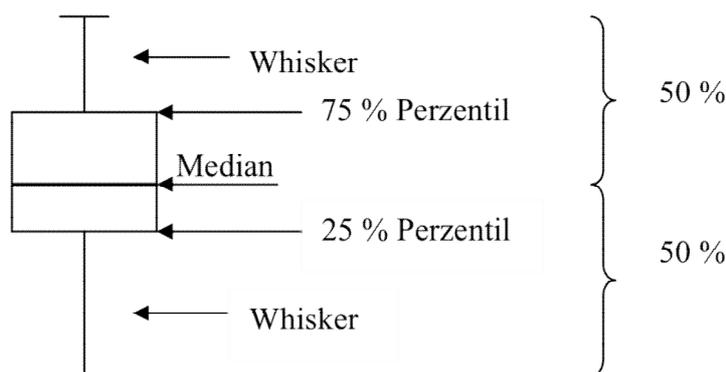


Abbildung 17: Boxplot

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Unfrakturierte Knochen

#### 4.1.1 Histologische Ergebnisse

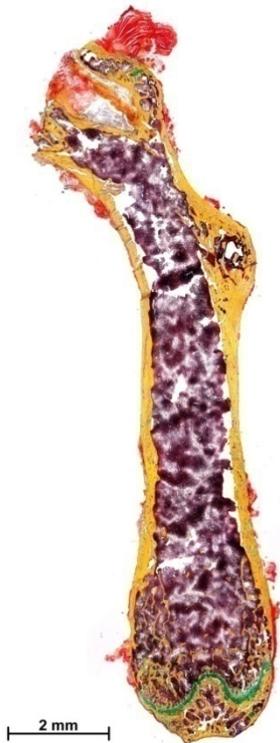


Abbildung 18: Bild eines 8 Wochen alten nativen RAG-1<sup>(-/-)</sup> Knochen, Movat- Pentachrom Färbung

Zunächst wurde geprüft, ob es Unterschiede zwischen den Phänotypen WT und RAG-1<sup>(-/-)</sup> gibt. Ein Unterschied zwischen den beiden Phänotypen würde die spätere Diskussion der Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Vorversuche durchgeführt. Ein wichtiger Parameter ist hier der relative Knochenanteil (BA/TA [%]), der mit histologischen Methoden erhoben wurde. Ein hoher Wert würde für eine stabile Knochenstruktur im Bereich der Metaphyse sprechen und eine gute Mineralisierung und Belastbarkeit des Knochens. Die Ergebnisse sind tabellarisch dargestellt, wobei die wichtigen Parameter zusätzlich als Boxplot verdeutlicht sind. Die drei Parameter Totale Fläche (TA), Knochenfläche (BA) und BA/TA sind hier abgebildet:

Tabelle 2: Gesamtfläche, Knochenoberfläche und relative Knochenoberfläche innerhalb der Region of Interest

Perzentilen	TA [mm <sup>2</sup> ]		BA [mm <sup>2</sup> ]		BA/TA [%]	
	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>
25% Quartil	1,28	1,32	0,12	0,20	9,07	11,22
50% Quartil (Median)	1,33	1,47	0,16	0,24	10,13	15,63
75% Quartil	1,66	1,94	0,18	0,28	12,29	17,44

Vergleicht man diese drei Parameter miteinander, so ergibt sich ein  $p > 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test) für unverbundene Stichproben) für das TA und das BA/TA. Der p-Wert für die BA lag bei  $p = 0,015$ . Dies ist jedoch ein absoluter Wert, ohne Berücksichtigung der ROI-Eigenschaften. Hier sieht man somit einen signifikant erhöhten Knochenanteil bei den RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen, die Werte des relativen Knochenanteils unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Auch

#### 4. Ergebnisse

weisen die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen eine erhöhte Streuung der Werte auf, wie an dem Boxplot zu erkennen ist (Abb. 19).

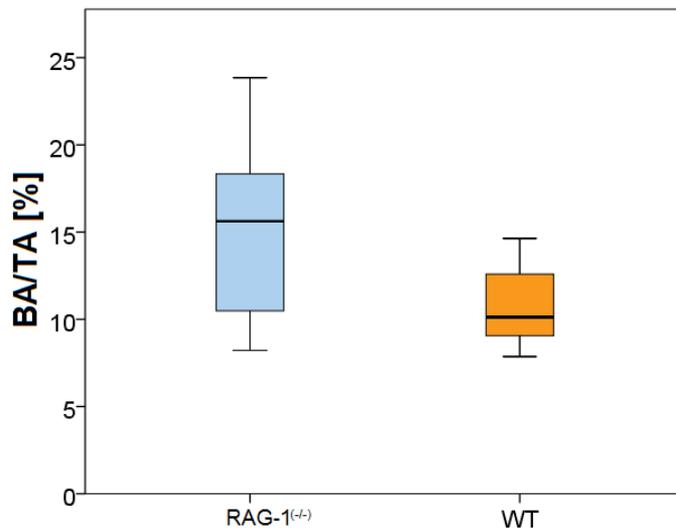


Abbildung 19: Anteil der Knochenoberfläche innerhalb der Region of Interest der Metaphyse,  $p=0,105$  (Mann-Whitney-U-Test)

Betrachtet man nun die anderen strukturellen Parameter der Histologie, die relative Trabekelanzahl und die Trabekeldicke, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Auch hier liegt erneut die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe mit den Werten über den Werten der WT-Gruppe, auch hier fällt bei Ersteren eine höhere Streuung der Werte auf. Es zeigt sich somit ein erhöhter Anteil an Knochen in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe, auch wenn dieser nicht statistisch signifikant ist.

Tabelle 3: Ergebnisse der nativen Histologie

Perzentilen	relative Trabekelanzahl (Trabekelanzahl/ Flächeninhalt der ROI)		Trabekeldicke [ $\mu\text{m}$ ]	
	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT
25% Quartil	49,86	39,65	0,0159	0,0170
50% Quartil (Median)	81,76	43,27	0,0191	0,0173
75% Quartil	100,62	50,81	0,0220	0,0177

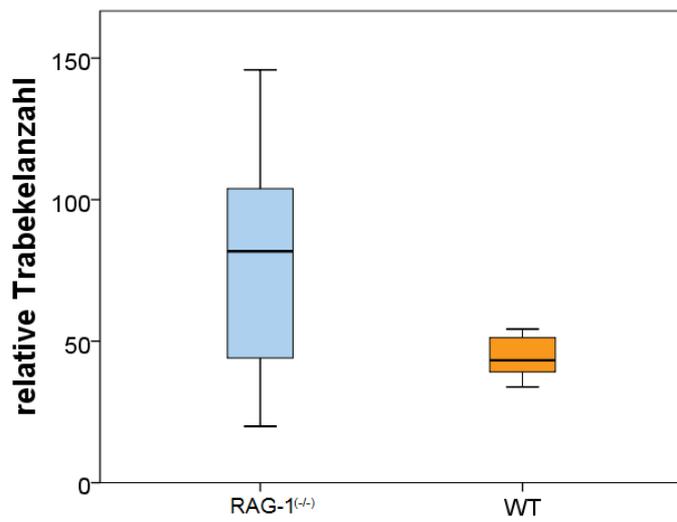


Abbildung 20: Anzahl der Trabekel in der Region of Interest (Trabekelanzahl/Flächeninhalt der ROI),  $p=0,105$  (Mann-Whitney-U-Test)

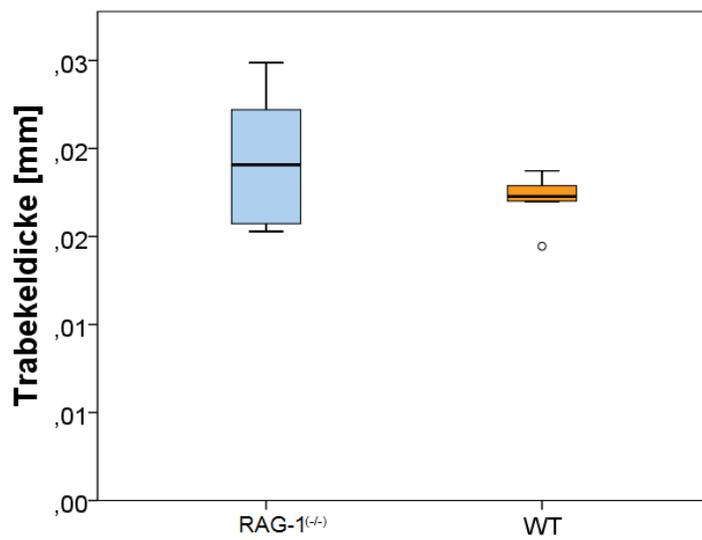


Abbildung 21: Trabekeldicke in der Region of Interest,  $p=0,328$  (Mann-Whitney-U-Test)

### 4.1.2 Biomechanische Testung der nativen Knochen

Die nativen Knochen der 8 Wochen alten Tiere zeigen folgende Ergebnisse in der biomechanischen Testung:

Tabelle 4: Daten der biomechanische Testung der nativen Knochen

Perzentilen	max. Torsionsmoment [Nmm]		Steifigkeit [Nmm/°]		Versagensenergie [mJ]	
	RAG-1 <sup>(-/)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/)</sup>	WT
25% Quartil	23,00	16,70	3,19	2,01	2,49	1,32
50% Quartil (Median)	23,90	19,85	3,62	2,86	2,70	1,86
75% Quartil	25,05	22,45	3,85	3,83	2,93	2,12

Vergleicht man die Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Parametern in beiden Gruppen. Der p-Wert war stets größer als 0,05. Auch erzielten die RAG-1<sup>(-/)</sup>-Knochen bei den Werten in jeder Perzentile einen höheren Wert als der Wildtyp. Beim maximalen Torsionsmoment stellte sich beim Wildtyp eine größere Streuung der Werte dar, ebenso bei den ermittelten Steifigkeiten und der vor dem Spiralbruch aufgenommenen Energie.

Die Diagramme der Testungen werden hier exemplarisch gezeigt (Abb. 22 und 23). In beiden Gruppen sieht man einen relativ linearen Anstieg der Kurven, bei dem Wiltypen zeigen sich auch hier sehr inhomogene erreichte Winkelgrade, dies erklärt auch die größere Bandbreite der Parameter wie oben beschrieben. Die dunkelblaue Kurve (Wt\_1N) zeigt den Kurvenverlauf, der am wenigsten linear erscheint. So zeigt sich am Ende der Messung eine „Delle“ und anschließend bricht der Knochen. Ein Messverlauf dieser Art stellt sich bei den RAG-1<sup>(-/)</sup>-Knochen nicht dar. Hier zeigte sich stets ein sehr linearer Kurvenverlauf, wie sich an dem beiden Grafiken erkennen lässt.

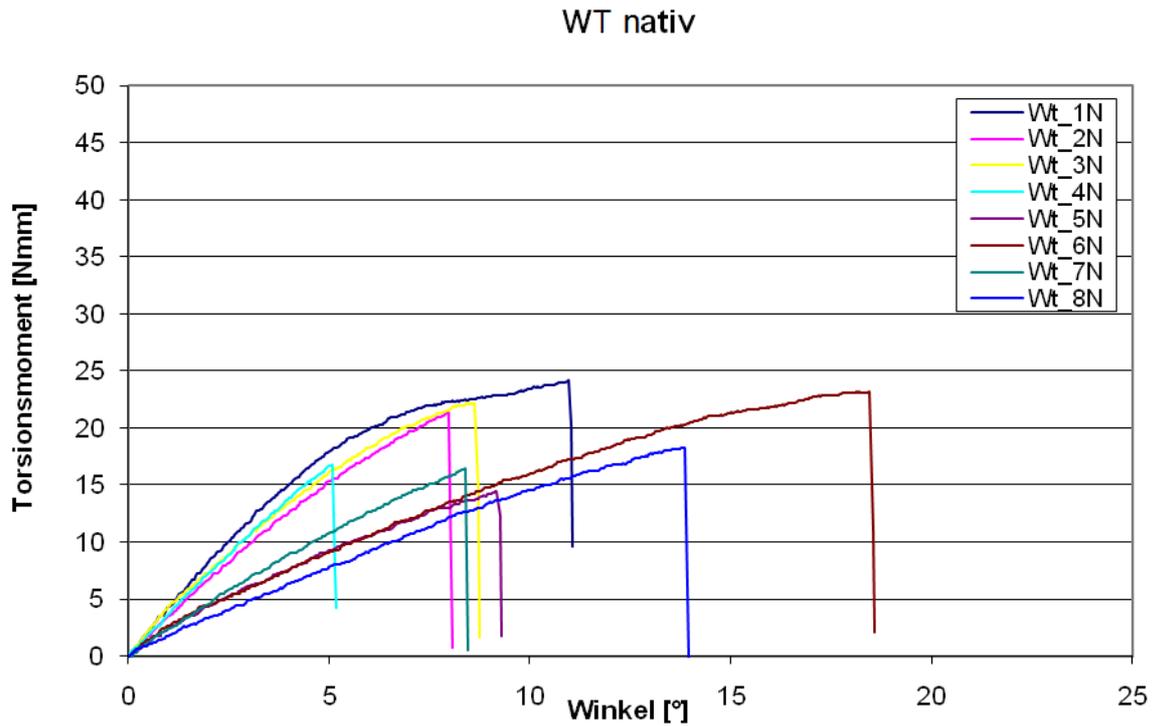


Abbildung 22: Biomechanische Testung der nativen Wildtyp-Knochen

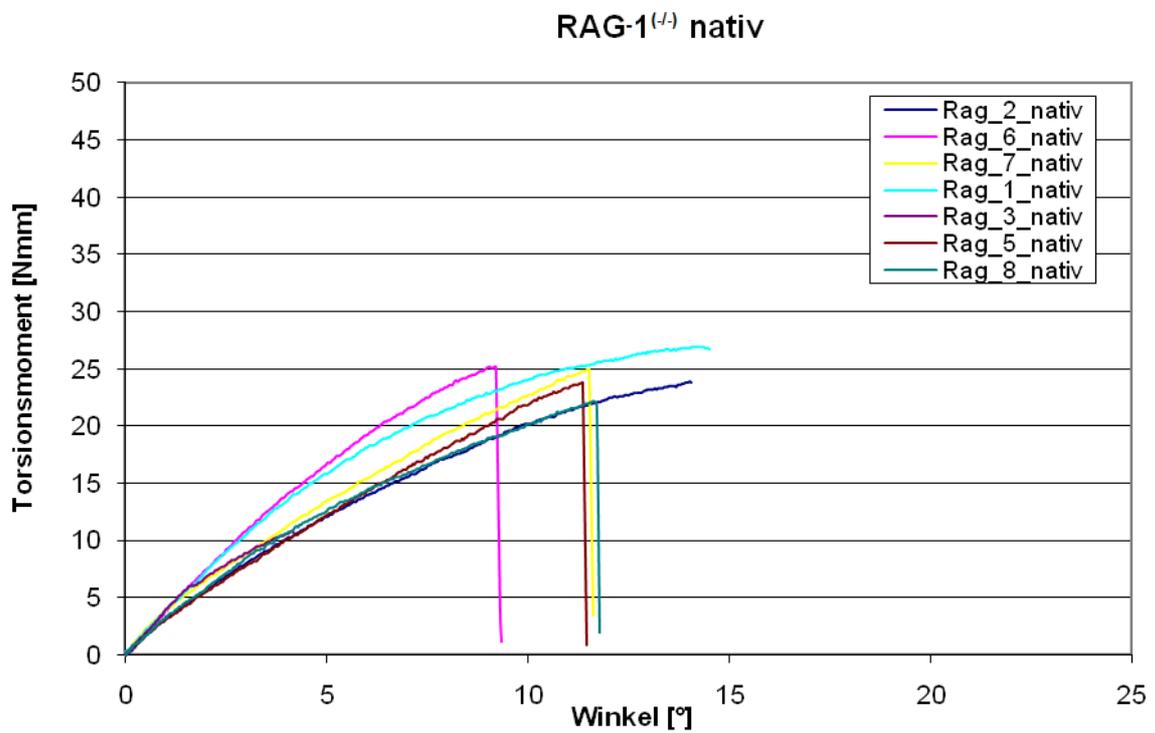


Abbildung 23: Biomechanische Testung der nativen RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen

### 4.1.3 $\mu$ CT der nativen Knochen

Mit dem Mikro-CT wurden die Parameter mittlere Mineralisierung-Dichte des Knochens (BMD) und die gesamte Dichte bestimmt (TMD). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch hier war der p-Wert stets größer als 0,05.

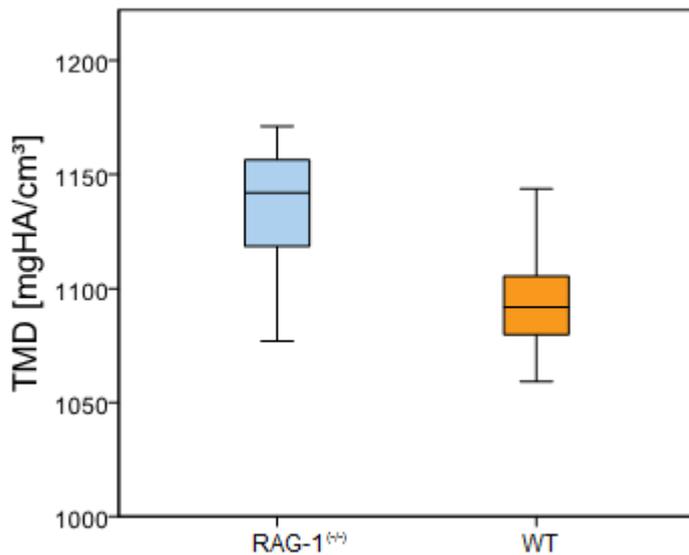


Abbildung 24: Mittlere Mineralisierungsdichte der nativen Diaphysen,  $p=0,07$  (Mann-Whitney-U-Test)

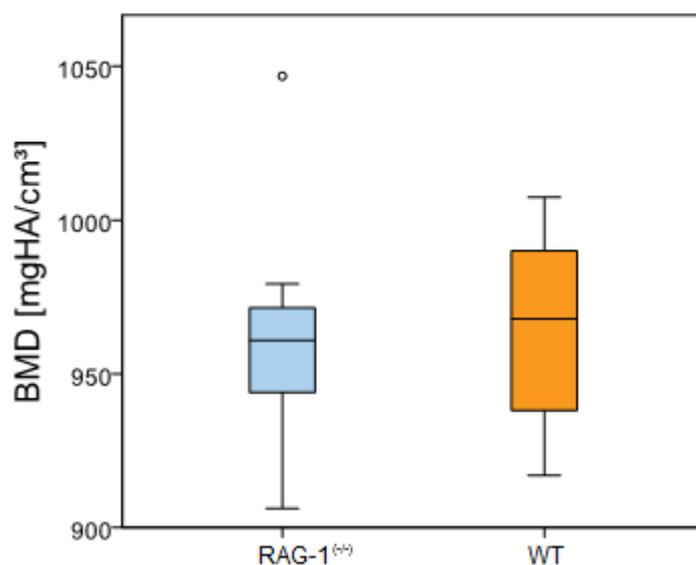


Abbildung 25: Mittlere Knochenmineralisierungsdichte der nativen Diaphysen,  $p=0,69$  (Mann-Whitney-U-Test)

Der Median der totalen Mineralisierungsdichte der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe lag dabei 1141,99 mgHAcm<sup>3</sup> und somit über dem der WT-Gruppe. Die Streuung der Werte war in beiden Gruppen ähnlich. Das Signifikanzniveau von 0,05 wird bei diesem

Parameter jedoch knapp verfehlt. Mit einem Wert von  $p=0,07$  kann hier von einem statistischen Trend gesprochen werden. Somit ließe sich mit einer größeren Gruppengröße eventuell ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen messen.

Bei der knöchernen Mineralisierungsdichte verhalten sich beide Gruppen sehr ähnlich. Sowohl die Streuung und die Mediane liegen in beiden Gruppen in der gleichen Größenordnung. Dies erklärt auch den  $p$ -Wert von 0,69, der sich bei dem Vergleich der beiden Gruppen ergibt.

**Tabelle 5: Analyse der nativen Knochen im  $\mu$ CT**

Perzentilen	BMD [mgHA/cm <sup>3</sup> ]		TMD [mgHA/cm <sup>3</sup> ]	
	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT
25% Quartil	927,37	935,83	1101,71	1078,63
50% Quartil (Median)	960,91	967,80	1141,99	1091,83
25% Quartil	979,21	995,85	1166,07	1106,10

## 4.2 Verlaufparameter Gewicht

Das Körpergewicht der Tiere kann Tabelle 6 entnommen werden. Bei dem Verlauf des Gewichts zeigt sich, dass alle Versuchsgruppen auch nach der Fraktur zunehmen. Eine Ausnahme bildet die Gruppe der Mäuse vom Wildtyp an Tag 7, die leicht abgenommen haben. Die Darstellung des Gewichts zeigt, dass sich die Tiere trotz des invasiven Eingriffs weiter normal entwickelt haben.

**Tabelle 6: Gewichte der Tiere während des Experiments**

			Tiergewichte in Gramm			
			Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
WT	Tag der Operation	Median	26	26,30	24,6	24,90
		Min-Max	25,8-28,2	25,9-30	23,6-27,6	23,6-25,7
	Post-Mortem	Median	25,40	26,95	26,75	28,05
		Min-Max	23,9-26,4	25,4-30,2	25,5-28,3	23,8-30,7
RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	Tag der Operation	Median	24,8	24,8	24,95	25,05
		Min-Max	21,5-28,3	21,8-26,9	22,4-26	23-27,7
	Post-Mortem	Median	24,95	26,05	26,1	28,7
		Min-Max	22,1-26,9	22,6-27,4	24-28,2	26-30,7

### 4.3 Radiologie

Röntgenbilder der Tiere zeigten sowohl nach der Operation als auch vor der Tötung korrekt sitzende Marknägel. Der jeweilige Marknagel überbrückte den Frakturspalt und die Tiere zeigten im Röntgenbild die zu erwartende Kallusbildung. Bei keinem der Tiere waren im Röntgenbild Anzeichen von Osteolysen zu erkennen. Ab dem 14. Tag nach dem Eingriff war eine Wolkenbildung im Bereich des Frakturspaltes als Hinweis auf die beginnende Mineralisierung des Kallus sichtbar. Auf einigen Röntgenbildern war zu erkennen, dass der Draht ein Stück weit in das Kniegelenk hinreichte. Dies schien die Tiere jedoch nicht zu beeinträchtigen und ist Bestandteil der hier verwendeten Methode. Abbildung 26 zeigt den Heilungsverlauf der Mäuse im Röntgenbild über den gesamten Verlauf:

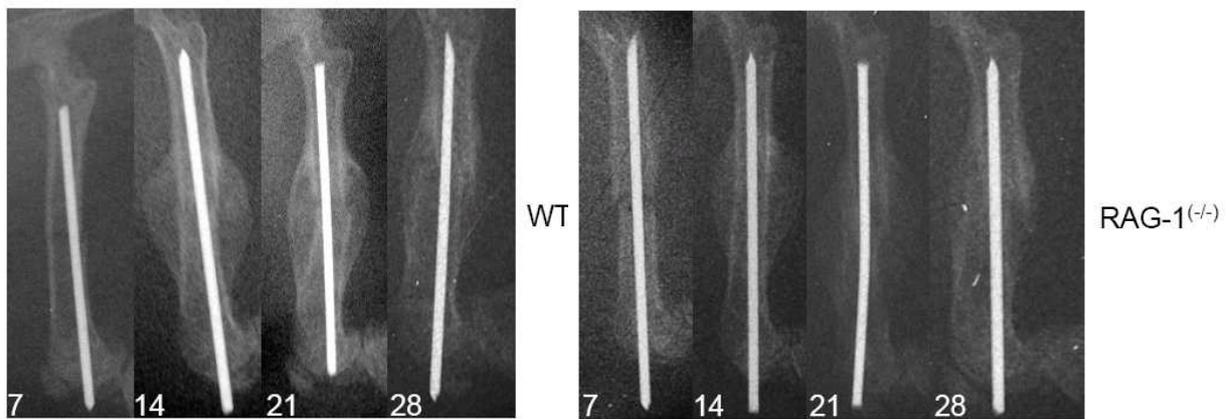


Abbildung 26: Röntgenenergebnisse über den gesamten Zeitverlauf

#### 4.4 Ergebnisse des $\mu$ CTs

Auch mit dem  $\mu$ CT wurden Bilder erstellt, um den Heilungsverlauf betrachten zu können. Es wurde dazu ein Verlauf in 3D erstellt:

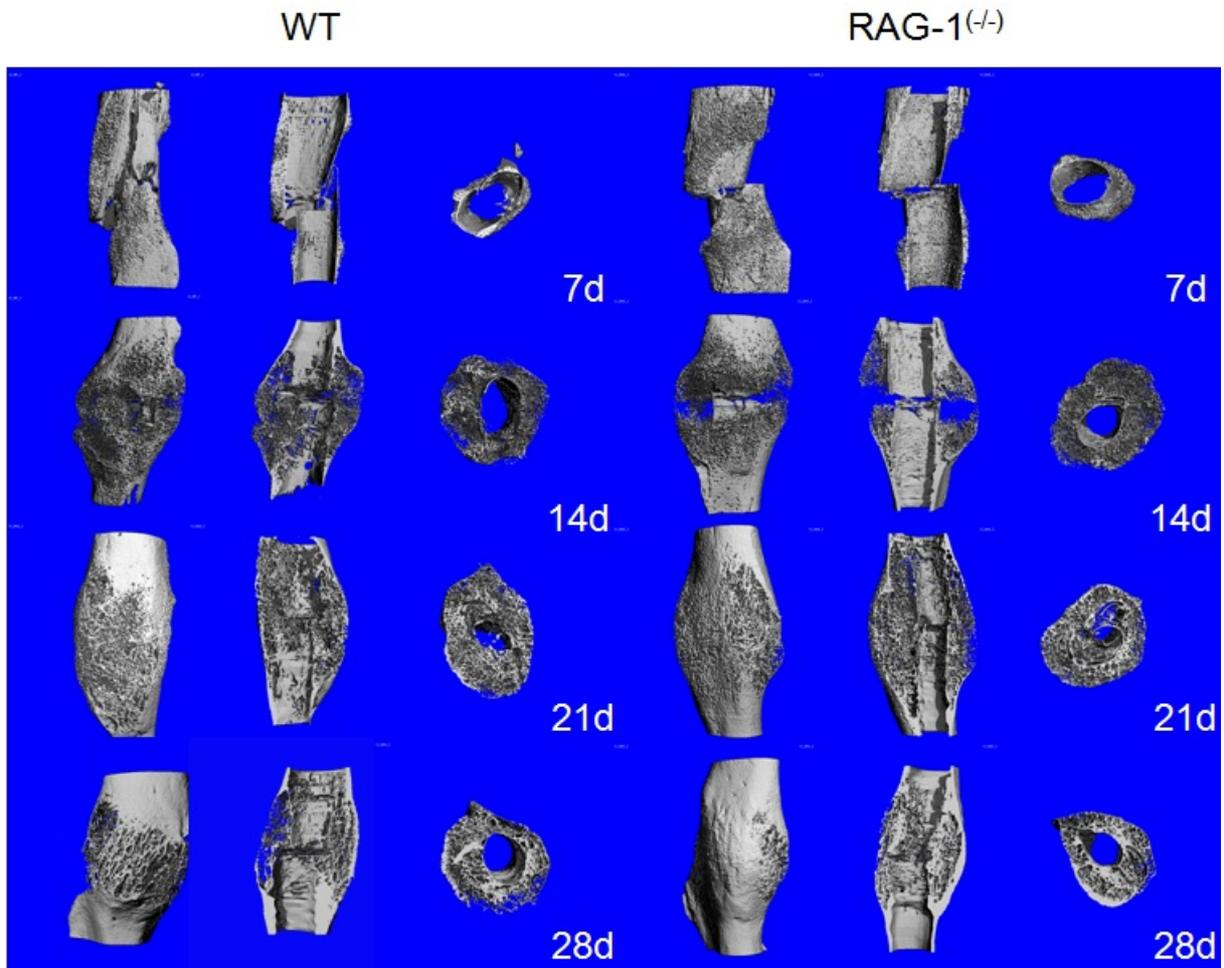


Abbildung 27: 3D-Bilder der frakturierten Knochen im zeitlicher Anordnung

Anhand der 3D-Bilder lässt sich die Heilung anschaulich nachverfolgen. Schon nach 14 Tagen ist sowohl bei der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus als auch bei dem Wildtyp eine partielle Überbrückung des Frakturspalts sichtbar. Nach 21 Tagen ist der Spalt dann überbrückt, und es beginnt ein Remodelling des Kallus. An Tag 28 zeigt die RAG-1<sup>(-/-)</sup> Maus sogar einen besser organisierten und kompakter wirkenden Knochen. Bei den Bildern handelt es sich um Einzelaufnahmen, welche nur einen groben Überblick über die Heilungsverläufe geben. Zunächst werden die beiden Parameter totales Kallusvolumen (TV) und Knochenvolumen (BV) dargestellt:

## 4. Ergebnisse

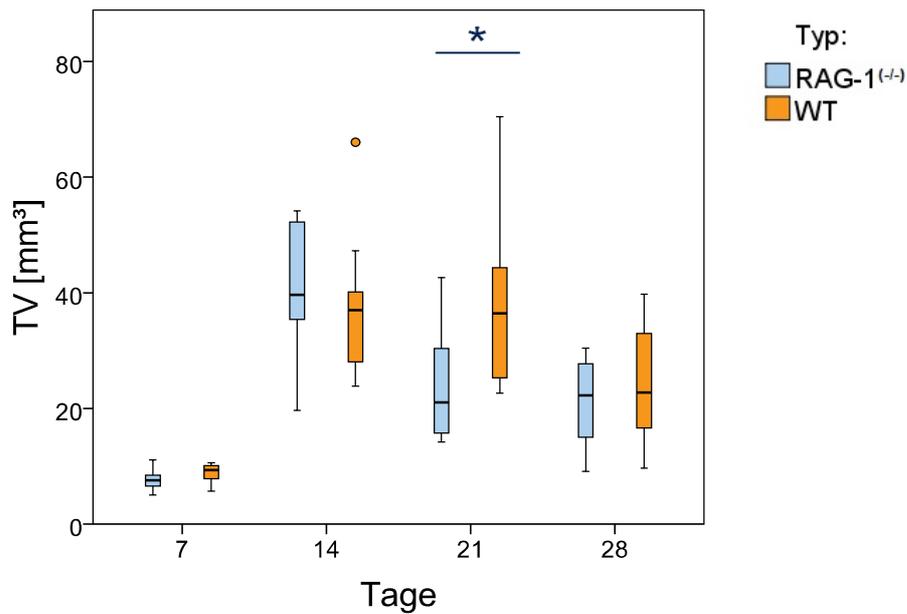


Abbildung 28: Totales Kallusvolumen, \*p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

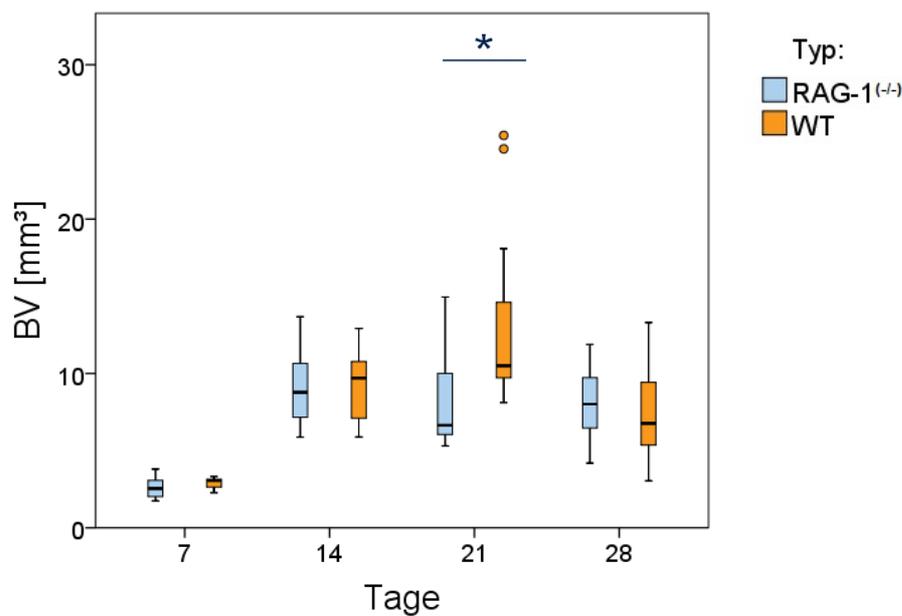


Abbildung 29: Knöchernes Kallusvolumen, \*p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

Es zeigen sich hier keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, außer am 21. Tag: Hier ist sowohl das totale Volumen als auch das Knochenvolumen im WT signifikant höher.

Im Verlauf ist in Bezug auf das Kallusvolumen in beiden Gruppen gleichermaßen eine rasante Zunahme zwischen Tag 7 und Tag 14 auffällig, danach ist eine Abnahme zu beobachten. Auch das Knochenvolumen nimmt zur gleichen Zeit deutlich zu und stagniert anschließend auf ungefähr der gleichen Ebene. Der WT verhält sich hier anders und zeigt zwischen Tag 14 und 21 eine weitere Zunahme,

um dann an Tag 28 ein niedrigeres Knochenvolumen zu präsentieren. Letzteres lässt sich durch ein Kallusremodelling erklären. Das Knochenvolumen bezogen auf das Gesamtkallusvolumen (BV/TV) sieht wie folgt aus:

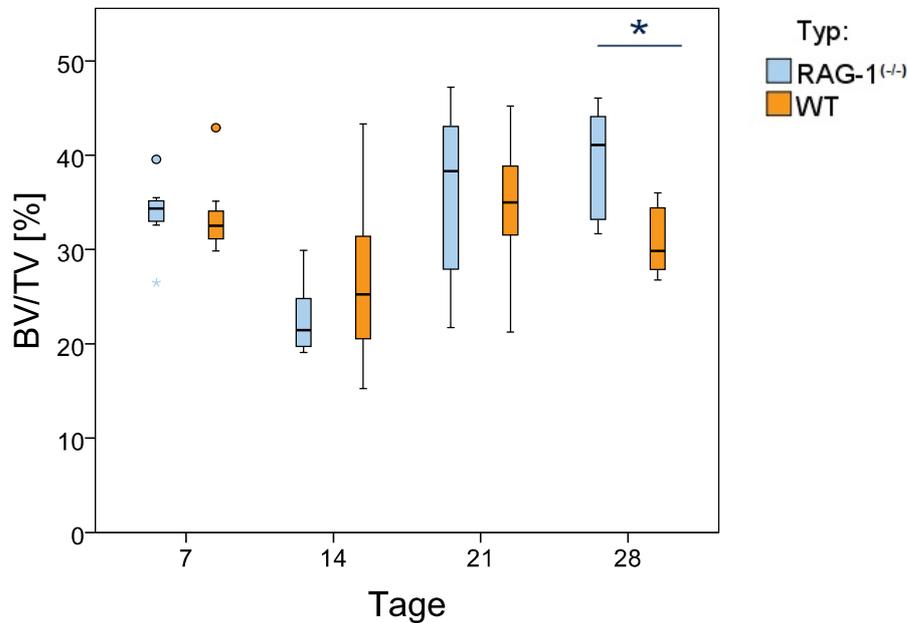


Abbildung 30: Knöchernes Kallusvolumen geteilt durch totales Kallusvolumen, \* $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test)

Hier ist gut zu sehen, wie sich das Verhältnis von Knochen und Gesamtvolumen zwischen Tag 7 und 14 zunächst verringert, da der Frakturspalt zunächst mit Knorpel und Bindegewebe überbrückt wird. Danach nimmt die Mineralisierung zu. Dies ist beim RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Tier stärker der Fall als im Wildtyp. Danach verhalten sich die Gruppen grundsätzlich unterschiedlich. Während der Knochenanteil in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe weiter zunimmt, fällt der Knochenanteil im WT zwischen Tag 21 und 28 deutlich ab. Dies zeigt, dass sich das Remodelling in den beiden Gruppen unterschiedlich gestaltet. Dieser Eindruck wird dadurch unterstrichen, dass an Tag 28 der Knochenanteil im RAG-1<sup>(-/-)</sup> signifikant höher ist als beim Wildtyp. An den anderen Messzeitpunkten liegt kein signifikanter Unterschied vor.

Zwei weitere Parameter sind auch hier die Werte BMD und TMD. Bei der totalen Dichte des Kallus (TMD) zeigt sich über die gesamte Messung hin ein kontinuierlicher Anstieg. Hierbei gibt es keinen Unterschied zwischen den Gruppen, nur die Standardabweichung der Wildtyp-Gruppe ist größer. An Tag 7 gibt es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Der p-Wert liegt hier bei  $p = 0,083$ , womit statistisch von einem Trend gesprochen werden kann. Wahrscheinlich wäre mit einer umfangreicheren Gruppengröße ein

#### 4. Ergebnisse

Unterschied festzustellen. Somit zeigt sich eine leicht erhöhte Dichte in der Gruppe der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Tiere:

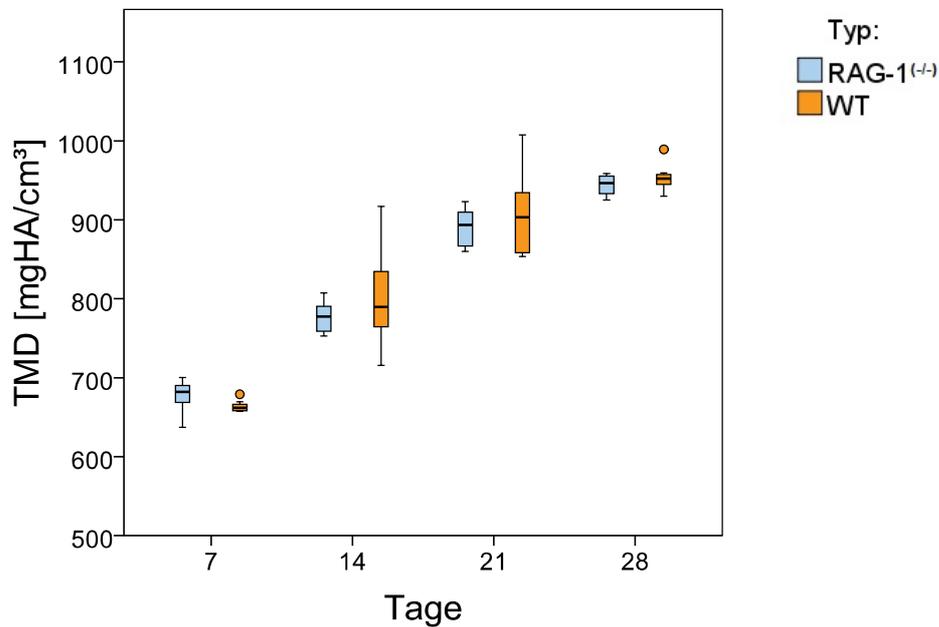


Abbildung 31: Mittlere Mineralisierungsdichte

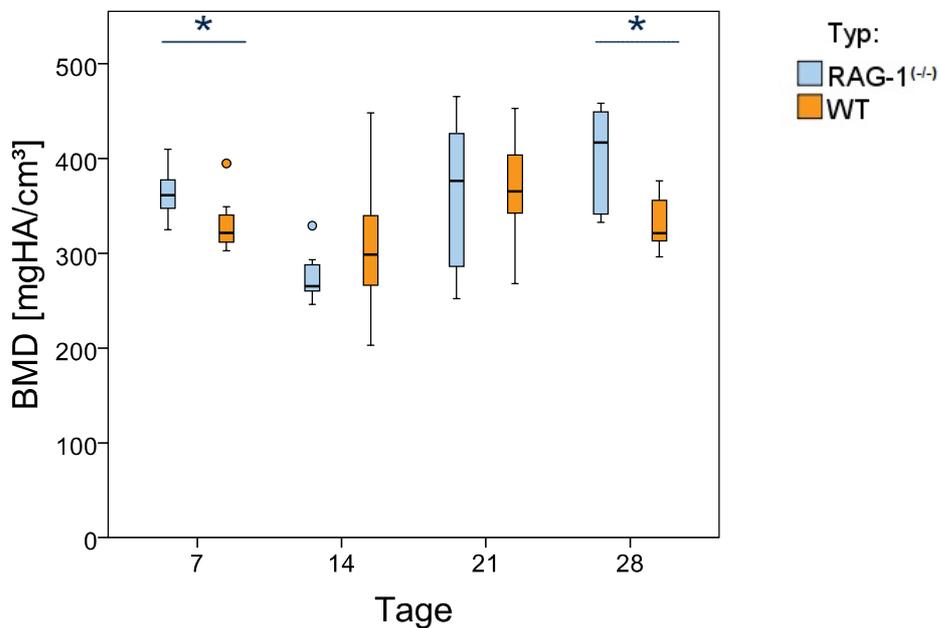


Abbildung 32: Mineralisierungsdichte des knöchernen Kallus, \*p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

Betrachtet man die Knochendichte über den gesamten Verlauf, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei dem Parameter BV/TV, was daran liegt, dass eine hohe mittlere Dichte des mineralisierten Gewebes für einen hohen Knochenanteil im Kallusvolumen spricht. Auch hier zeigt sich an Tag 28 in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe eine

#### 4. Ergebnisse

signifikant höhere Knochendichte. An Tag 7 ist die mittlere Mineralisierungsdichte der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe ebenfalls signifikant höher. Die folgende Tabelle zeigt alle Daten der Auswertung mit dem  $\mu$ CT im Überblick:

**Tabelle 7: Ergebnisse des  $\mu$ CT (Signifikante Werte sind rot markiert, gelbe Werte weisen ein  $p \leq 0,1$  auf)**

Tage	Perzentilen	TV [mm <sup>3</sup> ]		BV [mm <sup>3</sup> ]		BV/TV [%]		TMD [mgHA/cm <sup>3</sup> ]		BMD [mgHAcm <sup>3</sup> ]	
		RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT
7	25% Quartil	6,26	7,16	2,01	2,54	32,79	30,98	664,41	658,04	343,21	308,92
	50% Quartil	7,58	9,32	2,54	3,06	34,36	32,53	682,08	661,80	361,45	321,62
	75% Quartil	8,78	10,30	3,34	3,16	35,34	34,61	690,14	668,00	378,72	344,83
	p-Wert	0,20		0,33		0,28		0,08		0,02	
14	25% Quartil	34,85	27,62	6,91	7,06	19,56	19,42	756,54	761,09	259,97	259,32
	50% Quartil	39,63	37,01	8,78	9,70	21,46	25,25	777,42	789,61	265,36	298,54
	75% Quartil	52,78	40,15	10,86	10,80	25,02	32,02	791,01	836,04	290,55	340,28
	p-Wert	0,29		0,98		0,29		0,27		0,19	
21	25% Quartil	15,69	25,23	5,89	9,70	27,73	30,49	865,80	857,49	284,92	335,63
	50% Quartil	21,02	36,45	6,65	10,49	38,31	35,00	893,45	903,13	376,46	365,52
	75% Quartil	33,24	46,14	10,38	14,69	43,87	38,93	911,83	943,27	435,45	405,74
	p-Wert	0,01		0,01		0,52		0,85		0,88	
28	25% Quartil	14,93	16,42	6,44	4,96	32,95	27,76	931,42	943,09	338,50	310,89
	50% Quartil	22,28	22,77	8,01	6,77	41,08	29,86	946,40	952,29	416,89	321,20
	75% Quartil	28,20	35,70	9,77	10,33	44,27	34,53	955,97	958,39	453,41	356,48
	p-Wert	0,57		0,57		0,02		0,38		0,02	

### 4.5 Ergebnisse der biomechanischen Testung

Wie bereits beschrieben, wurde während der Testung ein Spiralbruch erzeugt, der eine erneute Fraktur in dem Kallus herbei führte (Abb.32). Dabei wurden die drei Parameter Torsionsmoment, Steifigkeit und Versagensenergie bestimmt. Diese Werte wurden mit den Ergebnissen der kontralateralen Seite normalisiert.

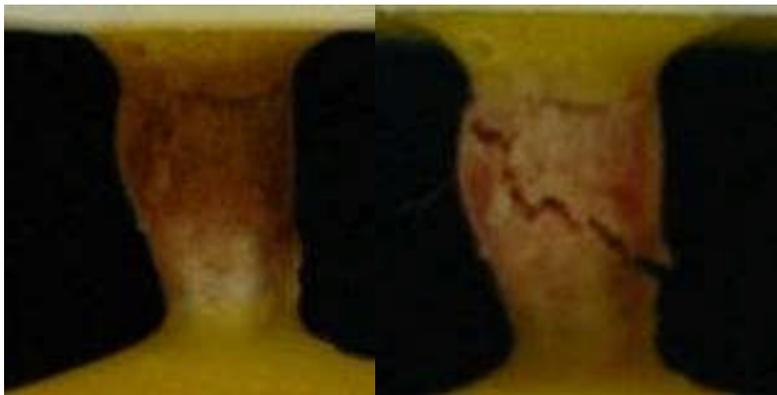


Abbildung 33: Erzeugung eines Torsionsbruchs durch den Kallus

Die Testungen der frakturierten Knochen zeigten einen Verlauf, der nicht so linear war, wie der der kontralateralen Seite. Dies erschwerte die Bestimmung der Steifigkeit. Hier sollen exemplarisch die Kurven der frakturierten Knochen 28 Tage nach der Operation dargestellt werden:

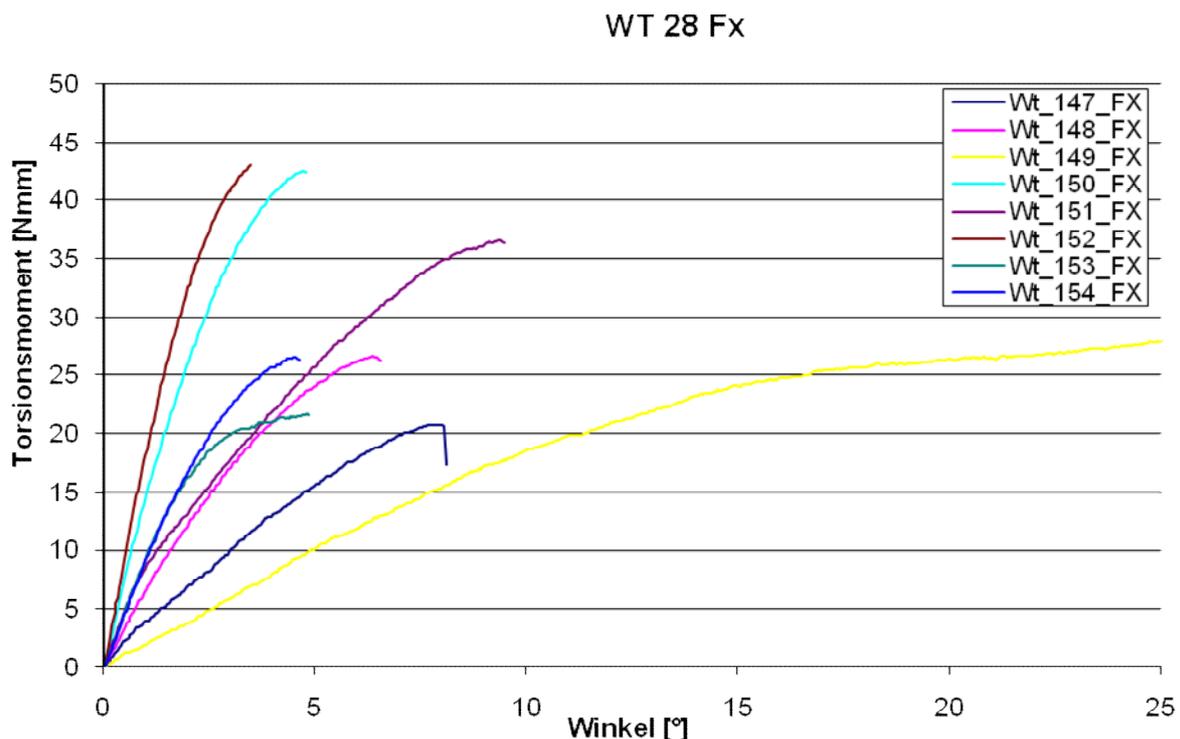


Abbildung 34: Biomechanische Testung der frakturierten Wildtypknochen 28 Tage post-OP

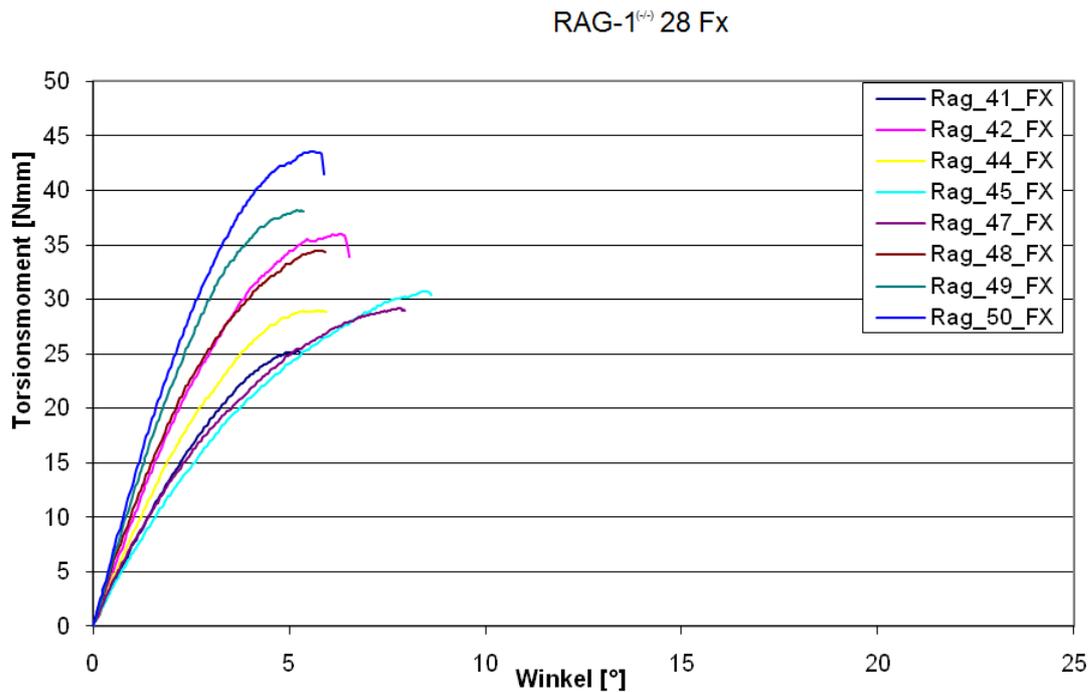


Abbildung 35: Biomechanische Testung der Rag-1<sup>(+/+)</sup>-Knochen 28 Tage post-OP

Anhand der Messkurven ist zu erkennen, dass die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe eher ein höheres Torsionsmoment erzielt als die WT Gruppe. Auch die Kurven weisen einen steileren Anstieg auf, was für eine höhere Steifigkeit sprechen würde. Nach der Normalisierung der Werte durch die intakte Gegenseite kommt man zu folgenden Ergebnissen:

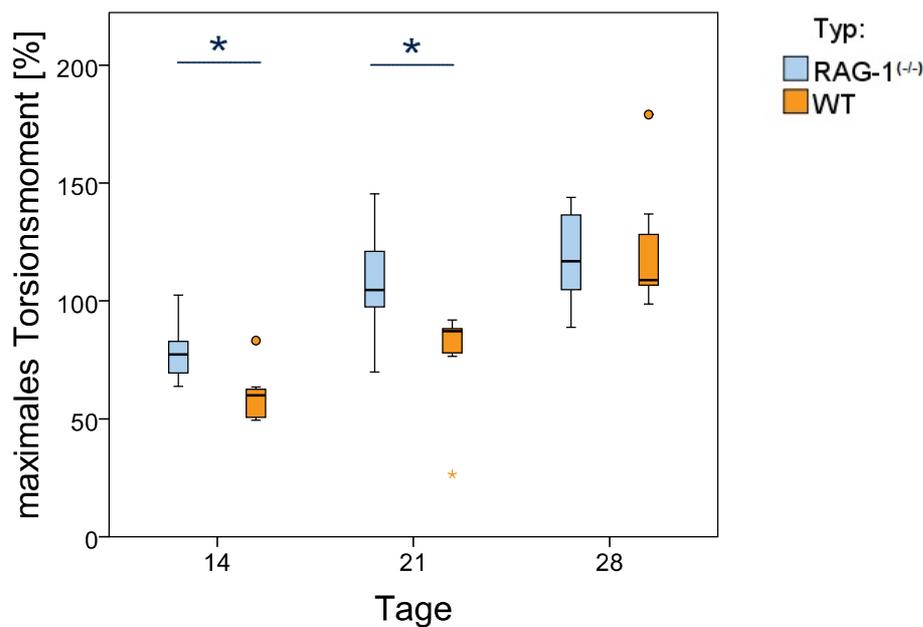


Abbildung 36: Relatives maximales Torsionsmoment, \*p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

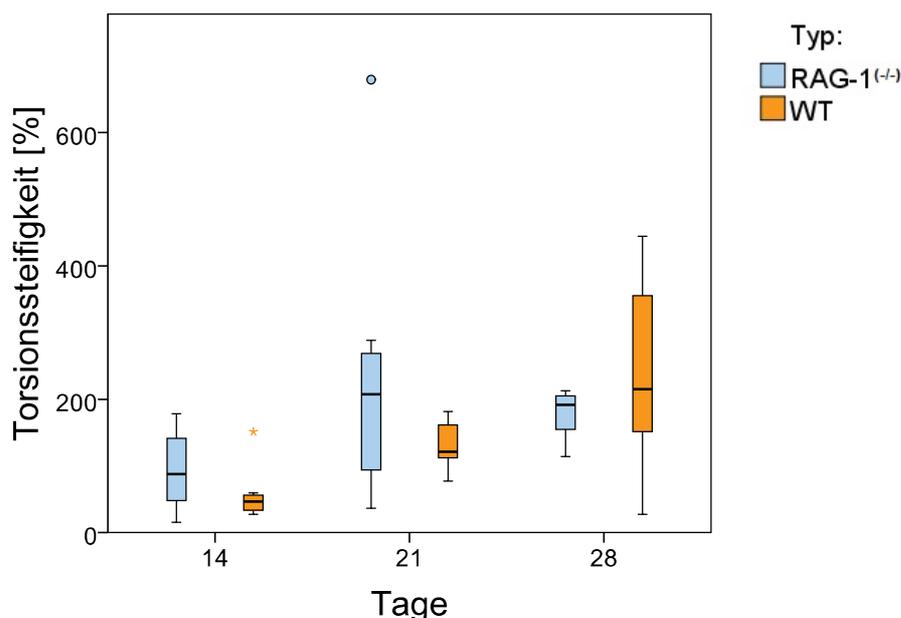


Abbildung 37: Relative Torsionssteifigkeit

Hier zeigen sich interessanterweise keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Steifigkeiten der beiden Untersuchungsgruppen. Die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe weist jedoch 14 und 21 Tage nach Fraktur ein signifikant höheres Torsionsmoment auf. Zum Zeitpunkt von 28 Tagen gibt es dahingehend keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In Bezug auf die Energie, die nötig war, um ein Versagen der Knochen herbeizuführen, sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Die Ergebnisse sind in tabellarischer Form dargestellt:

Tabelle 8: Ergebnisse der biomechanischen Testung

Tage	Perzentilen	maximales Torsionsmoment [%]		Torsionssteifigkeit [%]		Versagensenergie [%]	
		RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT	RAG-1 <sup>(-/-)</sup>	WT
14	25% Quartil	69,15	50,41	38,81	33,31	66,64	55,52
	50% Quartil	12,14	59,95	87,60	46,66	91,02	94,32
	75% Quartil	83,55	62,99	149,78	57,98	144,55	144,23
	p-Wert	0,01		0,20		0,88	
21	25% Quartil	95,34	77,17	76,26	110,53	92,20	88,10
	50% Quartil	104,63	87,14	207,41	121,15	132,01	125,72
	75% Quartil	121,78	88,45	278,75	167,90	140,63	164,27
	p-Wert	0,01		0,23		0,72	
28	25% Quartil	102,20	105,99	143,13	136,55	94,09	70,34
	50% Quartil	116,82	108,83	191,61	215,08	103,24	79,44
	75% Quartil	137,63	132,52	208,72	365,84	130,03	104,76
	p-Wert	0,65		0,23		0,16	

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **5.1.1 Tiermodell**

Will man die Frakturheilung optimieren und regenerative Prozesse des Knochens nachvollziehen, lassen sich nur wenige Fragestellungen allein durch klinische Untersuchungen lösen. Für die Hypothese dieser Arbeit müssen vergleichbare Bedingungen zwischen den Gruppen herrschen. Es ist deshalb nötig, äußere Störfaktoren auszuschalten, da das Fehlen von immunkompetenten Lymphozyten den einzigen Unterschied zwischen den beiden Gruppen darstellen soll. Beobachtungen bei Menschen mit Immuninsuffizienz wären nie miteinander hinsichtlich dieser Fragestellung vergleichbar. Es ist bereits bekannt, dass sich bei Menschen mit einer Immunsuppression durch HIV-Infektion und einer verminderten T-Helfer-Zell-Zahl die Frakturheilung ebenfalls verzögert<sup>91</sup>. Dies ist allerdings auch durch die retrovirale Therapie bedingt, welche ebenfalls mit einer erniedrigten Mineralisierungsdichte des Knochens einhergeht<sup>92-95</sup>. Aus diesem Grund ist es nötig, die Frakturheilung bei Immuninsuffizienz auf ein Tiermodell zu übertragen.

Das Problem bei einer tierexperimentellen Studie ist jedoch, inwiefern die gewonnenen Erkenntnisse sich tatsächlich auf den Menschen übertragen lassen. Die Maus als Versuchstier weist eine nahezu kritische Größe in Bezug auf die muskuloskeletale Anatomie auf. Das chirurgische Vorgehen ist anspruchsvoll. Dennoch wird sie häufig als Versuchstier eingesetzt. Das erste Modell zur Frakturheilung wurde 1992 etabliert<sup>96</sup>.

Der Vorteil der Maus gegenüber anderen kleinen Versuchstieren, wie z.B. Ratten, ist, dass zahlreiche Knock-Out Stämme existieren, mit denen sich biologische Möglichkeiten ergeben, die mit größeren Säugetieren nicht möglich wären<sup>97</sup>. Es existiert keine andere Tierspezies mit Knock-Out Stämmen, in denen keine reifen Lymphozyten existieren.

Ein weiterer Vorteil der Maus ist die günstige Anschaffung, Haltung und die einfache Handhabung der Versuchstiere. Auch lassen sich Ergebnisse in kürzerer Zeit messen, da die Heilungsverläufe im Vergleich zum Menschen beschleunigt ablaufen. Die sogenannten Standzeiten sind deutlich kürzer.

Ein entscheidender Nachteil der Maus ist jedoch, dass sich Mäuseknochen histologisch von Menschenknochen unterscheiden. Der Mäuseknochen besitzt kein Haverssystem und es treten nur Primärosteone auf<sup>98</sup>. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass bei der kurzen Lebensspanne der Maus Osteone nicht ersetzt werden und dass es bei der Maus nicht die Notwendigkeit eines intensiven Mineralaustausches mit dem Skelett gibt<sup>99</sup>.

Ein weiterer Nachteil bei dem Vergleich eines Wildtypen mit einem „immunologischen Knock-Out-Modell“ ist, dass ein KO-Stamm immer ein stark verändertes Immunsystem besitzt, welches sich bei der Entwicklung der Tiere an diesen Umstand anpasst. Dies erschwert den Transfer der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse können somit nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Die Arbeit steht am Beginn eines sich neu entwickelnden Forschungsfeldes und dient somit der Grundlagenforschung. Dies rechtfertigt die Verwendung der Maus als Versuchstier. Die Grundzüge der Frakturheilung zwischen Mensch und Maus sind jedoch sehr ähnlich. So ergeben sich durch diese Arbeit Rückschlüsse auf die Frakturheilung beim Menschen unter Immunsuppression.

### **5.1.2 Histologische Auswertung**

Es wurden repräsentative Schnitte durch den Knochen in transversaler Ebene erstellt. Ein Kritikpunkt bei dem Vergleich der beiden Gruppen ist jedoch, dass nur jeweils ein Schnitt pro Knochen in die Auswertung einging. Es wurde bei der Herstellung der Schnitte versucht, die Mitte des jeweiligen Knochens zu treffen, um damit vergleichbare Verhältnisse zu schaffen. Dies konnte bei den Versuchen realisiert werden. Außerdem wurden auch Schnitte anderer Ebenen mikroskopisch betrachtet, um strukturelle Besonderheiten der Knochen nicht zu übersehen und letztlich vergleichbare Schnitte zu haben.

Die gewählte Methodik zur Bestimmung der Region of Interest wurde eigens für den Vergleich der beiden Gruppen entwickelt. Es stellt sich die Frage, ob die gewählte Methodik überhaupt in der Lage war, Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu messen. Es musste für die Analyse der Knochen ein Mittel gefunden werden, bei den Schnitten eine vergleichbare Region of Interest zu definieren. Dies war problematisch, da sich nicht alle proximalen Metaphysen in den gleichen

Größenordnungen und Dimensionen darstellten. Der Grund hierfür war, dass nicht alle Knochen in exakt der gleichen Ebene mit dem Mikrotom getroffen werden konnten, auch besaß jeder Knochen individuelle Besonderheiten. Jedoch wurden die ermittelten Werte immer durch die Größe der vorliegenden ROI normalisiert, was diesen Effekt ausglich. Da jedoch nicht alle Bereiche der Metaphyse die gleichen Trabekeleigenschaften besitzen, stellt dies jedoch eine mögliche Fehlerquelle dar und ist ein Kritikpunkt an der verwendeten Methode.

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass für die Untersuchung ausschließlich die Femora benutzt wurden, bei Betrachtungen von nativen Knochenstrukturen werden jedoch häufig Wirbelkörper auf ihre Spongiosaarchitektur untersucht<sup>100</sup>. Dies wurde in dieser Studie nicht durchgeführt, da eine Fraktur des Femurs gesetzt wurde und gerade dieser Knochen Gegenstand der Betrachtung war. Es war bereits aus einer anderen Quelle der Umstand bekannt, dass sich die beiden Mäusestämme nicht unterscheiden und die Untersuchung der Femora diene außerdem der Überprüfung, ob die explizit hier vorliegenden Knochen keinen Unterschied aufwiesen<sup>43</sup>.

Die eigentliche histologische Auswertung erfolgte histomorphometrisch. Dies erleichtert und objektiviert die Aussage über Unterschiede zwischen Knochenstrukturen<sup>101</sup>. So konnte anhand der Farbunterschiede und der geometrischen Strukturen eine objektive Aussage zu den einzelnen Metaphysenbereichen getroffen werden. Damit wurde ein neues effektives Analysesystem geschaffen, um die Metaphysen der Mäusephänotypen zu vergleichen.

### 5.1.3 Frakturmodell und biomechanische Testung

Es existieren vielerlei Frakturmodelle, die Frakturen an Mäusen applizieren. Dabei wird entweder das Femur, Rippen oder die Tibia verwendet<sup>96,102,103</sup>. Rippenfrakturen an Mäusen können nicht dazu eingesetzt werden, biomechanische Tests durchzuführen. Jedoch lassen sich mit diesen Modellen Genexpressionen messen<sup>104,105</sup>. Die wichtigste Funktion des Knochens ist seine Stabilität. Die erlangte Stabilität nach einer Heilung sollte deshalb immer Teil eines Frakturmodells sein.

Mit den tibialen Frakturmodellen lassen sich mechanische Tests durchführen. Hierbei werden vor allem 4-Punkt-Biege-Tests beschrieben<sup>102</sup>. Diese Tests bergen eine gewisse Fehlerquelle, da ein Knochen benötigt wird, der eine ausreichende Länge besitzt, um Messfehler zu minimieren<sup>106</sup>. 3-Punkt-Biege-Testungen sind für Heilungsverläufe grundsätzlich ungeeignet, weil auf das Frakturzentrum eine zu

große Last wirkt<sup>12</sup>. Die Tibia weist keine gerade Form auf, und die Fibula stellt eine Störgröße bei Rotationstests dar. Aus diesem Grund ist das Femur besser für Torsionstests geeignet, da es sich hierbei um einen langen und geraden Knochen handelt. Daher wurde in dieser Studie die vielfach eingesetzte Frakturmethode nach Kakar et al. mit einer 3-Punkt-Biege-Fraktur und einem anschließenden Torsionstest verwendet<sup>89</sup>.

Ein berechtigter Kritikpunkt einer Biegefraktur ist, dass die Streuung der Daten relativ groß werden kann. Im Gegensatz zu einem Osteotomiemodell sind hier die Art der Fraktur, z.B. die Anzahl der Fragmente, und die Größe der Dislokation, sehr variabel<sup>102</sup>. Während der Operationen wurde versucht, diese Variablen gering zu halten. Selbstverständlich sind auch beide Versuchsgruppen zu gleichen Teilen von diesem Umstand betroffen. Für eine Biegefraktur spricht allerdings, dass es eine „natürlichere“ Art des Knochenbruchs ist. Dazu lässt sie sich an der Maus einfacher, unkomplizierter, schneller realisieren.

Bei den durchgeführten Versuchen ergab sich jedoch teilweise eine große Streuung in den erhobenen Parametern, dagegen war sie an manchen Zeitpunkten eher gering. Auch kam es vor, dass an einem bestimmten Zeitpunkt die Ergebnisse in einer Gruppe nicht weit auseinander lagen, in der zu vergleichenden Gruppe allerdings schon. In der strukturellen Analyse beispielsweise weist das BV/TV (Bone Volume/Total Volume) der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen an Tag 21 eine sehr hohe Streuung auf und ähnliches ist der Fall bei der biomechanischen Testung der Torsionssteifigkeit der Wildtyp-Knochen an Tag 28 (siehe Seite 44 und 48). Die Frage an dieser Stelle ist nun, ob dieser Umstand von der Frakturmethode herrührt, an der jeweiligen Messmethode liegt oder aber vorhanden und reproduzierbar ist. Die große Streuung ist zu einem nicht unerheblichen Teil der Frakturmethode geschuldet. Nicht jeder Knochen bricht zwischen den 3 Punkten auf exakt dieselbe Art. Von diesem Effekt sollten aber alle Tiere zu gleichen Teilen betroffen sein. Es erklärt nicht, warum die Streuung in einer Gruppe zu einem Zeitpunkt groß ist, in der Vergleichsgruppe aber nicht, oder warum die Werte zu einem frühen Messzeitpunkt weniger streuen als zu einem späten, obwohl sich hier Unterschiede in den Frakturen nivelliert haben sollten. Eine kausale Erklärung für diese Umstände kann an dieser Stelle nicht gegeben werden und muss für jede entsprechende Gruppe gesondert diskutiert oder hingenommen werden. Der Nachteil der gewählten Methode ist aber

eindeutig die teilweise große Streuung der Werte und die damit verbundene erschwerte Interpretierbarkeit.

Bei der Fraktur musste ein Marknagel eingesetzt werden, in Form eines kleinen Pins. Ohne einen Marknagel ließe sich keine vergleichbare Heilung zwischen den einzelnen Tieren messen, da die Frakturrenden direkt nach dem Setzen der Fraktur frei gegeneinander beweglich wären und die Heilung nicht standardisiert ablaufen könnte<sup>89</sup>. Eine Überlegung war, ob dieser Pin während der mechanischen Testung in dem Knochen belassen werden konnte oder entfernt werden sollte. Zum Zeitpunkt der Testung war der Frakturspalt bereits durch neu gebildeten Knochen überbrückt. Da gerade dieser neu gebildete Knochen untersucht werden sollte, musste der Pin entfernt werden. Einerseits befindet sich der Pin in der Rotationsachse und stellt somit rein theoretisch kein Problem bei der Testung dar<sup>12</sup>. Bei der hier vorliegenden Studie wurde jedoch der Pin bereits vor dem Scan mit dem  $\mu$ CT entfernt, da sich ansonsten hier Artefakte bildeten. Der Pin wurde vorsichtig aus dem Knochen entfernt, und der Knochen war zum Zeitpunkt der Testung bereits soweit stabil, dass dies kein Problem darstellte. Es bestand daher nicht die Gefahr, dass der Pin letztendlich doch mit der biomechanischen Testung interferierte.

Ein anderer Aspekt, den es zu diskutieren gilt ist, dass bei der verwendeten Biegefraktur die Stabilisierung mittels eines Pins nicht ganz unkompliziert ist. So stabilisiert der Marknagel die Fraktur zwar, da er jedoch nur in den Markraum „gesteckt“ wird, füllt er diesen nicht komplett aus. Dies führt teilweise zu einer gewissen Restbeweglichkeit der Frakturrenden. Hieraus resultiert dementsprechend eine vermehrte Kallusbildung. Bei einer vermehrten Kallusbildung laufen inflammatorische Signale stärker ab als bei einer komplett rigide fixierten Fraktur mit kleiner Kallusbildung oder direkter Knochenheilung. Diesen Aspekt gilt es in der weiteren Diskussion zu berücksichtigen.

Ein weiterer Störfaktor, den es zu erwähnen gilt, ist das Einfrieren der Knochen kurz nach der Tötung der Tiere und der Entnahme der Knochen. Dies war nötig, da die Analysegeräte nicht immer sofort nach der Knochenentnahme zur Verfügung standen. Das Einfrieren verändert den Knochen in seiner Struktur, fügt ihm womöglich Schäden zu und verändert die mechanischen Eigenschaften. Es ist allerdings zu betonen, dass mit allen Knochen gleich verfahren wurde, doch stellt dies eine mögliche Fehlerquelle dar.

### 5.1.4 Mikro-Computertomograph

Der Vorteil des  $\mu$ CTs ist, dass es sehr sensitiv Unterschiede zwischen einzelnen Knochenstrukturen detektieren kann<sup>107</sup>. Die heute angewandten Auflösungen von 10,5 $\mu$ m sind verglichen mit anderen bildgebenden Verfahren überragend hoch. Dazu ist es möglich, den gesamten Kallus zu analysieren, während in der Histologie nur einzelne Schnitte berücksichtigt werden<sup>108</sup>. Oftmals stellen sich aus diesem Grund Unterschiede in der Knochenstruktur am sensitivsten mit dem  $\mu$ CT dar. In dieser Studie konnten so anhand eines festen Schemas zur Evaluierung der Knochen kleine Unterschiede zwischen den Gruppen herausgearbeitet werden.

Ein Problem bei der hier eingesetzten Technik war, dass der Kallus sich bei einem Biegemodell variabel in der Längenausdehnung bildet. Für die  $\mu$ CT-Analyse wurde allerdings immer ein nahezu gleich großer Bereich des Kallus evaluiert. Aus diesem Grund wurde der Faktor der variablen Längenausdehnung nicht in der Analyse des Kallus berücksichtigt. Dies stellt unter Umständen jedoch eine Fehlerquelle dar.

Ein anderes Problem stellte die notwendige Konturierung der Knochenstrukturen dar. Sie erfolgte per Hand und computergestützt. Dabei bestand die Möglichkeit, dass bei der Konturierung nicht gleichbleibend gearbeitet wurde oder dass Konturen falsch eingezeichnet wurden. Pro frakturierten Knochen ist es nötig, 630 Innenkonturen und 630 Außenkonturen einzuzichnen. Es erfolgten mehrfach manuelle Kontrollen, um eine falsche Einzeichnung auszuschließen, doch auch dies stellt eine mögliche Fehlerquelle dar.

## 5.2 Ergebnisse

Die in der Studie gewonnenen Ergebnisse überraschen, da sie nicht mit der Hypothese übereinstimmen. Es fällt grundsätzlich auf, dass die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen keine beeinträchtigte Heilung aufweisen. Die Heilungsergebnisse stellen sich zu allen Zeitpunkten im Vergleich zum Wildtyp qualitativ gleichwertig oder besser dar. Dies ist eine sehr interessante Beobachtung im Bezug auf die inflammatorische Reaktion und deren Bedeutung für die Knochenheilung. Somit ist die Frakturheilung der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus in unserem Experiment beschleunigt.

Die Frage an dieser Stelle ist, was mögliche Gründe für diese Beobachtung sein können. Zunächst muss hinterfragt werden, ob die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus grundsätzlich über eine beschleunigte Frakturheilung verfügt, oder nur bei dem hier verwendeten Frakturmodell. Wie bereits oben beschrieben wurde, wurde bei unserem

Frakturmodell eine Stabilisierung verwendet, die nicht komplett die Frakturrenden gegeneinander stabilisiert. Dies erkennt man an den großen Kallusvolumina, welche erreicht werden um die Fraktur letztlich zu stabilisieren. Es muss diskutiert werden, ob gerade aus diesem Grund der Wildtyp einer überschießenden Inflammation durch eine nicht ausreichende Stabilisierung ausgesetzt ist, und somit die Heilung verzögert wird. Da die inflammatorische Reaktion in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus unterdrückt ist, läuft hier die Heilung eventuell lediglich normal im Vergleich zum Wildtyp, aber nicht beschleunigt ab. Der Unterschied zwischen diesen beiden Aussagen ließe sich nur mit einer erneuten Durchführung des Versuchs mit einer komplett rigide fixierten Fraktur abschließend klären. Hier wäre dann die strukturelle Untersuchung des Kallus aufgrund der geringen Größe um ein vielfaches schwieriger.

Letztlich ist somit davon auszugehen, dass bei der hier beobachteten Heilung eine Mischung aus generell verbesserter Knochenheilung Heilung und Unterdrückung einer überschießenden Inflammation, welche der Art der Frakturstabilisierung geschuldet ist, vorliegt.

### 5.2.1 Native Mäuseknochen

Hier zeigt sich, wie anfangs erwartet, weder im  $\mu$ CT, noch in der biomechanischen Testung und der histologischen Untersuchung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Es ist jedoch deutlich, dass die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen mit ihrem Knochenanteil und den biomechanischen Eigenschaften fast immer über den WT-Knochen liegen, dies jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die beiden Phänotypen unterscheiden sich nicht in ihrer Knochenbeschaffenheit im Alter von 8 Wochen voneinander. Ohne reife Lymphozyten scheint sich jedoch ein leichter Trend zu etwas erhöhtem Knochenwachstum zu ergeben. Es wurde vorher bereits erwähnt, dass andere Autoren in der Vergangenheit zu ähnlichen Ergebnissen gekommen sind, jedoch zu früheren Entwicklungszeitpunkten der Mäuse. Im Alter von 2 Wochen unterscheiden sich die beiden Gruppen in keinem der erhobenen Parameter voneinander<sup>43</sup>. Nun konnte ergänzend ein Unterschied der Knochenstruktur bei einem Mausalter von 8 Wochen widerlegt werden.

Die Untersuchung von nur 8 Knochen lässt die Möglichkeit offen, dass sich signifikante Ergebnisse mit einer höheren Probenzahl ergeben. In den  $\mu$ CT-Untersuchungen wurde bewusst die Knochenstruktur der mittleren Diaphyse untersucht, da auch bei den Untersuchungen der Frakturen die Knochenstruktur in

diesem Bereich untersucht werden sollte, anstatt sie in anderen Regionen wie dem proximalen Femur oder Wirbelkörpern zu messen.

Interessanterweise offenbaren viele andere Tiere mit Immundefekten deutliche Veränderungen in der Knochenstruktur. Dabei scheint nicht nur die Veränderung im Immunsystem von Bedeutung zu sein, sondern auch die Methode, mit der sie erzeugt wurde. Die Lymphozytenentwicklung lässt sich durch viele Mechanismen unterdrücken. Bekanntermaßen hat die Pax5<sup>(-/-)</sup> Maus eine Osteopenie, obwohl die gleichen Zelllinien ausgeknockt sind wie bei der RAG-1<sup>(-/-)</sup> Maus<sup>43</sup>. Man weiß bis heute nicht, warum dies der Fall ist. Zukünftige Fragestellungen sind daher, warum die Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen die Knochenentwicklung beeinflussen, unter anderen aber nicht.

### 5.2.2 Heilungsverläufe

#### 5.2.2.1 Mikro-Computertomograph

Im  $\mu$ CT zeigt sich ein Vorsprung in der Heilung der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus. Die mittlere Mineralisierungsdichte des Knochens zeigt sich an Tag 7 und 28 signifikant erhöht gegenüber dem Wildtyp (Abb. 31). Dies spricht für eine schnellere Mineralisierung zu Beginn der Heilung. Erstaunlich ist auch, dass an Tag 14 und 21 sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen darstellen, jedoch an Tag 28. Dies entspricht nicht der ursprünglichen Hypothese, nach der sich Veränderung vor allem zu Beginn der Messung zeigen sollten. Der Unterschied wird ebenso durch ein erhöhtes BV/TV an Tag 28 in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe unterstrichen (Abb. 30). Damit wird deutlich, dass die Lymphozyten-Knock-Out-Tiere auch über ein verändertes Remodelling verfügen, was in dieser Form nicht zu erwarten war. Die Knochenumbauvorgänge scheinen in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus insofern beschleunigt zu sein, als dass der Kallus in der Spätphase kompakter und dichter geformt ist. Noch beeindruckender ist die Tatsache, dass im Gegensatz zum Wildtyp die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe in den BV/TV-Werten sogar von Tag 21 zu 28 noch leicht ansteigt. Hier verhalten sich beide Gruppen unterschiedlich. Dies zeigt die beschleunigten Remodelling-Eigenschaften bei einem Fehlen der Lymphozyten. Ein interessanter Aspekt, an dem die Heilung gut erkennbar ist, ist der Anstieg der Kallusgesamtdichte in beiden Gruppen während des Heilungsverlaufes (Abb. 31). Es zeigt die kontinuierliche Bildung neuen Knochens über den gesamten Verlauf des

Experiments. In Abbildung 31 ist ebenfalls zu erkennen, dass sich die Mineralisierungsdichten in den beiden Gruppen nicht signifikant unterscheiden. Jedoch liegt an Tag 7 der p-Wert nah an der Signifikanzgrenze mit  $p=0,08$ . Mit einer größeren Gruppengröße ließe sich hier eventuell ein Unterschied feststellen. Dies würde für einen Unterschied in der Anfangsphase der Heilung sprechen, mit einer schnelleren Heilung der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe. Hier kann nur von einem Trend in diese Richtung gesprochen werden.

Das Kallusvolumen (Abb. 28) steigt zwischen Tag 7 und 14 in beiden Gruppen rasant an, danach fällt es in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe signifikant stärker ab als in der Wildtyp-Gruppe, um sich dann schließlich an Tag 28 auf gleiche Verhältnisse einzupendeln. Eine ähnliche Beobachtung lässt sich auch in der Gruppe des knöchernen Kallusvolumens machen (Abb. 29). Auch hier sind die Werte der WT-Gruppe signifikant gegenüber der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe erhöht, an allen anderen Messzeitpunkten jedoch nicht. Der Wert der Wildtyp-Gruppe an Tag 21 sticht im Vergleich zu allen anderen Messzeitpunkten besonders hervor. Normalerweise steigt das totale und knöcherne Volumen zwischen Tag 14 und 21 nur noch dezent an<sup>89</sup>. Für diese Beobachtung, die ungewöhnlich ist, war es schwer, eine eindeutige Erklärung zu finden. Am ehesten lassen sich die Veränderungen als Anfang des beschleunigten Knochenumbaus der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus deuten. Während der WT noch über einen längeren Zeitraum Bindegewebssubstanz und Knochenmaterial in den Kallus einlagert, ist dies bei den RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Knochen nicht mehr der Fall, hier liegt dafür bereits ein deutlich stabileres Ergebnis vor, bei kleineren Kallusgrößen.

Jedoch sind diese Werte mit Sorgfalt zu betrachten, denn es handelt sich bei beiden Parametern um absolute Werte. Der Anteil des Knochens (BV/TV) unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Gruppen an Tag 21. Deshalb sind beide Parameter zwar strukturell interessant, liefern aber keinen endgültigen Hinweis auf einen Unterschied in der Heilung. Es scheint so, als würden die Umbauvorgänge des Kallus im Wildtyp anders ablaufen als in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe. Im Wildtyp wird länger ein voluminöser aber im Verhältnis zum Knochen ähnlicher Kallus aufrecht erhalten, während in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe der Kallus schneller abgebaut wird, und eher die ursprüngliche Knochenstruktur erreicht wird. Bei Abwesenheit des adaptiven Immunsystems werden strukturelle Umbauten am Knochen somit beschleunigt.

All diese Beobachtungen zeigen, dass die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe - ausgenommen der Werte für TV und BV an Tag 21 - für einen strukturell stabileren Kallus und eine

schnellere und verbesserte Heilung sprechen. An allen anderen Messzeitpunkten unterscheiden sich die Gruppen nicht signifikant oder die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe zeigt einen Vorteil gegenüber der WT Gruppe.

### 5.2.2.2 Biomechanischen Testung

In der biomechanischen Testung zeigen sich ebenfalls unerwartete Ergebnisse. Das maximale Torsionsmoment ist in der Anfangsphase der Heilung signifikant erhöht in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe. Dies ist gleich an zwei Messzeitpunkten (Tag 14 und 21) der Fall (Abb. 36). Hier zeigt sich eindrucksvoll die stabilere und verbesserte Knochenheilung bei Fehlen der Lymphozyten. Das maximale Torsionsmoment ist ein valider Parameter, der deutlich biomechanische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen darstellt. Der Kallus ist somit in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe früher reif und belastbar. An Tag 28 hat der WT dann schließlich in der Heilung aufgeholt, und es gibt keinen Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen. Insgesamt entsteht der Eindruck, dass im Vergleich zur Gegengruppe der WT in der Heilung um eine Woche verlangsamt ist. Bei den anderen beiden biomechanischen Parametern (Steifigkeit und Versagensenergie) zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede.

Abschließend ist zu sagen, dass sich die signifikanten Unterschiede im Torsionsmoment an zwei Messzeitpunkten darstellen. Der Knochen der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus verheilt aus diesem Grund schneller und erreicht früher mechanische Stabilität. Dies ist ein überraschendes Ergebnis.

## 5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Unerwartet zeigt sich hier ein verbesserter Phänotyp der Knochenheilung. Das Fehlen der Lymphozyten hat entgegen der ursprünglich formulierten These einen positiven Effekt auf die Knochenheilung. Dieses Phänomen beschränkt sich nicht nur auf den Anfang der Heilung sondern zeigt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Es stellt sich eine beschleunigte Ossifikation, eine früher erreichte mechanische Kompetenz und ein verändertes Remodelling dar, wobei die Maus ohne kompetente Lymphozyten eine höhere Knochenmasse im Kallus aufrechterhält als der Wildtyp. Unsere Gruppe hat ebenfalls gezeigt, dass alle hier beschriebenen Beobachtungen sich auch mittels histologischer Untersuchungen

nachvollziehen lassen. In diesen wird gleichfalls eine beschleunigte Knochenheilung deutlich. Auch weist die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus ein im Bezug auf die Frakturheilung verändertes Zytokin-, Kollagen-, RANKL- und Osteoprotegrinexpressionsmuster auf<sup>109</sup>.

Betrachte man das Geschehen auf zellulärer Ebene, so können folgende Erklärung für die hier vorliegenden Erkenntnisse gefunden werden: Es ist bekannt, dass im Frakturhämatom des Schafs im Vergleich zum Muskelhämatom ein erhöhtes Verhältnis von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen vorliegt. Die T-Zellen wandern konsequent in das Hämatom und in das frühe Granulationsgewebe ein, sie können jedoch nicht in Bereichen gefunden werden, in denen sich momentan Knochen und Knorpelgewebe neu bildet. Ebenfalls steigt der Prozentsatz an B-Zellen im Frakturhämatom innerhalb der ersten 4 Stunden deutlich an<sup>4</sup>. Grundsätzlich sind jedoch die T-Zellen zu allen Zeitpunkten zahlenmäßig den B-Zellen überlegen, dies untermauert ihre selektive Einwanderung in das Frakturhämatom. Im Probenmaterial von menschlichem nicht-infizierten Pseudarthrosengewebe ist die dominierende inflammatorische Zelle der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyt. Dieser kommt doppelt so häufig vor wie der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyt<sup>110</sup>. In schlecht heilenden Frakturen sieht man also eine andauernde Inflammation ohne infektiöse Genese. Verantwortlich hierfür sind unter anderem die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten.

Wie bereits beschrieben, hat das Immunsystem regenerative und toxische Einflüsse auf die Heilung. Die Hauptfrage bleibt also, durch welche Prozesse Lymphozyten nun die Heilung verschlechtern und die inflammatorische Reaktion einen sogenannten „Burst“ für das Knochengewebe darstellt. Die genauen molekularen Mechanismen sind an dieser Stelle noch nicht geklärt und es sind weitere Untersuchungen nötig, um eines Tages die immunologische Antwort bei allen Eingriffen am Knochen zu modulieren - mit einem positiven Effekt auf die Heilung.

Die Gruppe um Colburn et al. hat im Jahr 2009 die Frakturheilung an einem Knock-Out-Modell evaluiert. Die gamma/delta-T-Zell-KO-Maus zeigt eine verbesserte Heilung im Vergleich zum Wildtypen<sup>64</sup>. Die Rolle dieser nur sehr kleinen Lymphozytengruppe ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Bei diesen Zellen handelt es sich am ehesten um T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften<sup>111</sup>. Bekannt ist, dass diese Lymphozytenpopulation steuernde Funktionen bei regenerativen Prozessen übernehmen. So konnte gezeigt werden, dass sie bei Verbrennung essentiell für die Rekrutierung anderer Immunzellen in das Wundgebiet

sind<sup>112</sup>. Ein Knock-Out dieser Zellen führt zu einer Verschlechterung der Wundheilung<sup>113,114</sup>.

Es verwundert, dass bei der Frakturheilung der gegenteilige Effekt eintritt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen WT und gamma/delta-T-Zell-KO verlieren sich aber nach etwa 14 Tagen. Ab diesem Zeitpunkt scheint sich in der Immunologie der Frakturheilung die Bedeutung der inflammatorischen Antwort zu verringern und andere Prozesse in den Vordergrund zu treten. Eventuell sind es explizit die gamma/delta-T-Zellen, welche für sogenannte „Danger-Signals“ verantwortlich sind, die die Heilung letztlich verzögern<sup>64</sup>.

Diese Signale können evolutionär früher einmal angebracht gewesen sein, da dem Organismus nach einer Fraktur unter Umständen eine systemische oder lokale Infektion bevorsteht. Somit wäre es möglich, zunächst die Heilung einer Fraktur zu Gunsten der Vermeidung eines Infektes unterzuordnen. Optimale Heilung in der Anfangsphase und systemische immunologische Aktivierung scheinen nach dieser Überlegung nicht miteinander vereinbar zu sein.

So zeigt sich, dass ähnlich wie das Fehlen der gamma/delta T-Zellen auch die Abwesenheit aller Lymphozyten die Heilung beschleunigt. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die NK-Zellen eine größere Rolle bei der Frakturheilung spielen als bisher angenommen. Da die RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus eine erhöhte Anzahl an NK-Zellen besitzt, ist es möglich, dass dieser Umstand die Heilung ebenfalls beeinflusst<sup>82</sup>.

An dieser Stelle muss auch gesagt werden, dass eine andere Gruppe zu ähnlichen Erkenntnissen gekommen ist. Allerdings wurden diese Daten nie in einem Journal veröffentlicht und sind somit nicht über die Datenbank „www.pubmed.com“ einsehbar. Laut dieser Gruppe hat die SCID-Maus, welche ebenfalls keine reifen Lymphozyten besitzt, eine beschleunigte und verbesserte Frakturheilung<sup>115</sup>. Durch diese Erkenntnisse wird die hier getroffene Aussage somit untermauert.

Die hier vorliegende Arbeit liefert einen interessanten Hinweis darauf, dass es in Zukunft das Ziel sein muss, die inflammatorische Antwort lokal so zu unterdrücken und zu modulieren, dass ähnlich gute Heilungsergebnisse daraus resultieren. Diese Beobachtungen sollten dann auf ein größeres, dem Menschen näheres Versuchstier, übertragen werden. Ein interessanter Ansatzpunkt ist hier z.B. die Singnalkaskade von Interferon- $\gamma$ , eine reduzierte Expression würde zu einer verminderten Makrophagenaktivierung führen und dies wiederum durch fehlende TNF- $\alpha$  Ausschüttung zu weniger destruktiven Prozessen<sup>67,116</sup>. Interferon- $\gamma$  wird von Th1-

Zellen gebildet und ist ein wichtiges Zielmolekül in der Frakturheilung. Ein anderer denkbarer Ansatzpunkt wäre, zu prüfen wie IL-4, ein antiinflammatorisches Zytokin, sich auf die Heilung auswirkt. Es fördert die Differenzierung von B-Lymphozyten, inhibiert die Knochenresorption und aktiviert Osteoblasten<sup>117,118</sup>. Weitere antiinflammatorische Zytokine sind IL-10 und IL-11, welche beide bei einer Fraktur hochreguliert werden und so die Immunreaktion vermutlich abschwächen. Hier wäre zu klären, inwieweit diese Effekte für die Verbesserung der Heilung, ein sogenanntes „Fracture Enhancement“, genutzt werden können<sup>119,120</sup>. Diese Moleküle könnten in Zukunft von großem Interesse sein um die hier beobachteten Effekte zu erklären.

Weitere tief greifendere Untersuchungen sind nötig, um die hier beobachteten Effekte auf molekularer Ebene zu erklären. Auch wäre es zu prüfen, ob z.B. mit einem adoptiven Lymphozytentransfer bei der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus, die Heilung sich wieder auf den Ursprungszustand zurück setzen lässt.

Durch diese Arbeit muss die Rolle des adaptiven Immunsystems für die Frakturheilung in einem neuen Licht betrachtet werden. Der Grundstein für folgende Arbeiten ist gelegt, um an der lokalen Unterdrückung der Immunantwort, insbesondere an der Lymphozytenaktivierung zu forschen. So ist es das Ziel der nächsten Zeit, die Signalkaskaden der Lymphozyten weiter zu identifizieren und die schädlichen Elemente gezielt bei der Heilung zu unterdrücken, damit die Knochenheilung auch ohne einen Gen-Knock-Out verbessert werden kann.

Gerade der Aspekt, dass die anfängliche Hypothese nicht bestätigt werden konnte, sondern ein genau konträres Ergebnis eingetreten ist, machen die nun folgenden Schritte umso interessanter. Somit müssen die bisherigen Erkenntnisse über die inflammatorische Reaktion im Rahmen einer Fraktur überdacht werden.

## **6. Zusammenfassung**

**Zielsetzung:** Die Anfangsphase der Knochenheilung wird durch immunologische Prozesse maßgeblich beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war, zu ermitteln, wie die Abwesenheit von Lymphozyten die Frakturheilung beeinflusst. Lymphozyten spielen eine Schlüsselrolle bei der Modulation der inflammatorischen Reaktion einer Fraktur. Die Hypothese hierbei war, dass diese Reaktion essentiell für die Initialisierung einer Frakturheilung ist und, dass die Frakturheilung bei Abwesenheit von Lymphozyten gestört sein würde.

**Methoden:** Es wurden 8-Wochen alten Wildtyp- und RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (C57/Bl6) Dreipunkt-Biege-Frakturen zugefügt. Ein Knock-Out des RAG-1-Gens führt zum vollständigen Fehlen von Lymphozyten. Die Mäuse wurden an Tag 7, 14, 21 und 28 nach der Operation getötet. Anschließend wurden die Knochen mit dem  $\mu$ CT gescannt und einer biomechanischen Testung unterzogen. Die Gruppengröße betrug jeweils 8 Tiere. Für die statistische Auswertung wurde ein Mann-Whitney U-Test verwendet.

**Ergebnisse:** In der biomechanischen Testung stellte sich ein signifikant höheres Torsionsmoment zum Zeitpunkt 14 Tage (77% vs. 60% [median],  $p=0,01$ ) und 21 Tage nach Fraktur (105% vs. 87%,  $p=0,007$ ) in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe dar. Im  $\mu$ CT zeigte sich an Tag 28 ein signifikant höherer Knochenanteil (BV/TV) in der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe (41% vs. 30%,  $p=0,02$ ). Ebenso zeigte sich eine signifikant höhere knöcherne Mineralisierungsdichte im Kallus (BMD) der RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Gruppe an Tag 7 (361 vs. 322 [mgHA/cm<sup>3</sup>],  $p=0,02$ ) und Tag 28 (417 vs. 321 [mgHA/cm<sup>3</sup>],  $p=0,02$ ).

**Schlussfolgerung:** Ohne reife Lymphozyten im Organismus erreicht der Kallus früher mechanische Stabilität. Die Ergebnisse der Studie zeigen somit einen unerwarteten Effekt der Lymphozyten auf die Frakturheilung. Durch den Knock-Out des RAG-1-Gens wird die Heilung überraschenderweise beschleunigt und verbessert. In der frühen und späten Phase der Knochenheilung sind die lymphozytendefizienten Tiere in der Lage, den Kallus stärker zu mineralisieren. Damit ist bewiesen, dass das adaptive Immunsystem die Heilung negativ beeinflusst. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die genauen Prozesse hier zu verstehen. Die Aufgabe der Zukunft ist es, die Immunantwort der Knochenheilung so zu modulieren, dass eine optimale Heilung stattfinden kann und negative und schädliche immunologische Einflüsse auf die Heilung identifiziert werden können.

## 6.1 Abstract

**Introduction:** The initial phase of bone healing is dominated by immunological processes. The aim of this study was to determine, how the absence of lymphocytes influences fracture healing. The inflammatory reaction, which occurs after a fracture, strongly influences bone healing. The hypothesis was that because of the reduced inflammatory reaction, the healing will be delayed.

**Methods:** Complete absence of the adaptive immune system was modelled by using RAG-1 (recombination activating gene 1) knockout mice lacking mature B and T lymphocytes. A standard closed 3 point bending femoral fracture was created in 8 weeks old wildtype (WT) and RAG-1 knockout (RAG-1<sup>-/-</sup>) mice. For  $\mu$ CT analysis and biomechanical testing, animals were sacrificed after 7, 14, 21 and 28 days (N=8/time point). Statistical comparisons between the groups were performed using the Mann-Whitney *U*-test.

**Results:** Biomechanical testing demonstrated a significantly higher torsional moment at day 14 (77% vs. 60% [median],  $p=0.01$ ) and day 21 (105% vs. 87%,  $p=0.007$ ) in the RAG-1<sup>-/-</sup> group in comparison to the WT group.  $\mu$ CT evaluation of RAG-1 specimens showed at day 28 a higher bone volume fraction of the callus (BV/TV) in the RAG-1<sup>-/-</sup> group in comparison to the WT group (41% vs. 30%,  $p=0.02$ ). A significantly higher bone mineral density was also shown at day 7 (361 vs. 322 [mgHA/cm<sup>3</sup>],  $p=0.02$ ) and 28 (417 vs. 321 [mgHA/cm<sup>3</sup>],  $p=0.02$ ).

**Conclusion:** The results of the study show an unexpected influence of lymphocytes on fracture healing. Contradictory to the original thesis, lymphocytes impair fracture healing. The knockout of the RAG-1 gene shows a positive effect on fracture healing. Without mature lymphocytes the callus reaches earlier mechanical stability. In the early and late phase of bone healing, the lymphocyte deficient mice show a higher osteogenic potential. This proves that although the two animals do not differ phenotypically, the adaptive immune system influences bone healing negatively. Further studies are required to elucidate the exact processes. The aim of the future will be to modulate the immune response according to our findings and to optimize fracture healing with the minimization of the noxious effects of the immune system.

## Literaturverzeichnis

- 1 Cooper, C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *Am J Med* **103**, 12S-17S; discussion 17S-19S (1997).
- 2 Herbert Baum, T. K., Ulrich Westerkamp, Martina Straube. Volkswirtschaftliche Kosten durch Straßenverkehrsunfälle in Deutschland 2008. (2010).
- 3 Seifert, J. Unfallchirurgie und Rehabilitation von Unfallopfern. Bonn: Deutscher Verkehrssicherheitsrat. (Besucht am 10. August 2011 unter: [http://www.dvr.de/download/ps090910-11\\_30\\_1.pdf](http://www.dvr.de/download/ps090910-11_30_1.pdf))
- 4 Schmidt-Bleek, K. *et al.* Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: A study in sheep. *J Orthop Res* (2009).
- 5 Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2 edn, (2006).
- 6 Gerhard Aumüller, G. A., Andreas Doll, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Siegfried Mense, Laurenz J. Wurzingler. *Duale Reihe Anatomie*. Vol. 2 (Thieme, 2010).
- 7 Wolff, J. The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. *Clin Orthop Relat Res* **468**, 1056-1065, (2010).
- 8 Niethard, F. U., Pfeil, J. & Biberthaler, P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 6 edn, (2009).
- 9 Blair, H. C. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* **20**, 837-846 (1998).
- 10 McKibbin, B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* **60-B**, 150-162 (1978).
- 11 Bonnarens, F. & Einhorn, T. A. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* **2**, 97-101, (1984).
- 12 Manigrasso, M. B. & O'Connor, J. P. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* **18**, 687-695, (2004).
- 13 Einhorn, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21 (1998).
- 14 Bolander, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* **200**, 165-170 (1992).
- 15 Henricson, A., Hulth, A. & Johnell, O. The cartilaginous fracture callus in rats. *Acta Orthop Scand* **58**, 244-248 (1987).
- 16 Takayanagi, H. New immune connections in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* **1192**, 117-123, (2010).
- 17 Martinelli, C. & Reichhart, J. M. Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J Endotoxin Res* **11**, 243-248, (2005).
- 18 Armant, M. A. & Fenton, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* **3**, (2002).
- 19 Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S. & Fishelson, Z. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol* **41**, 583-597, (2004).
- 20 Borghans, J. A., Noest, A. J. & De Boer, R. J. How specific should immunological memory be? *J Immunol* **163**, 569-575, (1999).
- 21 Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-117, (2000).
- 22 Lorenzo, J., Horowitz, M. & Choi, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* **29**, 403-440 (2008).

- 23 Blair, H. C. & Athanasou, N. A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* **19**, 189-199 (2004).
- 24 Yoshida, H. *et al.* The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* **345**, 442-444, (1990).
- 25 Benninghoff, D. *Anatomie*. 17 edn, Vol. 1 (2008).
- 26 Dougall, W. C. *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-2424 (1999).
- 27 Kong, Y. Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323, (1999).
- 28 Walsh, M. C. *et al.* Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* **24**, 33-63 (2006).
- 29 David, J. P. Osteoimmunology: a view from the bone. *Adv Immunol* **95**, 149-165 (2007).
- 30 Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* **40**, 287-293, (2005).
- 31 Mundy, G. R. Myeloma bone disease. *Eur J Cancer* **34**, 246-251, (1998).
- 32 Di Rosa, F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Immunol Cell Biol* **87**, 20-29 (2009).
- 33 Giuliani, N. *et al.* Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* **100**, 4615-4621, (2002).
- 34 Fox, S. W. & Chambers, T. J. Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 868-872, (2000).
- 35 Gao, Y. *et al.* IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest* **117**, 122-132, (2007).
- 36 Li, Y. *et al.* B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* **109**, 3839-3848 (2007).
- 37 Yun, T. J. *et al.* Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* **166**, 1482-1491 (2001).
- 38 Lader, C. S. & Flanagan, A. M. Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* **139**, 3157-3164 (1998).
- 39 Hill, P. A., Tumber, A., Papaioannou, S. & Meikle, M. C. The cellular actions of interleukin-11 on bone resorption in vitro. *Endocrinology* **139**, 1564-1572 (1998).
- 40 Horowitz, M. C., Bothwell, A. L., Hesslein, D. G., Pflugh, D. L. & Schatz, D. G. B cells and osteoblast and osteoclast development. *Immunol Rev* **208**, 141-153, (2005).
- 41 Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241, (2004).
- 42 Cenci, S. *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10405-10410, (2003).
- 43 Horowitz, M. C. *et al.* Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors. *J Immunol* **173**, 6583-6591, (2004).
- 44 Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Imberti, L. & Notarangelo, L. D. Omenn syndrome: a disorder of Rag1 and Rag2 genes. *J Clin Immunol* **19**, 87-97 (1999).

- 45 Cenci, S. *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* **106**, 1229-1237, (2000).
- 46 Kawai, T. *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* **169**, 987-998, (2006).
- 47 Grcevic, D., Lee, S. K., Marusic, A. & Lorenzo, J. A. Depletion of CD4 and CD8 T lymphocytes in mice in vivo enhances 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro by a mechanism that is dependent on prostaglandin synthesis. *J Immunol* **165**, 4231-4238 (2000).
- 48 Miyaura, C. *et al.* Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9360-9365 (1997).
- 49 Miyaura, C. *et al.* *mu.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9360-9365 (1997).
- 50 Hartgring, S. A., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P. & van Roon, J. A. Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Ann Rheum Dis* **65 Suppl 3**, iii69-74, (2006).
- 51 Manabe, N. *et al.* Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* **167**, 2625-2631 (2001).
- 52 Lee, S. K., Kalinowski, J. F., Jastrzebski, S. L., Puddington, L. & Lorenzo, J. A. Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis. *Endocrinology* **144**, 3524-3531 (2003).
- 53 Toraldo, G., Roggia, C., Qian, W. P., Pacifici, R. & Weitzmann, M. N. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 125-130, (2003).
- 54 Choi, Y. *et al.* Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* **31**, 2179-2188, (2001).
- 55 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* **175**, 5-14, (2005).
- 56 Beloosesky, Y. *et al.* Cytokines and C-reactive protein production in hip-fracture-operated elderly patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 420-426, (2007).
- 57 Giannoudis, P. V., Smith, M. R., Evans, R. T., Bellamy, M. C. & Guillou, P. J. Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand* **69**, 184-188 (1998).
- 58 Giannoudis, P. V. *et al.* Pattern of release and relationship between HMGB-1 and IL-6 following blunt trauma. *Injury* **41**, 1323-1327, (2010).
- 59 Jones, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* **175**, 3463-3468, (2005).
- 60 Moore, F. A. & Moore, E. E. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* **75**, 257-277 (1995).
- 61 Tsiridis, E., Upadhyay, N. & Giannoudis, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* **38 Suppl 1**, S11-25, (2007).
- 62 Einhorn, T. A., Majeska, R. J., Rush, E. B., Levine, P. M. & Horowitz, M. C. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* **10**, 1272-1281 (1995).

- 63 Andrew, J. G., Andrew, S. M., Freemont, A. J. & Marsh, D. R. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* **65**, 462-466 (1994).
- 64 Colburn, N. T., Zaal, K. J., Wang, F. & Tuan, R. S. A role for gamma/delta T cells in a mouse model of fracture healing. *Arthritis Rheum* **60**, 1694-1703 (2009).
- 65 Henricson A, H. A., Johnell O. The occurrence of accessory immunologic cells in bone induction. *Clin Orthop Relat Res* **264**, 270-277 (1991).
- 66 Yang, X. *et al.* Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* **41**, 928-936 (2007).
- 67 Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* **18**, 1584-1592, (2003).
- 68 Schaffer, M. & Barbul, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* **85**, 444-460 (1998).
- 69 Barbul, A., Breslin, R. J., Woodyard, J. P., Wasserkrug, H. L. & Efron, G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* **209**, 479-483 (1989).
- 70 Schaffer, M. & Becker, H. D. [Immune regulation of wound healing]. *Chirurg* **70**, 897-908, (1999).
- 71 Dimayuga, P. *et al.* Inhibitory effect on arterial injury-induced neointimal formation by adoptive B-cell transfer in Rag-1 knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 644-649 (2002).
- 72 Altman, R. D. *et al.* Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* **9**, 392-400 (1995).
- 73 Ho, M. L., Chang, J. K. & Wang, G. J. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*, 270-278 (1995).
- 74 Simon, A. M., Manigrasso, M. B. & O'Connor, J. P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* **17**, 963-976, (2002).
- 75 Holstein, J. H. *et al.* Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol* **154**, 1055-1062, (2008).
- 76 Voggenreiter, G. *et al.* Immunosuppression with FK506 has no influence on fracture healing in the rat. *Bone* **37**, 227-233, (2005).
- 77 Voggenreiter, G. *et al.* Immunosuppression with FK506 increases bone induction in demineralized isogeneic and xenogeneic bone matrix in the rat. *J Bone Miner Res* **15**, 1825-1834, (2000).
- 78 Schütt, C. & Bröker, B. *Grundwissen Immunologie*. Vol. 1 (2006).
- 79 Chun, J. J., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Jaenisch, R. & Baltimore, D. The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* **64**, 189-200, (1991).
- 80 Janeway, Travers, Walport & Shlomchik. *Immunologie*. Vol. 5 (2002).
- 81 Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
- 82 Grundy, M. A. & Sentman, C. L. Immunodeficient mice have elevated numbers of NK cells in non-lymphoid tissues. *Exp Cell Res* **312**, 3920-3926 (2006).
- 83 Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867, (1992).
- 84 Cushman, J., Lo, J., Huang, Z., Wasserfall, C. & Petitto, J. M. Neurobehavioral changes resulting from recombinase activation gene 1 deletion. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 13-18 (2003).

- 85 Bosma, M. J. & Carroll, A. M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* **9**, 323-350, (1991).
- 86 Huang, H. & Manton, K. G. Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review. *Front Biosci* **10**, 1024-1039, (2005).
- 87 Wada, T. *et al.* Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* **106**, 2099-2101, (2005).
- 88 Parfitt, A. M. *et al.* Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **2**, 595-610 (1987).
- 89 Kakar, S. *et al.* Enhanced Chondrogenesis and Wnt-signaling in Parathyroid Hormone Treated Fractures. *J Bone Miner Res* (2007).
- 90 Morgan, E. F. *et al.* Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* **44**, 335-344, (2009).
- 91 Richardson, J. *et al.* Fracture healing in HIV-positive populations. *J Bone Joint Surg Br* **90**, 988-994 (2008).
- 92 Amorosa, V. & Tebas, P. Bone disease and HIV infection. *Clin Infect Dis* **42**, 108-114 (2006).
- 93 Bongiovanni, M. & Tincati, C. Bone diseases associated with human immunodeficiency virus infection: pathogenesis, risk factors and clinical management. *Curr Mol Med* **6**, 395-400 (2006).
- 94 Triant, V. A., Brown, T. T., Lee, H. & Grinspoon, S. K. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3499-3504 (2008).
- 95 Prior, J. *et al.* Fragility fractures and bone mineral density in HIV positive women: a case-control population-based study. *Osteoporos Int* **18**, 1345-1353 (2007).
- 96 Bourque, W. T., Gross, M. & Hall, B. K. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* **42**, 369-374 (1992).
- 97 M. Silver, L. *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. Vol. 1 (Oxford University Press, 1995).
- 98 Nunamaker, D. M. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, S56-65 (1998).
- 99 Cindik, E. D. *Untersuchung des Einflusses der c-kit Rezeptorinsuffizienz und der daraus resultierenden Mastzelldefizienz auf den Knochenaufbau unter Verwendung des W/W-Mausmodells, hochauflösender bildgebender Verfahren und biomechanischer Tests* Dr. med. thesis, Universität, Frankfurt am Main, (1999).
- 100 Bourrin, S. *et al.* Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. *Calcif Tissue Int* **51**, 137-142 (1992).
- 101 Hunt, J. A. & Williams, D. F. Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials* **16**, 167-170, (1995).
- 102 Hiltunen, A., Vuorio, E. & Aro, H. T. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* **11**, 305-312, (1993).
- 103 Nakase, T. *et al.* Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* **9**, 651-659, (1994).

- 104 Bourque, W. T., Gross, M. & Hall, B. K. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* **37**, 573-579 (1993).
- 105 Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* **17**, 513-520, (2002).
- 106 Turner, C. H. & Burr, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* **14**, 595-608 (1993).
- 107 Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, A. M., Jesion, G. & Kleerekoper, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* **4**, 3-11, (1989).
- 108 Dufresne, T. Segmentation techniques for analysis of bone by three-dimensional computed tomographic imaging. *Technol Health Care* **6**, 351-359 (1998).
- 109 Toben, D. *et al.* Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res* **26**, 113-124, (2011).
- 110 Santavirta S, K. Y., Nordström D, Mäkelä A, Sorsa T, Hukkanen M, Rokkanen P. Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand.* **63**, 579-586 (1992).
- 111 Moore, T. A., Moore, B. B., Newstead, M. W. & Standiford, T. J. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine Klebsiella pneumonia. *J Immunol* **165**, 2643-2650, (2000).
- 112 Daniel, T. *et al.* Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. *Shock* **28**, 278-283, (2007).
- 113 Jameson, J. *et al.* A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* **296**, 747-749, (2002).
- 114 Toulon, A. *et al.* A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* **206**, 743-750 (2009).
- 115 Gaston MS, N. B., Simpson AHRW. in *53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society* (San Diego, 2007).
- 116 Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs* **169**, 285-294, (2001).
- 117 Watanabe, K. *et al.* Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 1035-1041 (1990).
- 118 Lind, M., Deleuran, B., Yssel, H., Fink-Eriksen, E. & Thestrup-Pedersen, K. IL-4 and IL-13, but not IL-10, are chemotactic factors for human osteoblasts. *Cytokine* **7**, 78-82 (1995).
- 119 Kidd, L. J. *et al.* Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing. *Bone* **46**, 369-378, (2010).
- 120 Takamiya, M., Fujita, S., Saigusa, K. & Aoki, Y. A study on mRNA expressions of interleukin 10 during fracture healing for wound age determination. *Leg Med (Tokyo)* **10**, 131-137, (2008).

## Danksagung

Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda danke ich für die Bereitstellung des Themas, und die Begutachtung meiner Dissertation.

Besonderer Dank gebührt Dr. Daniel Toben und Frau Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation, das konzentrierte gemeinsame Arbeiten, die vielen Verbesserungsvorschläge und die vielen Korrekturvorschläge für das hier vorliegende Manuskript.

Ich möchte mich bei dem gesamten Team des Julius Wolff Instituts bedanken, für die Möglichkeit, in angenehmer und motivierender Atmosphäre zu forschen und zu promovieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Ireen Schröder, Taqif el Khassawna, Mark Heyland und Sebastian Kröner für die Unterstützung und vielen Anregungen.

Ich möchte mich bei Mario Thiele für die Ratschläge und die Hilfe bei der Bedienung von mikro-CT, Bildanalyse und Photoshop bedanken, vor allem für die Geduld! Auch möchte ich mich bei Marzena Princ, Jan Erik Hoffman, Alexander Schill, Manav Metha, Hanna Schell und Jasmin Lienau für die Denkanstöße und immer schnelle Hilfe bedanken!

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, meinen Eltern Gerald und Ingrid, Lisa, Georg und Lilli. Danke für die Korrektur und vor allem für die unermessliche Unterstützung, das Vertrauen und die Kraft, die Ihr mir gegeben habt. Ein riesiger Dank geht an Peter, Paul, Lars, und Anne – ohne euch wäre das alles nie möglich gewesen!

*„Ein bißchen Freundschaft ist mehr wert als die Bewunderung der ganzen Welt“*

*(Otto von Bismarck)*

*Danke!*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Jan Tilman Frisch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Frakturheilung bei Immuninsuffizienz – Eine Untersuchung der lymphozytendefekten RAG-1<sup>(-/-)</sup>-Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift