

**Untersuchung des Knochenstatus  
von Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Maren Stähle**  
aus Heilbronn

Gießen 2019



Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Heiß

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Herr Prof. Dr. Markus Rickert

Tag der Disputation: 12.12.2019

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 KNOCHEN UND SEIN STOFFWECHSEL.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 AUFBAU DES KNOCHENS .....	1
1.1.2 ZELLEN IM KNOCHEN .....	5
<b>1.2 HORMONELLE EINFLÜSSE AUF DEN KNOCHEN .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 LEPTIN.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 DB/DB-MÄUSE .....	19
1.3.2 LEPTIN-REZEPTOREN.....	20
1.3.3 LEPTIN UND SEINE BEZIEHUNG ZUM KNOCHEN .....	22
<b>1.4 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 TIERMODELL.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 BIOMECHANIK.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 HISTOLOGIE UND ENZYMHISTOCHEMIE .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 ENTKALKUNG UND ANFERTIGUNG DER SCHNITTE.....	31
2.3.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG .....	32
2.3.3 TRAP-FÄRBUNG .....	32
2.3.4 HISTOMORPHOMETRIE.....	33
2.3.5 EPON-EINBETTUNG .....	34
<b>2.4 REAL-TIME RT-PCR.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 RNA-ISOLIERUNG .....	36
2.4.2 cDNA-HERSTELLUNG.....	36
2.4.3 REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR) .....	37
2.4.4 GELELEKTROPHORESE.....	38
2.4.5 ETABLIERUNG DER REAL-TIME RT-PCR .....	39
2.4.6 REAL-TIME RT-PCR .....	41
<b>2.5 STATISTIK.....</b>	<b>41</b>
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 GEWICHT DER VERSUCHSTIERE.....</b>	<b>43</b>

<b>3.2 BIOMECHANIK.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 HISTOLOGIE .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 HISTOMORPHOMETRIE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5 ENZYMHISTOCHEMIE.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6 REAL-TIME RT-PCR.....</b>	<b>50</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 DAS TIERMODELL ALS GRUNDLAGE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 AUSWIRKUNGEN VON LEPTIN AUF DIE KNOCHENSTRUKTUR .....</b>	<b>54</b>
4.2.1 EINORDNUNG DER BIOMECHANISCHEN ERGEBNISSE .....	54
4.2.2 EINORDNUNG DER ERGEBNISSE BEZÜGLICH DER KNOCHENSTRUKTUR .....	55
4.2.3 BEURTEILUNG DER UNTERSUCHTEN GENEXPRESSION IM KNOCHENSTOFFWECHSEL	58
<b>4.3 DIE ERGEBNISSE IM KONTEXT ANDERER STUDIEN .....</b>	<b>61</b>
<b>5. AUSBLICK .....</b>	<b>63</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>64</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>66</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>70</b>
<b>10. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>11. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
<b>12. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>13. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>14. DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>



# 1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden Röhrenknochen und Wirbelkörper von Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen mit den korrespondierenden heterozygoten Mäusen verglichen, um die Auswirkungen von Leptin auf den Knochen und seinen Stoffwechsel zu untersuchen.

## 1.1 Knochen und sein Stoffwechsel

Um den Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel näher betrachten zu können, müssen zunächst die komplexe Struktur des Knochens, seine Funktion sowie die Mechanismen seines Stoffwechsels erklärt werden. Das Knochengewebe spielt eine entscheidende Rolle, indem es unserem Körper die notwendige Stabilität und gleichzeitig Flexibilität für mechanische Beanspruchungen gibt. Im Knochen findet zudem die Produktion neuer Blutzellen statt und er trägt zur Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes bei. Knochen setzt sich aus den Knochenzellen und der Interzellulärsubstanz zusammen. Die Knochensubstanz ist je nach Körperregion und Alter des Individuums unterschiedlich aufgebaut. Es wird unter anderem zwischen langen Röhrenknochen (*Ossa longa*), wie dem von uns verwendeten Femur der Maus, und irregulären Knochen (*Ossa irregulata*), wie den Wirbelkörpern, unterschieden. Im nächsten Abschnitt soll deren Aufbau und Funktion näher erläutert werden. Zudem soll ein Überblick über die Umbauprozesse im Knochen gegeben werden, da diese wesentlich für das Verständnis der Bedeutung von Leptin auf diese Prozesse sind.

### 1.1.1 Aufbau des Knochens

Röhrenknochen kommen hauptsächlich in den Extremitäten vor. Sie können in unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden, um ihren Aufbau zu beschreiben. Die jeweiligen Enden werden als Epiphysen bezeichnet, hier bildet eine Knorpelfläche den Abschluss und trägt zur Gelenkbildung bei. Der lange Röhrenteil wird auch als Diaphyse bezeichnet. Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich die Metaphyse. Sie stellt mit dem Epiphysenspalt den Ort des Längenwachstums dar (Abbildung 1). Hier wird Knorpelgewebe in Knochengewebe umgebaut, dieser Vorgang wird auch enchondrale Ossifikation genannt. Die letzten Epiphysen verknöchern beim Menschen während der Pubertät mit dem Ende des Längenwachstums und werden dann als *Linea epiphysialis* bezeichnet. Die Verknöcherung der Epiphyse des Trochanter minor am

Femur beim Menschen findet als letzte Epiphyse im Alter zwischen 18 bis 25 Jahren statt. Bei männlichen Mäusen geschieht dies bereits zwischen dem 3. und 4. Lebensmonat. Die Verknöcherungsprozesse finden somit in Mäusen um einiges rascher statt. Die Reihenfolge der Verknöcherungen ist bei Mensch und Maus wiederum sehr ähnlich (Kilborn et al., 2002).

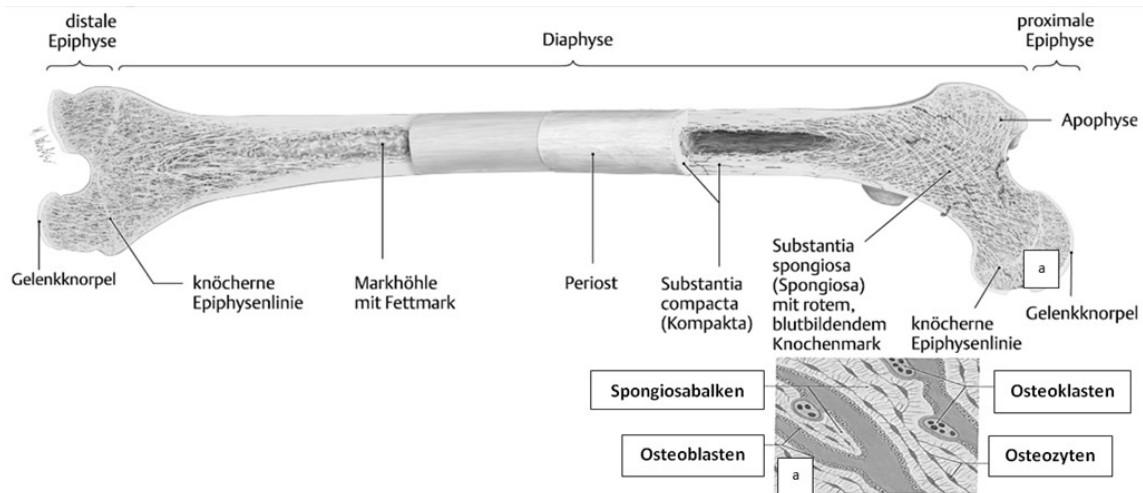


Abbildung 1: Darstellung eines Röhrenknochens, hier der Femur des Menschen. Übersicht und als mikroskopische Ansicht (a). Modifiziert nach Duale Reihe, Aumüller et al., 2017 und PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem, 2014.

Das schwammartige Innere der Knochen wird Substantia spongiosa genannt. Umgeben wird dieser Teil des Knochens von einer stabilen Substantia compacta, auch als Kortikalis bezeichnet, die durch eine kompakte Anordnung der Kollagenfasern gekennzeichnet ist und den Abschluss zum umgebenden Bindegewebe, dem Periost, bildet. Bezüglich der Anordnung der Kollagenfasern wird zwischen Geflecht- und Lamellenknochen unterschieden. Geflechtknochen kommt in der Phase der Knochenbildung und -heilung vor. Hier sind die Kollagenfasern zufällig angeordnet, wodurch der Knochen wenig zug- und belastungsstabil ist. Er wird dann im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umgebaut. Lamellenknochen finden sich vor allem im Körper des Erwachsenen. Der Verlauf jeder Lamelle passt sich in ihrer Verlaufsrichtung und ihrem Steigungswinkel der wechselnden Druck- und Zugbelastung auf den Knochen an und ist daher dem Schaft entlang ausgerichtet. Beim Menschen sind die Lamellen in der Kortikalis zirkulär um einzelne, den Knochen durchziehende Gefäßkanäle (Havers Kanäle) angeordnet. Sie bilden eine als Osteon bezeichnete Funktionseinheit, die sich nur in der Kortikalis finden lässt. Bei Mäusen kommen zwar



ebenfalls Osteon-ähnliche Anordnungen in der Kortikalis vor, wenngleich sie weniger gut organisiert sind, wie die des Menschen (Hassler et al., 2014). Es wird vermutet, dass diese Art der Knochenstruktur von der Größe und Belastung der jeweiligen Spezies abhängig ist (Almeida et al., 2017). An den Lammellengrenzen liegen die Osteozyten in kleinen Höhlen, den Lacuna ossea. Sie stehen untereinander über dünne Kanälchen, den Canaliculi ossea, in Verbindung. In der Spongiosa, die das Innere des Knochens darstellt, befinden sich die Kollagenfasern in einer eher dreidimensionalen Lamellenstruktur angeordnet, die die Trabekel bilden. Zwischen diesen Trabekeln findet die Blutbildung statt. Es entsteht so ein stabiler, leichter und dennoch bis zu einer gewissen Belastung biegsamer Knochen, der vor allem in den langen Röhrenknochen vorkommt (Schiebler, 2007).

Eine reduzierte Knochendichte und eine fehlerhafte Mikrostruktur des Knochenbaus führen zu einer Reduktion der Biegefestigkeit und Stabilität und dadurch zu Erkrankungen wie der Osteoporose. Mittels dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) - Verfahren kann die Knochendichte gemessen werden. Sie korreliert signifikant mit der Biegefestigkeit (de Bakker et al., 2017). Dennoch gibt sie nur indirekt einen Hinweis auf die funktionelle Qualität des Knochens, da weitere Parameter wie Mikrofrakturen, kortikale Dicke, Mineral- und Kollagengehalt sowie die Form des Knochens einen Einfluss haben (Felsenberg & Boonen, 2005). Die mechanische Qualität des Knochens kann unter Verwendung von vier Eigenschaften beschrieben werden: Stärke, Elastizität, Steifigkeit und Zähigkeit. Eine Fraktur tritt auf, wenn die aufgebrachte Kraft einen Stress ausübt, der die Stärke des Knochens überschreitet (Abbildung 2).

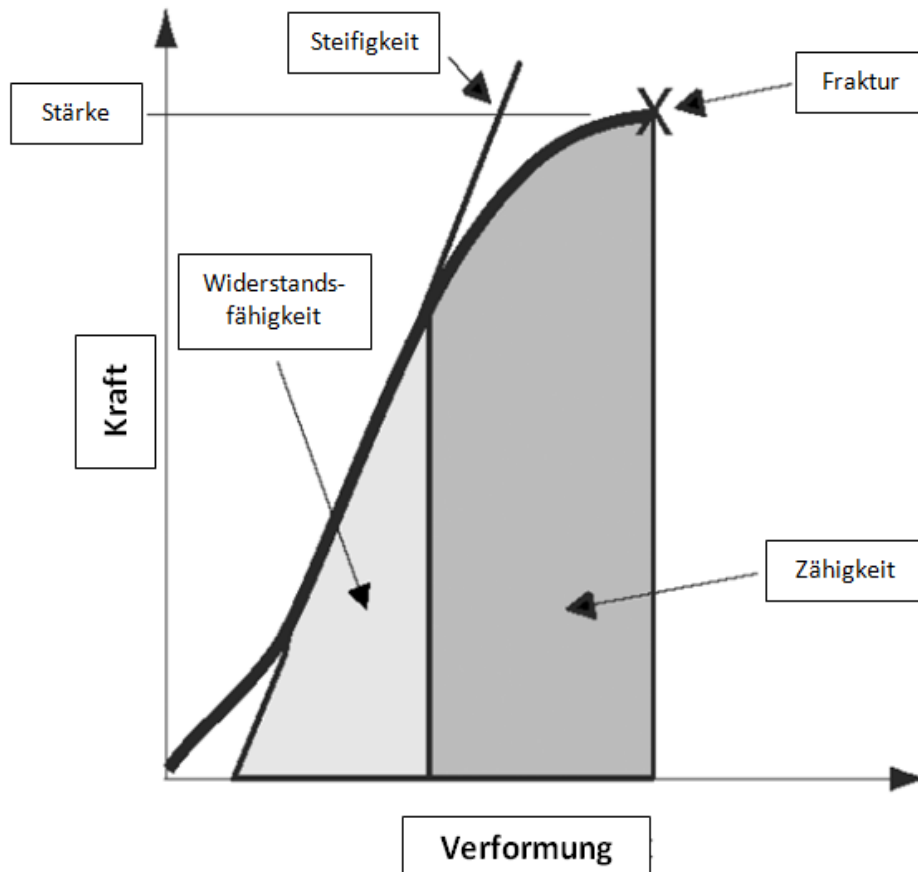


Abbildung 2: Darstellung der mechanischen Testung eines Knochens mittels Kraft-Verformungs-Diagramm. Der höchste Punkt der Kurve zeigt den Punkt der maximalen Belastung an, die der Knochen tragen kann, bevor er frakturiert. Der Teil unter der Kurve repräsentiert die Zähigkeit und Widerstandsfähigkeit des Knochens. Die maximale Steigung stellt die Steifigkeit des Knochens dar. Diese spielt vor allem zu Beginn der Testung eine Rolle, da sie ein entscheidender Parameter für die Biegung oder Knickbildung des Knochens darstellt. Modifiziert nach Felsenberg et al., 2005.

Die Biegefestigkeit wird als wichtiger messbarer physikalischer Indikator neben der Knochendichte bei der Beurteilung der Qualität des Knochens herangezogen (Hernandez & Keaveny, 2006). Um die Biegefestigkeit und das damit verbundene Frakturrisiko des Knochens zu messen, gibt es unterschiedliche Methoden. Der Drei-Punkt-Biegetest wird bevorzugt bei kleinen Versuchstieren durchgeführt, da diese Knochen sehr fragil und empfindlich sind und der Test einen guten Kompromiss zwischen Durchführbarkeit und Genauigkeit darstellt (Ritchie et al., 2008). Dieser Test beruht auf folgendem Versuchsaufbau: Der Knochen wird wie ein Balken auf einer geraden Auflage an beiden Enden befestigt. In der Mitte des Knochens wird dann so

lange eine Kraft aufgebracht, bis der Knochen frakturiert. Diese Stelle ist der Punkt der maximalen Kompression des Knochens, an der gegenüberliegenden Seite erfolgt die maximale Dehnung. In der Mitte zwischen diesen beiden Punkten befinden sich neutralen Fasern, die keine Dehnung oder Kompression erfahren. Durch diesen Punkt wird eine horizontale Achse gelegt und dies als Nulllinie, auch Querschnittsachse bezeichnet, definiert. Diese Linie wird für die Berechnung der Maximalspannung benötigt. Die Maximalspannung ist als diejenige Normalspannung definiert, die am äußersten Punkt der Nulllinie gemessen wird. Die ihr zugeordnete Einheit ist Pascal ( $\text{Pa}=\text{N}/\text{m}^2$ ). Das E-Modul spiegelt die Steifigkeit unabhängig von der Form des Materials wider und ist von seiner Zusammensetzung abhängig. In Prozent (%) wird die relative Dehnung ( $\epsilon$ ) angegeben. Am Ende der Testung werden die Werte normalisiert, um sie unabhängig von Größe und Durchmesser der einzelnen Knochen bewerten zu können. Das Ergebnis wird mittels Kraft-Verformungs-Diagramm dargestellt. Hier werden die Kraft auf der y-Achse und die Verformung auf der x-Achse aufgetragen (Deckard et al., 2017).

### **1.1.2 Zellen im Knochen**

Wie bereits im letzten Abschnitt erwähnt, ist Knochen kein statisches Organ, sondern unterliegt einem stetigen Wandel. Es muss hierbei zwischen Knochenaufbau- und Knochenumbauprozessen unterschieden werden. Während Knochenaufbau vor allem im Wachstum eine Rolle spielt, findet der Knochenumbau überwiegend in Knochen von Erwachsenen statt (Erben, 2015). Der Knochenumbauprozess ist in unserem Körper essenziell. Hierdurch kann die Stabilität und Widerstandsfähigkeit des Knochens stetig dem körperlichen Zustand und der Beanspruchung angepasst werden. Es wird an weniger belasteten Stellen Knochen abgebaut und an Stellen, die eine erhöhte Zug- oder Druckbelastung aufweisen, Knochen aufgebaut. Innerhalb eines Jahres werden durchschnittlich 25 % des spongiösen Knochens, aber nur 3 % des kortikalen Knochens ab- und wieder aufgebaut (Manolagas & Jilka, 1995). Dieser stetige Umbau als Anpassung an die wechselnde Belastung wird von zwei antagonistischen Systemen, den Osteoblasten und Osteoklasten, gewährleistet. Diese bestimmen maßgeblich den Auf- und Abbau des Knochens und werden als eine Funktionseinheit, basic multicellular unit (BMU), bezeichnet (Sims & Martin, 2015).

Im kortikalen Knochen sind Osteoblasten und Osteoklasten in kleinen Erosionsbahnen zusammen mit Blutgefäßen und Nerven organisiert (Parfitt, 1994). Der Ab- und Aufbau

des Knochens findet hier mit einer Zeitverzögerung von mehreren Wochen statt und unterliegt einer komplexen Regulation. Im spongiösen Knochen erfolgt der Umbau ebenfalls durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten, jedoch findet hier der Umbau schneller statt und das Trabekelnetzwerk trägt zu einer komplexeren Struktur und Kommunikation der Zellen untereinander bei (Frost, 1969). Dabei ist es für die Knochenstabilität von großer Bedeutung, dass sich diese Prozesse im Gleichgewicht befinden. Ist dies nicht der Fall, entsteht ein instabiler, nicht voll funktionsfähiger Knochen. Dies führt zu einer Reihe von Knochenerkrankungen, wie zum Beispiel der Osteoporose (Zhang et al., 2017).

Die Frage nach der Kommunikation zwischen Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten im Rahmen des Knochenab- und aufbaus ist ein komplexer Vorgang und wird als Coupling bezeichnet. Bezüglich der Osteoklasten spielen drei Mechanismen eine Rolle. Zum einen die von Osteoklasten ausgeschütteten Faktoren, die an undifferenzierten Osteoblasten binden und hier eine Differenzierung zu aktiven Osteoblasten initiieren. Zum anderen schütten Osteoklasten Faktoren aus, die an Zellen wie Osteozyten binden, die wiederum in Verbindung mit sowohl undifferenzierten als auch differenzierten Osteoblasten stehen. Als dritten Kommunikationsweg wird angenommen, dass Osteozyten die von Osteoklasten hervorgerufenen physiologischen Veränderungen der Knochenstruktur erkennen. Diese Information werden dann an die Osteoblasten weiter vermittelt, die dann als Vorläuferzellen an den Ort des Knochenabbaus wandern, um dort für die richtige Menge an neu produzierter Knochenmasse zu sorgen (Abbildung 3, Sims et al., 2015). Die Rolle der Osteozyten in diesem Gleichgewicht ist Gegenstand aktueller Forschung. Sie sezernieren Sklerostin, das wiederum den Knochenaufbau durch Bindung an Osteoblasten hemmen kann. Eine Hemmung der Expression von Sklerostin kann wiederum durch mechanische Stimulation des Knochens oder durch Faktoren wie dem Parathormon und Interleukin 6 stattfinden. Auch Osteoklasten können über die Expression von Cardiotrophin-1 Sklerostin supprimieren und so indirekt einen erhöhten Knochenaufbau bewirken (Koide et al., 2017). Osteoblasten vermitteln eine Hemmung der Differenzierung von Osteoklasten wiederum zum Beispiel durch die Expression von Osteoprotegerin (OPG). Da die Eigenschaften der verschiedenen Zellen die Grundlage des Gleichgewichts im Knochenumbau darstellen, werden diese im nächsten Abschnitt näher erläutert.

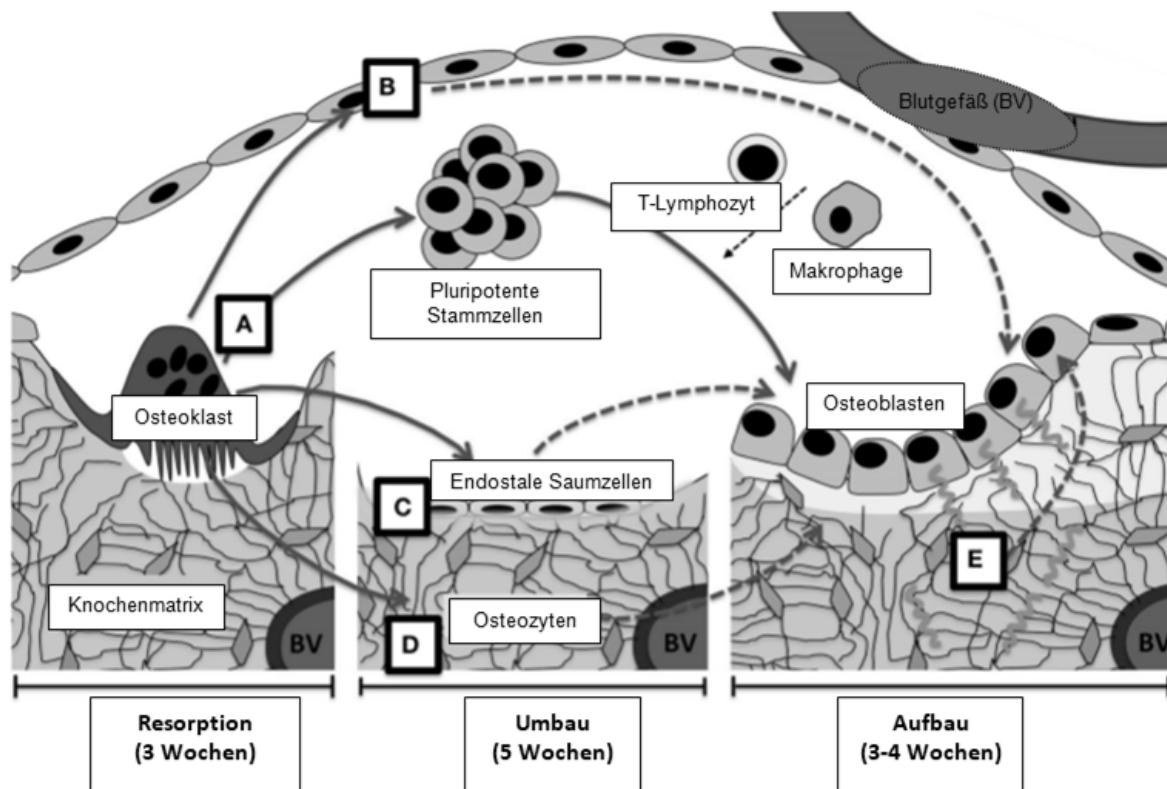


Abbildung 3: Mögliche Coupling-Mechanismen in der Zeit zwischen Knochenresorption und Aufbau. A: Osteoklasten vermitteln über die Zellmatrix, ihre Zellmembran sowie über ausgeschüttete Botenstoffe eine Aktivierung der Osteoblasten. Dies kann sowohl die Vorläuferzellen in der Umbauzone (B), als auch die endostalen Saumzellen (C) und die Osteozyten in der Knochenmatrix (D) betreffen. Zudem geben die Osteozyten eine Rückmeldung über die mechanische Belastung sowie die physikalischen Veränderungen im Knochen an die Osteoblasten weiter, um ein richtiges Maß an neu produzierter Matrix sicherzustellen (E). Modifiziert nach Sims et al., 2015.

## Osteoblasten

Die Osteogenese, also der Knochenaufbau, erfolgt durch die Osteoblasten. Diese stammen aus der mesenchymalen Zellreihe und sind einkernige Zellen von kubischer Form. Die Differenzierung erfolgt unter dem Einfluss von Runx-Related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) als wichtigster Transkriptionsfaktor. Zudem spielen andere Transkriptionsfaktoren wie Osterix, die geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (Sox9) und Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 4 (Atf4) eine Rolle (Jensen et al., 2010). Auch Vitamin D und Parathormon (Howard et al., 1981) sowie die auf den Knochen einwirkende mechanische Druck- und Zugbelastung haben einen großen Einfluss. Zum Aufbau der Knochenmatrix geben die Osteoblasten Kollagen 1, aber

auch weitere Proteine wie Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin, in den interstitiellen Raum ab und entwickeln sich dabei über Proosteoblasten zu ausgereiften Osteoblasten (Rutkovskiy et al., 2016). Die Mineralisation des Knochens wird durch die Anlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen abgeschlossen. Die Osteoblasten können sich dann in drei Richtungen entwickeln. Entweder sie werden in die Matrix eingebettet und differenzieren sich zu Osteozyten oder sie bleiben auf der Knochenoberfläche als inaktive endostale Saumzellen, die das Endost bilden und erneut als Osteoblasten in Funktion treten können. Als dritten Weg können die Osteoblasten in Apoptose gehen. Die ALP wird als Marker für die Aktivität von Osteoblasten herangezogen, da sie von diesen produziert und in der Phase der Organisation der extrazellulären Matrix exprimiert wird (Stein et al., 1996). Sie besitzt eine enzymatische Funktion, indem sie Phosphorsäureester hydrolysiert. Hierdurch kann Phosphat für die Knochenbildung zur Verfügung gestellt werden. Zusammen mit Calcium entsteht dann Hydroxylapatit. Hierfür ist ein alkalischer pH-Wert notwendig. Die ALP kommt jedoch nicht nur im Knochen vor, sondern konnte als gewebespezifische Isoformen im menschlichen Körper im Darm, der Plazenta und den Keimzellen nachgewiesen werden. Die im Knochen vorkommende ALP wird als gewebeunspezifische ALP oder Leber-Knochen-Nieren ALP bezeichnet (Hoylaerts et al., 2015). Eine Mutation im ALP-Gen und somit eine geringere ALP-Konzentration im Organismus führt zur Hypophosphatasie, eine selten Form der Osteomalazie, die durch extrazelluläre Anreicherung von anorganischem Pyrophosphat charakterisiert ist. Dies führt zu einer Hemmung der Knochenmineralisierung und somit zu Osteopenie und Osteosklerose. Zudem kommt es zu einer ungesteuerten Kristallbildung aus Phosphat und Calcium, die in den Gelenken, aber auch im Muskel zu schweren Entzündungen führen kann (Millán & Whyte, 2016). Als Gegenspieler der ALP kann Osteopontin angesehen werden. Osteopontin ist ein Glycoprotein, das ebenfalls an der Bildung der Knochenmatrix beteiligt ist. Es wird im Knochen von Osteoblasten und Osteozyten synthetisiert und bindet extrazellulär an Hydroxylapatit. In phosphoryliertem Zustand hemmt es die Knochenmineralisation. Die ALP hat hierauf Einfluss, in dem es Osteopontin phosphorylieren kann. Die Expression von Osteopontin wird wiederum durch eine hohe extrazelluläre Konzentration an Pyrophosphat gehemmt (Halling Linder et al., 2017). Osteopontin spielt nicht nur im Knochen eine wichtige Rolle, es wird zudem von unterschiedlichsten Zellen im Organismus wie den T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Dort hat es über die Aktivierung der Differenzierung von

proinflammatorischen Lymphozyten Einfluss auf die Entzündungsreaktion und spielt bei der Entstehung von autoimmunem Geschehen eine Rolle (Clemente et al., 2016).

## **Osteozyten**

Neben den Osteoblasten rücken Osteozyten immer mehr in das Interessenfeld der Forschung. Sie machen 95 % der Knochenzellen aus. Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten müssen sich erst aus Vorläuferzellen durch externe Signalkaskaden differenzieren. Osteozyten dagegen sind dauerhaft im Knochen vorhanden. Daher liegt es nahe, dass Osteozyten eine zentrale Steuerungsfunktion in der Regulation des Knochenaufbaus übernehmen (Schaffler et al., 2014). Sie liegen in Lakunen innerhalb der Trabekel, die untereinander über kleine Kanäle, den Canaliculi, verbunden sind. Als Dendriten ausbildende Zellen weisen sie nur noch einen kleinen Zellkörper auf, können jedoch über Mechanorezeptoren und Schwankung der Oberflächenspannung Veränderungen in der sie umgebenden Matrix detektieren (You et al., 2004). Diese Informationen können sie über lange Zytoplasmafortsätze und den daran endenden gap junctions an andere Osteozyten weitergeben. Zudem stehen sie mit den endostalen Saumzellen in Verbindung. Die gap junctions sind aus Protein-Monomeren der Connexin-Familie aufgebaut und stellen interzelluläre Membrankanäle dar (Abbildung 4). Sie ermöglichen den Zellen einen direkten Austausch von Ionen und kleinen Molekülen. Diese dürfen jedoch nur eine Größe von maximal 1000 Dalton (Da) aufweisen, um den Membrankanal passieren zu können. Im Knochen spielt vor allem Connexin 43 (Cx43) eine Rolle. Die Benennung setzt sich aus der Abkürzung für Connexin Cx und der molaren Masse zusammen. Im menschlichen Körper wurden bisher 21, im Körper der Maus 20 Connexin-Varianten gefunden (Laird, 2006). Im Knochen konnten zusätzlich zu Cx43 auch Cx40, Cx45, Cx46 und Cx37 nachgewiesen werden. Deren Bedeutung auf den Knochenstoffwechsel ist jedoch noch unklar (Buo & Stains, 2014). Cx43 bildet neben den gap junctions die hemichannels aus, also Verbindungen von Osteozyten zur extrazellulären Matrix (Plotkin & Bellido, 2013). Da Cx43 auch von Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert wird, können auch diese Zellreihen untereinander durch gap junctions kommunizieren (Abbildung 5). Dies spielt in der Regulation des Knochenauf- und umbaus eine tragende Rolle. Ein Fehlen von Cx43 bewirkt eine verringerte und ineffiziente Knochenbildung (Lecanda et al., 2000).

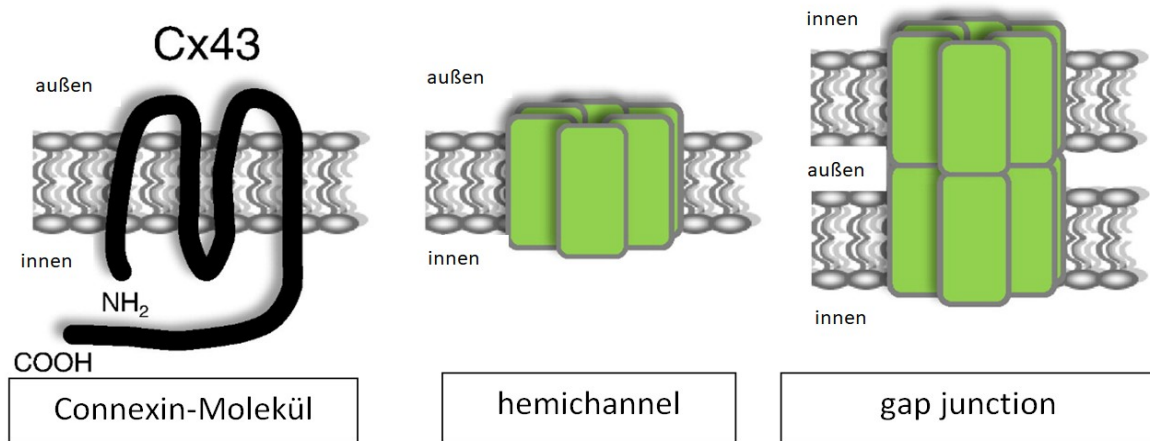


Abbildung 4: Connexin 43, hemichannel und gap junction. Schematische Darstellung eines Cx43 Moleküls mit der Kohlenhydrat (COOH)- und Amino (NH<sub>2</sub>)-Domäne, die sich auf zytoplasmatischer Seite befinden, sowie die 4 transmembranen Domänen. Sechs Cx43 Moleküle bilden ein Connexon oder einen hemichannel. Zwei Connexone benachbarter Membranen bilden dann eine gap junction. Modifiziert nach Plotkin et al., 2013.

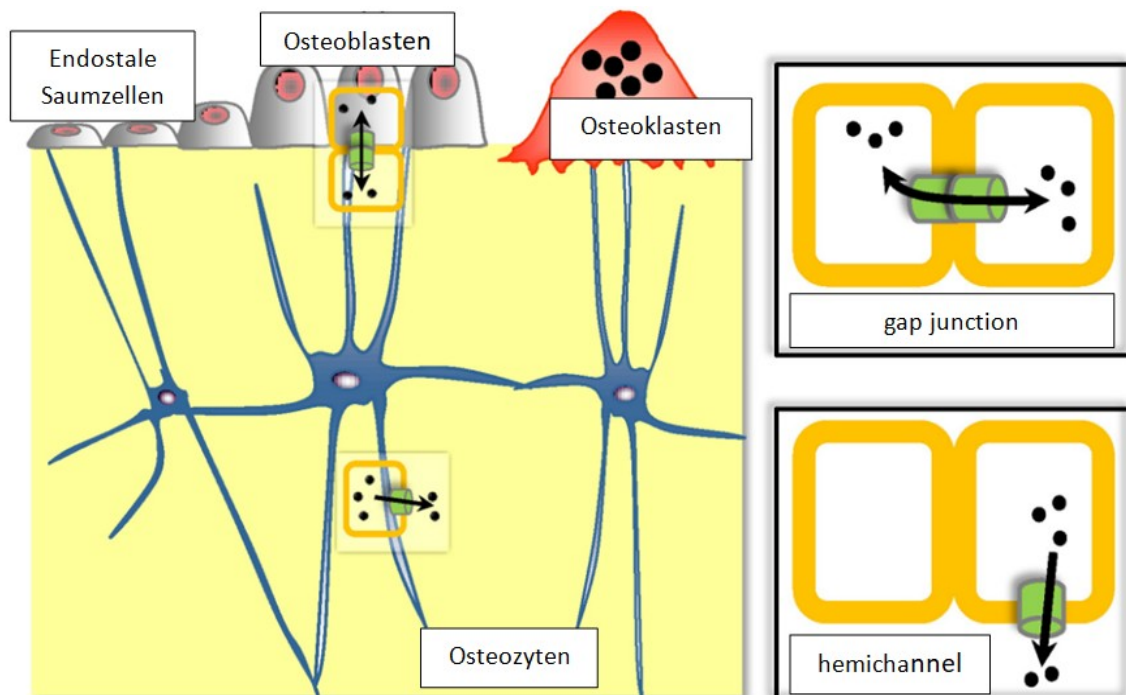


Abbildung 5: Cx43 wird von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten exprimiert, sodass die verschiedenen Zell-Typen untereinander mittels gap junctions und mit der extrazellulären Matrix über hemichannels kommunizieren können. Modifiziert nach (Plotkin et al., 2013).



## Osteoklasten

Der Knochenabbau erfolgt durch die Osteoklasten. In diesem Zusammenhang spielen sie auch im Kalzium-Haushalt des Körpers eine wichtige Rolle, da beim Knochenabbau Kalzium frei gesetzt wird. Ihre Vorläuferzellen sind einkernig und gehören per Definition zum mononukleär-phagozytären System. Nach der Aktivierung durch unten genauer beschriebene Faktoren können sie sich zu mehrkernigen Riesenzellen zusammenschließen (Schiebler, 2007). Sie liegen an der Trabekeloberfläche in kleinen Vertiefungen, den Howship-Lakunen, und bauen dort zunächst die anorganische Knochenmatrix mittels Ansäuerung ab. Sie setzen hierfür Salzsäure frei, wodurch ein saures Milieu mit einem pH-Wert zwischen 3,0 und 4,5 entsteht. Anschließend erfolgt durch Lyse der Abbau der organischen Bestandteile. Hierzu werden proteolytische Enzyme sezerniert. Zwei Gruppen spielen hier eine Rolle. Die lysosomalen Cysteinproteasen wie Cathepsin K (CtsK) und die Matrix-Metalloproteasen (MMPs). CtsK ist hauptsächlich für den Abbau von Kollagen Typ 1 verantwortlich, das den Großteil der organischen Knochenmasse stellt. Die Protease wird durch das saure Milieu in der Resorptionszone aktiviert und baut dann sehr effektiv Kollagenfasern ab. Eine Hemmung der CtsK-Expression führt zu einer erhöhten Knochenmasse und zu einer verbesserten Knochenstruktur (Le Duong et al., 2016). Eine Mutation in dem für Cathepsin K kodierenden Gen führt zur Pyknodysostose, einer Form der Osteochondrodysplasie, die gekennzeichnet ist durch Osteosklerose und verkürztem Längenwachstum (Saftig et al., 1998). Da CtsK vor allem von aktiven Osteoklasten exprimiert wird, wird sie häufig als Marker für die Aktivität von Osteoklasten herangezogen (Bossard et al., 1996). Neue Studien zeigen jedoch auch eine Expression von CtsK durch Osteozyten (Bonnet et al., 2017), was wiederum deren komplexe Aufgabe im Knochenstoffwechsel untermauert. Als Marker für die Osteoklasten-Aktivität und somit der Knochenresorption wird zudem die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) herangezogen. Es existieren zwei Isoformen. TRAP 5a ist ein Monomer und kann mittels posttranslationalen Prozessen in ein Dimer, TRAP 5b umgewandelt werden (Ljusberg et al., 1999). Nur TRAP 5b konnte im Knochen nachgewiesen werden und hat eine hohe enzymatische Aktivität. Sie wird hauptsächlich von Osteoklasten und Makrophagen exprimiert. Eine Erhöhung der TRAP 5b findet sich bei postmenopausaler Osteoporose (Janckila et al., 2001).

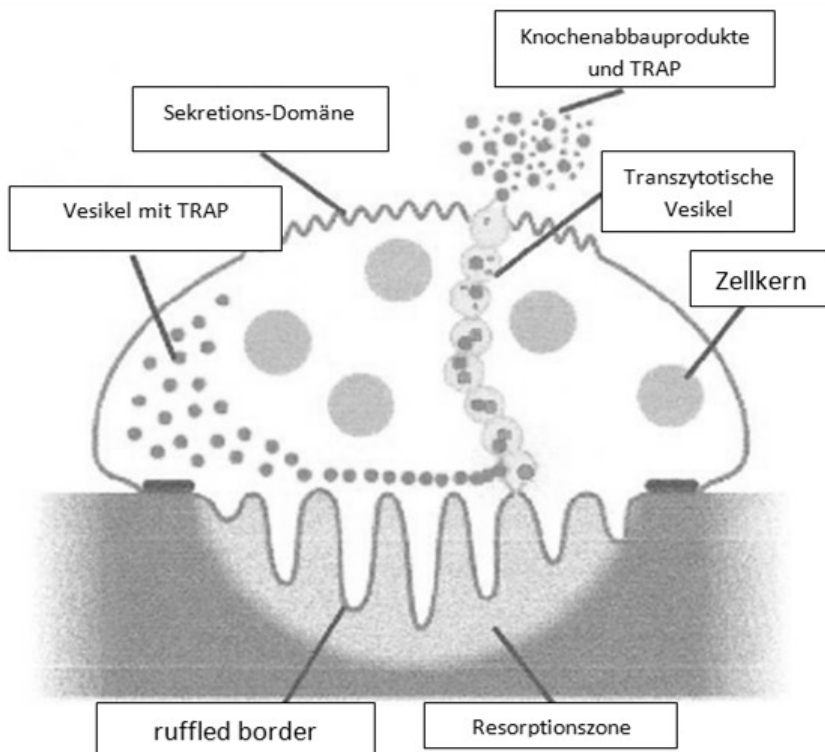
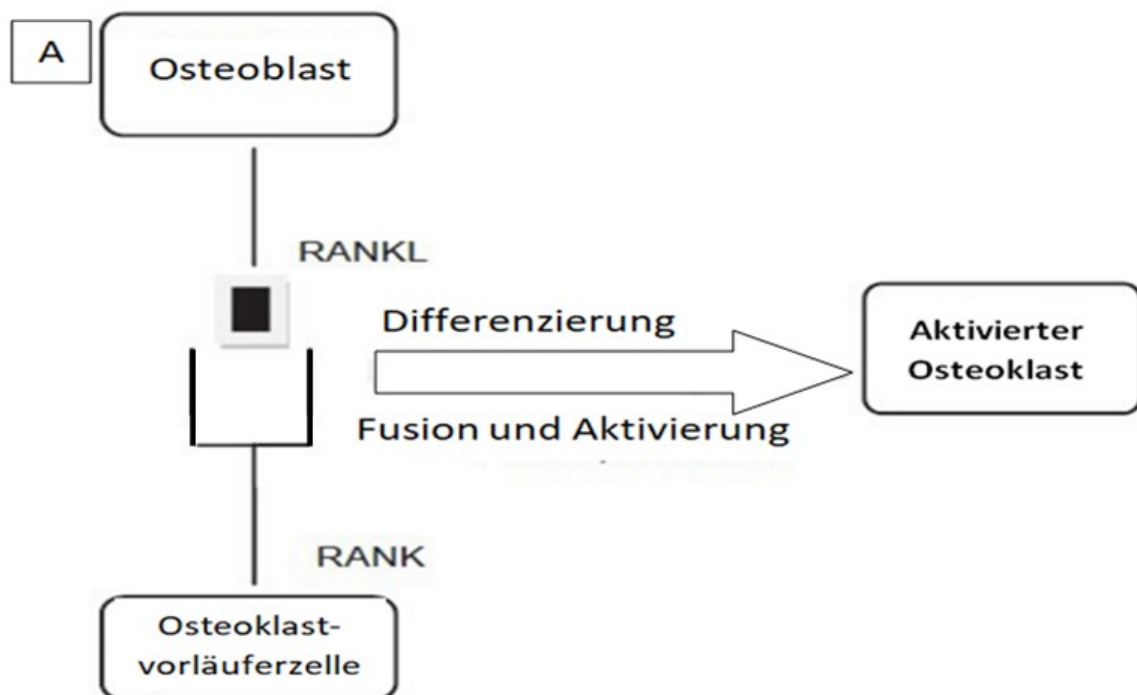


Abbildung 6: Funktion der TRAP in den Osteoklasten. Modifiziert nach Halleen et al., 2003.

Die Abbauprodukte des Knochens werden durch die Osteoklasten phagozytiert. Innerhalb der Osteoklasten fusionieren die endozytotischen Vesikel dann mit Vesikeln, die TRAP enthalten und im Golgi-Apparat der Osteoklasten produziert wurden. Die TRAP entfaltet nach der Fusion der Vesikel ihre oxidative Wirkung, sodass die Abbauprodukte der Knochenmatrix weiter aufgespalten werden können und schließlich über die Sekretions-Domäne am apikalen Pol der Osteoklasten in den interstitiellen Raum abgegeben werden (Abbildung 6, Halleen et al., 2003). Die Zellen haben dabei einen sehr engen Kontakt zum Knochen. Sie haften mit Integrinen am Knochen an und bilden dort eine Versiegelungszone, auch sealing zone genannt. Diese sorgt für ein abgeschlossenes System, indem die Resorption stattfinden kann. Um eine möglichst große Oberfläche zur Resorption zu generieren, bilden die Osteoklasten mit ihrer Zellmembran multiple Einstülpungen, auch ruffled border genannt, aus (Babaji et al., 2017). Die Differenzierung der Osteoklasten aus ihren hämatopoetischen Vorläuferzellen wird vor allem über ihre Gegenspieler, den Osteoblasten, gesteuert. Von Osteoklastenvorläuferzellen wird der Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) exprimiert. Osteoblasten und T-Zellen wiederum exprimieren den Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL), der an RANK binden kann. Hierfür muss RANK zuvor vom

macrophage colony stimulating factor (M-CSF) aktiviert werden. Auf diesem Weg erfolgt die Aktivierung der Osteoklasten. Die Osteoblasten können jedoch auch eine Inhibierung der Osteoklasten initiieren. Dies geschieht durch das von ihnen sezernierte OPG. OPG bindet an RANKL und verhindert, dass dieser an RANK der Osteoklasten-Vorläufer bindet (Kamat et al., 2013). OPG ist daher essentiell für die Erhaltung der Knochenmasse. Es wird vermutet, dass der RANKL-RANK-Signalweg bidirektional ist, sodass hierdurch auch wiederum die Osteoblasten von den Osteoklasten beeinflusst werden können (Abbildung 7, Zhang et al., 2017). Zudem zeigen neue Studien, dass Osteozyten vermutlich mehr RANKL als Osteoblasten exprimieren und eine noch bedeutendere Rolle in der Aktivierung der Osteoklasten spielen (Xiong et al., 2015).



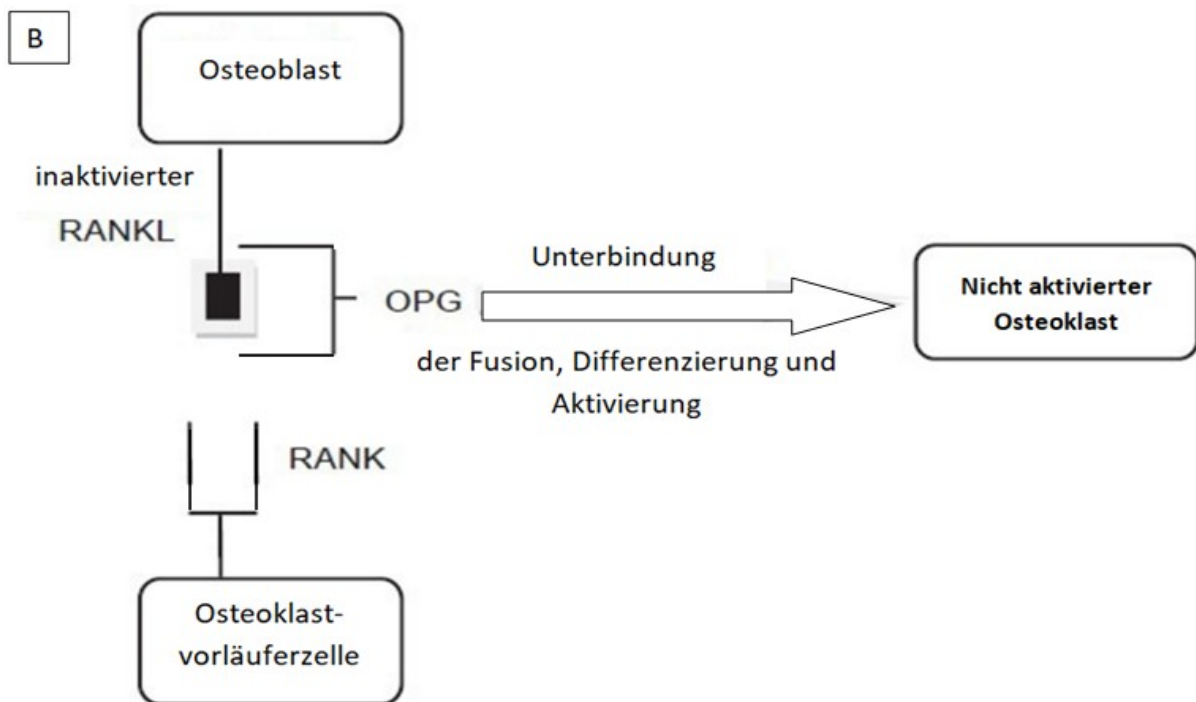


Abbildung 7: Schematische Darstellung des RANK/RANKL/OPG-Systems. A: RANKL bindet an RANK, sodass der Osteoklast aktiviert wird. B: OPG blockiert den RANKL, daher ist keine Aktivierung des Osteoklasten über die RANKL/RANK-Bindung möglich. Modifiziert nach Kamat et al., 2013.

Bei der Steuerung der Osteoklasten-Aktivität spielen jedoch noch wesentlich mehr Faktoren eine Rolle. Eine gesteigerte Expression von RANK kann durch Vitamin D3 und Tumornekrosefaktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) erfolgen. Die Expression von OPG wird ebenfalls durch viele verschiedene Hormone, Zytokine und Medikamente gesteigert. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und Steroidhormone wie 17 $\beta$ -Östradiol sind nur einige davon.

## 1.2 Hormonelle Einflüsse auf den Knochen

Der Knochenstoffwechsel wird, wie bereits im Kapitel zuvor erwähnt, durch zahlreiche Hormone beeinflusst. In diesem Abschnitt sollen einige davon näher erläutert werden. Glukokortikoide und Parathormon bewirken eine verminderte Expression von OPG. Das Parathormon sorgt für eine gesteigerte Expression von RANKL und führt indirekt zu einer verminderten Expression von OPG. Dies führt zu einer Steigerung der

Osteoklasten-Aktivierung und damit verbunden zu einer Erhöhung des extrazellulären Kalziums. Eine hohe extrazelluläre Kalzium-Konzentration hemmt wiederum die Osteoklasten-Aktivität. Ebenfalls zu erwähnen sind die Hormone der Calcitonin-Peptid-Familie.

Calcitonin selbst ist der Gegenspieler zum Parathormon. Es wird von den C-Zellen der Schilddrüse produziert und spielt im Kalzium-Haushalt eine wichtige Rolle. Es bewirkt eine Erniedrigung des Kalziumspiegels im Blut durch eine Erhöhung der Kalziumausscheidung über die Nieren, sowie der Hemmung der Osteoklasten und eine daraus resultierende verminderte Knochenresorption. Calcitonin vermittelt seine Wirkung über den Calcitonin-Rezeptor, der im Hypothalamus und in den Nieren zu finden ist. Im Knochen ließ sich dieser Rezeptor-Typ zudem auf Osteoklasten nachweisen (Keller et al., 2014). Calcitonin aus Lachs hat eine deutlich höhere biologische Potenz als das humane Calcitonin und wird auf Grund seiner Wirkung auf den Knochen zur Therapie bei Osteoporose und Morbus Paget eingesetzt (Pondel, 2000).

Adrenomedullin (ADM) gehört zur Calcitonin-Peptid-Familie, da es eine strukturelle Ähnlichkeit zu Calcitonin aufweist. Es wird in hohen Konzentrationen von Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert. ADM-Rezeptoren konnten auf Osteoblasten nachgewiesen werden. ADM kann dort direkt auf die Steuerung der Aktivität von Osteoblasten Einfluss nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass ADM sowohl die Proliferation von Osteoblasten steigern, als auch deren Apoptose verhindern kann (Uzan et al., 2008). ADM bewirkt zudem eine Suppression der über RANKL vermittelten Osteoklasten-Differenzierung *in vitro* und *in vivo* bei Mäusen (Liu et al., 2017).

Ebenfalls ein Protein der Calcitonin-Familie ist Intermedin (IMD), auch als Adrenomedullin 2 bezeichnet. Es ist vor allem in der Hypophyse, dem Hypothalamus und im Gastrointestinaltrakt zu finden, konnte aber auch in der Lunge und der Plazenta nachgewiesen werden. Seit seiner Entdeckung 2004 war seine genaue Funktion lange unklar. Eine Studie von Ren et al. konnte zeigen, dass IMD ähnlich wie ADM über den RANKL/OPG Signalweg einen positiven Einfluss auf den Knochenaufbau hat, in dem es die Apoptose von Osteoblasten verhindert. Zudem verhindert es die Reifung und Differenzierung von Osteoklasten, was insgesamt zu einer erhöhten Knochenmasse führt (Ren et al., 2015).

Der Wachstumsfaktor brain derived neurotrophic factor (BDNF) gehört zu der Gruppe der Neutrophine. BDNF wird im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle synthetisiert und als pro-BDNF in den Golgi-Apparat transportiert. Dort kann es zum einen zum sogenannten mature BDNF (mBDNF) prozessiert werden oder weiter als proBDNF fortbestehen. Beide Varianten werden dann in den Extrazellularraum abgegeben. Dabei wird der jeweilige Anteil beider Varianten von Faktoren wie dem Entwicklungszustand und dem Alter des Individuums beeinflusst. In der neonatalen und adoleszenten Phase konnten sowohl proBDNF als auch mBDNF nachgewiesen werden. Im erwachsenen Alter dominierte mBDNF. Der jeweilige Anteil der beiden Proteine spielt eine wichtige Rolle, da sie zum Teil gegensätzliche Rezeptor-Signalkaskaden vermitteln können. So aktiviert proBDNF den p75-Rezeptor. Dieser gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren und vermittelt über die Ligandenbindung eine Apoptose von Nervenzellen und kann die Proliferation von Stammzellen sowie die Differenzierung von Neuronen hemmen (Li et al., 2017). mBDNF spielt daher in der Entwicklung von peripheren als auch der zentralen Neuronen eine wichtige Rolle, in dem er deren Effizienz und Plastizität fördert und bewirkt hierdurch einen Schutz der bestehenden Neuronen vor der Apoptose. Seine Wirkung vermittelt er über seinen spezifischen Rezeptor, der Tropomyosin Rezeptor Kinase B (TrkB). Dieser findet sich sowohl an der prä- als auch postsynaptischen Membran. Der BDNF-TrkB Signalweg kann an den Neuronen einen Einfluss auf die Transkription und Translation oder aber die Weiterleitung und Freigabe von verschiedensten Proteinen bewirken, die an der Bildung der Synapsen beteiligt sind. BDNF hat zudem einen Einfluss auf die Östrogen-Ausschüttung im Hippocampus und Hypothalamus. Diese Eigenschaften machen klar, dass BDNF eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Erkrankungen spielt, die das Gehirn betreffen (Cattaneo et al., 2016). Es konnte bei Patienten mit Demenz, Schizophrenie, Depression, bipolarer Störung, aber auch Anorexia nervosa und Bulimia nervosa eine Veränderungen der BDNF-Expression und eine gestörte BDNF-Funktion nachgewiesen werden (Polyakova et al., 2015). BDNF spielt zudem eine Rolle im Knochenstoffwechsel, indem es Einfluss auf die Differenzierung der Zellen über den TrkB-Rezeptor nimmt. Es konnte BDNF und auch TrkB in aktiven Osteoblasten nachgewiesen werden. Eine Wirkung auf Osteoklasten wird ebenfalls vermutet. In einer Studie von 2012 konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von BDNF zu mesenchymalen Stammzellen eine Erhöhung von RANKL und somit eine Förderung der Differenzierung zu Osteoklasten bewirkt (Ai et al., 2012). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Nervenschädigung

im Knochen zu einer lokalen Expression von BDNF führt. BDNF aktiviert dann über TrkB die Osteoblasten-Differenzierung und vermittelt zeitgleich eine Aktivierung von Osteoklasten, was zu einem koordinierten Knochenumbau führt (Ida-Yonemochi et al., 2017). Zudem hat BDNF über zentrale Wege einen Einfluss auf den Knochen. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von BDNF im Gehirn der Maus zu einer gesteigerten Femur-Länge und erhöhten Knochendichte und Mineralgehalt führt (Camerino et al., 2012).

### **1.3 Leptin**

Leptin ist eine Aminosäure, die vor allem von weißem Fettgewebe exprimiert wird. Die Bezeichnung stammt aus dem Griechischen, hier bedeutet „leptos“ dünn. Diese Namensgebung deutet bereits indirekt auf den Phänotyp der sogenannten ob/ob-Knockoutmäusen hin, bei denen die Produktion von Leptin durch einen Defekt im Leptin-Gen nicht möglich ist. Sie weisen daher einen absoluten Mangel an Leptin auf. Diese Mäuse sind deutlich fettleibig, sodass das entsprechende Gen als obese Gen (englisch für fettleibig) benannt wurde (Zhang et al., 1994). Bei Mäusen liegt das für Leptin kodierende Gen auf Chromosom 6 und konnte 1994 erstmals nachgewiesen werden. Im Jahr 1995 konnte das entsprechende Korrelat im menschlichen Genom identifiziert werden. Dieses liegt auf Chromosom 7q (Green et al., 1995). Es konnte seitdem gezeigt werden, dass Leptin ein Schlüsselhormon in der Regulation des Energiehaushaltes sowohl der Maus als auch des Menschen darstellt (Maffei et al., 1995), indem es direkt positiv mit der Aufnahme von Nahrung sowie dem Body Mass Index (BMI) korreliert. Die Plasma-Leptin-Spiegel waren demnach bei Menschen mit einer Gewichtsreduktion durch limitierte Nahrungsaufnahme deutlich erniedrigt (Chanet al., 2003). Frauen tendieren im Vergleich zu Männern auch nach der Menopause zu einem erhöhten Leptinspiegel. Dies kann daraus resultieren, dass subkutanes Fett, das bei einer Frau im Vergleich zum Mann einen höheren Anteil am gesamten Körperfett ausmacht, mehr Leptin produziert als viszerales Fett. Die dafür notwendige Regulation erfolgt über zentrale Wege, wobei der Hypothalamus, das mesolimbische Dopaminsystem sowie die Medulla oblongata eine entscheidende Rolle spielen (Park & Ahima, 2015, Abbildung 8).

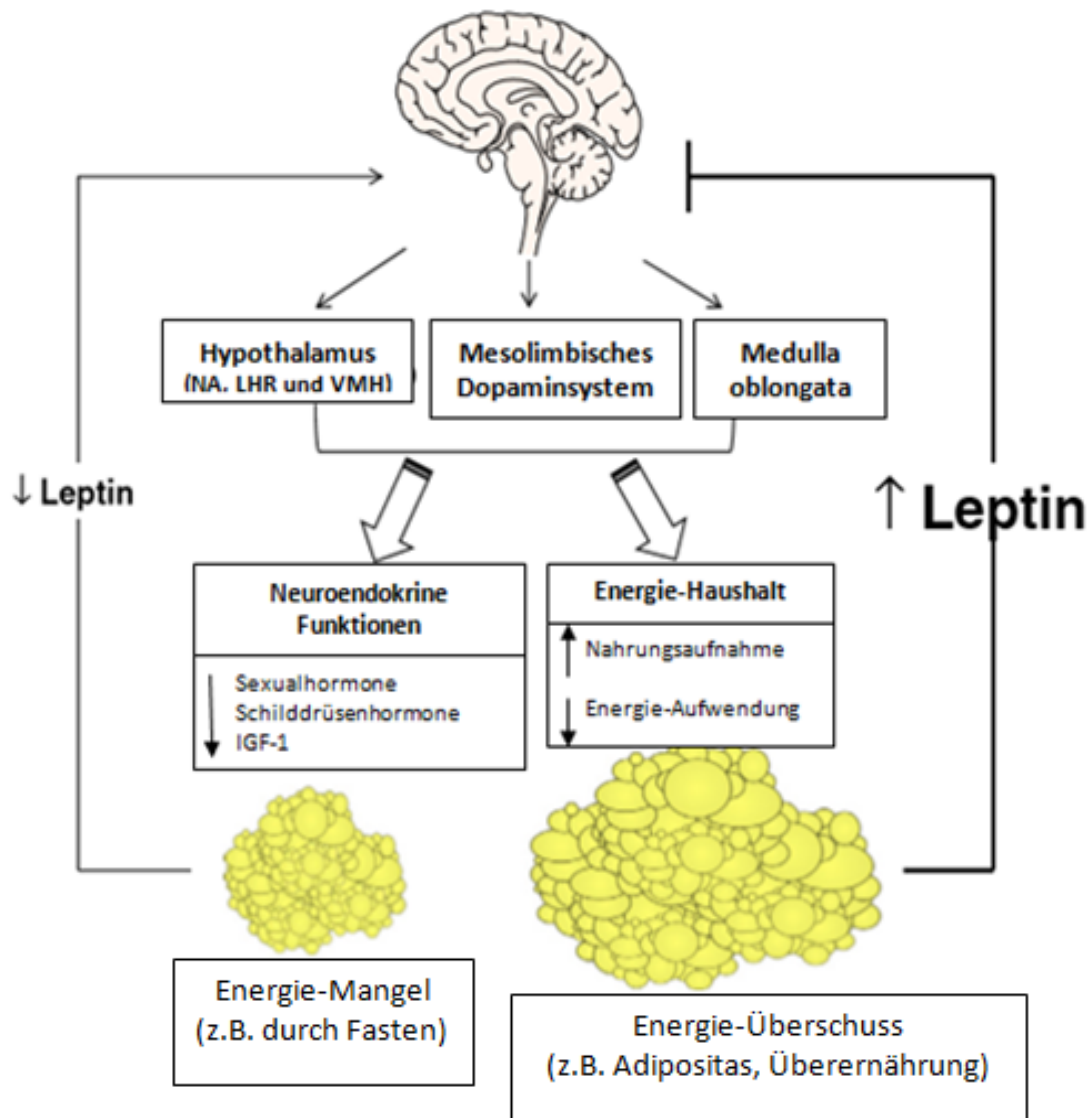


Abbildung 8: Die Auswirkungen von Leptin im Fall eines Energie-Mangels oder -Überschusses. Bei Energie-Mangel nimmt der Leptin-Spiegel im Blut ab und sorgt über zentrale Wege für eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, sowie eine Senkung der Sexual- und Schilddrüsen-Hormon-Produktion. Umgekehrt senkt ein hoher Leptin-Spiegel im Blut die Nahrungsaufnahme. Abkürzungen: NA- Nucleus arcuatus, LHR- Laterale Hypothalamische Region, VMH- Ventromedialer Hypothalamus. Modifiziert nach Park et al., 2015.

Die Ausschüttung von Leptin wird jedoch nicht nur durch weiße Fettzellen und der Nahrungsaufnahme beeinflusst, sondern steht mit vielen anderen Hormonen wie Sexualhormonen, Insulin, Glukokortikoiden, Zytokinen und Katecholaminen im Wechselspiel (Ahima & Osei, 2004, Tabelle 1).



Tabelle 1: Den Plasma-Leptin-Spiegel beeinflussende Faktoren. Angepasst aus Ahima et al., 2004. Abkürzungen: TNF-Tumornekrosefaktor, IL 6-Interleukin 6

Was erhöht den Leptin-Spiegel im Blut	Was senkt den Leptin-Spiegel im Blut
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erhöhter Körperfettanteil</li> <li>- Erhöhter Plasma-Glukose-Spiegel</li> <li>- Überernährung</li> <li>- Insulin, Östrogen</li> <li>- Proinflammatorische Zytokine (TNF, IL6)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kälteexposition und adrenerge Aktivierung</li> <li>- Verringerter Körperfettanteil</li> <li>- Hungern</li> <li>- Schilddrüsenhormone</li> <li>- Testosteron</li> </ul>

Leptin konnte abgesehen vom Fettgewebe und Hypothalamus auch in anderen Körperregionen wie Plazenta, Brustgewebe, Skelettmuskel und Knochen nachgewiesen werden (Margetic et al., 2002). Somit hat Leptin nicht nur für das metabolische Gleichgewicht große Bedeutung, sondern spielt auch im Hinblick auf immunologische, physiologische und reproduktive Faktoren eine wichtige Rolle (Friedman & Mantzoros, 2015). Bei Mäusen mit einem Defekt im Leptin-Gen konnte ein verringertes Hirnvolumen und eine weniger ausgeprägte Myelinisierung des Gehirns festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass Leptin einen Einfluss auf das Wachstum des Gehirns und dessen Entwicklung hat (Ahima et al., 1999). Weiterhin ergab eine nicht randomisierte Studie an Patienten von London et al. auch funktionelle Defizite des Gehirns bei Menschen mit angeborenem Leptin-Mangel, die durch eine Behandlung mit Leptin reversibel waren (London et al., 2011). Leptin hat zudem über direkten und indirekten Weg Einfluss auf den Knochenstoffwechsel.

### 1.3.1 Db/db-Mäuse

Das Gen, welches für den Leptin-Rezeptor (LEPR) kodiert, liegt bei Mäusen auf dem Chromosom vier. Der LEPRb, einer von sechs Rezeptor-Subtypen, ist hauptsächlich im Hypothalamus und zu geringeren Teilen auch in den Hoden und weißem Fettgewebe zu finden. Er ist in Mäusen vom Typ C57BL/Ks db/db defekt und damit funktionslos (Lee et al., 1996). Die anderen Rezeptor-Subtypen, die in der Stimulation der Synthese von Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Kollagen und Osteopontin eine Rolle spielen, sind jedoch weiter funktionsfähig (Sahai et al., 2004).

Dies führt zu einem typischen Phänotyp. Die Mäuse sind charakterisiert durch Fettleibigkeit, erhöhte Nahrungsaufnahme und erhöhte Insulin- und Glukose-Spiegel im Blut (Staats, 1975). Zudem weisen sie eine Muskelhypoplasie, einen Hypogonadismus und einen Hypercortisolismus auf. Dieses Mausmodell wird häufig zur Untersuchung der Insulinresistenz und der damit vergesellschafteten Komorbiditäten genutzt. Bezüglich des Knochenstatus der Mäuse gibt es unterschiedliche Forschungsergebnisse. Ducky et al. zeigte in seiner Studie, dass db/db-Mäuse einen gesteigerten Knochenumbau und in Folge eine erhöhte Knochenmasse aufweisen. Es wurde eine erhöhte Anzahl an Trabekeln sowohl in Röhrenknochen als auch Wirbelkörpern mittels histologischer Analyse nachgewiesen. Zudem wurde eine dreifach erhöhte Knochendichte festgestellt. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) (Ducky et al., 2000). Bezüglich der Knochenheilung nach einer Fraktur konnte ein um das Zweifache erhöhter Knochenumbau in den Röhrenknochen der db/db-Mäuse festgestellt werden (Beil et al., 2011). In anderen Studien wurden dagegen eine verminderte Knochendichte sowie eine reduzierte Anzahl an Trabekeln und deren Dicke beschrieben. Dies wurde mittels  $\mu$ CT untersucht. Zudem wurde die Biegefestigkeit mittels Drei-Punkt-Biegetest genauer betrachtet. Hier zeigte sich eine geringere Biegefestigkeit der Knochen der db/db-Mäuse. Auch hier stellten WT-Mäuse die Vergleichsgruppe dar (Williams et al., 2011; Ealey et al, 2006). Röszer et al. verglich ebenfalls homozygote db/db-Mäuse und WT-Mäuse miteinander. Er wies einen erhöhten Knochenumbau in db/db-Mäusen nach, jedoch beschrieb er auch eine erhöhte Osteoklastenaktivität und Verfettung des Knochens, was wiederum zu einer niedrigeren Knochenstabilität führte (Röszer et al., 2014).

### **1.3.2 Leptin-Rezeptoren**

Leptin vermittelt seine Wirkung durch Bindung an spezifische Leptin-Rezeptoren (LEPR), von denen bisher sechs verschiedene Untergruppen identifiziert werden konnten (LEPRa, LEPRb, LEPRc, LEPRd, LEPRE, LEPRf, Abbildung 9).

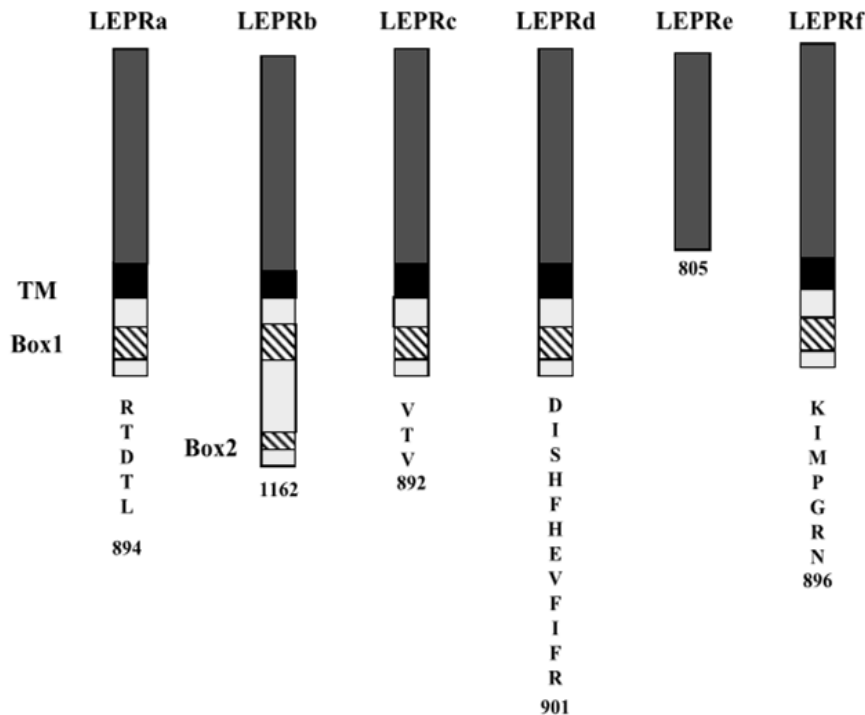


Abbildung 9: Darstellung der Struktur der durch alternatives Splicing entstandenen LEPR Isoformen. Die terminalen Aminosäurereste der LEPR Isoformen sind nach dem Alphabet benannt. Modifiziert nach (Ahima et al., 2004).

Die Leptin-Rezeptoren teilen im Aufbau eine gemeinsame extrazelluläre Leptin-Bindungsstelle. Sie haben jedoch als intrazellulären Teil eine unterschiedliche Kohlenhydrat-Domäne. Diese entstehen jeweils durch alternatives Splicing. Die kurze Variante des Rezeptors (LEPRa) kommt ubiquitär vor, wohin gegen die lange Rezeptorvariante (LEPRb) vor allem im Hypothalamus zu finden ist und dort die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt reguliert (Fei et al., 1997; Lee et al., 2002). Der LEPRb besitzt eine Bindungsstelle für die Janus Kinase (JAK) Signalkaskade und stellt dadurch eine hocheffiziente Leptin-Wirkung sicher. Diese Rezeptorvariante ist bei den db/db-Knockoutmäusen defekt. Dem LEPRc dagegen fehlt die transmembrane sowie die intrazelluläre Domäne. Er zirkuliert als ein löslicher Rezeptor im Blut und spielt somit gemeinsam mit den anderen kurzen Rezeptorvarianten eine Rolle im Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke (Wauman et al., 2017).

Bezüglich des Vorkommens der verschiedenen vorhandenen Rezeptorvarianten gibt es unterschiedliche Forschungsergebnisse im Hinblick auf verschiedene Spezies. Es

wurden auf Osteoblasten von Ratten die Subgruppen LEPRa, -Rb, -Rc, und -Rf nachgewiesen (Lee et al., 2002). Auf humanen Osteoblasten wurde hingegen vor allem die Rezeptorvariante LEPRb gefunden (Reseland et al., 2001).

### **1.3.3 Leptin und seine Beziehung zum Knochen**

Dass Fettgewebe nicht nur als Energiespeicher dient, sondern einen bedeutenden Einfluss auf die Homöostase des gesamten Körpers hat, ist seit der Entdeckung von Leptin 1994 bekannt. Knochen- und Fettgewebe stehen in engem Kontakt und beeinflussen sich gegenseitig durch von ihnen ausgeschüttete Hormone. Wissenschaftliche Studien zeigen immer mehr die Bedeutung von Leptin, einem der wichtigsten vom Fettgewebe exprimierten Zytokine, auf den Knochenstoffwechsel (Abbildung 10, Chen & Yang, 2015).

Ducy et al. untersuchte den Knochenstatus sowohl bei ob/ob- als auch bei db/db-Mäusen. Hier zeigte sich bei beiden Versuchsgruppen eine Erhöhung der Knochenmasse und des Knochenumbaus. Bei der Betrachtung der verschiedenen Knochenarten fiel jedoch ein Unterschied auf. Das Femur der Mäuse wies im Vergleich zu WT-Mäusen eine verkürzte Länge sowie eine verringerte Trabekelfläche und einen reduzierten Knochenmineralgehalt auf. Zudem waren vermehrt Fettzellen im Knochen zu sehen. Die Wirbelkörper zeigten dagegen eine erhöhte Trabekelfläche, ein gesteigertes Längenwachstum sowie einen erhöhten Mineralgehalt. Die ob/ob-Mäuse wiesen zudem eine deutlich verringerte Muskelmasse auf. Ähnliche Konstellationen konnten im Menschen während des Alterns nachgewiesen werden. Daher wurde hier ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Muskelmasse, Zunahme des Fettgewebes und Osteopenie vermutet (Hamrick et al, 2004). Da Leptin an Zellen im Hypothalamus bindet, liegt die Vermutung nahe, dass Leptin über einen zentralen Weg den Knochenumbau regulieren kann. Eine intrazerebroventrikuläre Leptin-Gabe bewirkt laut Ducy et al. in ob/ob-Mäusen ebenso wie in WT-Mäusen eine Verringerung der Knochenmasse (Ducy et al., 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass sich auf Knochenstammzellen, aus denen Osteoblasten und Fettzellen entstehen können, ebenfalls Leptin-Rezeptoren befinden. Leptin kann somit auch direkt lokal auf den Knochenstoffwechsel Einfluss nehmen. Es bewirkt dort die Ausdifferenzierung der Stammzellen zu Fettzellen anstatt zu Osteoblasten und hat lokal einen negativen Effekt auf den Knochen (Yue et al., 2016; Turner et al., 2013). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Ealey et al. und Williams et al., die bei db/db-Mäusen eine reduzierte

Knochenqualität mit verminderter Trabekeldichte nachweisen konnten und daher einen positiven Einfluss von Leptin auf den Knochen vermutet hatten (Ealey et al., 2006; Williams et al., 2011). Leptin bewirkt an den Osteoblasten eine Herabregulierung von RANKL und eine Hochregulierung von OPG (Poudyal & Brown, 2013). OPG wiederum hemmt indirekt über die Bindung an RANKL die Differenzierung und Proliferation von Osteoklasten, wodurch es einen negativen Effekt auf den Knochenabbau vermitteln kann (Boyce & Xing, 2007). Hierdurch hat Leptin zwei gegenteilige Möglichkeiten auf den Knochenstoffwechsel Einfluss zu nehmen.

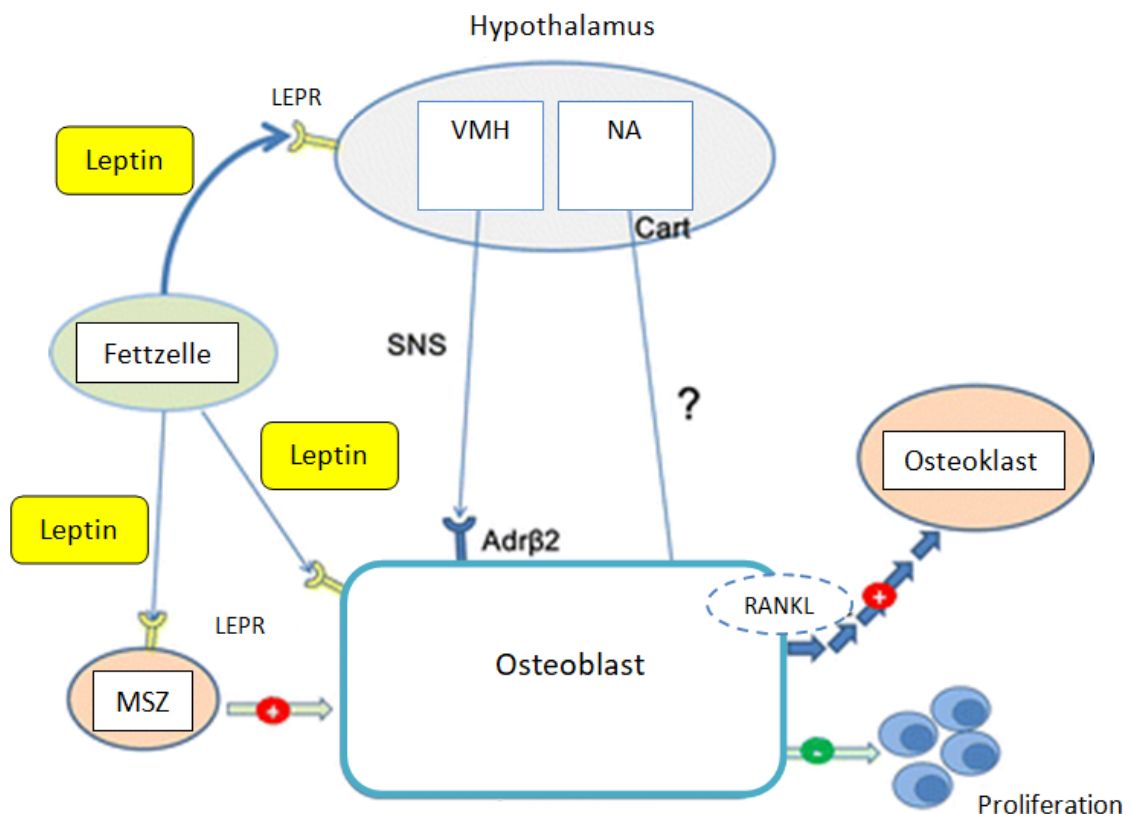


Abbildung 10: Zentraler und peripherer Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel. MSZ- mesenchymale Stammzelle, LEPR- Leptin-Rezeptor, VMH- Ventromedialer Hypothalamus, NA- Nucleus arcuatus, SNS- Sympathisches Nervensystem, Cart- Cocain- und Amphetamin- reguliertes Transkript. Modifiziert nach Chen et al., 2015.

## 1.4 Fragestellung

Leptin ist ein Hormon mit komplexen Aufgaben. Es hat zum einen Einfluss auf die Regelung des Energiehaushalts und die Bildung von Fettgewebe, zum anderen spielt es aber auch in der Steuerung des Immunsystems, der Entwicklung des Gehirns und in der Regulation des Knochenstoffwechsels eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob Leptin über den LEPRb eine Wirkung auf den Knochen vermittelt. Und wenn ja, ob diese Wirkung einen positiven oder negativen Einfluss auf die Knochenqualität hat.

Zur Rolle von Leptin im Knochenstoffwechsel zeigen bisherige Studien unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die komplexen Zusammenhänge von Leptin und dem Knochenstoffwechsel bei Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen zu untersuchen und die Knochenstruktur der Mäuse mittels einer direkten heterozygoten Vergleichsgruppe neu zu betrachten. Für diese Arbeit wurden homozygote db/db-Knockout-Mäuse verwendet. Als Vergleichsgruppe wurden heterozygote db/+ Mäuse herangezogen. Hierdurch konnte ein direkter Vergleich der beiden Phänotypen erfolgen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten deutlich machen zu können. Da Leptin in den db/db-Mäusen noch vorhanden und lediglich einer der sechs Leptin-Rezeptor-Subtypen defekt ist, kann diese Studie eine neue Sichtweise auf die Wirkung dieses LEPRb ermöglichen.

Um eine Aussage über die Stabilität und Qualität des Knochens der beiden Versuchsgruppen zu erreichen, erfolgte eine Untersuchung der Knochen mittels biomechanischer Testung. Um die möglichen strukturellen Unterschiede genauer untersuchen und vergleichen zu können, wurde zudem eine histologische und histomorphometrische Untersuchung durchgeführt. Die Fragestellung lautete, ob sich Unterschiede in der Struktur, der Anzahl der verschiedenen Knochenzellen und der Trabekelfläche feststellen lassen.

Mit der Frage nach dem Einfluss von Leptin auf die Aktivierung und Hemmung von verschiedenen Knochenzellen mittels hormoneller Kaskaden und um die im Knochengewebe stattfindenden Veränderungen des Gleichgewichts der knochenauf- und abbauenden Zellen besser beurteilen zu können, wurde die Expression verschiedener, am Knochenstoffwechsel beteiligter, Hormone untersucht.

Mithilfe der zu erwartenden Ergebnisse kann eine Aussage über die Rolle der durch den LEPRb vermittelten Wirkung von Leptin auf den Knochenstoffwechsel der Maus getroffen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

Zur Untersuchung des Knochenstatus an Leptin-defizienten Mäusen wurden zwei Vergleichsgruppen verwendet. Es wurden fünfzehn männliche, homozygote BKS(D)-Leprdb/jOrlRj (db/db) Mäuse mit fünfzehn männlichen heterozygoten BKS(D)-Leprdb/jOrlRj Temoin (db/+) Mäusen verglichen. Alle Untersuchungen wurden im Einklang mit der EU-Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Tierversuchsnummer GI20/11- Nr.A18/2010). Der Bezug der Tiere erfolgte von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Sie wurden mit Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum gefüttert. Die Haltung fand unter speziell pathogen-freien Bedingungen mit Kontrolle der Luftfeuchtigkeit ( $50 \pm 10\%$ ), Temperatur ( $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) und Beleuchtung (6:00-18:00) in der Tierhaltung der Biochemie Gießen statt.

Die Tiere wurden im Alter von 6, 12 und 18 Wochen euthanasiert. Die Betäubung der Tiere erfolgte mit einer Lösung aus Ketamin 10% und Xylazin 2% in NaCl 0,9% im Verhältnis 1:0,8:8,2. Hiervon wurden 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Anschließend wurden die Mäuse per Aortenschnitt getötet.

Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Tiere

Bezeichnung	Standzeit	Spezifizierung	Gewicht [g]
M 01	6 Wochen	db/+	21
M 02	6 Wochen	db/+	20
M 03	6 Wochen	db/+	21
M 04	6 Wochen	db/+	21
M 05	6 Wochen	db/+	20
M 06	6 Wochen	db/db	30
M 07	6 Wochen	db/db	30
M 08	6 Wochen	db/db	29
M 09	6 Wochen	db/db	29



M 10	12 Wochen	db/+	26
M 11	12 Wochen	db/+	24
M 12	12 Wochen	db/+	24
M 13	12 Wochen	db/+	25
M 14	12 Wochen	db/+	23
M 15	12 Wochen	db/+	25
M 16	12 Wochen	db/db	48
M 17	12 Wochen	db/db	42
M 18	12 Wochen	db/db	47
M 19	12 Wochen	db/db	49
M 20	12 Wochen	db/db	40
M 21	12 Wochen	db/db	47
M 22	18 Wochen	db/+	28
M 23	18 Wochen	db/+	25
M 24	18 Wochen	db/+	28
M 25	18 Wochen	db/+	29
M 26	18 Wochen	db/db	52
M 27	18 Wochen	db/db	58
M 28	18 Wochen	db/db	62
M 29	18 Wochen	db/db	57
M 30	18 Wochen	db/db	59

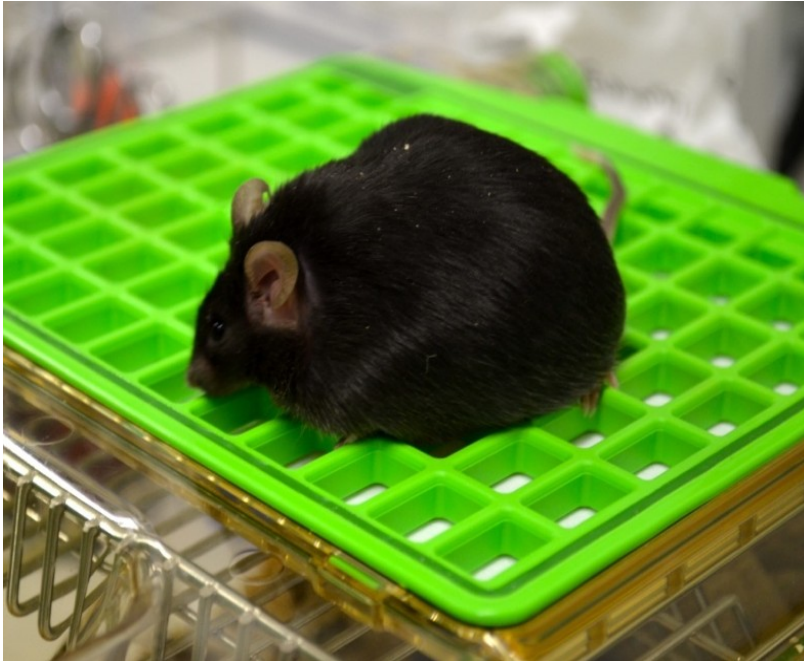


Abbildung 11: Bild einer homozygoten, männlichen BKS(D)-Leprdb/jOrlRj (db/db) Maus im Alter von 18 Wochen

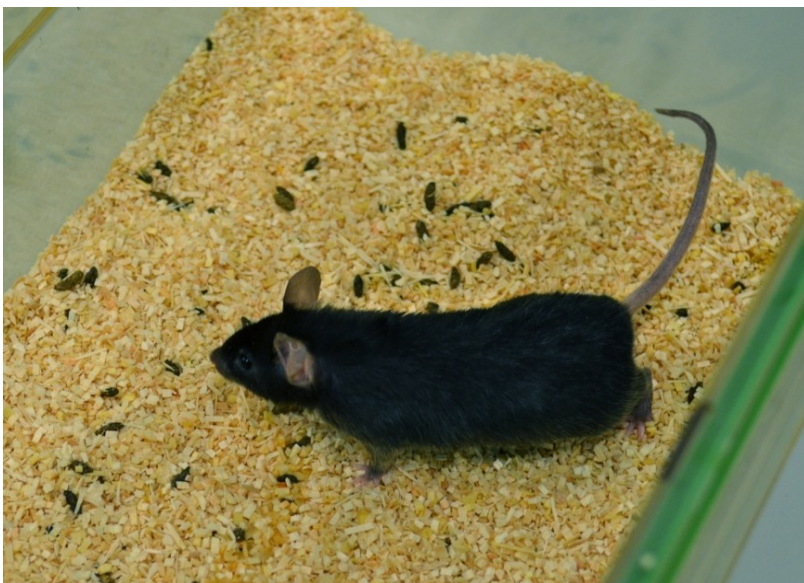


Abbildung 12: Bild einer heterozygoten, männlichen BKS(D)-Leprdb/jOrlRj Temoin (db/+) Maus im Alter von 18 Wochen

Im Anschluss wurden die in der Tabelle 3 aufgeführten Knochen entnommen und vom Gewebe freipräpariert. Da der Knochenstatus der Knockoutmäuse bisher kontrovers diskutiert wird, wurden standardisierte Parameter zur Objektivierung der Knocheneigenschaften verwendet.

Für die Paraffin-Histologie wurden die Knochen in 4%iges phosphatgepuffertes Paraformaldehyd und für die nicht entkalkten Epon-Semidünnschnitte in eine Yellow-Fix-Lösung gelegt. Die Lösung bestand aus 2% Paraformaldehydlösung, 0,1 molare Masse (M) Na-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4, 2% Glutardialdehyd und 0,02% Pikrinsäure. Die Knochen für die real-time RT-PCR wurden umgehend in flüssigen Stickstoff überführt und die Proben für die biomechanische Analyse mit einer in 0,9% NaCl<sub>2</sub> getränkten Kompresse bei -20°C tiefgefroren.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Knochen

Knochen	Verwendungszweck
Linker Femur	Biomechanik
Wirbelkörper Th10	Real-time RT-PCR
Wirbelkörper L2	Paraffin-Einbettung für die Histomorphometrie und Enzymhistologie
Wirbelkörper L3	Epon-Einbettung für die Histologie

## 2.2 Biomechanik

Um die Biegefestigkeit im Bereich der Diaphyse des linken Femurs zu bestimmen, wurde ein 3-Punkt-Biegeversuch verwendet. Am Ort der Testung, dem Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm, Deutschland, wurden die Knochen zunächst aufgetaut und bis zur Messung in 0,9%iger NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelagert. Die Fixation des proximalen Femurs erfolgte dann mittels UV-aushärtendem Kleber (iCEM®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) in einer extra hierfür angefertigten Aluminiumhülse von 8 Millimeter (mm) Durchmesser mit Zentrierbohrung (Werkstatt der Universitätsklinik Ulm) mittels einer UV-Polymerisationslampe (EXAKT, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde der Knochen in eine spindelgetriebene Materialprüfmaschine Z10 (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) gespannt. Die Platzierung des Prüfstempels fand in der Mitte zwischen proximalem und distalem Teils des Femurs statt. Der Biegeversuch erfolgte in je drei Zyklen, wobei die zwei ersten Zyklen mit dem Ziel der

Probenfeinjustierung unter einer jeweiligen Maximallast von 4 Newton (N) stattfanden. Im dritten Zyklus der Testmethode wurde eine Maximallast von bis zu 20 N angewendet, die dann zum Bruch des Knochens führte. Zur Auswertung des Biegeversuchs diente die Software testXpert II® der Firma Zwick/Roell.

Anschließend wurde folgende Formel verwendet, um die Biegesteifigkeit ( $EI$  in  $N/mm^2$ ) zu berechnen:

$$EI = \frac{k}{3l} a^2 b^2$$

$k$  steht hierbei für die Steigung der Linearen,  $l$  für die Distanz zwischen den beiden Endpunkten,  $a$  und  $b$  für die Distanzen zwischen den Auflagepunkten und dem Prüfstempel.

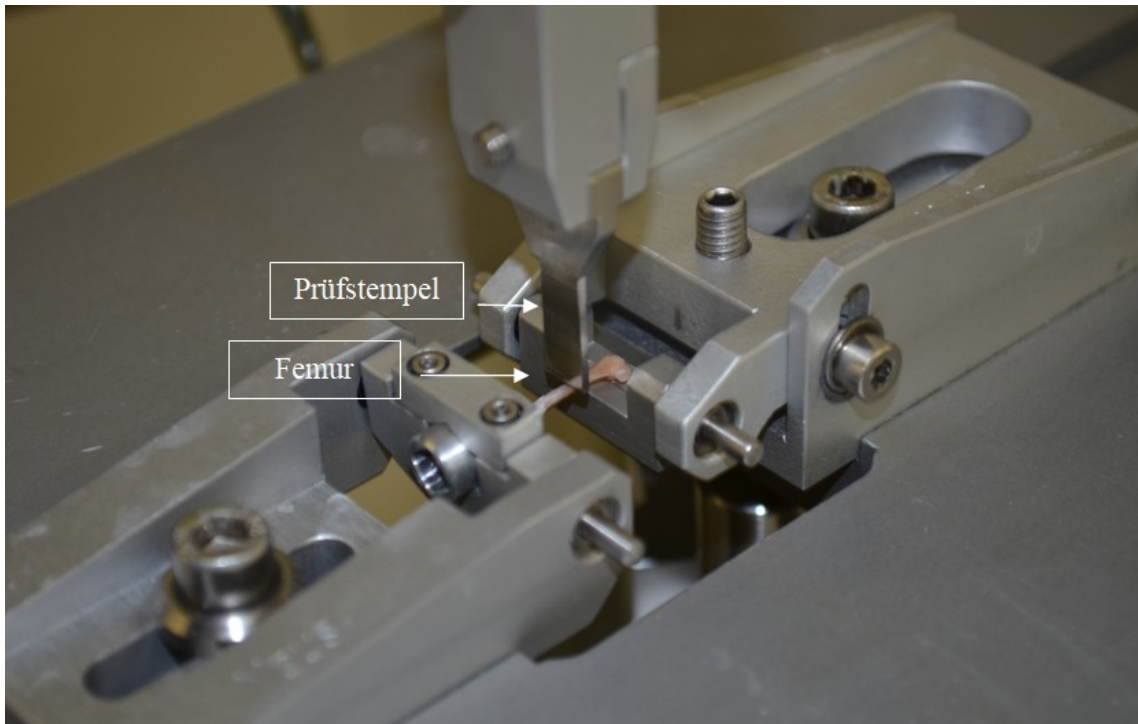


Abbildung 13: Aufbau der Biomechanik-Versuche. Zu erkennen ist der Femur-Knochen, auf den die Kraft mittels Prüfstempel aufgebracht wird. Freundlich zur Verfügung gestellt von W. Floel

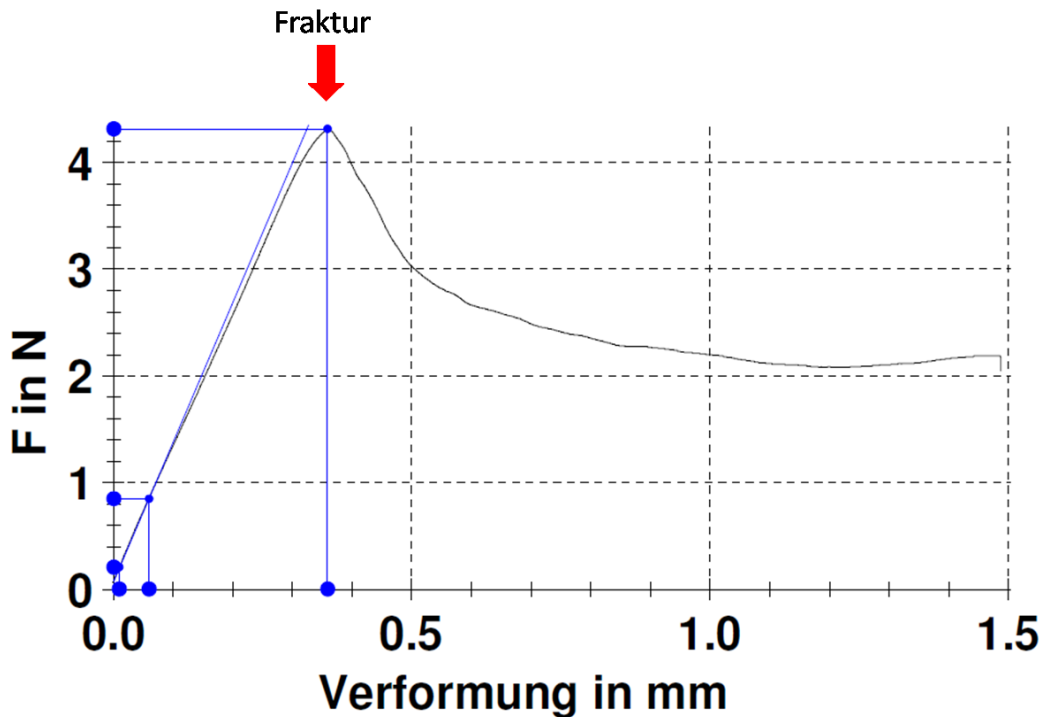


Abbildung 14: Messgrafik 4/3, Zyklus 3 (bis  $F_{max}$ ); roter Pfeil = Bruch des Knochens

## 2.3 Histologie und Enzymhistochemie

### 2.3.1 Entkalkung und Anfertigung der Schnitte

Die histologischen Untersuchungen wurden an entkalkten Wirbelkörpern L2 durchgeführt. Vor der Entkalkung wurden die Proben für 24 Stunden (h) in 4% Paraformaldehydlösung pH 7,4 (PFA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 8°C fixiert und anschließend 6x mit einem 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die Entkalkung für die Paraffin-Schnitte erfolgte dann mittels einer Ethylendinitrotetratessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung). Diese bestand aus einem 0,281 M Tris-Puffer (3,4% Trizma base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und einer 10% EDTA-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die EDTA-Lösung wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Proben befanden sich in Einbettungskapseln auf einem Rüttler, um eine gleichmäßige Entkalkung zu gewährleisten. Eine ausreichende Entkalkung wurde festgestellt, in dem eine Präpariernadel den Knochen ohne Widerstand durchdringen konnte. Anschließend wurden die Knochen 1 h unter fließendem Leitungswasser gespült und mittels einer ansteigenden Reihe von Ethanol-Bädern (70-80-96% je 2 h, 3 x 100% je 3 h) und Xylol (je 3x 1 h) dehydriert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte in

kleinen Gussformen. Die Wirbelkörper wurden möglichst waagrecht in ihnen platziert. Anschließend wurden die Formen mit flüssigem Paraffin (Leica EG 1120, Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgefüllt. Nach dem Aushärten wurden die Proben aus der Gussform entfernt. Die Anfertigung der Schnitte mit einer Dicke von 4-5 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) erfolgte mittels eines Rotationsmicrotoms (RM 2155, Leica). Die Schnitte wurden aus dem Wasserbad mit einem Pinsel auf Objektträger gezogen, mit Bleistift beschriftet und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank getrocknet.

### **2.3.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde verwendet, um die Kerne mittels Hämalaun, sowie das Bindegewebe mittels Eosin in einem Schnittpräparat zu kennzeichnen. Hierfür mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dies erfolgte mit Xylol 2x für 5 Minuten (min). Im Anschluss wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100-96-80-70%) und schließlich Aqua dest. für je 3 Sekunden (s) rehydriert. Die Färbung fand dann mit Mayers Hämalaunlösung (Kernfärbung, Merck) für 4 min statt. Dann folgte das Spülen mit Aqua dest., das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min, sowie erneutes Spülen mit Aqua dest.. Im Anschluss wurden die Schnitte in 1% Eosinlösung (Eosin G, Merck) für 1 min inkubiert. Es folgte erneutes Spülen mit Aqua dest. und Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70-80-96-100%). Zum Schluss folgte eine Inkubation in Xylol für 2x 5 min. Das Eindeckeln fand mit DePex (Serva, Heidelberg, Deutschland) statt.

### **2.3.3 TRAP-Färbung**

Um die Osteoklasten und Makrophagen zu kennzeichnen, wurde eine enzymhistochemischer Nachweis für TRAP durchgeführt. Hierfür wurden die in Paraffin gebetteten Schnitte zunächst zweimal mit Xylol für 5 min entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolfolge (100-96-70%) ebenfalls für 2 min rehydriert. Das Spülen erfolgte im Anschluss mittels eines 0,1 M Acetat-Puffers (pH 5,2, Merck) für 10 min. Die Färbung fand bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 2 h in einer Färbelösung statt. Diese bestand aus Naphtolen-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich), N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich), Echtrotsalz (Sigma-Aldrich) und di-Natriumtartrat-Dyhidrat (Merck). Die Schnitte wurden anschließend 3x mit Aqua dest. gespült und mit Hämatoxylin



gegengefärbt. Das Eindecken zum Schluss erfolgte mittels eines Deckgläschens und im Wasserbad verflüssigter Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, Merck).

### 2.3.4 Histomorphometrie

Um eine Aussage über die Veränderungen der Knochenstruktur in den Versuchstieren geben zu können, erfolgte eine Quantifizierung der relativen zweidimensionalen Trabekelfläche in Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) zur gesamten Knochenfläche ohne Kortikalis. Dies fand an je einem der mit HE gefärbten Querschnitte des Wirbelkörpers L2 aller Versuchstiere statt. Die dafür benötigten Bilder wurden mit dem Fotomikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angefertigt, das mit einer DC500 Digitalkamera (Leica) ausgestattet war. Es wurde für die HE-Schnitte eine 10x Vergrößerung verwendet. Das Zusammenfügen der Einzelbilder erfolgte mittels Adobe Bridge (Adobe Systems, München, Deutschland), die anschließenden Messungen mittels Adobe Photoshop CC (Adobe Systems). Die Spongiosa wurde unter Ausschluss der Kortikalis in  $\text{mm}^2$  bestimmt und danach die Trabekelfläche innerhalb der Spongiosa in  $\text{mm}^2$  gemessen. Daraus konnte im Folgenden ein Verhältnis der beiden Flächen in Prozent zueinander bestimmt werden. Die Messung wurde zweimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt, um mögliche Messfehler zu minimieren.

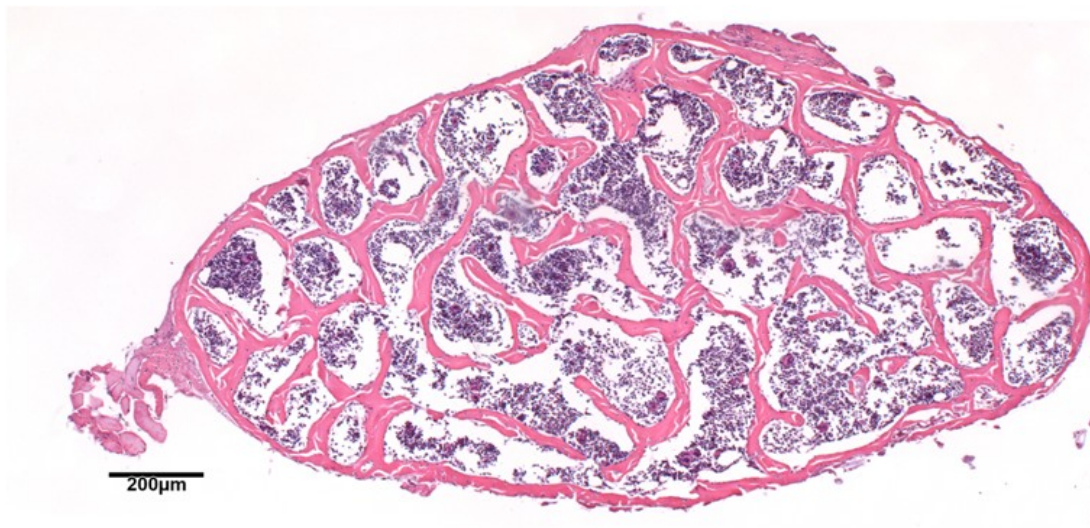


Abbildung 15: L2 Querschnitt einer 12 Wochen alten homozygoten db/db Maus in HE-Färbung

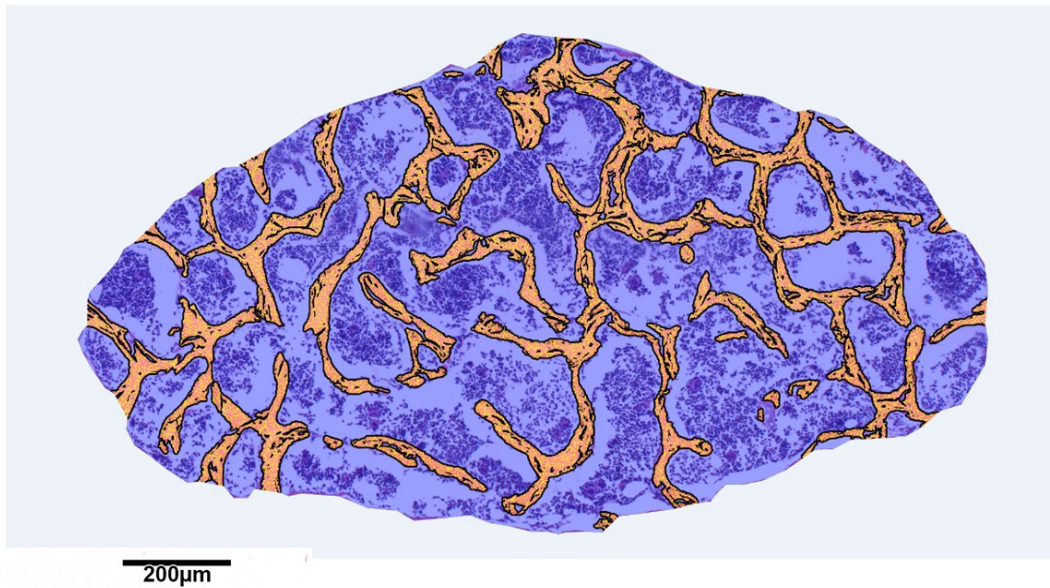


Abbildung 16: L2 Querschnitt einer 12 Wochen alten homozygoten db/db-Maus. Nach Ausschluss der Kortikalis wurde die Spongiosa (blau) in mm<sup>2</sup> bestimmt und die Trabekelfläche (gelb) innerhalb der Spongiosa in mm<sup>2</sup> gemessen.

Zudem wurde die relative Anzahl von Osteoklasten zur Trabekeloberfläche an Hand der TRAP und Hämatoxylin gefärbten Schnitte der Wirbelkörper L2 bestimmt. Hierfür wurde beim Fotomikroskop Axioplan 2 zunächst für die Bestimmung der Trabekeloberfläche in mm eine 20x Vergrößerung gewählt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte wie bei der oben beschriebenen Messung der relativen Trabekelfläche. Um die Osteoklasten-Zahl und ihr Verhältnis zur Trabekeloberfläche in jedem Schnitt zu ermitteln, erfolgte zuerst einmal die Messung der Trabekeloberfläche innerhalb der Spongiosa in mm. Anschließend wurden alle Osteoklasten gezählt. Da nicht nur Osteoklasten sondern auch Makrophagen durch die TRAP-Färbung gekennzeichnet werden, wurden folgende Kriterien zur Definition der Osteoklasten verwendet. Die Zellen mussten zusätzlich zur TRAP-Färbung der zuvor gemessenen Trabekeloberfläche anliegen und drei oder mehr Zellkerne besitzen. Gezählt wurden die Zellen mit einem 100x Objektiv und das Verhältnis der Trabekeloberfläche zur Anzahl der Osteoklasten in Prozent angegeben.

### 2.3.5 Epon-Einbettung

Für die Einbettung in Epon (Serva) zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Wirbelkörper L3 der Versuchstiere verwendet. Diese wurden direkt nach der



Präparation für 24 h bei 4°C mittels Yellow-Fix-Lösung fixiert. Im Anschluss erfolgte 6 x das Spülen der Schnitte mit 0,1 M Cacodylate-Puffer pH 7,2-7,4, sodass die gelbe Farbe der Pikrinsäure vollständig entfernt wurde. Eine Nachfixation fand dann mittels 1% Osmiumtetroxid-Lösung (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) wiederum in 0,1 M Cacodylatpuffer für 2 h statt. Es folgte erneutes 6x Spülen mit 0,1 M Cacodylatpuffer und schließlich die Dehydrierung durch eine aufsteigenden Ethanol-Reihe (30-50-70-80-96-100%) sowie Waschen mit Xylol 3x für je 30 min. Die Einbettung in Epon fand im Anschluss innerhalb von sieben Tagen statt. Die Proben wurden hierfür in einem Epon/Xylol-Gemisch inkubiert, das täglich einen höheren Anteil an Epon enthielt bis zur reinen Epon-Lösung ab dem 6. Tag. In diesem Zeitraum wurden die Proben jeweils zur Nacht einem Unterdruck von -600 mbar in einem Exikator ausgesetzt. Am 7. Tag erfolgte die erneute Zugabe des Epon/Xylol-Gemischs. Im Anschluss wurden die Proben für 3 Zyklen für je 10 min bei 55°C und darauffolgend 50 min bei -600 mbar im Exikator gelagert. Die Ausbettung erfolgte, indem die Proben erneut 10 min bei 55°C, 15 min bei -600 mbar, und 3 h bei 48°C gelagert wurden. Die Polymerisation fand für 20 h bei 60°C statt.

Die Anfertigung der Semidünnschnitte in einer Dicke von 500 Nanometer (nm) erfolgte mittels Ultramikrotom (ReichertUltracut, Leica). Anschließend fand eine Färbung mit Toluidinblau und Safranin-O für 2-3 s statt. Es folgte das Spülen mit Aqua dest. und schließlich das Eindeckeln, in dem ein Tropfen reines Epon zwischen den Objektträger und das Deckgläschen gegeben wurde. Nach dem Aushärten konnte die mikroskopische Darstellung mit dem Photomikroskop (Axioplan 2 mit Photomodul 7 Axiophot 2, Zeiss) sowie der Kamera (DC500, Leica) erfolgen.

## **2.4 Real-time RT-PCR**

Um die Effekte von Leptin auf den komplexen Vorgang des Knochenbaus in unserer Untersuchung transkriptional genauer betrachten zu können, wurden Marker-Gene verwendet, die jeweils als Indikator für die auf- und abbauenden Zellreihen im Knochen zu verstehen sind. Diese wurden bereits in der Einleitung benannt und ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel erklärt.

Die molekularbiologische Untersuchung der Wirbelkörper erfolgte an den Wirbelkörpern Th10 aller Mäuse. Nach der Probenentnahme und Freipräparation von

Gewebe wurden diese in mit RNAlater (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, NM, USA) gefüllte 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und auf Eis gelegt. Der Transport erfolgte ebenfalls auf Eis, es wurde eine maximale Entnahmezeit von 30 min eingehalten, sodass die Proben anschließend im Labor bis zur RNA-Extraktion bei -80°C tiefgekühlt werden konnten. RNAlater-Lösung trug hierbei zur Stabilisierung und dem Schutz der zellulären Ribonukleinsäure (RNA) bei.

#### **2.4.1 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Extraktion wurden die bei -80°C gelagerten Knochen zunächst mit einem Mörser zerkleinert. Es wurde während dessen stets flüssiger Stickstoff zugegeben, um die Zerkleinerung zu erleichtern. Die RNA-Extraktion fand anschließend mittels des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) statt. Zunächst wurde 1 ml Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dem zerkleinerten Knochen zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 200 Mikroliter ( $\mu$ l) Chloroform (Chloroform 99%, Sigma-Aldrich), 15 s starkes Schütteln und eine erneute Inkubation von 2 min bei RT. Die anschließende Zentrifugation (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nierenstein, Deutschland) bei 14.000 g für 15 min fand bei 4°C statt. Die obere Phase des Zentrifugats wurde in ein neues Reagenzgefäß pipettiert, 600  $\mu$ l 70% Ethanol zugegeben und gemischt. Dann erfolgte das Auftragen von 700  $\mu$ l der Probe auf ein RNeasy Mini Säule und die Zentrifugation für 15 s bei 8000 g und RT. Dies wurde mit der restlichen Probe wiederholt und der Durchfluss jeweils verworfen. Danach folgte ein Spülen mit je 700  $\mu$ l RW1 Puffer und 2x mit 500  $\mu$ l RPE Puffer unter denselben Bedingungen. Auch dieser Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Tube gestellt und 1 min mit 18.000 g bei RT zentrifugiert. Auf die Säule erfolgte dann das Auftragen von 40  $\mu$ l RNase freiem Wasser und die Zentrifugation für 1 min mit 8000 g bei RT.

Um die Konzentration der isolierten RNA zu bestimmen wurde eine Messung mittels NanoDrop ND-1000® Spektrophotometer (NanoDrop, Wilmington, NC, USA) durchgeführt und eine Wellenlänge von 260-280 nm verwendet. Die Lagerung des RNA-Produktes erfolgte anschließend bei -80°C.

#### **2.4.2 cDNA-Herstellung**

Mit der zuvor isolierten RNA erfolgte dann die Herstellung einer cDNA mittels des Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Für die cDNA-Herstellung wurde die

RNA zunächst auf Eis aufgetaut. Die genomische DNA wurde dann jeweils von 0,5 Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ ) RNA durch Inkubation mit 2  $\mu\text{l}$  gDNA Wipeout Buffer für 2 min bei 42°C eliminiert. Anschließend erfolgte die Transkription der RNA in cDNA durch Zugabe des RT Mastermixes. Dieser bestand aus 1  $\mu\text{l}$  Quantiscript Reverse Transkriptase, 4  $\mu\text{l}$  Quantiscript RT Puffer und 1  $\mu\text{l}$  des Primer-Mixes, der eine Mischung aus Olig(dT)- und Random-Primern enthielt (alles Bestandteile des Kits). Die Inkubation fand bei 42°C für 30 min statt. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte dann bei 95°C für 3 min. Um den vollständigen Abbau der genomischen DNA zu kontrollieren wurde jeweils eine Probe mit RNase freiem Wasser statt der Reversen Transcriptase versetzt und anschließend als Negativkontrolle mitgeführt.

### **2.4.3 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte mit dem AmpliTaq Gold-Kit (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA).

Für die folgende Reverse Transkription wurde zuerst ein Mastermix angesetzt, der aus 2,5  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer II (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 2  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ -Puffer (25 mM, Applied Biosystems), 0,125  $\mu\text{l}$  AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ , Applied Biosystems), 0,625  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM), und 18,125  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser bestand. Zusätzlich wurde dem Mastermix je 0,625  $\mu\text{l}$  forward und reverse Primer (200 pmol/ $\mu\text{l}$ , Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, Tabelle 4) und 1  $\mu\text{l}$  der zuvor hergestellten cDNA zugegeben. In eine Probe erfolgte statt der Zugabe der cDNA die Zugabe von RNase freiem Wasser, um eine Negativkontrolle durchzuführen. Zu Beginn wurde bei 95°C für 12 min eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge im Thermocycler (BIO-RAD Laboratories, München, Deutschland) durchgeführt. Es folgten 40 Zyklen des folgenden Ablaufs: Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95°C für 20 s, das Einhalten einer Annealing-Temperatur für 58-62°C (Tabelle 4) für 20 s um die Hybridisierung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitten zu gewährleisten und anschließend die Initiierung der gegenläufigen Primer zur DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase bei 72°C für ebenfalls 20 s. Die vollständige Replikation der DNA fand schließlich bei 72°C für 7 min statt mit darauf folgender Kühlung auf 4°C.

#### 2.4.4 Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte eine Gelelektrophorese mittels Agarose-Gel hergestellt aus 2% Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TAE-Puffer (für 50x: 242 g Tris Base, Merck), 57,1 ml Essigsäure und 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Carl Roth).

Es wurde zu den Proben 10x DNA Ladepuffer (5 Prime, Hilden, Deutschland) zugegeben, als Referenz zusätzlich ein Größenmarker (100 bp, Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA) aufgetragen und über 40 min eine Spannung von 110 Volt (V) (Biometra, Göttingen, Deutschland) angelegt. Danach wurde eine Färbung im Dunklen mit 6 µl SYBRGreen (Sigma-Aldrich) in 60 ml 1x TAE-Puffer für 30 min durchgeführt. Zur Dokumentation der DNA-Banden im Gel wurde UV-Licht verwendet (UVsolo, Biometra, Abbildung 17).

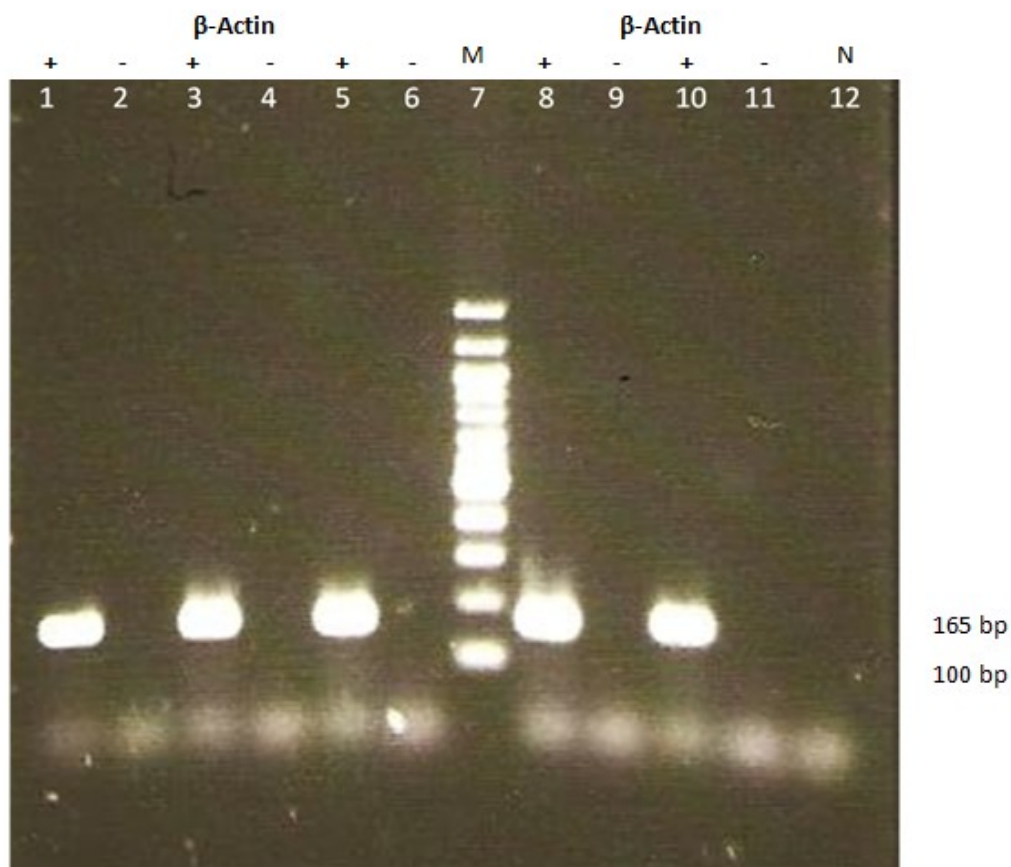


Abbildung 17: Bild einer Gelelektrophorese zur Kontrolle des PCR-Produkts von  $\beta$ -Actin mit einer erwarteten Länge von 165 Basenpaare (bp) (Linie 1, 3, 5, 8, 10) und je eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O statt der RT (Linie 2, 4, 6, 9, 11). N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O statt cDNA. M = DNA-Marker.

#### **2.4.5 Etablierung der real-time RT-PCR**

Die Herstellung der Primer erfolgte mittels Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen. Die Etablierung der real-time RT-PCR fand im LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, Schweiz) statt. Als Reagenz wurde das QuantiFast (QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen) eingesetzt. Zur Bestimmung der Effizienz wurde für jeden Primer aus zuvor gepoolter DNA in Doppelbestimmung eine Standardkurve mittels Verdünnungsreihe erstellt. Es wurde dazu unverdünnte cDNA und verdünnte cDNA bis 1:100 verwendet. Zudem wurde eine Negativkontrolle Aqua ad injectabile statt cDNA mitgeführt.

Bei den Primern handelte es sich um intron-spannende Primer. Hierdurch sollte im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA eine Amplifizierung dieser genomischen DNA verhindert werden.

Es wurde jeweils 0,2 µl Primer (je 20 µM, forward und reserve), 3,8 µl Aqua ad injectabile und 5 µl des oben genannten QuantiFast Reagenz zusammen mit der reinen, bzw. verdünnten cDNA in eine Kapillare (LightCycler®Capillaries, Roche) gegeben. Anschließend erfolgte mittels der Lightcyclersoftware (LightCycler Software Version 4.05, Idaho Technology Inc., Idaho, USA) die Erstellung des real-time RT-PCR-Protokolls für jeden Primer. Zunächst erfolgte für 10 min die Denaturierung der cDNA bei 95°C und im Anschluss folgten weitere 40 Zyklen, in denen eine erneute Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95°C für 5 sec, dann die Primeranlagerung für 5 sec sowie eine Synthesephase von 5 sec bei 72°C stattfand. Die Primeranlagerung erfolgte primerspezifisch bei 60°C (ALP, Cx43, BDNF, TrkB, ADM, M2G), 64°C (IMD) und 58°C (CtsK). Zum Schluss wurde durch den LightCycler die Fluoreszenz-Abnahme bei Zunahme der Temperatur jeweils um 0,1°C/s (von 65°C bis 95°C) gemessen und dann die Proben auf 4°C gekühlt. Die Lightcycler-Software berechnete mittels der in der Verdünnungsreihe bestimmten Werte für jeden Primer die PCR-Effizienz und Spezifität durch die Schmelzpunktanalyse. Als Referenzen wurde  $\beta$ -Actin verwendet, das als Strukturprotein ubiquitär zu finden ist. Die Reinheit des Produkts wurde mittels der oben beschriebenen Gelelektrophorese kontrolliert.

Tabelle 4: Verwendete Primer.

Gen		Sequenz (5'-3')	Produkt länge [bp]	Annealing- Temperatur [C°]	Genbank- Zugangs- nummer
ADM <sup>a</sup>	fwd <sup>i</sup>	GCAGGGCCAGATACTCCTTC	70	60	NM_009627.1
	rev <sup>j</sup>	CCTCTTCCCACGACTTAGC			
ALP <sup>b</sup>	fwd	TCAGCTAATGCACAATATCAAGG	87	60	NM_007431.2
	rev	TCCACATCAGTTCTGTTCTTCG			
BDNF <sup>c</sup>	fwd	GACGACATCACTGGCTGACAC	100	60	NM_007540.4
	rev	GTCCGCGTCCTTATGGTTTTC			
CtsK <sup>d</sup>	fwd	GAGGCGGCTATATGACCACT	119	58	NM_007802.3
	rev	CTTTGCCGTGGCGTTATAACA			
Cx43 <sup>e</sup>	fwd	TGCTTCCTCTCACGTCCCAC	127	60	NM_010288.3
	rev	CGCGATCCTTAACGCCCTTG			
IMD <sup>f</sup>	fw	GGTAACCCTCGGTTGCATCAG	178	64	NM_182928.3
	rev	GGCATGACGACGACGCTTCC			
M2G <sup>g</sup>	fwd	TGTTACCAACTGGGACGACA	165	60	NM_007393.3
	rev	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA			
TrkB <sup>h</sup>	fwd	ATCTCCGCTCACTTCATGGG	99	60	NM_008745.2
	rev	AATGTCAGTTGGCGTGGTC			

a- Adrenomedullin, b- Alkalische Phosphatase, c- Brain-derived neurotrophic factor, d- Cathepsin K, e- Connexin 43, f- Intermedin, g- Beta-2-Mikroglobulin, h- Tropomyosin receptor kinase B, i- forward, j- reverse.

#### **2.4.6 Real-time RT-PCR**

Die Real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR) erfolgte unter Verwendung eines LightCyclers 2.0 (Roche). Hierbei wurden jeweils 1 µl cDNA mit 2 µl 5x Roche Mastermix (LightCyclerFast Start DNA Master SYBR Green I, Roche), 0,2 µl der Primer (Eurofins MWG Operon, Tabelle 4) und 6,8 µl RNase freies Wasser (Qiagen) sorgfältig gemischt und in eine Glaskapillare gegeben. Die real-time RT-PCR beinhaltete dann folgende Schritte: Ein Aufheizen auf 95°C für 10 min, 40 Zyklen von jeweils 5 s bei 95°C, Annealing für 5 s bei 58-64°C, Elongation für 5 s bei 72°C. Abschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt um die Reinheit des PCR-Produkts zu kontrollieren. Hierfür wurde die Fluoreszenz der Probe bei einer Erhöhung der Temperatur von 65°C bis 95°C gemessen.

Die Software des Lightcycler-Gerätes berechnet einen für jedes Gen spezifischen  $\Delta$ -Cp Wert (Crossing point) als Maximalwert, der nach einer bestimmten Zyklen-Anzahl erreicht wird. Dies erfolgt mittels eines standardisierten Vergleichsgens, hier  $\beta$ -Actin. Die relative Expression des jeweiligen Gens wurde nach der  $\Delta\Delta$ Cp-Methode berechnet. Als Negativkontrolle wurde eine cDNA ohne Zugabe von RT und eine PCR ohne Zugabe einer cDNA verwendet, um eine Verunreinigung der Proben mit anderen DNA-Fragmenten ausschließen zu können.

#### **2.5 Statistik**

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse aus der real-time RT-PCR, der Histomorphometrie, der Enzymhistochemie und der Biomechanik wurden der parameterfreie statistische Kruskal-Wallis-Test sowie der Mann-Whitney-Test herangezogen. Durch den Kruskal-Wallis-Test wird eine Varianzanalyse durchgeführt, um zu testen, ob einzelne Stichproben bezüglich einer bestimmten Variablen einen gemeinsamen Schnittpunkt haben. Mittels des Mann-Whitney-Tests erfolgt für zwei Verteilungen eine Prüfung der Signifikanz der jeweiligen Übereinstimmungen. Für die Durchführung der Tests wurde die SPSS Software (Version 21.0, SPSS Institute Inc., Chicago, USA) verwendet. Als Konfidenzniveau wurde ein  $p \leq 0,05$  als signifikant definiert und mit \* gekennzeichnet. Zudem wurde  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant definiert und mit \*\* gekennzeichnet. Mittels eines Boxplots erfolgte die grafische Darstellung der Ergebnisse. Durch diesen wird der Bereich dargestellt, in dem sich 50% der

mittleren Ergebnisse befinden. Die zusätzlichen Whisker dienen der Veranschaulichung der Spannweite der Ausreißer, wobei sehr hohe oder niedrige Werte als Punkte markiert wurden.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gewicht der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden vor der Euthanasie gewogen. Dabei fiel ein deutlicher Unterschied des Gewichts der homozygoten Tiere im Vergleich zu den heterozygoten Tieren auf. Die homozygoten db/db-Mäuse wiesen eine ausgeprägte Fettleibigkeit bereits in der 6. Lebenswoche auf. Diese nahm bis zur 18. Lebenswoche weiter zu. Im Vergleich dazu zeigten die db/+ Mäuse eine einer WT-Maus entsprechende Gewichtsentwicklung (Body Weight Information for C57BL/6J, (Abbildung 18)).

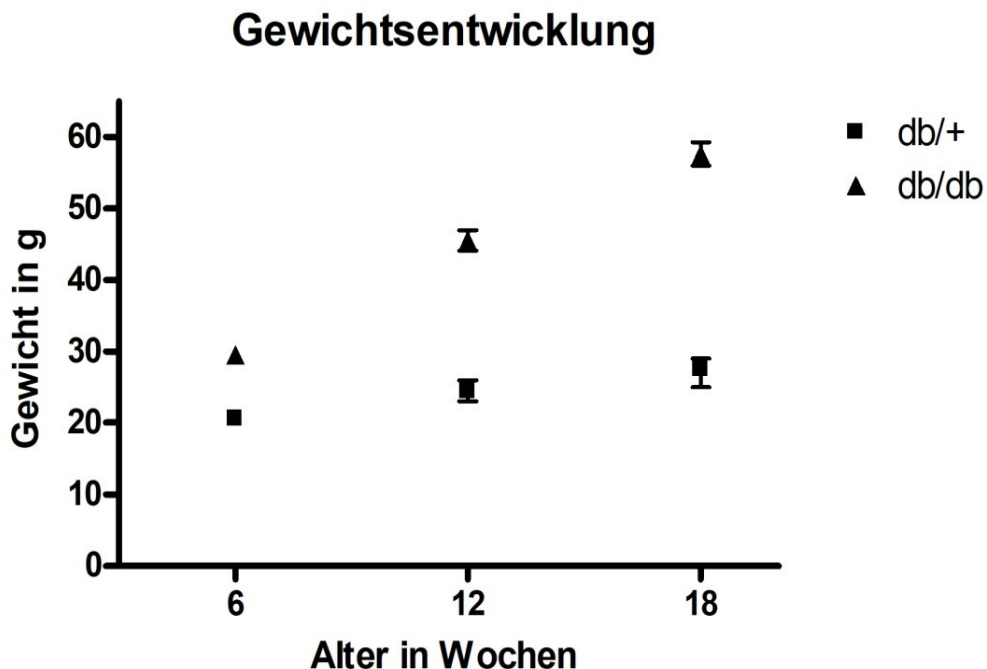


Abbildung 18: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere im Alter von 6, 12 und 18 Wochen.

#### 3.2 Biomechanik

Die Biegefestigkeit des linken Femurs aller Mäuse wurde als Vergleichswert für die biomechanische Belastbarkeit der Mäuseknochen herangezogen. Die gemessenen Werte zeigten, dass die Biegefestigkeit der Knochen aller db/db Mäuse im Vergleich zu den db/+ Mäusen signifikant reduziert war. Bereits bei den Mäusen im Alter von sechs Wochen zeigte

sich dies mit einer Signifikanz von  $p \leq 0.05$ . Noch deutlicher wurde dies bei den Mäusen im Alter von zwölf und achtzehn Wochen, hier ergab sich mit  $p \leq 0.01$  eine hohe Signifikanz. Beim Betrachten aller Mäuseknochen, sowohl homo- als auch heterozygot, ergab sich ein konstanter Zuwachs der Beigefestigkeit der Knochen beider Versuchstiergruppen mit zunehmendem Alter (Abbildung 19).

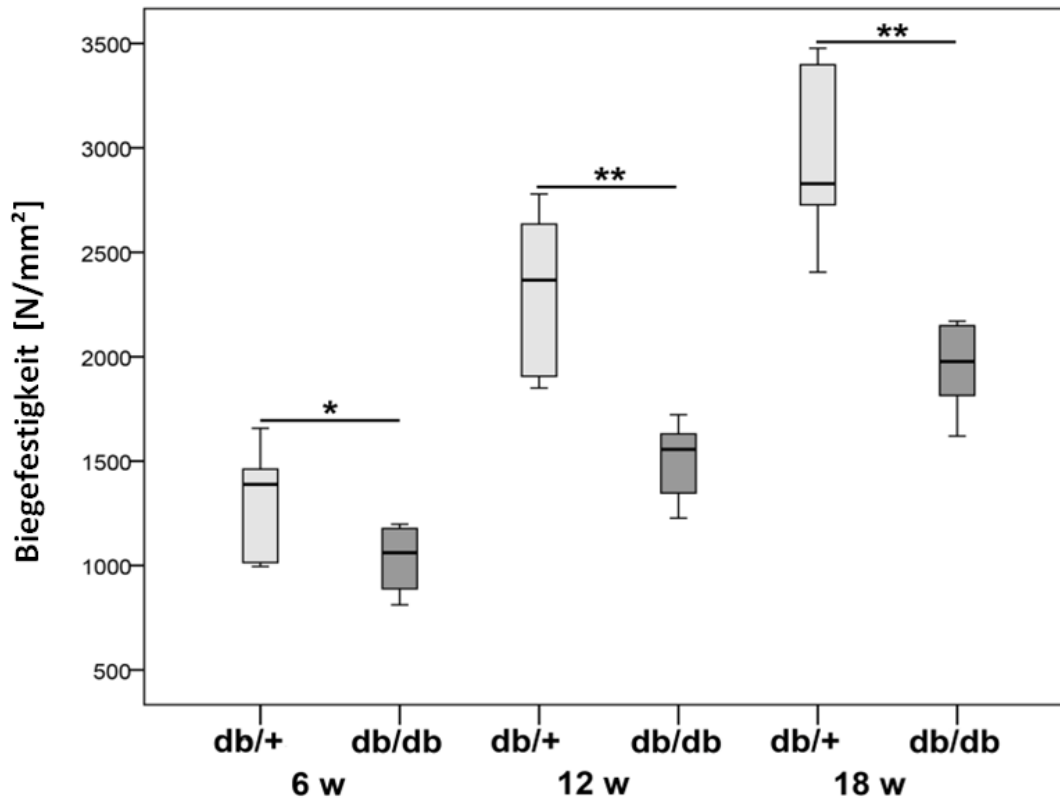


Abbildung 19: Ergebnisse der Biomechanik: Db/db Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Biegefestigkeit im Vergleich zu den db/+ Mäusen. Die Box zeigt den Median, die 25%- und 75%-Perzentile, sowie das Minimum und Maximum. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , w=Wochen

### 3.3 Histologie

Die in Epon eingebetteten Semidünnschnitte des Wirbelkörpers L3 wurden zur histologischen Untersuchung der Knochenstruktur beider Mäuse-Gruppen verwendet (Abbildung 14). Dies fand mittels eines Lichtmikroskops statt. Alle Schnitte der sechs Wochen alten Mäuse zeigten einen aktiven Knochenumbau. Der Trabekelfläche lagen beinahe lückenlos endostale Saumzellen als inaktive Osteoblasten an. Zudem konnten reichlich kubisch geformte, aktive Osteoblasten identifiziert werden, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Neben diesen Zellen fanden sich auch die antagonistisch wirkenden resorbierenden Zellen wie die

Makrophagen-ähnlichen Zellen. Diese wiesen häufig nur ein bis zwei Zellkerne auf (Abbildung 14 A-C). Auch Osteoklasten mit 3 oder mehr Zellkernen waren vereinzelt zu finden. Sowohl in der Verteilung der jeweiligen Zelltypen, als auch im Aufbau der Trabekel und der Anordnung der Osteozyten im Osteoid zeigte sich kein Unterschied zwischen den db/db und db/+ Mäusen. Nach zwölf Wochen wiesen die Osteoblasten ein abgeflachtes Aussehen auf, was auf eine geringere Aktivität mit einer reduzierten Syntheseleistung dieser Zellen schließen lässt. Dagegen wiesen die resorbierenden Zellen mit größerer Häufigkeit mehrere Zellkerne auf (Abbildung 14 D-F) und konnten hierdurch als aktive Osteoklasten identifiziert werden. Sie bildeten zur Trabekeloberfläche hin Howship-Lakunen als Resorptionszone aus. Bei der Betrachtung der Knochenschnitte der 12 Wochen alten Mäuse zeigte sich insgesamt kein Unterschied in der Verteilung der Zellen oder der Anordnung der Osteozyten im Trabekelsystem. Im Alter von 18 Wochen wiesen die Osteoblasten erweiterte Interzellularräume auf. Zudem zeigte sich eine Auflockerung der Zellmembranstruktur als Hinweis auf eine beginnende Apoptose dieser Zellen. Es waren insgesamt mehr aktive Osteoklasten zu finden. Im Hinblick auf die Verteilung der Zellen, die Anordnung der Trabekel und der darin eingebetteten Osteozyten zeigte sich zwischen den Vergleichsgruppen kein Unterschied (Abbildung 20 G-I).

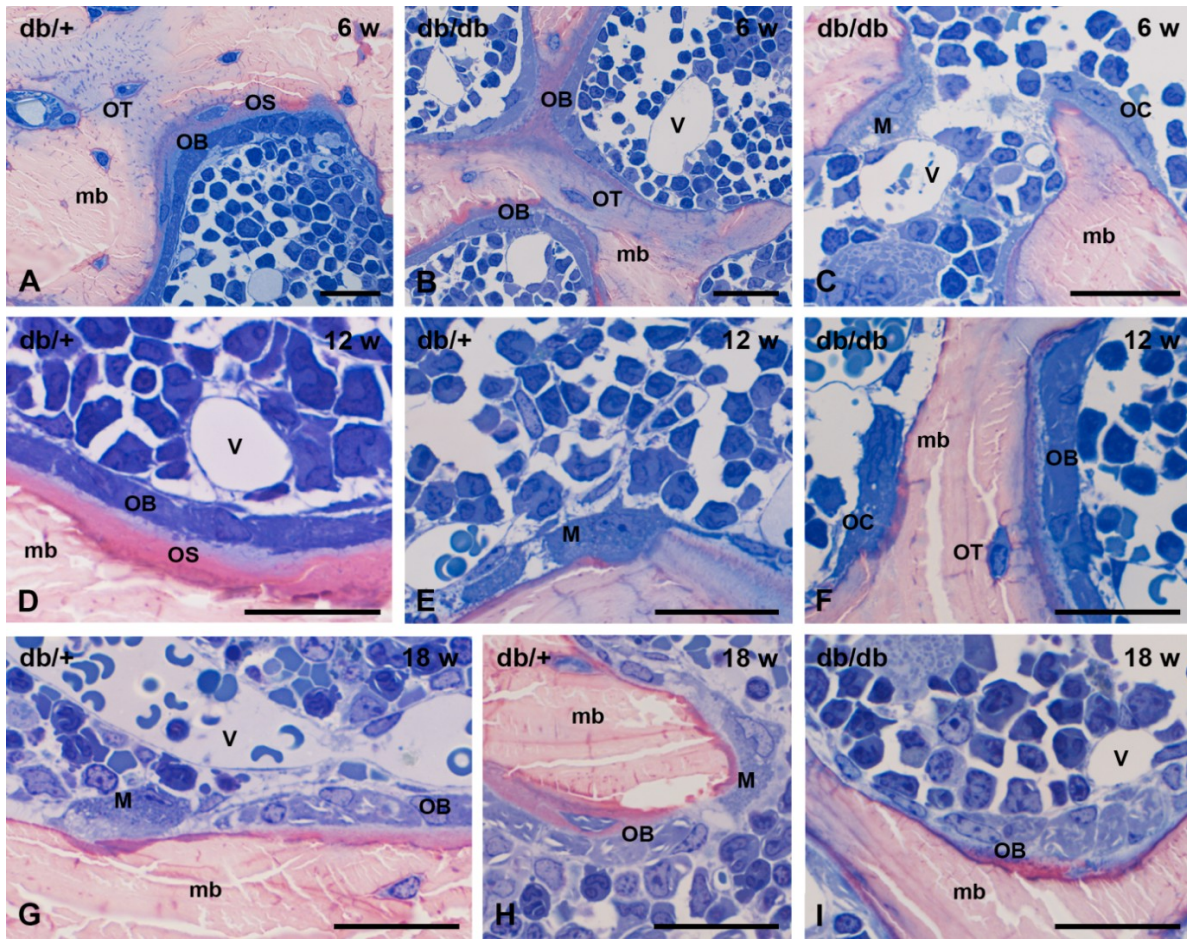


Abbildung 20: Mikrostruktur der Spongiosa in Semidünnschnitten von Wirbelkörper L3. Es wurden db/db Mäuse und db/+ Mäuse im Alter von 6, 12 und 18 Wochen auf die strukturellen Unterschiede im Hinblick auf Osteoblasten (OB), Osteozyten (OT), Osteoklasten (OC), resorbierende Makrophagen-ähnliche Zelle (M), Osteoid (OS), mineralisierter Knochen (mb) und Gefäße (V) untersucht. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.4 Histomorphometrie

Die relative Trabekelfläche im Bezug auf die gesamte Knochenfläche (AOI) wurde mittels histomorphometrischer Untersuchung bestimmt. Hierfür wurden HE gefärbte Paraffin-Schnitte des Wirbelkörpers L2 aller Versuchstiere verwendet. Es wurden sowohl die homozygoten Tiere mit der heterozygoten Vergleichsgruppe betrachtet, als auch die Entwicklung der relativen Trabekelfläche mit zunehmendem Alter der Mäuse. Es konnte in allen Altersklassen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Tabelle 5, Abbildung 21).

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse der Histomorphometrie

Alter [Wochen]	Versuchstiere	Relative Tabekelfläche [%]	Standard- abweichung	Anzahl der Versuchstiere
6	db/db	19.25	$\pm 0.95$	n = 4
6	db/+	17	$\pm 4.13$	n = 5
12	db/db	15.17	$\pm 1.05$	n = 6
12	db/+	20	$\pm 2.46$	n = 6
18	db/db	16.80	$\pm 1.2$	n = 5
18	db/+	15.75	$\pm 0.48$	n = 4

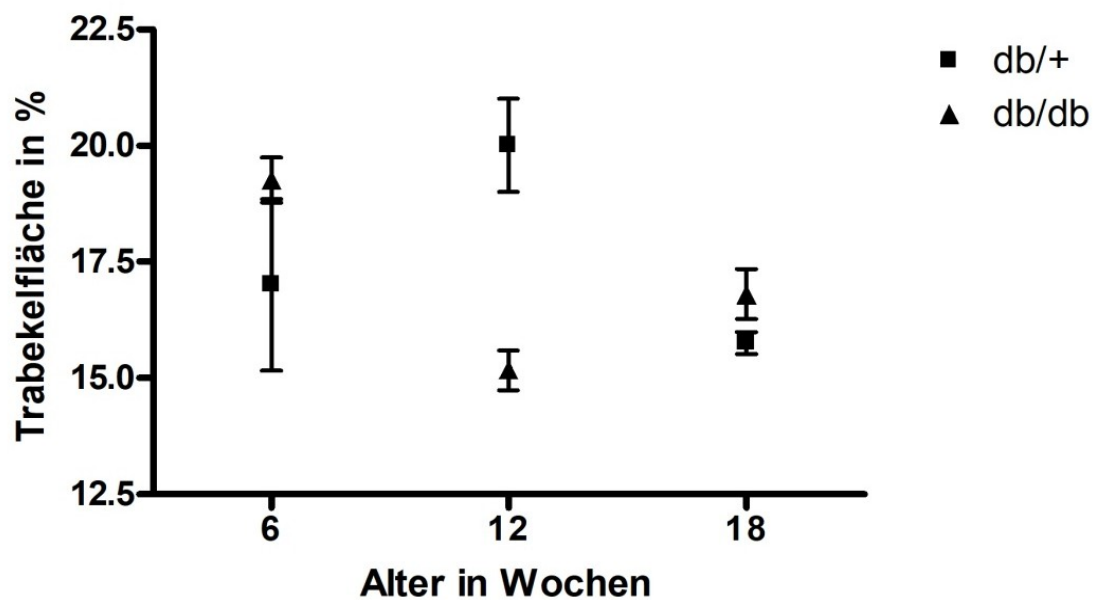


Abbildung 21: Darstellung der Trabekelfläche in % (y-Achse) zum Alter der Mäuse in Wochen (x-Achse)



### 3.5 Enzymhistochemie

Um die Anzahl der Osteoklasten relativ zum Trabekelumfang zu bestimmen, wurde je ein Paraffin-Schnitt durch die Mitte des Wirbelkörpers L2 angefertigt und die Osteoklasten mittels enzymhistochemischem Nachweis markiert und gezählt (Abbildung 22, 23). Es konnte in den Knochen der db/+ Mäuse und in denen der db/db Mäuse ein Zuwachs an gefärbten Osteoklasten beim Vergleich der 6 zu den 12 Wochen alten Mäusen festgestellt werden. Auch der Vergleich der 6 zu den 18 Wochen alten Mäusen ergab einen Zuwachs der Osteoklasten. Bei den heterozygoten Mäusen war dieser Zuwachs signifikant. Zwischen den homozygoten und den heterozygoten Mäusen konnte in keinem Alter ein Unterschied der Osteoklastenanzahl bezogen auf den Trabekelumfang festgestellt werden (Abbildung 24).

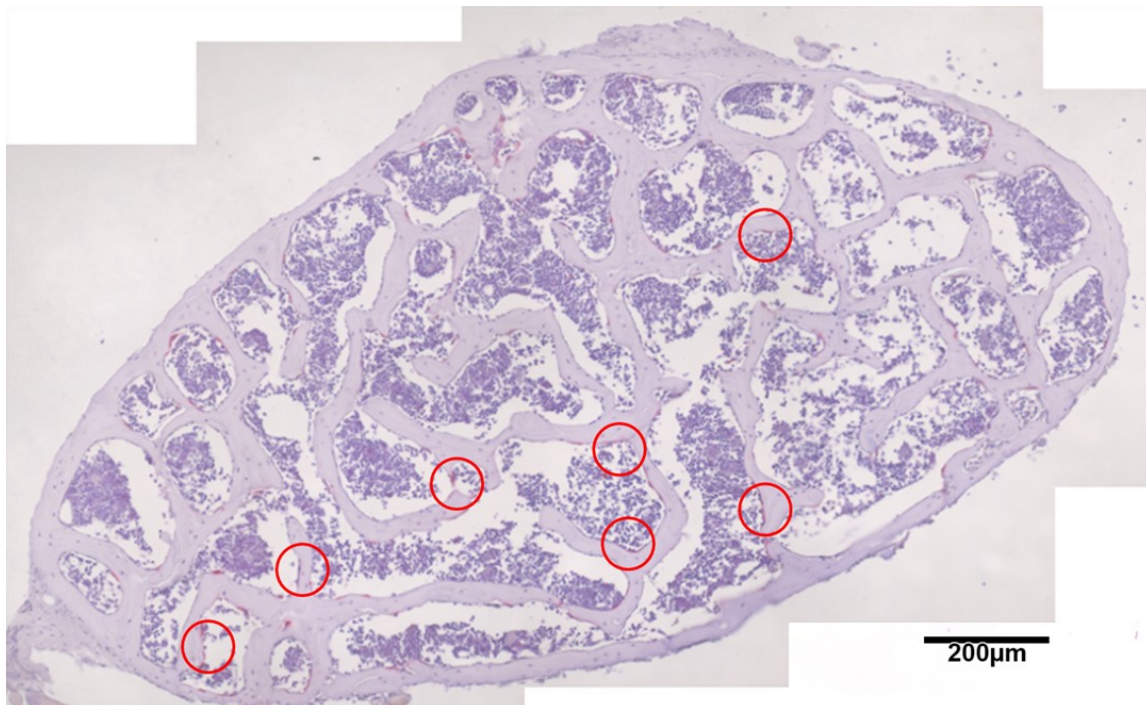


Abbildung 22: L2 Querschnitt einer db/db Maus in HE- und TRAP-Färbung. Die Osteoklasten wurden rot markiert.

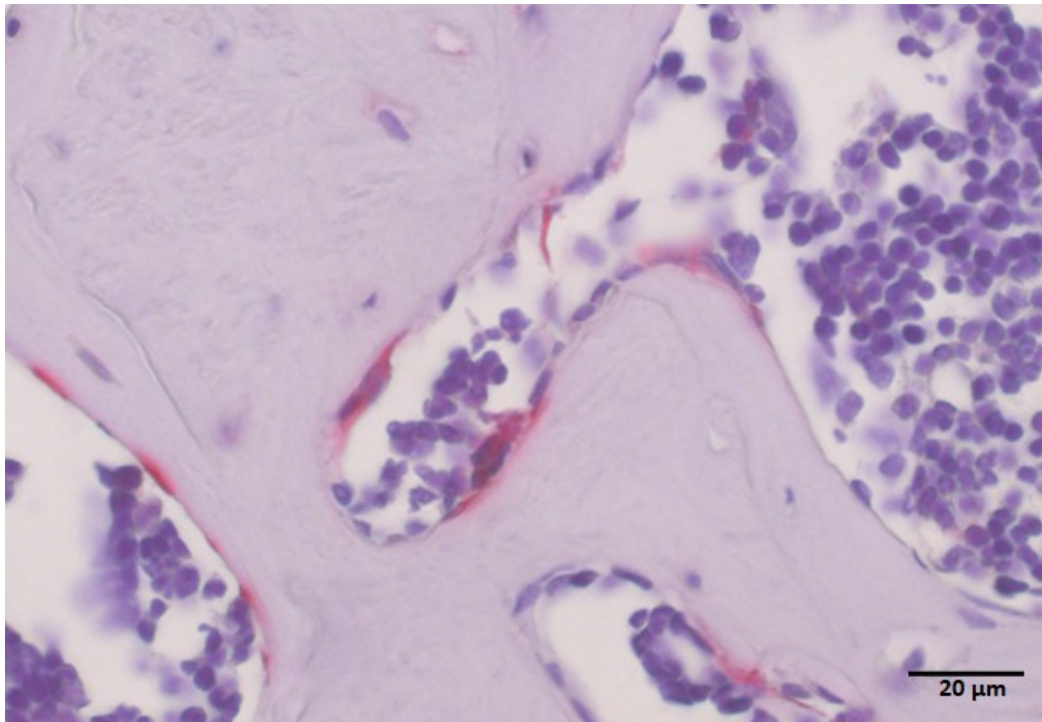


Abbildung 23: Paraffin-Schnitt eines Wirbelkörpers L2 einer 12 Wochen alten db/db-Maus mit TRAP- und Hämatoxylin-Färbung. Zentral sind zwei rötlich gefärbte Osteoklasten zu sehen.

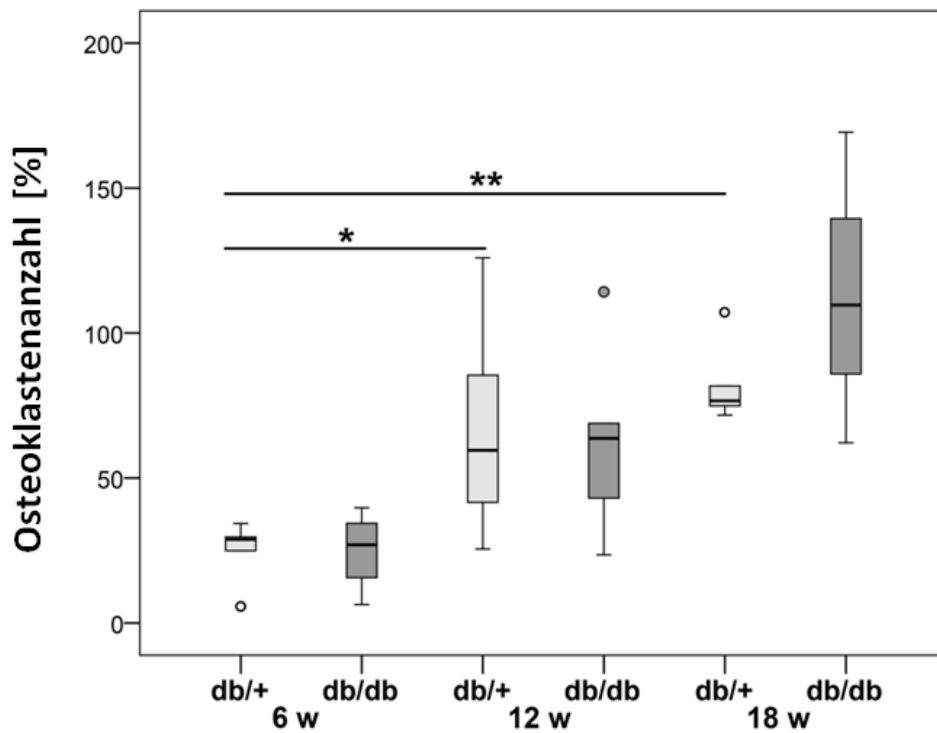


Abbildung 24: Enzymhistochemie. Die relative Anzahl der Osteoklasten wurde unter Verwendung der mit TRAP gefärbten Paraffin-Schnitte des Wirbelkörpers L2 jeder db/db und db/+ Maus im Alter von 6, 12 und 18 Wochen bestimmt. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

### 3.6 Real-time RT-PCR

Die mRNA-Expression der ALP, die als Osteoblasten-Marker herangezogen wird, war in allen untersuchten Mäusen im Alter von 12 und 18 Wochen signifikant verringert. Keine signifikante Änderung der ALP-Expression zeigte sich beim Vergleich der homozygoten zu den heterozygoten Mäusen (Abbildung 25, A). Als ein Marker für die Osteoklasten-Aktivität wurde CtsK verwendet. Hier zeigte sich bei den db/db Mäusen im Alter von 6 und 12 Wochen eine vermehrte mRNA-Expression von CtsK im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen gleichen Alters. Dies stellt einen Indikator für einen erhöhten Knochenabbau im Knochen zu diesem Zeitpunkt dar (Abbildung 25, B). Die mRNA-Expression von Cx43, ein typischer Marker für Zell-Zell-Kontakte, war bei den 12 Wochen alten db/db Mäusen im Vergleich zu den db/+ Mäusen erhöht. Jedoch war die Cx43-Expression mit steigendem Alter insgesamt signifikant verringert (Abbildung 25, C). Die mRNA-Expression von ADM zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden 18 Wochen alten Mäusegruppen. Hierbei war die ADM-Expression in den homozygoten Mäusen vermindert (Abbildung 25, D). Kein signifikanter Unterschied konnte für BDNF und den spezifischen Rezeptor TrkB gezeigt werden (Abbildung 26, A und B). Ebenfalls kein signifikanter Unterschied wurde in der Expression von Intermedin (IMD) festgestellt (Abbildung 26, C).



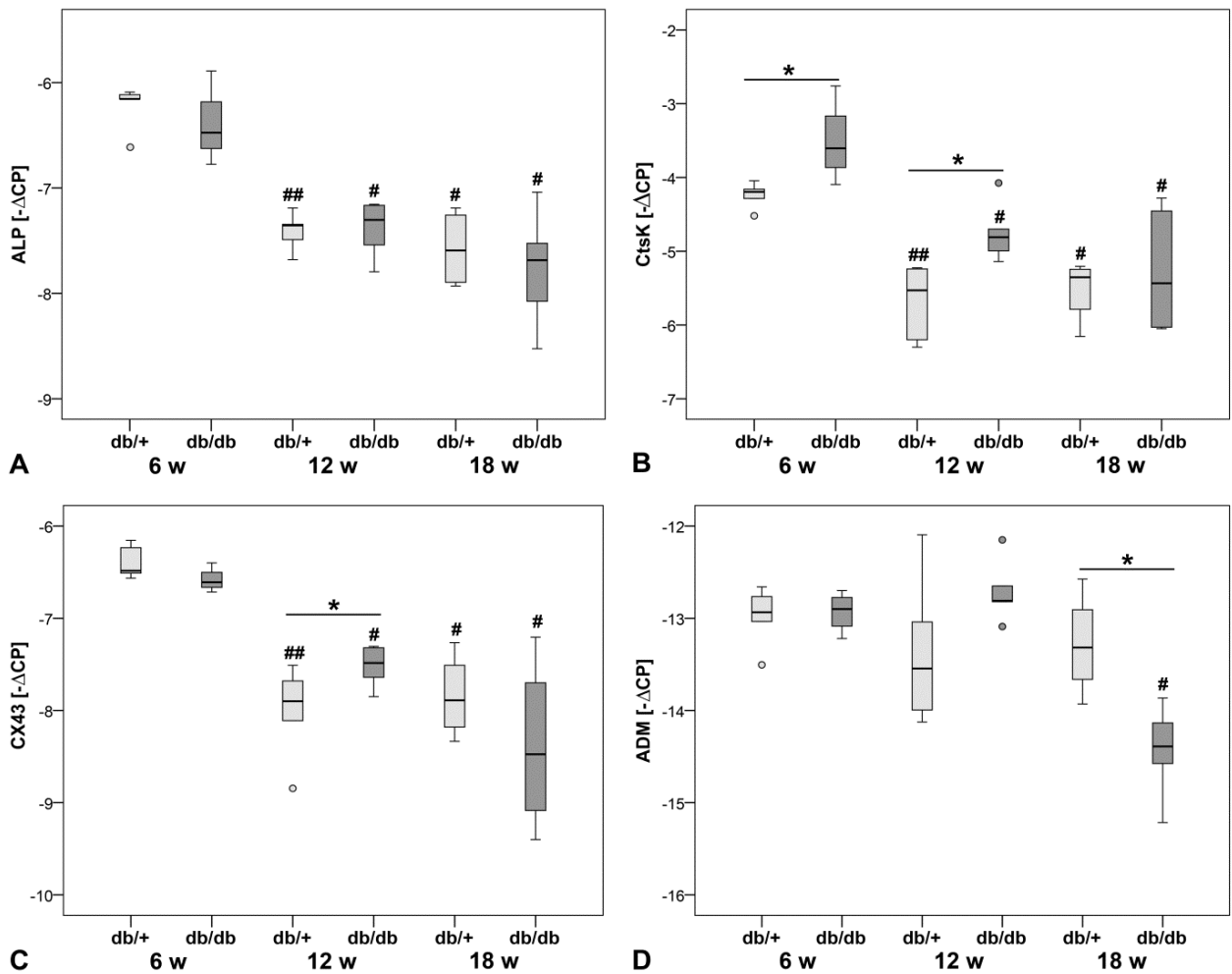


Abbildung 25: Ergebnisse der real-time RT-PCR, 1. Teil. (A) mRNA Expression von Alkalischer Phosphatase (ALP), (B) Cathepsin K (CtsK), (C) Connexin 43 (Cx43) und (D) Adrenomedullin (ADM) dargestellt durch Boxplots mit dem als Linie gekennzeichneten Median innerhalb der Box. Die kleinen Kreise repräsentieren Werte außerhalb des 1.5x des Medians. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . # im Vergleich zu den 6 Wochen alten Gruppen: # $p \leq 0.05$ , ## $p \leq 0.01$ , w=Wochen.

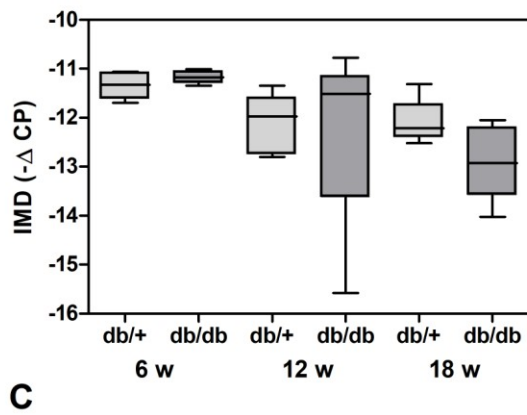
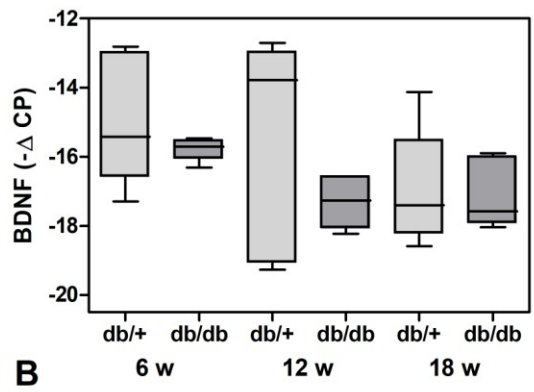
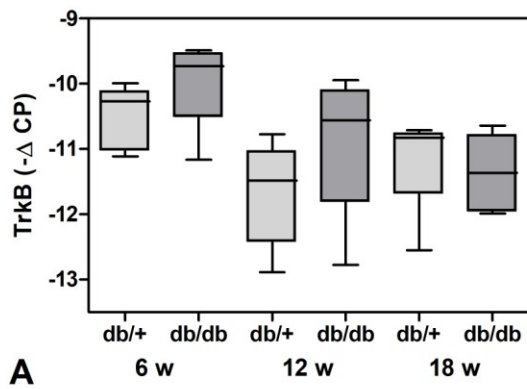


Abbildung 26: Ergebnisse der real-time RT-PCR, 2. Teil. (A) mRNA-Expression von TrkB, (B) BDNF, (C) IMD

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die durch den LEPRb vermittelte Wirkung von Leptin auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen. Da es in der Literatur bisher kontrovers diskutierte Ergebnisse bezüglich der direkten und indirekten Einflüsse von Leptin auf die Knochenstabilität und die Knochenmasse gibt, wurden für diese Arbeit db/db-Mäuse betrachtet, bei denen der LEPRb defekt ist und daher die Wirkung von Leptin nicht vermittelt werden kann. Es wurde als Vergleichsgruppe die heterozygote Variante der Versuchstiere herangezogen. Im folgenden Abschnitt sollen die erzielten Ergebnisse diskutiert und mit anderen Studien in Kontext gesetzt werden.

### 4.1 Das Tiermodell als Grundlage

Für diese Arbeit wurden männliche Mäuse zu drei verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert, um Unterschiede der Knochenstruktur im Bezug auf Alter und auch Ausprägung des Knochenphänotyps besser beurteilen zu können. Die Euthanasie fand im Alter von 6, 12 und 18 Wochen statt. Alle Mäuse wurden nach der Euthanasie gewogen. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Die homozygoten Mäuse wiesen zu jedem Zeitpunkt ein höheres Gewicht auf. Dies entspricht dem Ergebnis einer aktuellen Arbeit von Guilbaud et al.. Dieser zeigte zudem, dass die db/db-Mäuse sowohl im Alter von 8, als auch von 22 Wochen eine Glucoseintoleranz aufwiesen, wohingegen die db/+ -Mäuse weder eine Fettleibigkeit noch eine Glucoseintoleranz zeigten (Guilbaud et al., 2018). Eine so deutliche Differenz im Bezug auf das Gewicht und die Glucoseverträglichkeit der beiden Mäuse-Gruppen lässt die Frage zu, ob sich auch im Knochenstatus der homozygoten und heterozygoten Mäuse Unterschiede finden lassen.

Lorentzo et al. führte bereits 1986 eine ähnliche Studie durch. Zunächst zeigte er, dass db/db-Mäuse einen höheren Blutzuckerspiegel sowie einen höheren Insulinspiegel im Vergleich zu den db/+ - und WT-Mäusen aufwiesen. Im Anschluss verglich er den Knochenstatus der db/db- und db/+ -Mäuse miteinander und setzte beide Gruppen wiederum in einen Kontext mit WT-Mäusen. Seine Studie zeigte eine reduzierte Knochenmineralisierung bei den db/db-Mäusen. Zwischen den db/+ - und WT-Mäusen konnte er keine Unterschiede feststellen (Lorentzo et al., 1986). Um über die Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Mäusen eine bessere Aussage treffen zu können, wurde der Knochenphänotyp der db/db- und der db/+ -Mäuse mittels fünf modernen wissenschaftlichen Methoden neu betrachtet.

## 4.2 Auswirkungen von Leptin auf die Knochenstruktur

### 4.2.1 Einordnung der biomechanischen Ergebnisse

Mittels der Drei-Punkt-Biegetestung wurde die Biegefestigkeit als Indikator für die Stärke des Knochens untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen in jedem Alter. Die Femurknochen der db/db-Mäuse wiesen eine zu jeder Zeit geringere Biegefestigkeit auf als die Knochen der db/+ -Mäuse. Es muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass sich die mechanischen Eigenschaften der Knochen ex vivo verändern können. Daher wurde ein standardisiertes Verfahren verwendet, um Störfaktoren wie Austrocknung und Temperaturschwankungen zu minimieren. Nach der Probenentnahme wurden die Knochen direkt mit einer in NaCl 0,9% getränkten Kompresse bei -20°C tiefgefroren. Erst kurz vor der Messung wurden die Knochen aufgetaut und in NaCl 0,9% gelagert, um eine Austrocknung und somit Verminderung der Biegefestigkeit zu vermeiden. Der Versuchsablauf fand unter Raumtemperatur (23°C) statt. Dies ist als Störfaktor laut Turner et al. zu vernachlässigen, obwohl die Untersuchungsbedingungen nicht der physiologischen Körpertemperatur von 37°C entsprachen (Turner & Burr, 1993). Eine aktuellere Studie, die sich auf kleine Knochen wie die von Mäusen und Ratten bezieht, empfiehlt jedoch eine Testung bei 37 °C, da vor allem kleine Knochen sehr anfällig für Störfaktoren wie Temperaturunterschiede sind (Ritchie et al., 2008). Da beide Versuchsgruppen unter denselben Temperaturbedingungen untersucht wurden, ist dieser Störfaktor vermutlich in dieser Studie zu vernachlässigen.

Es wurde der Femurknochen zur Untersuchung ausgewählt, da bereits vorherige Studien von Ealey et al. und Williams et al. diesen Knochen verwendet haben und daher ein besserer Vergleich zu diesen Untersuchungen hergestellt werden kann. In der Untersuchung zeigten beide Gruppen mit zunehmendem Alter einen Zuwachs der Biegefestigkeit des Knochens. Die Knochen der db/db-Mäuse wiesen jedoch zu jeder Zeit eine signifikant geringere Biegefestigkeit als die Knochen der db/+ -Mäuse auf. Dieses Ergebnis korreliert mit anderen bisher veröffentlichten Arbeiten. Sowohl Williams et al., als auch Ealey et al. zeigten ebenfalls eine geringere Biegefestigkeit der Femurknochen von db/db-Mäusen. Als Vergleichsgruppe dienten jedoch WT-Mäuse (Williams et al., 2011; Ealey et al., 2006). Somit konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass nicht nur ein Unterschied zwischen homozygoten und WT-Mäusen besteht, sondern auch ein signifikanter Unterschied in der Stabilität des Knochens von homozygoten zu heterozygoten Mäusen nachzuweisen ist. Die Biegefestigkeit

des Knochens wird vor allem durch Hydroxylapatit und Kollagen beeinflusst. Beides wird von Osteoblasten produziert. Eine regelrechte Biegefestigkeit spricht für eine normale Osteoblastenaktivität. Zudem muss das Gleichgewicht in Knochenauf- und -abbau stimmen, um eine hohe Stabilität zu erreichen. Da die homozygoten Mäuse eine geringere Biegefestigkeit des Femurs aufwiesen, kann ein entstandenes Ungleichgewicht durch die fehlende Wirkung von Leptin auf den Knochen angenommen werden. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Leptin über seinen langen Rezeptorsubtyp einen positiven Einfluss auf die Knochenstabilität bewirkt. Mit der Messung der Biegefestigkeit allein kann jedoch keine genaue Aussage über die Stärke und Stabilität des Knochens getroffen werden. Um eine umfassende Beurteilung der Knochenstabilität treffen zu können, wäre die Durchführung von zwei weiteren Methoden sinnvoll gewesen. Die Zusammenschau der Ergebnisse aus  $\mu$ CT, DXA-Messung und Biomechanik erlauben eine präzisere Aussage über die Knochendichte in Kombination mit möglichen Mikrofrakturen, kortikaler Dicke sowie Mineral- und Kollagengehalt (Felsenberg et al., 2005). Ducy et al., der in seiner Studie einen negativen Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel nachwies, führte keine Biomechanik an den Knochen von db/db-Mäusen durch. Er betrachtete die Knochen mittels histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen (Ducy et al., 2000). Hierauf soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

#### **4.2.2 Einordnung der Ergebnisse bezüglich der Knochenstruktur**

Es erfolgte eine histologische Untersuchung der Mäuse-Knochen, um mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Knochenstruktur besser darzustellen. Hierfür wurden die Wirbelkörper L3 der Versuchsgruppen in Epon eingebettet, um sie dann als Semidünnschnitte unter dem Lichtmikroskop betrachten zu können. Der aktive Knochenumbau und die für den Knochenumbau typische Vorgänge in den Wirbelkörpern der 6, 12 und 18 Wochen alten Mäuse waren in beiden Versuchsgruppen im selben Ausmaß vorhanden. Dieses Ergebnis spricht gegen ein Ungleichgewicht im Stoffwechsel des Knochens und kann keine Erklärung für die oben genannten Unterschiede in der Biegefestigkeit des Knochens der beiden Versuchsgruppen liefern.

Zur besseren Quantifizierung der Trabekelfläche erfolgte zudem eine Histomorphometrie an den Wirbelkörpern L2. Hierfür wurde die relative zweidimensionale Trabekelfläche der Schnitte mit der Gesamtknochenfläche ohne Kortikalis in  $\text{mm}^2$  ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Zu berücksichtigen ist, dass eine Schwierigkeit in der Anfertigung dieser Schnitte auf Grund

der sehr kleinen Knochen besteht. Auch die Auswahl der zu betrachtenden Ausschnitte, um möglichst standardisierte Messbereiche zu erhalten, ist durch die strukturellen Gegebenheiten erschwert. Zudem muss bedacht werden, dass diese Untersuchung lediglich eine Aussage über ein zweidimensionales Bild des Knochens geben kann. Da der Knochen aber im Hinblick auf die Stabilität von seinem dreidimensionalen Aufbau profitiert, können die Ergebnisse nur indirekt einen Hinweis auf die Qualität des Knochens geben (Jiang et al., 2000). Zur Stabilität des Knochens leistet zudem die Kortikalis einen wichtigen Beitrag. Sie wurde bei dieser Untersuchung aber nicht mit erfasst. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass in der Histologie keine Unterschiede gefunden wurden, obwohl die Biomechanik zuvor signifikante Unterschiede zwischen den beiden Maustypen gezeigt hatte. Diese Untersuchung wurde zudem nicht verblindet durchgeführt, sodass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Untersucher nicht ausgeschlossen werden kann.

Williams et al. führte eine  $\mu$ CT Analyse an Wirbelkörpern und Tibiae von db/db-Mäusen durch, in der eine verminderte Trabekeldicke bei gleichbleibendem Gesamtvolumen festgestellt wurde (Williams et al., 2011). Ealey dagegen führte eine Röntgen-Untersuchung an Femur und Wirbelkörpern bei db/db-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen durch. Hier zeigte sich ein erniedrigter Knochenmineralgehalt der db/db-Mäuse im Femur, jedoch nicht im Wirbelkörper (Ealey et al., 2006). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Unterschiede in der Knochenstruktur der Versuchsgruppen zusätzlich von den untersuchten Knochen-Typen abhängig sind. Auch dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Biomechanik im Vergleich zur Histologie und Histomorphometrie geben. In den Studien von Ealey et al. und Williams et al. konnte gezeigt werden, dass Leptin einen positiven Einfluss auf die Knochenqualität hat. Ducy et al. führte ebenfalls eine histologische und histomorphometrische Betrachtung von Wirbelkörpern der db/db-Mäuse durch. In seiner Studie wurde eine erhöhte Trabekeldichte und ein höheres Knochenvolumen festgestellt. Somit zeigte seine Studie im Gegensatz zu den Studien von Ealey et al. und Williams et al. einen positiven Einfluss durch das Fehlen der Leptin-Wirkung auf den Knochen. Er verwendete hierfür Knochen von 6 Monaten alten Mäusen. Zudem untersuchte er nur weibliche Versuchstiere und verglich diese mit WT-Mäusen (Ducy et al., 2000). Dies könnte eine Erklärung für die gegenteiligen Ergebnisse der Studien liefern. In der hier vorgestellten Untersuchung wurden männliche Versuchstiere verwendet, um den hormonellen Einfluss, der bei weiblichen Versuchstieren durch den Zyklus verstärkt ist, zu minimieren.

Ein anderer Störfaktor bei der Beurteilung der Knochenstruktur stellt das unterschiedliche Körpergewicht der Mäusegruppen dar. Die mechanische Belastung spielt bei der Ausbildung der Trabekelstruktur im Knochen eine wichtige Rolle. Da das Gewicht der db/db-Mäuse zu jedem Betrachtungszeitpunkt deutlich höher war als das der db/+ -Mäuse, wäre ein Unterschied in der histologischen Untersuchung zu erwarten gewesen. Auch die sehr unterschiedliche metabolische Situation beider Versuchsgruppen muss als Störfaktor mit einbezogen werden. Ducy et al. wollte in seiner Studie diesen Störfaktor ausschließen und betrachtete hierfür Mäuse, die einen kompletten Mangel an Leptin aufwiesen (ob/ob) und verglich sie mit der dazugehörigen heterozygoten Mäuse-Gruppe (ob/+) sowie mit WT-Mäusen. Die ob/ob-Mäuse waren wie die db/db-Mäuse gekennzeichnet durch Fettleibigkeit, Hypogonadismus und diabetischer Stoffwechsellage, wohingegen die heterozygote Vergleichsgruppe ein normales Körpergewicht und eine normale Stoffwechsellage aufwies. Es konnte gezeigt werden, dass trotz der metabolischen Unterschiede die hetero- und homozygoten Mäuse-Gruppen denselben Knochenstatus mit erhöhter Knochenmasse im Vergleich zu den WT-Mäusen aufwiesen (Ducy et al., 2000). In dieser Studie mit db/db- und db/+ -Mäusen erfolgte kein Vergleich zu WT-Mäusen. Dies könnte die Tatsache, dass in der Betrachtung der Knochenstruktur keine deutlichen Unterschiede zwischen den homo- und heterozygoten Mäusen zu finden waren, erklären. Es stellt sich zudem die Frage, in wie weit ein Unterschied in der Knochenstruktur zwischen db/+ - und WT-Mäusen besteht. Dieser Vergleich ist für die Einordnung dieser hier vorgestellten Studie von wesentlicher Bedeutung. Nur so könnte eine Aussage über Ausprägung und Auswirkung der Expression des LEPRb in db/+ -Mäusen getroffen werden. Dadurch könnten wiederum die Unterschiede, die sich zwischen db/db- und db/+ -Mäusen feststellen lassen, besser eingeordnet werden.

Da Osteoklasten im Knochenstoffwechsel neben den Osteoblasten eine tragende Rolle spielen, wurde neben der Histomorphometrie eine TRAP-Enzymhistochemie durchgeführt. Hierbei wurden die Osteoklasten in den Paraffin-Schnitten der Wirbelkörper L2 mit TRAP eingefärbt, gezählt und in ein Verhältnis mit dem Trabekelumfang in mm gesetzt. Hierdurch konnte gezeigt werden, wie viele Osteoklasten zu den verschiedenen Zeitpunkten im Knochen aktiv sind. Mit zunehmendem Alter zeigte sich bei beiden Vergleichsgruppen ein Zuwachs an Osteoklasten. Ein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen ergab sich nicht. Der beobachtete Zuwachs stellt einen normalen Vorgang im Knochen dar. Bei jungen Mäusen steht zunächst noch der Knochenaufbau im Vordergrund. Mit zunehmendem Alter wird dieser durch den Knochenumbau-Prozess abgelöst (Erben, 2015). Das junge Alter der hier

untersuchten Mäuse könnte eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Forschungsergebnisse sein. Der Epiphysenschluss des Femurs und somit der Abschluss des Knochenaufbaus findet bei Mäusen erst im Alter von 16 Wochen statt. Erst im Anschluss dominiert der Knochenumbau anstatt des Knochenaufbaus.

Ducy et al. stellte in ihrer Studie im Jahr 2000 widersprüchlich zu der von ihm gemessenen hohen Knochenmasse der db/db-Mäuse eine Zunahme an Osteoklasten fest. Daher führte sie zusätzlich eine ex vivo Untersuchung an hämatopoetischen Stammzellen von db/db-Mäusen durch. Sie zeigte, dass durch Zugabe von Wachstumsfaktoren eine normale Ausdifferenzierung zu Osteoklasten stattfand. Daher schloss sie eine Funktionslosigkeit der Osteoklasten in den db/db-Mäusen aus und vermutete eine negative Wirkung von Leptin auf die Osteoklasten als Ursache der von ihr festgestellten erhöhten Knochenmasse. Da die Anzahl der Osteoblasten im Vergleich zu den WT-Mäusen gleich groß war, wurde die Osteoblastenaktivität genauer betrachtet. Sie untersuchte hierfür die Osteocalcin-Spiegel in vivo bei 3 und 6 Monate alten weiblichen db/db-Mäusen. Diese zeigten sich um 70% erhöht. Dies bestätigte ihre Theorie, dass das Fehlen von Leptin nicht auf die Ausdifferenzierung von Osteoblasten, sondern auf deren Aktivität positiven Einfluss nimmt. Sie konnte jedoch keinen Nachweis eines Leptinrezeptors im Knochen oder auf Osteoblasten erbringen. Auch konnte sie keine Expression von Leptin durch Osteoblasten nachweisen (Ducy et al., 2000).

Um die durch Leptin verursachten Veränderungen im Knochenstoffwechsel nicht nur strukturell, sondern auch im Hinblick auf die hormonellen Einflüsse betrachten zu können, wurden daher im nächsten Abschnitt die Genexpression verschiedener, im Knochenumbau eine Rolle spielender, Hormone betrachtet.

#### **4.2.3 Beurteilung der untersuchten Genexpression im Knochenstoffwechsel**

In der Untersuchung mittels real-time RT-PCR konnte für ALP eine signifikant verringerte Aktivität in den Knochen der 12 und 18 Wochen alten Mäusen festgestellt werden. Dies ist als Hinweis auf eine reduzierte Osteoblastenaktivität in diesem Alter zu werten. Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen ergab sich zu keiner Zeit ein Unterschied. Dies widerspricht der Theorie von Ducy et al., die eine negative Wirkung von Leptin auf die Osteoblastenaktivität vermutet hatte (Ducy et al., 2000). Ein positiver Effekt von Leptin auf Osteoblasten konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Womöglich spielt bei der Betrachtung der Zusammenhänge das Alter der Mäuse eine wesentliche Rolle. In dieser Studie wurden Mäuse nur bis zu einem Alter von 18 Wochen betrachtet. Da die Aktivität der Osteoblasten mit zunehmendem Alter



abnimmt, überrascht die Abnahme der ALP mit zunehmendem Alter hier nicht. Womöglich wäre bei einer Betrachtung von Mäusen in weiter fortgeschrittenen Alter ein Unterschied zu beobachten gewesen. Des Weiteren wurde ADM aus der Calcitonin-Peptid-Familie untersucht. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von ADM bei db/db-Mäusen im Alter von 18 Wochen. Dies korreliert mit dem Ergebnis von Williams et al., der anders als Ducy et al. erniedrigte Serum-Osteocalcin-Werte bei db/db-Mäusen festgestellt hatte (Williams et al., 2011). Da ADM die Proliferation von Osteoblasten induzieren kann und wiederum von Osteoblasten und Osteozyten exprimiert wird, spricht die Reduktion von ADM umgekehrt für eine reduzierte Osteoblastenaktivität und eine reduzierte Knochenmasse (Hamada et al., 2002). Zudem führt eine verminderte ADM-Expression zu einer verminderten Suppression der Osteoklasten-Differenzierung, wodurch eine erhöhte Osteoklasten-Anzahl in den Knochen der db/db-Mäuse zu erwarten gewesen wäre (Liu et al., 2017). Beim ebenfalls zur Osteocalcin-Familie gehörenden IDM ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ähnliche Ergebnisse wie bei ADM wären zu erwarten gewesen, da IDM ebenfalls über den RANK/RANKL-Signalweg positiv auf den Knochenaufbau einwirkt.

Da die reduzierte Biegefestigkeit der db/db-Knochen ein Ungleichgewicht im Knochenumbau nahegelegt hat, wurde als Gegenspieler der Osteoblasten die Osteoklasten-Aktivität betrachtet. Hierfür wurde CtsK als Marker herangezogen. CtsK ist eine lysosomale Cysteinprotease, die von Osteoklasten freigesetzt wird, um Knochenmatrix, hauptsächlich Kollagen I, aufzulösen. Es zeigte sich, dass die Expression von CtsK bei den db/db-Mäusen im Alter von 6 und 12 Wochen signifikant erhöht war. Dies lässt auf eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität in diesem Alter bei den homozygoten Mäusen schließen, obwohl die absolute Anzahl der Osteoklasten in der histomorphometrischen Untersuchung keine Veränderung gezeigt hatte. Eine Hemmung von CtsK führte in Studien zu einer erhöhten Knochenmasse und verbesserten Knochenstruktur, was im Umkehrschluss eine schlechtere Knochenstruktur bei erhöhter CtsK-Expression bedeuten könnte (Le Duong et al., 2016). Dieses Ergebnis korreliert mit der geringeren Biegefestigkeit der db/db-Knochen und lässt die Frage zu, ob Leptin einen direkten Einfluss auf die Osteoklasten-Aktivität ausübt. Neue Studien weisen darauf hin, dass CtsK auch von Osteozyten exprimiert wird (Bonnet et al., 2017). Dies muss als Störfaktor bei der Betrachtung der Ergebnisse mit einbezogen werden. Die Erhöhung von CtsK lässt auf erhöhte Knochenumbauprozesse schließen. Eine Aussage über die Qualität des dadurch veränderten Knochen lässt sich schwer treffen.

Auch die signifikante Erhöhung von Cx43 in 12 Wochen alten homozygoten Mäuseknochen passt zu den vorherigen Ergebnissen eines erhöhten Umbauprozesses. Eine Erhöhung von Cx43 steht für mehr Zell-Zell-Kontakte und einem gesteigerten Knochenstoffwechsel. Da Cx43 aber von allen drei Zellreihen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten exprimiert werden kann, lässt dieses Ergebnisse ebenfalls keinen genauen Rückschluss auf die Veränderung im Knochen zu. Die verringerte Expression mit zunehmendem Alter spricht für die insgesamt abnehmende Knochenbildung im Laufe des Lebens.

Auf Grund der zuvor durchgeführten Studien von Williams et al. und Ealey et al. mit dem Ergebnis einer reduzierten Knochenstabilität und Knochendichte, wäre ein Ungleichgewicht im Hinblick auf einen koordinierten Knochenumbau zu erwarten gewesen. BDNF und sein Rezeptor TrkB wurden hierfür als Indikatoren verwendet, da BDNF zum einen über die Expression von RANKL zu einer Steigerung der Osteoklasten-Differenzierung führen kann. Zum anderen kann BDNF über TrkB auch eine Aktivierung von Osteoblasten vermitteln und hierdurch zu einem gezielten Knochenumbau führen (Ida-Yonemochi et al., 2012). Die Untersuchung von BDNF zeigte jedoch keinen Unterschied in den untersuchten Mäusegruppen. Ein damit korrelierendes Ergebnis war hier dann auch im Bezug auf TrkB zu erwarten, da BDNF seinen Einfluss auf den Knochen über TrkB vermittelt. Somit kann ein Fehlen von BDNF nicht als Ursache der reduzierten Biegefestigkeit des Knochens bei den db/db-Mäusen herangezogen werden.

Zusammengefasst korrelieren die Ergebnisse der real-time RT-PCR positiv mit den in der Biomechanik und vorheriger Studien von Williams et al. und Ealey et al. festgestellten Knocheneigenschaften der db/db-Mäus. Diese sind eine verminderte Knochenstabilität, ein geringerer Mineralgehalt, sowie eine verminderte Trabekelfläche jedoch ohne verminderte Knochendichte (Williams et al., 2011; Ealey et al., 2006). Hierzu passen die Erhöhung von CtsK, die Verminderung von ADM und die vermehrte Expression von Cx43 als Indikator für hier stattfindende Umbauprozesse. Dies lässt die Frage zu, ob das Fehlen der durch den LEPRb vermittelten Wirkung von Leptin zwar einen erhöhten Knochenumbau bewirkt, wie es Ducey et al. vermutet hatte (Ducey et al., 2000), dieser Umbauprozess jedoch nicht effizient ist und dadurch zu einem negativen Effekt und einer verminderten Knochenqualität führt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie muss zudem berücksichtigt werden, dass bei db/db-Mäusen nur der LEPRb als eine der sechs Isoformen des Leptinrezeptors defekt ist. Die anderen fünf Isoformen sind noch aktiv, wodurch eine Wirkung von Leptin über diese

Rezeptorsubtypen noch immer möglich ist. Dennoch ist diese Studie als aussagekräftig zu betrachten, da der LEPRb als wichtigster Rezeptorsubtyp zu werten ist.

### 4.3 Die Ergebnisse im Kontext anderer Studien

Die Wirkung von Leptin auf den Knochen ist noch immer nicht vollständig geklärt und sollte weiter untersucht werden, da sein Potential für den Einsatz bei Erkrankungen des Knochenstoffwechsels wie zum Beispiel der Osteoporose als vielversprechend einzuschätzen ist. Die hier vorgestellte Studie hat, wie die Arbeiten von Ealey et al. und Williams et al., die Wirkung von Leptin am Knochen in vivo beurteilt, indem Knochen von Mäusen betrachtet wurden, die einen Defekt im LEPRb aufwiesen. In diesem Modell war somit einer der Mechanismen, über die Leptin seine Wirkung am Knochen vermitteln kann, nicht funktionsfähig. Eine aktuelle Studie beschäftigte sich detaillierter mit der Frage, wie genau Leptin seine Wirkung durch den LEPRb vermittelt. Es wurden drei unterschiedliche Signalkaskaden identifiziert. Leptin führt zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung von JAK 2. Diese wiederum phosphoryliert drei unterschiedliche Tyrosinreste (Tyr<sub>985</sub>, Tyr<sub>1077</sub>, Tyr<sub>1138</sub>). Jeder dieser phosphorylierten Tyrosinreste kann wiederum eigene Signalkaskaden in Gang setzen. Um diese drei Signalwege näher zu untersuchen wurden in der Studie von McCabe et al. 8 bzw. 9 Wochen alte Mäuse verglichen, die eine Mutation im Tyr<sub>985</sub> (LL-Maus) oder in der Tyr<sub>1077</sub> (SS-Maus) aufwiesen. Zudem wurden Mäuse betrachtet, die eine Verkürzung der Signaldomäne des LEPRb aufwiesen ( $\Delta$ 65-Maus) und daher durch die komplette Funktionslosigkeit des Rezeptors denselben Phänotyp wie die db/db-Mäuse hatten. Als Vergleichsgruppe dienten WT-Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\Delta$ 65-Mäuse wie erwartet ein erhöhtes Körpergewicht, eine verkürzte Femurlänge, ein reduziertes Trabekelvolumen, sowie eine verringerte Dicke der Kortikalis in Wirbelkörpern aufwiesen. Zudem wurde eine 10x höhere Verfettung des Knochens bei den männlichen Versuchstieren festgestellt. Bei den weiblichen Mäusen war die Verfettung nur um das 2x erhöht. Die SS-Mäuse wiesen ein noch deutlich höheres Gewicht, einen hohen Serum-Leptin-Spiegel, ein erniedrigtes Trabekelvolumen jedoch keine Veränderung in der Femurlänge auf. Nur die weiblichen SS-Mäuse zeigten eine Zunahme der Kortikalisdicke. Die LL-Mäuse wiesen ein geringeres Gewicht, zudem niedrigere Serum-Leptin-Spiegel, keine Veränderung der Femurlänge, aber ein höheres Knochen- und Trabekelvolumen auf (McCabe et al., 2019). Diese Studie gibt einen Einblick in die Komplexität der durch Leptin vermittelten Prozesse

und somit auch seiner möglichen pharmazeutischen Verwendung. Auch zeigt diese Studie geschlechtsspezifische Unterschiede auf, die genauer untersucht werden müssen, um einen therapeutischen Einsatz von Leptin möglich zu machen. Leptin kann seine Wirkung sowohl über einen zentralen Weg als auch über direkten Einfluss auf im Knochen vorkommende Zellen vermitteln, wodurch das Verstehen der Wirkungsmechanismen deutlich erschwert wird.

Eine andere Studie beschäftigte sich daher gezielter mit dem LEPRb auf mesenchymalen Stammzellen, die sich sowohl zu Osteoblasten als auch zu Fettzellen differenzieren können. Es wurden hierfür der LEPRb nur auf den Stammzellen in den langen Röhrenknochen funktionslos gemacht (fl/fl-Mäuse). Im Hypothalamus konnte Leptin über den LEPRb weiter seine Wirkung vermitteln. Die Mäuse wiesen ein normales Körpergewicht auf. Lediglich in den langen Röhrenknochen war eine Veränderung festzustellen. Es zeigte sich eine erhöhte Knochenbildung, eine Reduzierung des Fettanteils im Knochen sowie eine verbesserte Frakturheilung. Die fl/fl-Mäuse erhielten schließlich eine Fetternährung, um den sekundären Einfluss der Ernährung auf die zunächst positiven Ergebnisse durch das Fehlen von Leptin im Knochenstoffwechsel zu beobachten. Bei WT-Mäusen zeigte sich durch die Fetternährung eine erhöhte Fett- und erniedrigte Knochenbildung, wohingegen bei den fl/fl-Mäuse kein Effekt nachweisbar war (Yue et al., 2016). Dies lässt vermuten, dass Leptin durch seine direkte Wirkung auf den Knochen über den LEPRb einen negativen Einfluss auf das Knochenwachstum hat. Dem gegenüber hat diese Studie an db/db-Mäusen gezeigt, dass ein komplettes Fehlen der durch den LEPRb vermittelten Wirkung von Leptin einen negativen Effekt auf die Knochenqualität hat. Insgesamt wird so immer mehr klar, dass weitere Studien notwendig sind, um die zentrale Wirkung von Leptin auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen.

## 5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die durch den LEPRb vermittelte Wirkung von Leptin einen positiven Einfluss auf die Knochenstabilität hat. Einen direkten Einfluss auf die Trabekelstruktur oder den Knochenaufbau konnte nicht gezeigt werden.

In weiteren Studien sollte untersucht werden, inwieweit Leptin seine Wirkung über den LEPRb im Hypothalamus via zentraler Steuerung auf den Knochen vermittelt. Forschungsbedarf besteht hier in der detaillierten Untersuchung der molekularen Signalkaskaden. Zudem sollte eine genauere Betrachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede erfolgen, um eine therapeutische Anwendung von Leptin im Hinblick auf Knochenerkrankungen wie Osteoporose oder aber auch um einen gezielten lokalen Einsatz von Leptin zur Verbesserung der Knochenheilung möglich zu machen. Auch die unterschiedliche Wirkung von Leptin auf die verschiedenen Knochentypen wie den langen Röhrenknochen im Vergleich zu den Wirbelkörpern sollte näher untersucht werden. Zudem ist der Zusammenhang von Fettleibigkeit, dem Leptin-Serum-Spiegel und dem Knochenstatus näher zu betrachten. Da immer mehr Kinder und Jugendliche bereits einen erhöhten Körperfettanteil aufweisen, stellt sich die Frage, wie der erhöhte Leptin-Spiegel hierbei womöglich den Knochenstoffwechsel beeinflusst.

## 6. Zusammenfassung

Leptin stellt ein wichtiges Hormon in der Regulation des Energiehaushalts dar. Seine am Hypothalamus vermittelte Wirkung zur Hemmung der Nahrungsaufnahme ist mittlerweile ausgiebig erforscht. Dahingegen wird seine Wirkung auf den Knochen seit Langem kontrovers diskutiert. Diese Arbeit hatte das Ziel, den Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel am Beispiel von Mäusen zu untersuchen und durch den Vergleich von homo- und heterozygoten db/db-Mäusen näher zu betrachten. Es wurden lange Röhrenknochen und Wirbelkörper von Mäusen im Alter von 6, 12 und 18 Wochen betrachtet. Als Methoden zur Untersuchung des Knochenstatus wurden Biomechanik, Histologie, Histomorphometrie und Enzymhistochemie, sowie die real-time RT-PCR verwendet. Die statistische Auswertung fand mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test statt. Als Konfidenzniveau wurde  $p \leq 0,05$  als signifikant definiert.

Die db/db-Mäuse wiesen zu jedem Versuchszeitpunkt ein signifikant höheres Körpergewicht auf. Bei der Biomechanik zeigte sich zudem eine signifikant erniedrigte Biegefestigkeit der Knochen aller db/db-Mäuse. Sowohl bei der histologischen und histomorphometrischen, als auch bei der enzymhistochemischen Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Die real-time RT-PCR ergab für die Expression von ALP keinen Unterschied zwischen db/db- und db/+ -Mäusen. Bei CtsK zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression bei den db/db-Mäusen im Alter von 6 und 12 Wochen. Auch die Expression von Cx43 war bei den 12 Wochen alten db/db-Mäusen erhöht, jedoch war sie insgesamt betrachtet mit zunehmendem Alter signifikant verringert. In den 18 Wochen alten db/db Mäusen war die ADM-Expression signifikant vermindert. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied für BDNF, TrkB und IDM.

Die Ergebnisse der real-time RT-PCR mit der Erhöhung von CtsK und Verminderung von ADM, sowie die vermehrte Expression von Cx43 bei den db/db-Mäusen lassen den Schluss zu, dass ein erhöhter Knochenstoffwechsel nachzuweisen ist. Die Biomechanik hingegen zeigt, dass die Knochenqualität der db/db-Mäuse deutlich reduziert ist. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Studie: Das Fehlen der durch den LEPRb vermittelten Wirkung von Leptin führt zu einer reduzierten Knochenqualität. Dies korreliert mit vorangegangenen Arbeiten, die eine verminderte Knochenstabilität, einen geringeren Mineralgehalt, sowie eine verminderte Trabekelfläche nachweisen konnten (Ealey et al., 2006; Williams et al., 2011). Da andere Studien zuvor einen negativen lokalen Effekt von Leptin auf den Knochen aufgezeigt haben,

besteht im Bezug auf die Betrachtung der lokalen sowie zentralen Leptin-Wirkung noch erheblicher Forschungsbedarf.

## 7. Summary

Leptin is an important hormone in the regulation of energy balance. There is extensive research about the mechanism of action inhibiting food intake at the hypothalamus, but there is still controversy about the impact of leptin on the bone metabolism. This study evaluated the effect of leptin on the bone metabolism in mice through the comparison of homozygous and heterozygous leptin receptor gene deficiency db/db-mice. Long bones and vertebrae of mice at the age of 6, 12 and 18 weeks were examined.

Methods of examination were biomechanics, histology, histomorphometry, enzyme histochemistry and real-time RT-PCR. Kuskal-Wallis-Test and Mann-Whitney-Test were used for statistical analysis. A level of confidence  $p \leq 0,05$  was defined as significant. Db/db-mice had a significantly higher body weight at every age. All bones of db/db-mice had significantly lower bending stiffness. There was no difference in histologic and histomorphometric findings between the two study populations. Real-time-PCR showed no difference for the expression of ALP between the study groups. The mRNA-expression of CtsK was elevated in db/db-mice at the age of 6 and 12 weeks. Expression of Cx43 was elevated in db/db-mice at the age of 12 weeks, albeit in total there was a significant decrease with increasing age in both study groups. 18 week old db/db-mice had a significantly lower expression of ADM. There was no difference for the expression of BDNF, TrkB and IDM between the study groups. The findings in real-time-PCR with elevated expression of CtsK, Cx43 and a reduced expression of ADM in db/db-mice suggest an increased bone metabolism. In contrary to these findings, biomechanics show a reduced bone quality in homozygous db/db-mice. Therefore, the results of this study show that the lack of the LEPRb-mediated effect of Leptin affects bone stability negatively. This correlates with studies that showed decreased bone stability, mineral content and a reduced trabecular surface (Ealey et al., 2006; Williams et al., 2011).

In contrary to that, other studies showed a negativ local effect of Leptin on the bone. With these contradictory findings, further investigations of the local and central effects of Leptin are desperately needed.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
$\varepsilon$	relative Dehnung
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
ADM	Adrenomedullin
ALP	Alkalische Phosphatase
AOI	gesamte Knochenfläche
Atf4	Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 4
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMI	Body Mass Index
BMU	basis multizelluläre Einheit
bp	Basenpaare
CP	Cycle-Treshold-Wert
CtsK	Cathepsin K
Cx43	Connexin 43
dCP	delta- Cycle-Treshold
Da	Dalton
DXA	dual-energy Xray absorbtometry
Db/db	homozygote BKS(D)-Leprdb/jOrlRj
Db/+	heterozygote BKS(D)-Leprdb/jOrlRj Temoin
EDTA-Lösung	Ethylendinitrotetratessigsäure-Lösung
g	Zentrifugalkraft; Gramm
h	Stunde

HE	Hämatoxylin-Eosin
IMD	Intermedin
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
JAK	Janus Kinase
LEPR	Leptin-Rezeptor
M	Molare Masse
M2G	Beta-2-Mikroglobulin
min	Minute
MMP	Matrix-Metallprotease
M-CSF	Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
N	Newton
n	Anzahl
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
Pa	Pascal
RANK	Rezeptor Aktivator von NF-kB
RANK-L	Rezeptor Aktivator von NF-kB-Ligand
Real-time RT-PCR	Real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt-Related Transkriptionsfaktor 2
s	Sekunde
Sox9	geschlechtsbestimmende Region Y- Box

TGF- $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor- $\alpha$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase
TrkB	Tropomyosin Rezeptor Kinase B
V	Volt
WT-Mäuse	Wildtyp-Mäuse

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Röhrenknochens .....	2
Abbildung 2: Darstellung der mechanischen Testung eines Knochens mittels Kraft- Verformungs-Diagramm. ....	4
Abbildung 3: Mögliche Coupling-Mechanismen in der Zeit zwischen Knochenresorption und Aufbau.....	7
Abbildung 4: Connexin 43, hemichannel und gap junction .....	10
Abbildung 5: Cx43 wird von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten exprimiert...	10
Abbildung 6: Funktion der TRAP in den Osteoklasten .....	12
Abbildung 7: Schematische Darstellung des RANK/RANKL/OPG-Systems.....	14
Abbildung 8: Die Auswirkungen von Leptin im Fall eines Energie-Mangels oder – Überschusses .....	18
Abbildung 9: Darstellung der Struktur der durch alternatives Splicing entstandenen LEPR Isoformen .....	21
Abbildung 10: Zentraler und peripherer Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel .....	23
Abbildung 11: Bild einer homozygoten männlichen BKS(D)-Leprdb/jOrlRj (db/db) Maus im Alter von 18 Wochen .....	28
Abbildung 12: Bild einer heterozygoten männlichen BKS(D)-Leprdb/jOrlRj Temoin (db/+) Maus im Alter von 18 Wochen .....	28
Abbildung 13: Aufbau der Biomechanik-Versuche.....	30
Abbildung 14: Messgrafik 4/3.....	31
Abbildung 15: L2 Querschnitt einer 12 Wochen alten homozygoten db/db Maus in HE- Färbung.....	33
Abbildung 16: L2 Querschnitt einer 12 Wochen alten homozygoten db/db-Maus .....	34
Abbildung 17: Bild einer Gelelektrophorese .....	38
Abbildung 18: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere.....	43
Abbildung 19: Ergebnisse der Biomechanik.....	44

Abbildung 20: Mikrostruktur der Spongiosa in Semidünnschnitten von Wirbelkörper L3/4	46
Abbildung 21: Darstellung der Trabekelfläche in % .....	47
Abbildung 22: L2 Querschnitt einer db/db Maus in HE- und TRAP-Färbung.....	48
Abbildung 23: Paraffin-Schnitt eines Wirbelkörpers L2 .....	49
Abbildung 24: Enzymhistochemie .....	49
Abbildung 25: Ergebnisse der real-time RT-PCR, 1. Teil .....	51
Abbildung 26: Ergebnisse der real-time RT-PCR, 2. Teil .....	52

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Den Plasma-Leptin-Spiegel beeinflussende Faktoren .....	19
Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Tiere .....	26
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Knochen .....	29
Tabelle 4: Verwendete Primer.....	40
Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse der Histomorphometrie .....	47

## 11. Literaturverzeichnis

- Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Osei, S. & Flier, J. S. (1999). Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140(6), S. 2755–2762. DOI: 10.1210/endo.140.6.6774.
- Ahima, R. S. & Osei, S. Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology & behavior* 81(2), S. 223–241. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.02.014.
- Ai, L.-S., Sun, C.-Y., Zhang, L., Zhou, S.-C., Chu, Z.-B., Qin, Y., Wang, Y.-D., Zeng, W., Yan, H., Guo, T., Chen, L., Di Yang & Hu, Y. (2012). Inhibition of BDNF in multiple myeloma blocks osteoclastogenesis via down-regulated stroma-derived RANKL expression both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 7(10), e46287. DOI: 10.1371/journal.pone.0046287.
- Almeida, M., Laurent, M. R., Dubois, V., Claessens, F., O'Brien, C. A., Bouillon, R., Vanderschueren, D. & Manolagas, S. C. (2017). Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 97(1), S. 135–187. DOI: 10.1152/physrev.00033.2015.
- Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S. & Reißig, D. (2017). Anatomie. 4. Aufl. Stuttgart, New York, Delhi: Georg Thieme Verlag.
- Babaji, P., Devanna, R., Jagtap, K., Chaurasia, V. R., Jerry, J. J., Choudhury, B. K. & Duhan, D. (2017). The cell biology and role of resorptive cells in diseases: A review. *Annals of African medicine* 16(2), S. 39–45. DOI: 10.4103/aam.aam\_97\_16.
- Beil, F. T., Barvencik, F., Gebauer, M., Beil, B., Pogoda, P., Rueger, J. M., Ignatius, A., Schinke, T. & Amling, M. (2011). Effects of increased bone formation on fracture healing in mice. *The Journal of trauma* 70(4), S. 857–862. DOI: 10.1097/TA.0b013e3181de3dd9.
- Body Weight Information for C57BL/6J (000664). Abgerufen am 09.01.2018 von <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664#>.
- Bonnet, N., Brun, J., Rousseau, J.-C., Le Duong, T. & Ferrari, S. L. (2017). Cathepsin K controls cortical bone formation by degrading periostin. *Journal of Bone and Mineral Research* 32(7), S. 1432–1441. DOI: 10.1002/jbmr.3136.
- Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hanning, C. R., Jones, C., Kurdyla, J. T., McNulty, D. E., Drake, F. H., Gowen, M. & Levy, M. A. (1996). Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K expression, purification, activation and substrate identification. *Journal of Biological Chemistry* 271(21), S. 12517–12524. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12517.
- Boyce, B. F. & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy* 9 Suppl 1, S1. DOI: 10.1186/ar2165.
- Buo, A. M. & Stains, J. P. (2014). Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS letters* 588(8), S. 1315–1321. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.01.025.
- Camerino, C., Zayzafoon, M., Rymaszewski, M., Heiny, J., Rios, M. & Hauschka, P. V. (2012). Central depletion of brain-derived neurotrophic factor in mice results in high bone mass and metabolic phenotype. *Endocrinology* 153(11), S. 5394–5405. DOI: 10.1210/en.2012-1378.

- Cattaneo, A., Cattane, N., Begni, V., Pariante, C. M. & Riva, M. A. (2016). The human BDNF gene: Peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Translational psychiatry* 6(11), e958. DOI: 10.1038/tp.2016.214.
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. & Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of clinical investigation* 111(9), S. 1409–1421. DOI: 10.1172/JCI17490.
- Chen, X. X. & Yang, T. (2015). Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *Journal of bone and mineral metabolism* 33(5), S. 474–485. DOI: 10.1007/s00774-014-0569-7.
- Clemente, N., Raineri, D., Cappellano, G., Boggio, E., Favero, F., Soluri, M. F., Dianzani, C., Comi, C., Dianzani, U. & Chiocchetti, A. (2016). Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research* 2016. DOI: 10.1155/2016/7675437.
- Cohrs, P. & Jaffé, R. (1958). *Pathologie der Laboratoriumstiere*. Berlin: Springer.
- de Bakker, Chantal M. J., Tseng, W.-J., Li, Y., Zhao, H. & Liu, X. S. (2017). Clinical evaluation of bone strength and fracture risk. *Current Osteoporosis Reports* 15(1), S. 32–42. DOI: 10.1007/s11914-017-0346-3.
- Deckard, C., Walker, A. & Hill, B. J. F. (2017). Using three-point bending to evaluate tibia bone strength in ovariectomized young mice. *Journal of Biological Physics* 43(1), S. 139–148. DOI: 10.1007/s10867-016-9439-y.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M. & Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay. *Cell* 100(2), S. 197–207. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81558-5.
- Ealey, K. N., Fonseca, D., Archer, M. C. & Ward, W. E. (2006). Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice. *Regulatory peptides* 136(1-3), S. 9–13. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.04.013.
- Erben, R. G. (2015). Hypothesis: Coupling between resorption and formation in cancellous bone remodeling is a mechanically controlled event. *Frontiers in endocrinology* 6, S. 82. DOI: 10.3389/fendo.2015.00082.
- Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R. & Friedman, J. M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13), S. 7001–7005.
- Felsenberg, D. & Boonen, S. (2005). The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clinical therapeutics* 27(1), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.clinthera.2004.12.020.
- Friedman, J. M. & Mantzoros, C. S. (2015). 20 years of leptin: from the discovery of the leptin gene to leptin in our therapeutic armamentarium. *Metabolism: clinical and experimental* 64(1), S. 1–4. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.023.
- Frost, H. M. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified tissue research* 3(3), S. 211–237.
- Green, E. D., Maffei, M., Braden, V. V., Proenca, R., DeSilva, U., Zhang, Y., Chua, S. C., Leibel, R. L., Weissenbach, J. & Friedman, J. M. (1995). The human obese (OB) gene: RNA

- expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Research* 5(1), S. 5–12. DOI: 10.1101/gr.5.1.5.
- Guilbaud, A., Howsam, M., Niquet-Léridon, C., Delguste, F., Boulanger, E. & Tessier, F. J. (2018). The LepRdb/db mice model for studying glycation in the context of diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, e3103. DOI: 10.1002/dmrr.3103.
- Halleen, J. M., Räisänen, S. R., Alatalo, S. L. & Väänänen, H. K. (2003). Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. *Journal of Bone and Mineral Research* 18(10), S. 1908–1911. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.10.1908.
- Halling Linder, C., Ek-Rylander, B., Krumpel, M., Norgård, M., Narisawa, S., Millán, J. L., Andersson, G. & Magnusson, P. (2017). Bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: Potential co-regulators of bone mineralization. *Calcified tissue international* 101(1), S. 92–101. DOI: 10.1007/s00223-017-0259-2.
- Hamada, H., Kitamura, K., Chosa, E., Eto, T. & Tajima, N. (2002). Adrenomedullin stimulates the growth of cultured normal human osteoblasts as an autocrine/paracrine regulator. *Peptides* 23(12), S. 2163–2168. DOI: 10.1016/S0196-9781(02)00259-0.
- Hamrick, M. W., Pennington, C., Newton, D., Xie, D. & Isales, C. (2004). Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* 34(3), S. 376–383. DOI: 10.1016/j.bone.2003.11.020.
- Hernandez, C. J. & Keaveny, T. M. (2006). A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 39(6), S. 1173–1181. DOI: 10.1016/j.bone.2006.06.001.
- Howard, G. A., Bottemiller, B. L., Turner, R. T., Rader, J. I. & Baylink, D. J. (1981). Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(5), S. 3204–3208.
- Hoylaerts, M. F., van Kerckhoven, S., Kiffer-Moreira, T., Sheen, C., Narisawa, S. & Millán, J. L. (2015). Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS ONE* 10(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0119874.
- Ida-Yonemochi, H., Yamada, Y., Yoshikawa, H. & Seo, K. (2017). Locally produced BDNF promotes sclerotic change in alveolar bone after nerve injury. *PLoS ONE* 12(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0169201.
- Janckila, A. J., Takahashi, K., Sun, S. Z. & Yam, L. T. (2001). Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clinical Chemistry* 47(1), S. 74–80. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/47/1/74.full.pdf>.
- Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R. & Westendorf, J. J. (2010). Regulation of gene expression in osteoblasts. *BioFactors (Oxford, England)* 36(1), S. 25–32. DOI: 10.1002/biof.72.
- Jiang, Y., Zhao, J., White, D. L. & Genant, H. K. (2000). Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 1(1), S. 45–51.
- Kamat, M., Puranik, R., Vanaki, S. & Kamat, S. (2013). An insight into the regulatory mechanisms of cells involved in resorption of dental hard tissues. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP* 17(2), S. 228–233. DOI: 10.4103/0973-029X.119736.
- Keller, J., Catala-Lehnen, P., Huebner, A. K., Jeschke, A., Heckt, T., Lueth, A., Krause, M., Koehne, T., Albers, J., Schulze, J., Schilling, S., Haberland, M., Denninger, H., Neven, M., Hermans-Borgmeyer, I., Streichert, T., Breer, S., Barvencik, F., Levkau, B., Rathkolb, B.,



- Wolf, E., Calzada-Wack, J., Neff, F., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Angelis, M. H. de, Klutmann, S., Tsourdi, E., Hofbauer, L. C., Kleuser, B., Chun, J., Schinke, T. & Amling, M. (2014). Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nature communications* 5, S. 5215. DOI: 10.1038/ncomms6215.
- Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal* 394(3), S. 527–543. DOI: 10.1042/BJ20051922.
- Le Duong, T., Leung, A. T. & Langdahl, B. (2016). Cathepsin K Inhibition: A new mechanism for the treatment of osteoporosis. *Calcified tissue international* 98(4), S. 381–397. DOI: 10.1007/s00223-015-0051-0.
- Lecanda, F., Warlow, P. M., Sheikh, S., Furlan, F., Steinberg, T. H. & Civitelli, R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *The Journal of Cell Biology* 151(4), S. 931–944. DOI: 10.1083/jcb.151.4.931.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. & Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379(6566), S. 632–635. DOI: 10.1038/379632a0.
- Lee, Y.-J., Park, J.-H., Ju, S.-K., You, K.-H., Ko, J. S. & Kim, H.-M. (2002). Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS letters* 528(1-3), S. 43–47.
- Li, J.-Y., Liu, J., Manaph, N. P. A., Bobrovskaya, L. & Zhou, X.-F. (2017). ProBDNF inhibits proliferation, migration and differentiation of mouse neural stem cells. *Brain research* 1668, S. 46–55. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.05.013.
- Liu, Y., Zuo, G., Meng, X., Gao, X., Zhang, L. & Tang, P. (2017). Adrenomedullin inhibits osteoclast differentiation through the suppression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced nuclear factor-kappaB activation in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Experimental and therapeutic medicine* 14(5), S. 4009–4016. DOI: 10.3892/etm.2017.5025.
- Ljusberg, J., Ek-Rylander, B. & Andersson, G. (1999). Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochemical Journal* 343(Pt 1), S. 63–69.
- London, E. D., Berman, S. M., Chakrapani, S., Delibasi, T., Monterosso, J., Erol, H. K., Paz-Filho, G., Wong, M.-L. & Licinio, J. (2011). Short-term plasticity of gray matter associated with leptin deficiency and replacement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(8), E1212-20. DOI: 10.1210/jc.2011-0314.
- Lorentzon, R., Alehagen, U. & Boquist, L. (1986). Osteopenia in mice with genetic diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2(3), S. 157–163. DOI: 10.1016/S0168-8227(86)80017-1.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A. & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1(11), S. 1155–1161. DOI: 10.1038/nm1195-1155.
- Manolagas, S. C. & Jilka, R. L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling — Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332(5), S. 305–311. DOI: 10.1056/NEJM199502023320506.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G. & Hill, R. A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders* :

- Journal of the International Association for the Study of Obesity* 26(11), S. 1407–1433. DOI: 10.1038/sj.ijo.0802142.
- McCabe, I. C., Fedorko, A., Myers, M. G., Leininger, G., Scheller, E. & McCabe, L. R. (2019). Novel leptin receptor signaling mutants identify location and sex-dependent modulation of bone density, adiposity, and growth. *Journal of cellular biochemistry* 120(3), S. 4398–4408. DOI: 10.1002/jcb.27726.
- Millán, J. L. & Whyte, M. P. (2016). Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcified tissue international* 98(4), S. 398–416. DOI: 10.1007/s00223-015-0079-1.
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of cellular biochemistry* 55(3), S. 273–286. DOI: 10.1002/jcb.240550303.
- Park, H.-K. & Ahima, R. S. (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism: clinical and experimental* 64(1), S. 24–34. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.08.004.
- Plotkin, L. I. & Bellido, T. (2013). Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone* 52(1), S. 157–166. DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.030.
- Polyakova, M., Stuke, K., Schuemberg, K., Mueller, K., Schoenknecht, P. & Schroeter, M. L. (2015). BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. *Journal of affective disorders* 174, S. 432–440. DOI: 10.1016/j.jad.2014.11.044.
- Pondel, M. (2000). Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* 81(6), S. 405–422. DOI: 10.1046/j.1365-2613.2000.00176.x.
- Poudyal, H. & Brown, L. (2013). Osteoporosis and its association with non-gonadal hormones involved in hypertension, adiposity and hyperglycaemia. *Current drug targets* 14(14), S. 1694–1706.
- PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: LernAtlas der Anatomie (2014). 4. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Ren, H., Ren, H., Li, X., Yu, D., Mu, S., Chen, Z. & Fu, Q. (2015). Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/M-CSF in the MC3T3-E1 osteoblast cell line. *Molecular medicine reports* 12(5), S. 6711–6717. DOI: 10.3892/mmr.2015.4328.
- Reseland, J. E., Syversen, U., Bakke, I., Qvigstad, G., Eide, L. G., Hjertner, O., Gordeladze, J. O. & Drevon, C. A. (2001). Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16(8), S. 1426–1433. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.8.1426.
- Ritchie, R. O., Koester, K. J., Ionova, S., Yao, W., Lane, N. E. & Ager, J. W. (2008). Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone* 43(5), S. 798–812. DOI: 10.1016/j.bone.2008.04.027.
- Röszer, T., Józsa, T., Kiss-Tóth, E. D., Clerck, N. de & Balogh, L. (2014). Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration. *Cell and tissue research* 356(1), S. 195–206. DOI: 10.1007/s00441-013-1768-6.

- Rutkovskiy, A., Stenslkken, K.-O. & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast differentiation at a glance. *Medical Science Monitor Basic Research* 22, S. 95–106. DOI: 10.12659/MSMBR.901142.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P. & Figura, K. v. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(23), S. 13453–13458. DOI: 10.1073/pnas.95.23.13453.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R. M. & Whittington, P. F. (2004). Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: Role of short-form leptin receptors and osteopontin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287(5), G1035-G1043. DOI: 10.1152/ajpgi.00199.2004.
- Schaffler, M. B., Cheung, W.-Y., Majeska, R. & Kennedy, O. (2014). Osteocytes: Master orchestrators of bone. *Calcified tissue international* 94(1), S. 5–24. DOI: 10.1007/s00223-013-9790-y.
- Schiebler, T. H. (2007). Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie. [S.l.]: Steinkopff Darmstadt.
- Sims, N. A. & Martin, T. J. (2015). Coupling signals between the osteoclast and osteoblast: How are messages transmitted between these temporary visitors to the bone surface? *Frontiers in endocrinology* 6, S. 41. DOI: 10.3389/fendo.2015.00041.
- Staats, J. (1975). Diabetes in the mouse due to two mutant genes — a bibliography: Diabetologia. *Diabetologia* 11(4), S. 325–327. DOI: 10.1007/BF00422399.
- Stein, G. S., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J. & Montecino, M. (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological Reviews* 76(2), S. 593–629.
- Turner, C. H. & Burr, D. B. (1993). Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 14(4), S. 595–608.
- Turner, R. T., Kalra, S. P., Wong, C. P., Philbrick, K. A., Lindenmaier, L. B., Boghossian, S. & Iwaniec, U. T. (2013). Peripheral leptin regulates bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28(1), S. 22–34. DOI: 10.1002/jbmr.1734.
- Uzan, B., Villemin, A., Garel, J.-M. & Cressent, M. (2008). Adrenomedullin is anti-apoptotic in osteoblasts through CGRP1 receptors and MEK-ERK pathway. *Journal of cellular physiology* 215(1), S. 122–128. DOI: 10.1002/jcp.21294.
- Wautman, J., Zabeau, L. & Tavernier, J. (2017). The leptin receptor complex: Heavier than expected? *Frontiers in endocrinology* 8, S. 30. DOI: 10.3389/fendo.2017.00030.
- Williams, G. A., Callon, K. E., Watson, M., Costa, J. L., Ding, Y., Dickinson, M., Wang, Y., Naot, D., Reid, I. R. & Cornish, J. (2011). Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. *Journal of Bone and Mineral Research* 26(8), S. 1698–1709. DOI: 10.1002/jbmr.367.
- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J. J., Dusevich, V., Bonewald, L., Manolagas, S. C. & O'Brien, C. A. (2015). Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS ONE* 10(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0138189.

You, L.-D., Weinbaum, S., Cowin, S. C. & Schaffler, M. B. (2004). Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *The Anatomical Record* 278A(2), S. 505–513. DOI: 10.1002/ar.a.20050.

Yue, R., Zhou, B. O., Shimada, I. S., Zhao, Z. & Morrison, S. J. (2016). Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. *Cell stem cell*. DOI: 10.1016/j.stem.2016.02.015.

Zhang, S., Wang, X., Li, G., Chong, Y., Zhang, J., Guo, X., Li, B. & Bi, Z. (2017). Osteoclast regulation of osteoblasts via RANKRANKL reverse signal transduction in vitro. *Molecular medicine reports*. DOI: 10.3892/mmr.2017.7039.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505), S. 425–432. DOI: 10.1038/372425a0.

## 12. Publikationsverzeichnis

### Posterpräsentation:

**Stähle M**, Lips KS, Beckmann J, Floel W, Kneffel M, Dürselen L, Ignatius A, Linn T, Heiss C, Schnettler R. Investigation of bone formation in leptin-receptor-deficient mice. Von-Behring-Röntgen-Symposium, „Bone Disorders and New Treatment Concepts“. 9.-10. Oktober 2015, Gießen.

### 13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 14. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips für die Überlassung des Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die langjährige Unterstützung.

Die Arbeit fand im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie statt. Ich danke Frau Ivonne Bergen, Frau Martina Fink, Frau Ida Oberst, Frau Iris Schütz und Frau Dr. Janet Beckmann für ihre Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und die aufmunternden Worte an langen Tagen im Labor.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials aus dem Tierexperiment möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Linn, Medizinische Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Gießen und Marburg bedanken.

Besonderer Dank geht an meine Familie, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich bereit hielt, sodass ich nie das Ziel aus den Augen verloren habe.

Zudem danke ich Dr. Till Damm, ohne dessen kontinuierliche Ermutigung diese Arbeit nicht vollendet worden wäre.