

**Der Einfluss der alpha9- und alpha10-Untereinheit des
nikotinischen Acetylcholinrezeptors auf den Knochenstoffwechsel**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Baumann, Lisa

aus Chemnitz

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

(Labor für experimentelle Unfallchirurgie),

unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Christian Heiß

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 11.07.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Physiologie des Knochens	1
1.2	Osteoblasten.....	4
1.3	Osteozyten	7
1.4	Osteoklasten.....	10
1.5	Acetylcholin und das cholinerge System.....	13
1.6	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR).....	15
1.7	nAChR und Knochen	17
1.8	Fragestellung und Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Versuchstiere.....	23
2.2	Probeentnahme und Präparation	23
2.3	Biomechanische Testung	23
2.4	Mikro-Computertomographie (μ CT)	25
2.5	Real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	29
2.6	Histologische Färbungen und Histomorphometrie	35
2.7	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	41
2.8	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Körpergewicht und Biomechanik	44
3.2	μ CT.....	45
3.2.1	Femur.....	45
3.2.2	Wirbelkörper.....	51
3.3	Histomorphometrie.....	53
3.4	Osteoblasten.....	54
3.5	Osteozyten	56

3.6	Osteoklasten.....	60
3.7	Expression der Untereinheit $\alpha 9$ in $\alpha 10$ KO- und $\alpha 10$ WT-Tieren.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Funktionelle und strukturelle Defizite der Kortikalis der $\alpha 9$ KO-Tiere.....	64
4.2	Beeinträchtigung der Architektur der Trabekel der $\alpha 9$ KO-Tiere.....	68
4.3	Keine Regulation der Osteoklasten der $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere.....	72
4.4	Verminderte mRNA-Expression von Collagen in Osteoblasten der $\alpha 9$ KO-Tiere.....	73
4.5	Beeinträchtigung der Morphologie und Funktion der Osteozyten in $\alpha 9$ KO-Tieren..	76
4.6	Cholinerge Regulation des Knochenstoffwechsels durch nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$	80
4.7	Limitation der Studie.....	85
5	Zusammenfassung.....	87
6	Summary.....	89
7	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	91
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	94
7.3	Tabellenverzeichnis.....	95
8	Literaturverzeichnis.....	96
9	Publikationsverzeichnis.....	114
9.1	Originalarbeit.....	114
9.2	Konkressbeiträge/ Posterpräsentation.....	114
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	115
11	Danksagung.....	116

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Knochens

Knochengewebe gehört zur Gruppe der harten Binde- und Stützgewebe und bildet das Skelettsystem. Neben der Fähigkeit zur Fortbewegung und dem Schutz innerer Organe dient der Knochen als Depot für Calcium, Phosphat und das Knochenmark (Datta et al., 2008). Des Weiteren verfügt Knochengewebe über endokrine Funktionen, welche auf den Phosphathaushalt und den Energiestoffwechsel Einfluss nehmen (Burr und Akkus, 2014). Aufgebaut aus Substantia compacta und spongiosa, imponiert der Knochen durch seine biomechanischen Eigenschaften der Druck- und Zugfestigkeit bei gleichzeitiger Elastizität. Insgesamt 80 % des Knochens besteht aus der Substantia compacta, auch als Kortikalis oder Knochenrinde bezeichnet. Das sehr dichte und mineralisierte Gewebe der Kortikalis übernimmt besonders im Schaftbereich (Diaphyse) langer Röhrenknochen einen großen Teil der mechanischen Biege- und Torsionsfestigkeit. Begrenzt wird die Diaphyse vom kegelförmig aufgeweiteten Bereich der Metaphyse, welche der Epiphyse durch eine Wachstumsfuge getrennt anliegt. Im Inneren des Knochens ist die Substantia spongiosa lokalisiert, deren Netzwerk aus platten- oder stabähnlich geformten Trabekeln von Knochenmark umgeben ist. Der spongiöse Knochen hat trotz des niedrigen Anteils von 20 % im Gesamtknochen eine Knochenoberfläche von 80 % inne (Clarke, 2008). Die Spongiosa weist durch die große Kontaktfläche zu Zellen des Knochenmarks, des Bindegewebes und der Blutgefäße metabolische Funktionen auf und verfügt über einen höheren Knochenumsatz. Bei den Wirbelkörpern (Abb. 1) trägt die Spongiosa wesentlich zur mechanischen Stabilität bei (Baron, 2000). Die extrazelluläre Knochenmatrix besteht zu circa (ca.) einem Viertel aus organischem Material und zu zwei Dritteln aus anorganischen Hydroxylapatitkristallen. Die restlichen fünf bis zehn Prozent fügen sich aus Wasser und zu einem kleinen Anteil aus Lipiden zusammen (Burr und Akkus, 2014). Die organische Matrix wird zu 85–90 % durch Collagen Typ 1 gebildet, gefolgt von Collagen Typ 3, 5 und nicht-fibrillären Collagenen sowie von non-collagenen Proteinen (Proteoglykane, Glykoproteine, Osteocalcin, Osteonektin und small integrin binding ligand N-glycosylated (SIBLING)-Proteine wie dentine matrix protein 1 (DMP-1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), Osteopontin und Bone-Sialoproteinen) (Burr und Akkus, 2014).

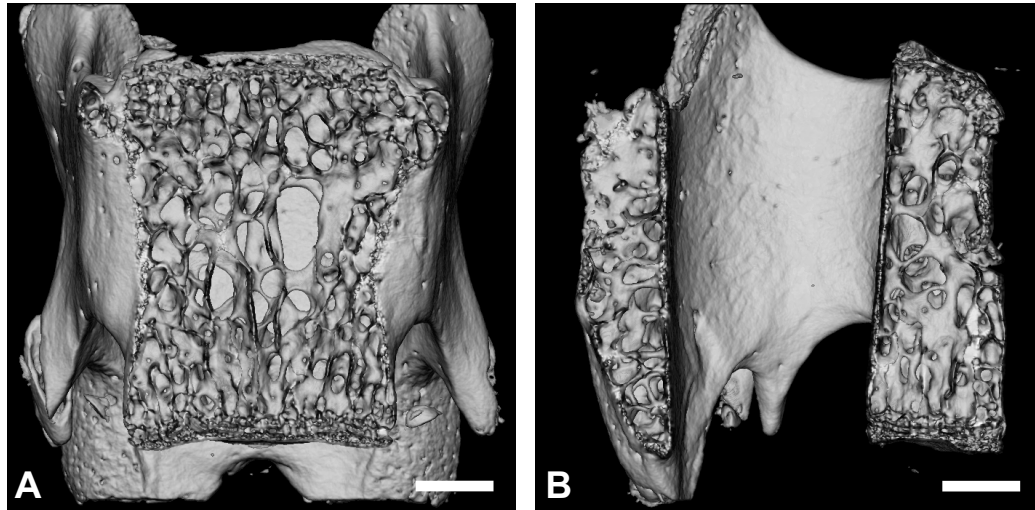


Abb. 1: 3D-Rekonstruktion eines Lendenwirbels L1.

Lendenwirbel L1 einer $\alpha 9$ Knockout (KO)-Maus im (A) Frontalschnitt mit Ansicht von ventral und (B) Sagittalschnitt mit Ansicht von dextral. Der Wirbelkörper besteht fast vollständig aus Spongiosa, welche nur von einem schmalen Kortikalissaum umschlossen wird. Maßstab 600 μm .

Das Knochengewebe unterliegt einem kontinuierlichen Prozess des Umbaus (Remodeling). Bei der Interaktion von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Saumzellen (Bone-Lining-Zellen) wird „alter“ mineralisierter Knochen abgebaut, durch neues Osteoid ersetzt und im Verlauf mineralisiert. Als dynamisches Organ passt sich der Knochen so an wechselnde biomechanische Kräfte an, behebt kleine Risse sowie Mikrofrakturen und erhält die Mineralhomöostase (Clarke, 2008; Hadjidakis und Androulakis, 2006). Der Zyklus des Remodelings beginnt in der Initiationsphase mit der Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten zur Resorption des Knochens. Das Areal des „alten“ Knochens wird dabei zufällig oder speziell bei dem Auftreten von Mikroverletzungen und bei der Apoptose von Osteozyten ausgewählt und abgebaut (Clarke, 2008). Daraufhin wird in der Transitionsphase durch die Sekretion verschiedener Signalmoleküle von Osteozyten und Bone-Lining-Zellen die folgende dritte Phase, die Knochenformation durch Osteoblasten, koordiniert und abgestimmt. Die Regulation des Knochenstoffwechsels erfolgt mithilfe von mechanischen und biochemischen Signalen. Mechanische Stimuli komprimieren oder dehnen die Knochenmatrix. Die verursachten Scherkräfte, die auf die extrazelluläre Flüssigkeit und die Osteozyten in ihren Kanalikuli einwirken, ermöglichen die Mechanotransduktion. Beispielsweise (bspw.) werden bei erhöhter mechanischer Belastung des Knochenareals anabole Signalmoleküle wie insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Prostaglandine oder Stickstoffoxid (NO) von

Osteozyten freigesetzt, welche die Aktivität der Osteoblasten fördern. Im Gegensatz dazu wird die Knochenformation bei verminderter mechanischer Belastung aufgrund der Sekretion von Sclerostin inhibiert und die Osteoklastogenese begünstigt (Florencio-Silva et al., 2015). Um die funktionelle und strukturelle Integrität des Knochens zu erhalten, sind fein abgestimmte Zellantworten nötig (Plotkin und Stains, 2015). Die biochemische Regulation des Knochenstoffwechsels wird entweder lokal durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, bone morphogenic proteins (BMP) sowie weitere lösliche Faktoren oder mithilfe von systemischen Botenstoffen vermittelt. Systemisch nehmen Parathormon (PTH), Vitamin-D₃, Schilddrüsenhormone und Steroidhormone (Glukokortikoide, Östrogene, Androgene) Einfluss auf den Metabolismus des Knochens (Hadjidakis und Androulakis, 2006).

Im klinischen Alltag erfolgt die Einschätzung des Knochenstatus routinemäßig über die Bestimmung der bone mineral density (BMD) mittels dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Ab dem Absinken der BMD unter einen T-Score von $\leq -2,5$ Standardabweichungen (SD), der im Vergleich zum Mittelwert des Referenzkollektivs gleichen Geschlechts im Alter von 20-29 Jahren bestimmt wird, kann die Diagnose Osteoporose gestellt werden (Kanis, 1994). Die Osteodensitometrie wird hierbei zur Beurteilung des Frakturrisikos und zur Indikationsprüfung und Verlaufsbeobachtung einer medikamentösen Therapie herangezogen. Die Ergebnisse müssen jedoch immer im Kontext mit Anamnese, klinischer und paraklinischer Untersuchung und gegebenenfalls Röntgendiagnostik beurteilt werden (Dachverband Osteologie e.V., 2018). Die Definition der Osteoporose anhand des T-Scores allein gewährleistet nicht die präzise Abschätzung des Frakturrisikos (Fonseca et al., 2014). In einer Multicenter-Studie zum Thema Zusammenhang zwischen Ergebnis der BMD-Messung und vorherrschendem Frakturrisiko, bei der 9704 Frauen in einem Alter über 64 Jahren eingeschlossen wurden, waren lediglich $< 10-44$ % typischer osteoporotischer Frakturen mit einem T-Score von $\leq -2,5$ SD assoziiert (Stone et al., 2003). Neben der densitometrischen Beschaffenheit beeinflussen morphologische und strukturelle Charakteristika des Knochens die biomechanische Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit gegen Krafteinwirkung. Die morphologischen Eigenschaften werden durch Geometrie und Architektur von kortikalem und trabekulärem Knochen beschrieben. Strukturelle Besonderheiten ergründen sich aus der Beschaffenheit, der Qualität und Quantität, von organischer und anorganischer Knochenmatrix (Bouxsein, 2003). Der Knochen als dynamisches Modell

passt die azelluläre Matrix, die letztlich die biomechanische Funktion des Knochens ausmacht, stetig an die ihn umgebenden Faktoren und Belastungen an. Der zellulären Komponente obliegt es, das Knochenremodeling an die einwirkenden hormonellen und mechanischen Einflüsse, wie Zug- und Druckkräfte, anzugleichen. Als Dirigent fungiert der Osteozyt, der über seine zahlreichen Dendriten mit den umliegenden Osteozyten und den Effektorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten, kommuniziert und die Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix sowie die Knochenresorption moduliert. Dem Aufbau und der Verbindung der Neurone des zentralen Nervensystems ähnelnd, bilden die Osteozyten ein gut organisiertes und dichtes Netzwerk, welches durch Fehlregulation bei der Pathogenese von Krankheiten mitwirken kann (Kerschnitzki et al., 2013).

1.2 Osteoblasten

Die für die Knochenformation bekannten Osteoblasten bilden ca. vier bis sechs Prozent der im Knochen vorkommenden Zellen. Nach der Differenzierung aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) wachsen die Osteoblasten über die Zwischenstufe der Osteoprogenitorzellen heran, welche BMP und Proteine des Wnt-Signalwegs bilden. Durch die für Osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktoren runt-related transcription factor 2 (Runx2), distal-less homeobox 5 und Osterix entwickeln sich Präosteoblasten, welche vorwiegend eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) aufweisen. Die Differenzierung zu reifen Osteoblasten geschieht unter dem Einfluss von Runx2 und Osterix und hat die Expression von Proteinen, wie bspw. Collagen, Osteocalcin und Bone-Sialoprotein, für die Synthese organischer Knochenmatrix zur Folge (Florencio-Silva et al., 2015).

Morphologisch sind Osteoblasten als kubische, an der Knochenoberfläche anliegende Zellen charakterisiert (Abb. 2A), die für ihre Funktion der Proteinbiosynthese zur Knochenformation reich an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER), sekretorischen Vesikeln und mit einem deutlich auszumachenden Golgi-Apparat ausgestattet sind. Osteoblasten sind polarisierte Zellen, welche nach apikal hin Matrixvesikel von ihrer Zellmembran abschnüren, die nachfolgend zur Mineralisierung dienen. Im Zellverband mit benachbarten Osteoblasten, Bone-Lining-Zellen und Knochenmarkszellen werden Tight-Junctions und Cadherine zur Zell-Zell-Adhäsion, Integrine zur Zell-Matrix-Adhäsion und Gap-Junctions zur Zell-Zell-Kommunikation genutzt (Bellido et al., 2014). Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation wird durch Connexine, Hemikänäle und

Pannexine ermöglicht. Connexine sind hexamer geformte Transmembranproteine, die als Hemikanal (Connexon) mit der Umgebung oder in Kombination mit einem Connexon der Nachbarzelle (Gap-Junction) kommunizieren und kleine Moleküle, Ionen oder Second Messenger austauschen. Das am häufigsten im Knochen vorkommende Connexin43 (Cx43) ist im *gap-junction alpha 1 (GJA1)*-Gen codiert und wird im Knochen von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten exprimiert (Plotkin, 2014).

Die Hauptaufgabe der Osteoblasten ist die Synthese neuer Knochenmatrix, bestehend aus der Bildung von Osteoid und dessen anschließender Mineralisierung. Zu Beginn werden die Proteine für die organische Matrix, Collagen Typ 1, 3 und 5 sowie non-collagene Proteine, synthetisiert und sezerniert. Diese noch nicht mineralisierte Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet und kann histologisch mithilfe der Kossa-van-Gieson-Färbung untersucht werden. Die Mineralisierung des Knochens gelingt durch die in Matrixvesikeln ausfallenden Calcium-(Ca^{2+}) und Phosphat-(PO_4^{3-})-Ionen. An der extrazellulären Membran der Osteoblasten und Matrixvesikel befindet sich die ALP (Abb. 2B), die Phosphoester, wie anorganisches Pyrophosphat, in PO_4^{3-} -Monomere hydrolysiert und mithilfe des Natrium-Phosphat-Cotransporters-III in die Matrixvesikel aufnimmt. Zusätzlich katalysiert die Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase-1 die Zersetzung von Phosphocholinen der inneren Plasmamembran der Matrixvesikel in Cholin und Phosphat. Die Bereitstellung von PO_4^{3-} -Ionen ist dabei auch von der ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP-1) und dem Transmembrankanal ankylosis abhängig. ENPP-1 katalysiert die Entstehung von anorganischem Pyrophosphat, welches durch den Transmembrankanal ankylosis nach extrazellulär gelangt. Durch die Bindung von wachsenden Hydroxylapatitkristallen inhibiert Pyrophosphat die Mineralisierung. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch die Ca^{2+} -Transport-ATPase ins Innere der Matrixvesikel wird durch die sauren Phospholipide der Plasmamembran erleichtert, die eine hohe Calciumaffinität aufweisen (Hasegawa, 2018). Bei Übersteigen des Löslichkeitsprodukts von Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen fällt Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) in den Matrixvesikeln aus, und es kommt zur Formung von Kristallen. Der entstandene Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) wächst radiär, bis die Kristalle die Plasmamembran der Matrixvesikel penetrieren und platziert sich als kalzifiziertes Knötchen an den Collagenfibrillen. Calcium-bindende Proteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Bone-Sialoprotein regulieren die Ablagerung von Mineral und

kontrollieren das Wachstum der kalzifizierten Knötchen (Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015).

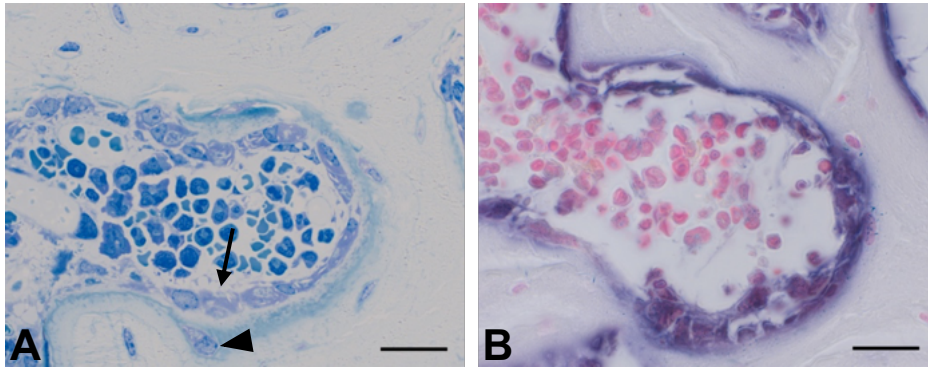


Abb. 2: Morphologie und Aktivität der Osteoblasten.

(A) Toluidinblaufärbung der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers L4 einer $\alpha 9$ KO-Maus. Der Zellverband von kuboidal geformten Osteoblasten (Pfeil) ist für die Synthese von Osteoid und die anschließende Mineralisierung verantwortlich. Ein frisch eingemauerter Osteozyt ist noch reich an zytoplasmatischen Zellorganellen (Pfeilkopf). (B) Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers L3 einer $\alpha 10$ KO-Maus. Enzymhistochemisch erfolgte der Nachweis der in Osteoblasten und vorwiegend in Matrixvesikeln vorkommenden ALP anhand von dunkelvioletten Signalen. Maßstab 20 μ m. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

Neben der Synthese und Sekretion von Matrixproteinen bilden Osteoblasten zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine und Rezeptoren für Hormone und Adhäsionsproteine. Zudem werden die Osteoklasten-beeinflussenden Faktoren macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), rezeptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) von Osteoblasten ausgeschüttet. Ein für Osteoblasten wichtiger Wachstumsfaktor ist das Wnt-Protein, welches seinen Namen durch die Entdeckung des *Wingless*-Gens in Fliegen und des *Int-1*-Gens in Organismen von Mäusen, zusammengefasst Wnt, erhielt. Die Bindung von Wnt-Proteinen an low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRP) 5/6-Rezeptoren und frizzled-protein-Rezeptoren aktiviert den kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg, welcher die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten sowie Osteozyten vermittelt und die Knochenformation steigert (Plotkin und Bivi, 2014). Bei Ligandenbindung wird β -Catenin stabilisiert, welches daraufhin in den Zellkern transloziert und die Gentranskription zur osteogenen Differenzierung von MSC und die Heranreifung von Osteoblasten initiiert. Zusätzlich wird die Expression von OPG und Cx43 erhöht sowie

die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten gehemmt (Baron und Kneissel, 2013; Bellido et al., 2014).

Nach Beendigung der Knochenformation gehen 60–80 % der Osteoblasten den Weg des programmierten Zelltodes. Der verbleibende Rest differenziert sich zu Osteozyten oder entwickelt sich zu Bone-Lining-Zellen, welche sich in ihrer Zellform abflachen und die inaktive Knochenoberfläche bedecken. Bone-Lining-Zellen besitzen die Regenerationsfähigkeit, sich durch die Stimulation von PTH wieder zu aktiven Osteoblasten zu entwickeln. Vorrangig üben Bone-Lining-Zellen regulatorische Funktionen aus, die den Prozess des Remodelings, den Calciumaustausch und die Kommunikation zu Osteozyten via Gap-Junctions einschließen (Bellido et al., 2014).

1.3 Osteozyten

90 % der Population der Knochenzellen besteht aus Osteozyten. Nach der Differenzierung aus Osteoblasten überleben Osteozyten Jahre bis Jahrzehnte und erfüllen regulatorische Eigenschaften des Knochenremodelings sowie der Homöostase der Mineralisierung. Morphologisch sind Osteozyten im trabekulären Knochen eher von rundlicher Form, im kortikalen Knochen eher spindelförmig. Die Differenzierung der Osteozyten ist in verschiedene Stadien gegliedert. Vom Osteoid-Osteozyten über den Präosteozyten entwickeln sich junge Osteozyten, welche später zu in mineralisierte Knochenmatrix eingebetteten reifen Osteozyten heranwachsen. Charakteristisch für diesen Prozess ist die Änderung des Phänotyps zu einer weniger kubischen Zellform und einem reduzierten Anteil an Zellorganellen, wie bspw. rER und Golgi-Apparat (Abb. 3) (Florencio-Silva et al., 2015).

In mineralisierter Knochenmatrix eingemauert, gehen vom in der Lakune liegenden Zellkörper des Osteozyten zahlreiche Fortsätze aus, welche sich in den Kanalikuli zu benachbarten Zellen, Blutgefäßen bis hin zu endokortikalen und periostalen Oberflächen erstrecken. Die Vernetzung der Zellen in diesem lakunokanalikulären System (LKS) ermöglicht die Kommunikation einerseits zwischen Osteozyten selbst, die an ihren Fortsätzen durch Cx43-gebildete Gap-Junctions metabolisch und elektrisch miteinander verbunden sind. Andererseits wird die Kommunikation mit Zellen an der Knochenoberfläche und im Knochenmarksraum durch den Transport von Proteinen und kleineren Signalmolekülen, wie Prostaglandin E_2 und I_2 (PGE_2 , PGI_2), NO,

Adenosintriphosphat (ATP) und Ca^{2+} im LKS gefördert. Die im LKS verlaufenden Gefäße sichern darüber hinaus den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Der die Osteozyten und ihre Fortsätze umgebende perizelluläre Raum bis hin zur mineralisierten Knochenmatrix wird von einer interstitiellen Flüssigkeit umspült, welche durch mechanische Belastung und Kraftveränderung auf die Zellen einwirkt (Chen et al., 2015). Dem Osteozyten kommt dabei die wichtige Rolle des Mechanosensors zu, das Remodeling an die einwirkenden mechanischen Kräfte abzustimmen. Mit der Umwandlung von mechanischen in chemische Signale geht ein noch nicht vollständig erforschter Prozess vonstatten, welcher eine Schlüsselrolle in der Knochenphysiologie und -pathophysiologie einnimmt.

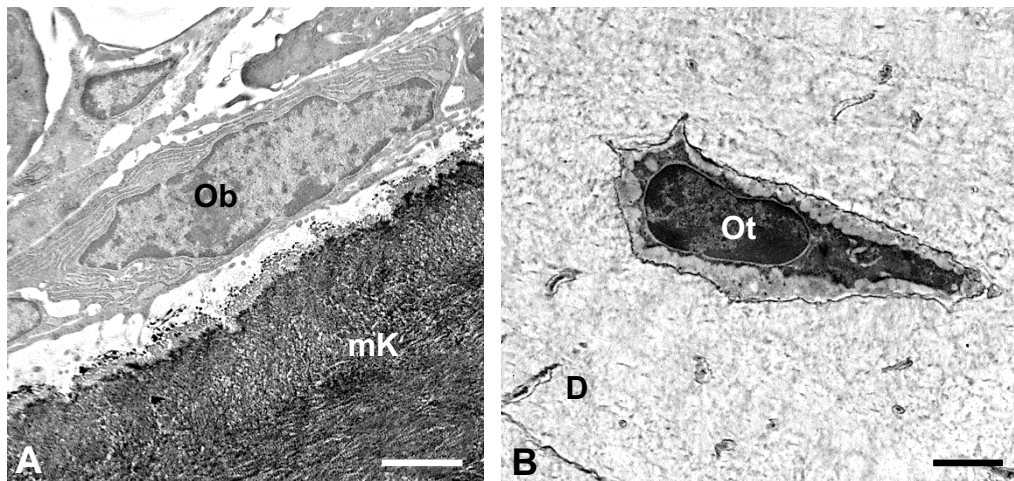


Abb. 3: Ultrastruktur von Osteoblast und Osteozyt.

Transmissionselektronenmikroskopische Bilder der Spongiosa des vierten Lendenwirbelkörpers einer $\alpha 9\text{KO}$ -Maus. (A) Osteoblasten (Ob) sind reich an Zellorganellen und liegen der Knochenmatrix direkt an. (B) Ein reifer Osteozyt (Ot) liegt in einer Lakune, tief eingemauert in der mineralisierten Knochenmatrix (mK). Teilweise sind Anschnitte der Ausläufer der Osteozyten (Dendriten, D) zu sehen. Maßstab 2 μm .

Der Phänotyp des Osteozyten ist durch die Expression von Proteinen charakterisiert, die für seine Morphologie sowie seine Funktionen im Prozess der Mineralisierung und der Regulation von Knochenaufbau und -abbau verantwortlich sind. Für die Bildung von Dendriten und Kanalikuli werden die membranassoziierten Proteine E11/PDPN/GP38 und Matrixmetalloprotease (MMP) 14 exprimiert (Bellido et al., 2014). Die Adhäsion der Osteozyten an die Lakunenwand wird durch Halteelemente aus Proteoglykanen, CD44 und Lamininen erreicht (Goggin et al., 2016). Die Kontrolle der Mineralisierung und des Phosphathaushaltes wird durch erhöhte Expression von Osteocalcin, DMP-1, phosphate-

regulating neutral endopeptidase (PEX), und fibroblast growth factor-23 (FGF-23) vermittelt.

Während PEX und DMP-1 die Matrixmineralisierung stimulieren, übt FGF-23 einen inhibitorischen Effekt auf die Mineralisierung und die Phosphatresorption in der Niere aus. Im Gegensatz zu Osteoblasten exprimieren Osteozyten nur geringe Mengen an ALP und Collagen Typ 1 für den Aufbau der Knochenmatrix. Der Osteozyt als Hauptquelle für OPG, RANKL, Sclerostin und Dickkopfpotein-1 (Dkk-1) hat vorrangig eine Kontrollfunktion, um das Ausmaß von Knochenresorption und -formation zu regeln. Die erhöhte Expression von RANKL in Osteoblasten und Osteozyten fördert die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten. Demgegenüber kann durch die gesteigerte Synthese von OPG die Osteoklastogenese und die Aktivität der Osteoklasten vermindert werden (Baron, 2000; Bellido et al., 2014). Die Osteozyten-spezifischen Proteine Sclerostin und Dkk-1 wirken durch die Inhibition der Knochenformation katabol. Sclerostin als Antagonist an LRP 5/6-Rezeptoren auf Osteoblasten und Bone-Lining-Zellen hemmt die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade und nachfolgend die Aktivität der Osteoblasten (Li et al., 2005). Des Weiteren ist Sclerostin in der Lage, BMP zu antagonisieren, wodurch der anregende Effekt von BMP auf die Knochenformation und Expression von ALP unterbleibt (Robling et al., 2008).

Sclerostin ist ein Glykoprotein, dessen Transkript im Gen *SOST* verschlüsselt ist. Es wird vorwiegend von reifen Osteozyten exprimiert, welche tief in der mineralisierten Knochenmatrix eingebettet sind. Ursprünglich wurden *SOST*-Mutationen in den Knochenerkrankungen der Van-Buchem-Krankheit oder der Sclerostose entdeckt (Balemans et al., 2002; Brunkow et al., 2001). Charakteristisch für diese Krankheiten ist das starke Knochenwachstum der Mandibula und des Schädelknochens mit der Folge neuroforaminaler Einengungen. Neben der negativen Regulation des Knochenaufbaus spielt Sclerostin eine Rolle bei der Transformation von mechanischen in biochemische Signale. In Knochenregionen, die einer erhöhten mechanischen Belastung ausgesetzt waren, wurde eine geringere Anzahl an Sclerostin-positiven Osteozyten gefunden. Demgegenüber besaßen wenig mechanisch beanspruchte Areale eine größere Anzahl an Sclerostin-positiven Osteozyten (Delgado-Calle et al., 2017; Robling et al., 2008; Sawakami et al., 2006).

Gründe für die Apoptose von Osteozyten sind neben Alterungsprozessen und der Postmenopause mit Östrogenentzug, eine langfristige Therapie mit Glukokortikoiden. Auch die fehlende Belastung des Knochens und pathologische Verhältnisse wie Mikrofrakturen oder eine Veränderung von Cx43 können den programmierten Zelltod der Osteozyten auslösen. Hierbei werden ATP-vermittelt Makrophagen und Monozyten rekrutiert, die Osteoklastogenese mittels vermehrter Sekretion von RANKL gefördert und Osteoklasten zur Resorption angeregt (Buckley et al., 2002; Gallagher, 2004; Komori, 2016).

1.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, welche ihren Ursprung in mononukleären Zellen der hämatopoetischen Stammzellreihe haben und die Eigenschaft der Knochenresorption ausüben (Abb. 4A). Die Zytokine M-CSF und RANKL tragen maßgeblich zur Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten, der Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen und der Initiierung der Knochenresorption durch reife Osteoklasten bei. RANKL, welcher von Osteoblasten, Osteozyten, Stromazellen und aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird, bindet den zugehörigen Rezeptor RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen. Die resultierende Signalkaskade aktiviert die Transkriptionsfaktoren nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), nuclear factor of activated T-cells 1 (NFATc1) und c-Fos sowie viele weitere Faktoren, welche die Expression von osteoklastogenen Markermolekülen wie der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) (Abb. 4B) und CathepsinK (CtsK) erhöhen. Gegenspieler des RANK/RANKL-Systems ist OPG, welches zum Großteil von Osteozyten, jedoch auch von Osteoblasten, Stromazellen und Fibroblasten ausgeschüttet wird (Baron, 2000). Die Ähnlichkeit der N-terminalen Region von OPG und RANK verhilft OPG zur Bindung von RANKL, sodass die Interaktion von RANK/RANKL verhindert und die Osteoklastogenese gehemmt wird. Der Einfluss von Vitamin-D₃, PTH und pro-inflammatorischen Zytokinen wie tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-11 begünstigt die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten über die Stimulation der RANKL-Synthese in Osteoblasten und Osteozyten. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, Interferon (IFN)- α , und IFN- β sowie β -Catenin hingegen hemmen die Osteoklastogenese (Amarasekara et al., 2018; Bellido et al., 2014).

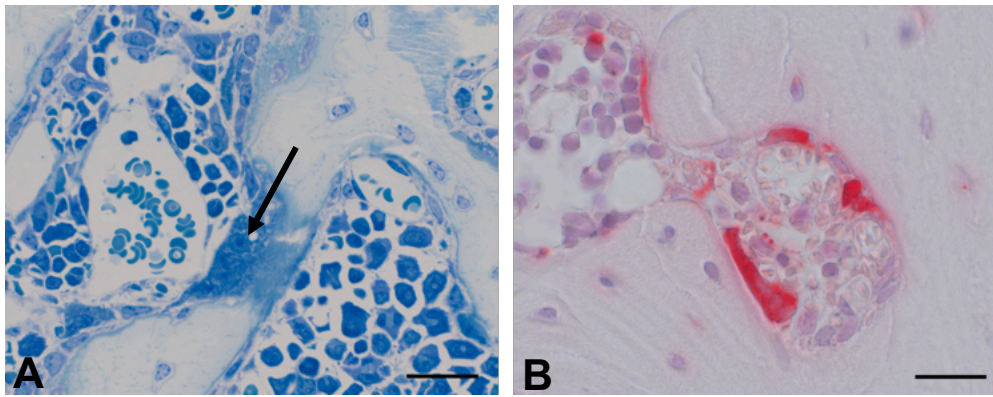


Abb. 4: Morphologie und Aktivität der Osteoklasten.

(A) Toluidinblaufärbung der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers L4 einer $\alpha 9$ KO-Maus. Eine mehrkernige Zelle, vermutlich ein aktiver Osteoklast, liegt der Knochenoberfläche direkt an und verschmälert die Trabekeldicke (Pfeil). (B) Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers L3 einer $\alpha 10$ KO-Maus. Enzymhistochemisch werden TRAP-positive Osteoklasten, gekennzeichnet an der roten Färbung, nachgewiesen. Maßstab 20 μ m.

Nachdem die Osteoklastenvorläuferzellen durch Zytokine, MMP und den vorherrschenden Calciumgradienten an die zu resorbierende Knochenoberfläche rekrutiert wurden, proliferieren und differenzieren sie sich durch M-CSF und RANKL zu reifen, mehrkernigen Osteoklasten. Einhergehend mit der Polarisierung der Zelle und der Reorganisation des Zytoskeletts wird die Adhäsion des Osteoklasten an die Knochenmatrix erreicht und die Resorptionslakune mit einer Versiegelungszone aus ringförmig angeordneten Aktinfilamenten von der umgebenden Knochenmatrix abgegrenzt (Bellido et al., 2014). Die Knochenresorption besteht aus der Entkalkung anorganischer Matrix und der Proteolyse organischer Matrix. Die der Resorptionslakune zugewandten Membran des Osteoklasten, der Faltensaum (Ruffled Border), nutzt zahlreiche Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung, über die hydrolytische Enzyme wie TRAP, CtsK und MMP in die sogenannte Howshiplakune transportiert werden (Abb. 5). Zusätzlich befinden sich in der Ruffled Border vakuolen-ähnliche H^+ -ATPasen, welche für das saure Milieu der Resorptionslakune sorgen und die Dekalzifikation der Hydroxylapatitkristalle erleichtern. Anschließend wird die freiliegende organische Matrix durch CtsK und MMP-14 enzymatisch degradiert. Die Bereiche des Osteoklasten, welche nicht mit der Knochenmatrix in Kontakt stehen, werden als basolaterale und funktional sekretorische Domäne bezeichnet. Die über Endozytose aufgenommenen degradierten Proteine, wie bspw. fragmentierte Collagenfibrillen, werden daraufhin über den funktional sekretorischen Teil per Transzytose aus dem Osteoklasten ausgeschleust

(Arana-Chavez und Bradaschia-Correa, 2009; Florencio-Silva et al., 2015; Mulari et al., 2003). Nach Abschluss der Knochenresorption gehen Osteoklasten in Apoptose. Initiiert wird dieser Prozess durch einen erhöhten extrazellulären Calciumgehalt, den Verlust der Integrin-vermittelten Adhäsion an der Knochenmatrix und ein niedriges Level an anti-apoptotischen Zytokinen wie M-CSF, RANKL, TNF α und IL-1 (Bellido et al., 2014).

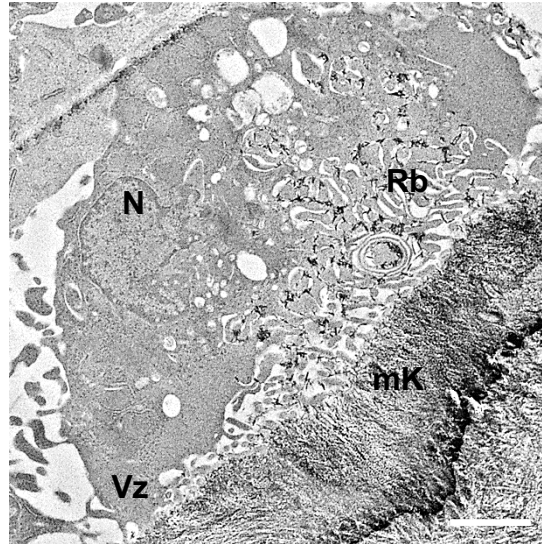


Abb. 5: Ultrastruktur eines Osteoklasten.

Transmissionselektronenmikroskopisches Bild der Spongiosa des vierten Lendenwirbelkörpers einer α 10KO-Maus. Eine polarisierte, mehrkernige Riesenzelle hat das Areal der Knochenresorption über eine Versiegelungszone (Vz) definiert. Die Oberflächenvergrößerung der Zellmembran (Ruffled Border, Rb) erlaubt die intensive Freisetzung von Degradierungsenzymen zum Abbau der Knochenmatrix. mK= mineralisierte Knochenmatrix, N= Nucleus. Maßstab 2 μ m.

Die Cysteinproteinase CtsK spielt im sauren Milieu der Resorptionslakune eine bedeutende Rolle in der Verdauung extrazellulärer Matrix. Ähnlich der Lokalisation von CtsK befindet sich die Metallophosphoesterase TRAP an der Ruffled Border und in Lysosomen. TRAP5b ist die aktive Isoform, welche spezifisch für Osteoklasten ist, wohingegen TRAP5a auch in Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommt. Im Gegensatz zu CtsK wird TRAP als Propeptid in die Resorptionslakune sezerniert und erst dort durch CtsK aktiviert (Ljusberg et al., 2005). Durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gelingt TRAP die Degradierung der Knochenmatrix (Bull et al., 2002). Zudem katalysiert TRAP die Hydrolyse von Phosphomonoestern, wie bspw. Osteopontin, welches als non-collagenes Protein der organischen Knochenmatrix der Adhäsion von Osteoklasten an die Knochenmatrix dient. Wird Osteopontin und Bone-

Sialoprotein durch TRAP dephosphoryliert, führt dies zur verminderten Anheftung der Osteoklasten und zur erleichterten Migration (Ek-Rylander und Andersson, 2010).

1.5 Acetylcholin und das cholinerge System

Mit seiner Funktion als Neurotransmitter wurde Acetylcholin (ACh) erstmals 1921 durch Otto Loewi beschrieben, nachdem Henry Dale im Jahr 1914 ACh als solches identifiziert hatte (Dale, 1914; Loewi, 1922). Der von Loewi eingeführte Begriff „Vagusstoff“ wurde vom Effekt dieses Überträgerstoffs auf die Verlangsamung der Herzfrequenz von Froschherzen abgeleitet. Das neuronale cholinerge System als Teil des autonomen Nervensystems nutzt ACh bei der synaptischen Signaltransduktion an prä- und postganglionären parasympathischen und präganglionären sympathischen Neuronen. Omnipräsent wird ACh als Überträgerstoff zwischen Neuronen, Interneuronen und Ganglienzellen im zentralen Nervensystem und bei der Neurotransmission an der muskulären Endplatte verwendet (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Phylogenetisch betrachtet, wird fern des Vorhandenseins des Nervensystems das Vorkommen von ACh in evolutionären Prozessen seit ca. drei Billionen Jahren geschätzt. Bereits Prokaryonten, wie Bakterien, und Eukaryonten, wie Protozoen, Pilze und Pflanzen, beinhalten diesen Transmitter. Dass ACh auch in non-neuronalen Geweben an der Regulation basaler Zellfunktionen beteiligt ist, wurde jedoch erstmals im Jahr 1963 durch Whittaker postuliert (Horiuchi et al., 2003; Wessler et al., 1999; Whittaker, 1963). Als in den darauffolgenden Jahrzehnten die fast ubiquitäre Synthese von ACh und die Expression von Acetylcholinrezeptoren (AChR) in Zellen von Säugetieren nachgewiesen wurde, wurde in Abgrenzung zur Funktion von ACh bei der chemischen Neurotransmission die Beschreibung universeller „Zytotransmitter“ geprägt (Grando, 1997). Außerhalb des Nervensystems wurde die Präsenz der Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems unter anderem (u. a.) in murinen embryonalen Zellen und in den folgenden humanen Zellen dokumentiert: Epithelzellen des Respirations- und Urogenitaltrakts, der Haut, der Plazenta, des Drüsengewebes, Endothel- und Mesothelzellen, Immunzellen und mesenchymalen Zellen (Adipozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Osteoblasten, Chondrozyten) (Beckmann und Lips, 2013; Wessler und Kirkpatrick, 2008).

Zu den Komponenten des cholinergen Systems in non-neuronalen Zellen zählen Proteine für die Synthese, Sekretion und den Abbau von ACh, sowie die Expression von AChR.

In Zellen des zentralen Nervensystems und des non-neuronalen cholinergen Systems wird ACh durch die Cholinacetyltransferase aus Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert. Eine Ausnahme bilden Skelettmuskel- und Urothelzellen, in denen ACh durch die Carnitinacetyltransferase synthetisiert wird (Horiuchi et al. 2003; Lips et al. 2007). Mithilfe von vesikulären Acetylcholintransportern (VACHT) wird in neuronalen Zellen ACh in Vesikeln gespeichert und über Exozytose freigesetzt, während in non-neuronalen Zellen organische Kationentransporter (OCT) und Cholintransporter-ähnliche (CTL)-Proteine für die überwiegend direkte Ausschüttung von ACh zuständig sind. Weiterhin wird das Mediatophor, ein Proteinkomplex aus Proteolipid-Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase, für den Transport von ACh über die Membran diskutiert (Beckmann und Lips, 2013). Die Wirkung von ACh an nAChR und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) wird durch die Acetylcholinesterase oder die weniger spezifische Butyrylcholinesterase limitiert, welche ACh hydrolytisch in Cholin und Acetat spalten. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Acetylcholinsynthese ist die Wiederaufnahme von Cholin nach intrazellulär, die im zentralen Nervensystem hauptsächlich über Cholintransporter, in peripheren Zellen auch über CTL-Proteine oder OCT funktioniert (Beckmann und Lips, 2013). Neben der Expression von Proteinen für Synthese, Freisetzung und Degradierung von ACh wurden in non-neuronalen Zellen ebenfalls verschiedene Rezeptorsubtypen und Signalwege nachgewiesen, wie sie auch in neuronalen Zellen vorkommen. Bereits 1997 wurde in Zellkulturversuchen mit humanen Epithelzellen der Haut oder des Respirationstrakts der auto- oder parakrine Effekt von ACh demonstriert. Bei der Applikation von Antagonisten der nAChR und mAChR änderte sich die Zellform von Keratinozyten und ihre Integrität zu Nachbarzellen (Grando, 1997). Die Signalvermittlung erfolgt über ligandengesteuerte Ionenkanäle oder Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren, welche intrazellulär verschiedenartige Second Messenger und Signalkaskaden modulieren und am Beispiel von Keratinozyten die Expression und Funktion von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen beeinflussten (Chernyavsky et al., 2007). Derweil reichen die Effekte des lokal wirkenden ACh von der Stimulation von Zellproliferation und Differenzierung, Kontrolle des Zytoskeletts, Adhäsion, Migration und Apoptose in Epithelzellen bis hin zur gesteigerten Genexpression von Collagen in Fibroblasten, zur Stimulation der Angiogenese und Hemmung der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen in Immunzellen (Wessler und Kirkpatrick, 2008).

1.6 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

AChR finden sich sowohl in neuronalen als auch in non-neuronalen Zellen in Form von muskarinischen oder nikotinischen Rezeptoren. Letztere gehören zur Familie der ligandengesteuerten Kationenkanäle, welche nach Binden des Liganden ACh den Influx von mono- oder divalenten Ionen in die Zelle zulassen. Die nAChR vom neuronalen Typ sind aus einer Kombination aus alpha- ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$) und beta- ($\beta 2$ - $\beta 4$) Untereinheiten in Form von Pentameren zusammengesetzt und sowohl in neuronalen als auch in non-neuronalen Geweben zu finden. Die Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ sind zudem in der Lage, Homopentamere zu formen. Die Untereinheit $\alpha 10$ bildet gemeinsam mit $\alpha 9$ ein α -Heteropentamer (Hurst et al., 2013). Rezeptoren bestehend aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ , und ϵ werden zum muskulären Typ gezählt und kommen lediglich an der motorischen Endplatte vor (Albuquerque et al., 2009). Die mAChR werden in fünf Subtypen (M_1R - M_5R) eingeteilt und zählen zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Bei der Bindung des Liganden ACh oder des namensgebenden Muskarins werden Signalkaskaden von Second Messengern ausgelöst, welche cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-, cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat)- oder Ca^{2+} -vermittelte Pfade beinhalten. Die Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen nikotinischen Untereinheiten bedingen die Unterschiede von Spezifität und Affinität für Liganden, Permeabilität für Kationen und die Kinetik des Kanals (Buisson und Bertrand, 1998). Die Expression des Rezeptorsubtyps hängt wesentlich vom Zelltyp, dem Status der Differenzierung, der Zellaktivität und dem die Zelle umgebenden Milieu ab (Grando et al., 2006). Darüber hinaus sind externe Einflüsse, wie bspw. Steroide in Form von Glukokortikoiden oder Östrogenen, an der Modifikation der Expression von AChR beteiligt (Carrasco-Serrano und Criado, 2004).

Die Ligandenbindung an einen nikotinischen Rezeptor führt zur Formationsänderung mit Bildung einer zentralen Pore und in der Folge zur Öffnung des Ionenkanals (Abb. 6). Die einströmenden Natrium- (Na^+) oder Ca^{2+} -Ionen wirken daraufhin direkt oder modulieren intrazelluläre Signalwege mit der Beteiligung von Phospholipase C (PLC), Proteinkinase A (PKA) und mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Eine Besonderheit der homomeren Rezeptoren aus $\alpha 7$ - oder $\alpha 9$ -Untereinheiten und des Heteropentamers $\alpha 9\alpha 10$ ist die hohe Calciumpermeabilität. Insbesondere bei Aktivierung des nAChR $\alpha 9\alpha 10$ kommt es zu einem umfangreichen Ca^{2+} -Influx, der

Second Messenger-Wege vermittelt oder Ca^{2+} -abhängige Kalium- (K^+) Kanäle öffnet (Fucile et al., 2006; Gahring und Rogers, 2006).

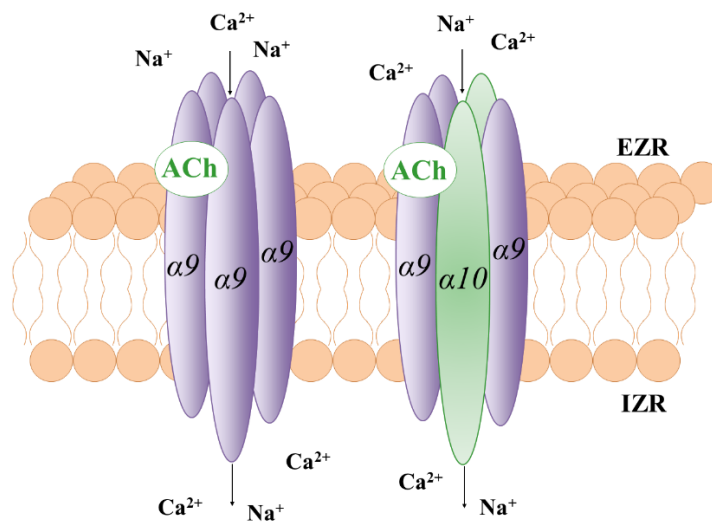


Abb. 6: Schemazeichnung der nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 9\alpha 10$.

Bindet Acetylcholin (ACh) an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR), der aus einem Homopentamer aus $\alpha 9$ -Untereinheiten oder einem Heteropentamer aus $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten aufgebaut ist, ändert sich die Formation des Rezeptors. Über die zentrale Pore des Kationenkanals strömen folglich Natrium (Na^+)- oder Calcium (Ca^{2+})-Ionen vom Extrazellularraum (EZR) in den Intrazellularraum (IZR). Schemazeichnung modifiziert nach Hurst et al., 2013.

In elektrophysiologischen Experimenten mit *Xenopus laevis*-Oozyten wurde nach der Injektion mit cDNA von humanen $\alpha 9$ - oder $\alpha 9\alpha 10$ -Untereinheiten des nAChR die durch ACh evozierte Stromstärke gemessen. Bei der Beimpfung von $\alpha 9$ -cDNA allein wurden funktionale homomere Ionenkanäle geformt, die jedoch eine sehr geringe Stromstärke nach Stimulation mit ACh aufwiesen. Wurden $\alpha 9$ und $\alpha 10$ koinjiziert, so war ein ca. hundertfacher Anstieg der Stromstärke zu beobachten (Sgard et al., 2002). Weiterhin wurden ACh und Methylcarbachol als Agonisten, Nikotin, Muskarin und Atropin als Antagonisten des nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 9\alpha 10$ identifiziert (Elgoyhen et al., 1994; Sgard et al., 2002; Verbitsky et al., 2000). Das Vorhandensein eines gemischt ionotropen und metabotropen Profils des $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptors kann durch die verschiedenen Stöchiometrien in $(\alpha 9)_3(\alpha 10)_2$ und $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ begründet sein. Versuche mit ACh und α -Conotoxin zeigten neben der bekannten Ligandenbindungsstelle zwischen $\alpha 9$ - $\alpha 10$ eine weitere Bindungsstelle zwischen $\alpha 9$ - $\alpha 9$ in $(\alpha 9)_3(\alpha 10)_2$ -Rezeptoren auf (Indurthi et al., 2014). Das Gift der Kegelschnecke, das α -Conotoxin, bindet selektiv an $\alpha 9$ und $\alpha 10$ nAChR und

wirkt inhibitorisch. Aktuell findet das α -Conotoxin-ähnliche Peptid RgIA4 Einsatz in Studien zur Therapie von neuropathischem Schmerz unter Oxaliplatin-haltiger Chemotherapie (Romero et al., 2017).

Mit der Identifikation der α 9-Untereinheit der nAChR im Jahr 1994 und der α 10-Untereinheit sieben Jahre später erforschten Elgoyhen und Mitarbeiter ihre Funktion im auditiven System (Elgoyhen et al., 2001, 1994). Besonders die Zusammensetzung von nAChR als α 9 α 10-Heteropentamer ist an der Vermittlung efferenter Reize von olivonukleären Fasern auf die äußeren Haarzellen des Corti-Organs beteiligt und spielt bei der Modulation und Desensitivierung der äußeren Haarzellen eine tragende Rolle (Elgoyhen et al., 2001). Darüber hinaus sind nAChR α 9 und α 9 α 10 in Spinalganglien von Ratten und im zentralen Nervensystem von Mäusen in verschiedensten Bereichen (frontaler und sensomotorischer Kortex, Di- und Mesencephalon, Hippocampus, Zerebellum, Medulla oblongata) lokalisiert worden (Lips et al., 2002; Lykhmus et al., 2017). In non-neuronalen Zellen wurde die Expression von α 9 und/oder α 9 α 10 in Keratinozyten (Chernyavsky et al., 2007; Grando et al., 2006), Trachealepithelzellen (Hollenhorst et al., 2012), Bronchialzellen (Chikova und Grando, 2011), in Epithelzellen der Brustdrüse (Lee et al., 2010), und in hämatopoetischen Stammzellen, Lymphozyten, Leukozyten, Monozyten und Makrophagen aufgezeigt (Bajayo et al., 2012; Hecker et al., 2015; Mandl et al., 2016; Peng et al., 2004). Sowohl in nativen MSC als auch in der Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten wurde das Vorhandensein der nAChR α 9 und α 10 nachgewiesen (Che et al., 2016; Luo et al., 1998; Zablotni et al., 2015).

1.7 nAChR und Knochen

Grundlegende biologische und physiologische Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung und Migration werden durch die Wirkung von ACh an nAChR und mAChR vermittelt (Wessler und Kirkpatrick, 2008). In Zellkulturversuchen mit murinen (MC3T3-E1) und humanen (SAOS-2) Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurden die notwendigen Enzyme und Transporter für die Synthese, Freisetzung und den Abbau von ACh sowie die Wiederaufnahme von Cholin nachgewiesen (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). Der Nachweis der Expression der Untereinheiten des AChR gelang in-vitro und in-vivo in Osteozyten-ähnlichen Zellen (Ma et al., 2014) und Osteoblasten-ähnlichen Zellen (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). Im Detail wurden in den humanen Osteoblasten-

ähnlichen Zellen die nAChR $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ gefunden, wohingegen in murinen Zellen die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$ nachzuweisen waren (En-Nosse et al., 2009). Interessanterweise beeinflusst ACh die Expression der Rezeptoruntereinheiten, welche sich im Verlauf der Differenzierung und des Knochenremodelings ändert (Che et al., 2016; Sato et al., 2010). Hohe Acetylcholinlevel während der Differenzierung stimulierten den Zellzyklus durch Hochregulierung von Cyclin D1 und führten zur Suppression der ALP-Aktivität in Osteoblasten-ähnlichen Zellen (Sato et al., 2010). Des Weiteren konnte durch die Applikation von ACh die Vitalität und Überlebensfähigkeit von Osteozyten-ähnlichen MLO-Y4-Zellen verbessert werden. Dabei wird eine Wirkung von ACh auf die Knochenformation über die veränderte Expression der Gegenspieler RANKL und OPG in Osteozyten vermutet (Ma et al., 2014).

Pluripotente MSC differenzieren sich zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten. Im Rahmen von traumatologischen Operationen wurden Bohrmehlproben von gesunden weiblichen und männlichen Patienten sowie von osteoporotischen Patientinnen gewonnen und molekularbiologisch auf die Expression von nAChR und mAChR untersucht. Native MSC und Adipozyten von weiblichen Patienten sowie Chondrozyten und Osteoblasten von beiden Geschlechtern exprimierten u. a. nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$. Interessanterweise zeigte sich in Osteoblasten gesunder Patientinnen eine erhöhte nAChR $\alpha 10$ Expression gegenüber Osteoblasten von osteoporotischen Spenderinnen (Zablotni et al., 2015).

Der Nachweis der Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in Knochenzellen und die durch ACh verursachte Modulation von Differenzierung, Migration und Apoptose (Bajayo et al., 2012; Sato et al., 2010; Wessler und Kirkpatrick, 2008) lässt auf eine nicht unbedeutende Rolle im Knochenremodeling schließen. Zahlreiche Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss einzelner Rezeptoruntereinheiten der AChR auf den Knochenmetabolismus. Die Deletion der $\alpha 2$ -Untereinheit der nAChR in Mäusen resultierte in einem reduzierten Knochenstatus mit Ähnlichkeiten eines osteoporotischen Phänotyps und erhöhten Parametern der Knochenresorption. Im Detail präsentierten nAChR $\alpha 2$ -defiziente Mäuse in der Computertomographie (CT) morphologisch ein erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen der distalen Femurmetaphyse und des dritten Lendenwirbelkörpers, histologisch eine Zunahme TRAP-positiver Osteoklasten und laborchemisch eine Erhöhung des C-terminalen Telopeptids des Collagen Typ 1 (Bajayo et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse waren an

mAChR M₃R KO-Mäusen zu erkennen. Neben der eingeschränkten Biegesteifigkeit des Femurs und der reduzierten mRNA-Expression von Collagen1 α 1 und 1 α 2 zeigte sich histologisch eine erniedrigte Anzahl an Osteoblasten und ein erhöhter Perimeter der am Knochen anliegenden Osteoklasten (Kliemann et al., 2012; Shi et al., 2010). Im Gegensatz zu diesen positiven Regulatoren der Knochenmasse, nAChR α 2 und mAChR M₃R, nimmt nAChR α 7 negativ Einfluss auf den Knochenstatus. Die Knochen von weiblichen nAChR α 7KO-Mäusen imponierten mit einer erhöhten Biegesteifigkeit und vergrößerter kortikaler Dicke, während der Knochenphänotyp von männlichen α 7KO-Tiere keine Veränderung biomechanischer, morphologischer und zellbiologischer Parameter aufwies (Kliemann et al., 2012). Auf molekularbiologischer Ebene wiesen weibliche α 7KO-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypen (WT) eine verminderte Genexpression des Osteoklasten-typischen Markers CtsK auf (Lips et al., 2015b). Im darauffolgenden Jahr publizierten Mandl und Mitarbeiter (2016) Ergebnisse von in-vivo Analysen der Tibia von α 7KO-Mäusen mit anschließenden in-vitro Experimenten zur Charakterisierung der Osteoklastenfunktion. Neben einer gesteigerten Knochenvolumenfraktion (BV/TV) und dem reduzierten Abstand zwischen den Trabekeln (Tb.Sp) zeigten die Proben der Tibia männlicher α 7KO-Mäuse reduzierte histomorphometrische Parameter für Osteoklasten (Mandl et al., 2016). In-vitro wurden Knochenmarkszellen von Femur und Tibia der 16 Wochen alten α 7KO- und α 7WT-Tieren kultiviert und Makrophagen mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastogenese stimuliert. Am Ende der Differenzierung war eine reduzierte Anzahl an Osteoklasten und TRAP-positiven Monozyten in den Kulturen der α 7KO-Tiere zu verzeichnen. Darüber hinaus wurde der Effekt von Agonisten und Antagonisten der nAChR auf die Osteoklastogenese untersucht. Die Stimulation von nAChR α 7 mit hohen Konzentrationen an Nikotin imponierte aufgrund der Hemmung der RANKL-assoziierten Aktivierung von c-Fos und NFATc1 mit negativen Effekten auf die Osteoklastogenese, wohingegen niedrige Konzentrationen sich leicht positiv auswirkten (Mandl et al., 2016).

Neben der lokalen Wirkung von ACh unterliegt der Knochenstoffwechsel auch einer zentralen Regulation. Der Einfluss des sympathischen und parasympathischen Nervensystems auf das Knochenremodeling stellt sich zweigeteilt dar: die adrenerge Aktivität des sympathischen Systems behindert die Knochenformation, während die cholinerge Aktivität des parasympathischen Systems die Knochenresorption hemmt (Eimar et al., 2013). Erste Hinweise einer cholinergen Innervation des Knochens durch

Nervenfasern des autonomen Nervensystems zeigten Versuche, bei denen durch Unterbinden des Nervus vagus unterhalb des Zwerchfells ein reduziertes Knochenvolumen der lumbalen Wirbelkörper beobachtet wurde (Tien et al., 2003). Bei der Denervierung des Periosts, welches durch Fasern des sympathischen Nervensystems innerviert wird, ließ sich eine mögliche Funktion bei der Knochenformation und Frakturheilung ableiten (Eimar et al., 2013). Die Aktivität des sympathischen Nervensystems wird zentral über Leptin und Serotonin moduliert. Das in Adipozyten produzierte Leptin wirkt an Neuronen von Raphekernen im Hirnstamm inhibitorisch auf die Synthese und Freisetzung von Serotonin. Normalerweise wirkt das im Gehirn gebildete Serotonin an Kernen des Hypothalamus und stimuliert über Htr1a- und Htr2b-Rezeptoren das Appetitverhalten sowie über Htr2c-Rezeptoren den Knochenmetabolismus. Eine durch Leptin gehemmte Freisetzung von Serotonin vermindert die Unterdrückung des sympathischen Tonus (Yadav et al., 2009). Letztlich wirkt Norepinephrin an adrenergen β 2-Rezeptoren auf Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen über die Erhöhung der RANKL-Expression positiv auf die Differenzierung der Osteoklasten und fördert die Knochenresorption (Elefteriou et al., 2005). Die Aktivität des Parasympathikus unterliegt ebenfalls einer zentralen Modulation, welche durch IL-1 vermittelt wird oder über vagale Nerven in die Peripherie gelangt. Bajayo und Mitarbeiter (2012) analysierten den Knochenstatus von Mäusen, deren zentrale IL-1-Ausschüttung durch die Überexpression von IL-1-Rezeptorantagonisten-(RA) unterdrückt wurde. Radiologisch zeigte sich im axialen Skelett und in den Extremitäten ein vermindertes trabekuläres Knochenvolumen. Die durch die Apoptose von Osteoklasten hervorgerufene Hemmung der Knochenresorption, welche der Funktion des Parasympathikus auf den Knochenstoffwechsel entspricht, wurde bei IL-1-RA-überexprimierten Mäusen unterbunden (Bajayo et al., 2012). Die cholinerge Regulation des Knochens, bei der sich ACh von vagalen Nerven indirekt auf Osteoblasten auswirkt, wurde von Mito et al. (2017) diskutiert. Die Bindung von ACh an nAChR α 7 auf Makrophagen führte zu einer Hemmung der Expression von TNF α . Bei α 7-Defizienz wäre bei Überwiegen des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α eine erhöhte RANKL-Expression mit demzufolge gesteigerter Knochenresorption zu erwarten. Das Femur der 8 Wochen alten α 7KO-Tiere präsentierte jedoch erhöhte Werte der BMD und BV/TV sowie erhöhte morphologische Parameter der Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekeldicke (Tb.Th) bei gleichzeitig erniedrigten Osteoklastenparametern in der Histomorphometrie (Mito et al., 2017). Im Serum der α 7KO-Tiere wurden erhöhte

OPG-Level parallel zu erniedrigten RANKL-Leveln gemessen. Eine zusätzlich durchgeführte Vagotomie an WT-Mäusen resultierte ebenfalls im Anstieg der OPG-Level, welches als Zeichen für die Hemmung der Osteoklastogenese gesehen werden kann. Letztlich wurde der inhibitorische Effekt von ACh und Nikotin auf die TNF α -Ausschüttung von Makrophagen als negativer Feedbackmechanismus zur Verhinderung eines übermäßigen Knochenverlusts im Rahmen einer Entzündungssituation gedeutet (Mito et al., 2017).

Der Einfluss von Nikotin auf Knochenzellen wurde in den vergangenen Jahren zum Gegenstand umfassender Forschung. Patienten mit langjähriger Raucheranamnese präsentierten einen beeinträchtigten Knochenstoffwechsel, eine höhere Inzidenz von Osteoporose und eine eingeschränkte Fraktur- und Wundheilung bis hin zum erhöhten Risiko der Entwicklung einer Pseudarthrose (Kallala et al., 2013). Eine Vielzahl an Studien mit humanen Proben oder Tiermodellen berichtet über einen dosisabhängigen Nikotineffekt auf den Knochenmetabolismus, der über nAChR auf die Knochenzellen vermittelt wird. Während geringen Konzentrationen an Nikotin stimulierende Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten nachgesagt werden, wirken höhere Nikotinkonzentrationen bei gesteigerter Differenzierung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen inhibierend auf die Knochenformation (Kallala et al., 2013; Kamer et al., 2006; Rothem et al., 2009; Walker et al., 2001).

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Bei in-vitro Versuchen mit humanen MSC wurde in Osteoblasten knochengesunder Patientinnen eine erhöhte Expression der $\alpha 10$ -Untereinheit der nAChR im Vergleich zu Osteoblasten osteoporotischer Patientinnen gefunden, wohingegen die Expression von nAChR $\alpha 9$ keiner Regulation unterlag. Die Zusammensetzung der nAChR aus $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten erfolgt als $\alpha 9$ -Homopentamer oder $\alpha 9\alpha 10$ -Heteropentamer. Um die Rolle der jeweiligen Untereinheit im Knochenremodeling genauer zu beleuchten, wurde der Knochenstatus im Mausmodell von $\alpha 9$ KO- oder $\alpha 10$ KO-Tieren im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT untersucht. Folgende Fragen werden in der vorliegenden Arbeit behandelt:

1. Gibt es Veränderungen der Biomechanik, Morphologie und Knochenmineralsalzdichte der Kortikalis der Femurdiaphyse der nAChR $\alpha 9$ KO- und nAChR $\alpha 10$ KO-Tiere?
2. Sind Unterschiede in der Morphologie und Knochenmineralsalzdichte der Spongiosa von Lendenwirbelkörper und Femurmetaphyse der nAChR $\alpha 9$ KO- und nAChR $\alpha 10$ KO-Tiere vorzufinden?
3. Haben nAChR $\alpha 9$ und/oder nAChR $\alpha 10$ Einfluss auf die Funktion und Aktivität von (a) Osteoklasten, (b) Osteoblasten und (c) Osteozyten des Knochens?

Die Analyse des Knochenstatus der jeweiligen KO-Tiere soll zur Charakterisierung der cholinergen Regulation des Knochenstoffwechsels beitragen. Die Untersuchung des einzelnen Proteins nAChR $\alpha 9$ oder $\alpha 10$ ermöglicht Aussagen über die Funktion und den Einfluss der jeweiligen Rezeptoruntereinheit auf die Stärke und Struktur des Knochens sowie die Physiologie der Knochenzellen. Aufgrund der Veränderung der Expression von nAChR $\alpha 10$ in MSC, welche osteogen differenziert wurden, kann eine cholinerge Regulation der Funktion der Osteoblasten und Osteozyten vermutet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die nAChR $\alpha 9$ KO-Mäuse (n = 8, 129S-*Chrna9*^{tm1Bedv/J}) und nAChR $\alpha 10$ KO-Mäuse (n = 8, 129S4-*Chrna10*^{tm1Bedv/Mmucd}) sowie ihre zugehörigen WT-Mäuse wurden nach Rücksprache mit der örtlichen Tierschutzbeauftragten in der Tierzucht der Justus-Liebig-Universität Gießen gemäß den Regularien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Die Brutpaare der KO-Stämme stammten von Douglas E. Vetter (Vetter et al., 2007, 1999). Die Tiere unterstanden einem 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Sie wurden per Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) genotypisiert.

2.2 Probeentnahme und Präparation

Nach erfolgter Registrierung der Tötungsanzeige (M_492, M_521) wurden die Mäuse im Alter von 16-20 Wochen durch Genickbruch getötet. Ihre Knochen wurden direkt im Anschluss von Bindegewebe, Muskeln und Sehnen freipräpariert und je nach anzuwendender Methode fixiert und aufbewahrt. Beide Humeri und der Wirbel Th10 wurden in RNA-Later (Ambion Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gegeben und bei -80 °C untergebracht. Das rechte Femur sowie die Wirbelkörper L1, L2 und L3 für die Mikro-Computertomographie (μ CT)-Untersuchung und die histologischen Färbungen wurden in 4 %-Phosphat-gepuffertem Paraformaldehyd (PFA, pH 7,4, Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Der Wirbelkörper L4 eines jeden Tieres wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Yellow Fix (siehe Kapitel 2.7) abgelegt. Das linke Femur wurde in einer feuchten Kompresse bei -20 °C bis zur biomechanischen Testung tiefgefroren.

2.3 Biomechanische Testung

Das linke Femur der Versuchstiere wurde im Drei-Punkt-Biegetest auf seine biomechanischen Eigenschaften, Biegesteifigkeit und Maximalkraft, geprüft. Nach der Entfernung des Weichteilgewebes vom Knochen wurde dieser bis zur Testdurchführung in einer NaCl-getränkten Kompresse bei -20 °C gelagert.

Vorbereitend wurde das Femur hüftkopfseitig mit I-Cem Adhesive Kleber (Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland) lotgerecht auf eine 8 mm breite Aluminiumhülse aufgebracht und unter einer UV-Polymerisationslampe (Exakt, Hamburg, Deutschland) ausgehärtet (Abb. 7A). Daraufhin wurde die Aluminiumhülse in die Schraubhalterung der Materialprüfmaschine Z 10 (Zwick, Ulm, Deutschland) gesteckt und die Femurkondylen auf der gegenüberliegenden, freibeweglichen Metallschiene abgelegt (Abb. 7B). Die horizontal ausgerichteten Proben wurden in einem definierten Abstand von 6,5 mm zu dem 20 N-Kraftaufnehmer (Zwick) platziert. In zwei Zyklen wurde mit einer Kraft von 4 N die korrekte Auflage der Kondylen kontrolliert. In einem dritten Zyklus wurde die Maximalkraft appliziert, bis das Femur frakturierte.

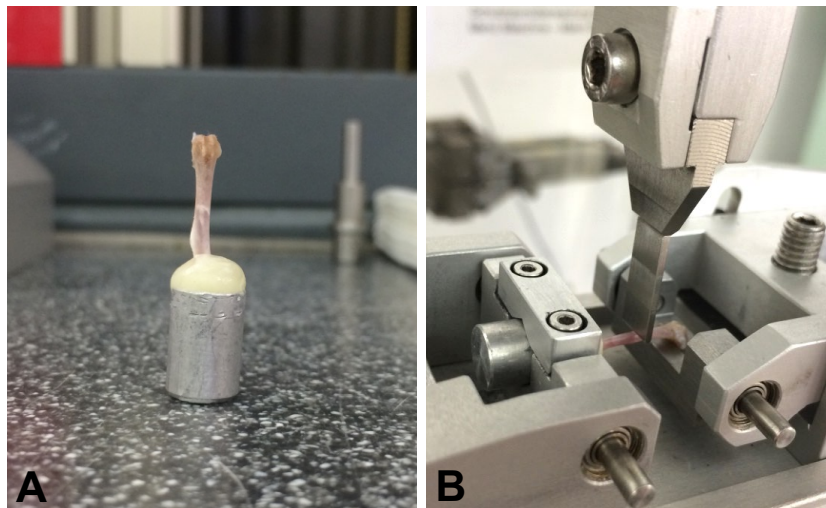


Abb. 7: Vorbereitung und Durchführung des Drei-Punkt-Biegetests.

(A) Das Femur wurde hüftkopfseitig mit Zahnzement auf einer Aluminiumhülse fixiert und (B) in der Materialprüfmaschine horizontal ausgerichtet. Der Kraftaufnehmer appliziert von vertikal Kraft auf die Femurdiaphyse.

Im Materialprüfprogramm testXpertII (Version 3.2, Zwick) wurden die Messdaten zusammengetragen und in einer Kraftverformungskurve veranschaulicht. In dem Diagramm (Abb. 8) wurde auf der x-Achse die Verformung in mm und auf der y-Achse die applizierte Kraft in N aufgetragen. Die Maximalkraft (F_{\max}), bei der das Femur frakturierte, wurde am Maximum des Graphen abgelesen. Die Steigung (S) des linearen Kurvenbereichs wurde durch Anlegen einer Steigungsgeraden ermittelt und ging neben der definierten Länge des Hebelarms (b) von 6,5 mm und der Stützweite (L) von 20 mm in die Berechnung der Biegesteifigkeit EI ein (Abb. 9) (Röntgen et al., 2010).

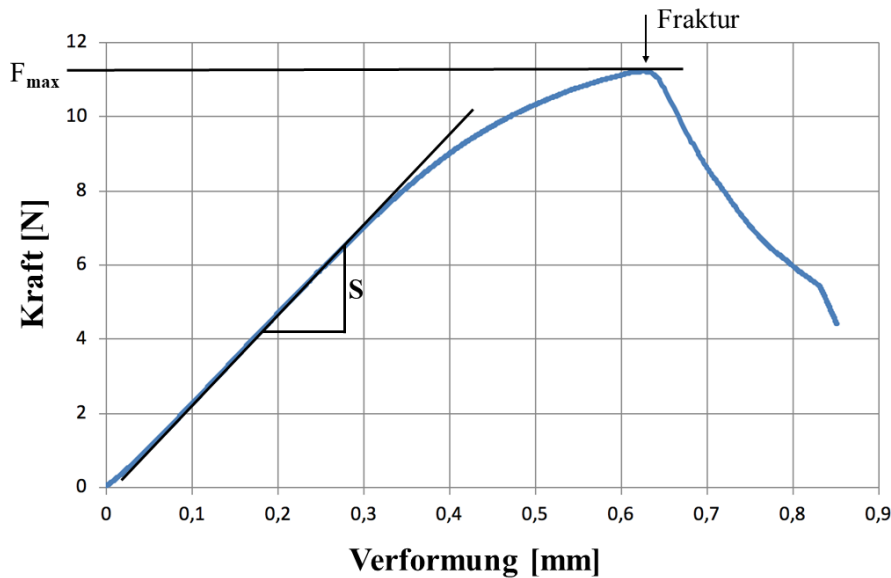


Abb. 8: Schematische Kraftverformungskurve.

Aus der Kraftverformungskurve wurden die biomechanischen Parameter Steigung (S) und Maximalkraft (F_{\max}) entnommen.

$$EI = \frac{S}{3L} a^2 b^2$$

Abb. 9: Berechnung der Biegesteifigkeit.

Die Biegesteifigkeit EI in Nmm^2 ermittelte sich aus der Steigung (S), der standardisierten Stützweite (L), der standardisierten Hebelarmlänge (b) und der Differenz aus Stützweite und Hebelarm (a).

2.4 Mikro-Computertomographie (μCT)

Mithilfe eines μCT -Scans können 3D-Rekonstruktionen kleiner Objekte, wie das Trabekelwerk eines Mausknöchens, mit einer Auflösung im einstelligen Mikrometerbereich erzielt werden. Besonderes Augenmerk wurde in dieser Untersuchung auf das Trabekelwerk der distalen Metaphyse des Femurs und des Lendenwirbelkörpers L1 sowie auf die Kortikalisbereiche des distaldiaphysären und mittlediaphysären Femurs gelegt. Die Methodik des μCT wurde gemäß den Empfehlungen “Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.” durchgeführt (Bouxsein et al., 2010).

Bildakquisition und Bildrekonstruktion

Die vom Weichteilgewebe befreiten Knochen, rechter Femur und Wirbelkörper L1, wurden mit den aneinander fixierten Kalibrierungsphantomen einer definierten Calciumhydroxylapatitdichte von 250 mg/cm^3 und 750 mg/cm^3 in einem Trinkstrohalm vertikal aufgereiht, mit 4 % Phosphat-gepuffertem PFA (Roth) umspült und im SkyScan-1773 μCT (Bruker Mikro-CT, Kontich, Belgien) gescannt. Die elektromagnetischen Wellen wurden mit einer Röhrenspannung von 40 kV und einem Röhrenstrom von $200 \mu\text{A}$ emittiert und durch einem 0,5 mm dünnen Aluminiumfilter aufgehärtet. Um die Ortsauflösung zu verbessern und Rauschartefakte zu reduzieren, wurden in definierten Rotationsschritten von $0,25^\circ$ vier Einzelbilder jeder Position mit einer Belichtungszeit von 1700 Millisekunden erstellt. Insgesamt rotierte die zu untersuchende Probe 180° um die Röntgenröhre. Die durch das Gewebe abgeschwächte Strahlung wurde mit einem 2240×2240 Pixel CCD-Flachdetektor aufgenommen. Die isotrope Bild-Pixel-Größe betrug $5,69 \mu\text{m}$ und die Farbtiefe 16 bit.

Die Bildrekonstruktion der Projektionsaufnahmen zu digitalen Signalen wurde mithilfe der NRecon Reconstruction Software (Version 1.6.10.2, SkyScan) durchgeführt. Gemäß dem Feldkamp Algorithmus wurden die aus vielen Rotationsschritten aufgenommenen Projektionsaufnahmen zu axialen Schnittbildern, in denen die Absorptionsdichte eines jeden Voxels mit dem zugehörigen Grauwert dargestellt wurde, rekonstruiert.

Bildverarbeitung

Die rekonstruierten Datensätze wurden im Data-Viewer (Version 1.5.2.5, SkyScan) geladen und entlang der frontalen, axialen und sagittalen Achse ausgerichtet. Die folgenden Schritte der Bildverarbeitung wurden mit der CT-Analyser Software (Version 1.16.4.1, SkyScan) durchgeführt. Die 3D-Rekonstruktionen wurden mit Analyze (Version 12.0, SkyScan) und die farbkodierten Modelle zur Darstellung der trabecular thickness (Tb.Th) mit CTvox (Version 3.3.0r1403 (64bit), SkyScan) erstellt.

Für die Bestimmung des Volume-of-Interest (VOI) des Femurs wurde die erste proximale Knorpelbrücke der Wachstumsplatte der distalen Femurkondylen als Referenzlevel herangezogen (Abb. 10). Um die Verzerrung morphologischer Parameter durch Anteile primärer Spongiosa an der Wachstumsplatte zu vermeiden, wurde der zu analysierende Bereich der trabekuläre Femurmetaphyse 38 Schichten (0,216 mm) proximal des Referenzlevels mit den nachfolgenden 308 Schichten (1,753 mm) gewählt. Die zu untersuchenden kortikalen Abschnitte des Femurs umfassten jeweils 80 Schichten (0,45 mm). Der distaldiaphysäre Korikalisbereich wurde 383 Schichten (2,179 mm) und der mittdiaphysäre Bereich 966 Schichten (5,497 mm) proximal des Referenzlevels definiert.

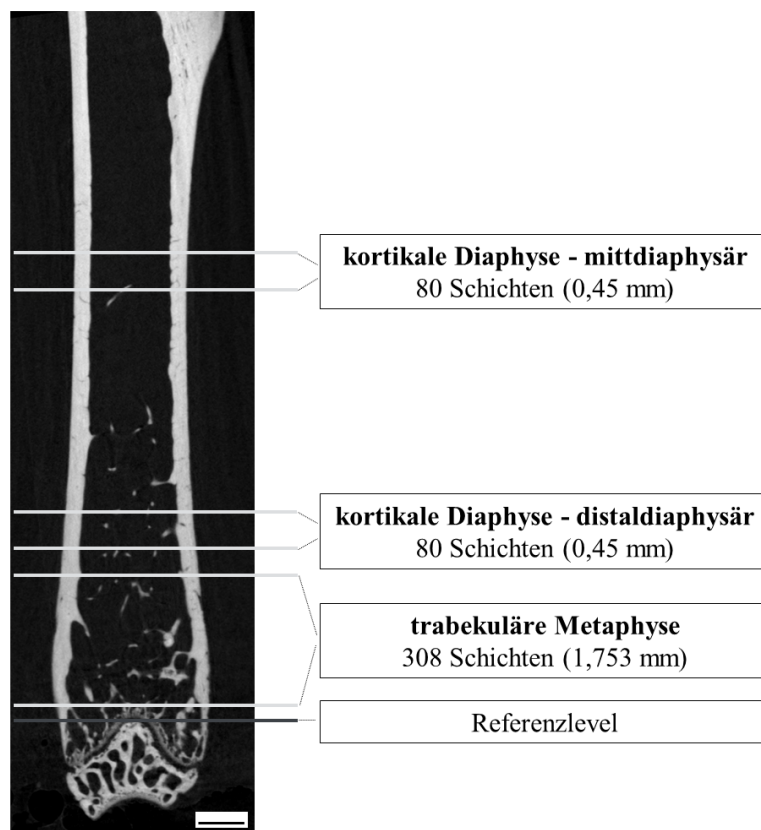


Abb. 10: Schematische Darstellung des Femurs im µCT.

Im Frontalbild wird die Schichthöheneinteilung des Femurs veranschaulicht. Das zu analysierende trabekuläre und kortikale Volume-of-Interest (VOI) des Femurs wurde im Abstand zum Referenzlevel definiert. mm= Millimeter. Maßstab 600 µm.

Bei der Festlegung der Region-of-Interest (ROI) wurden die trabekulären von den kortikalen Knochenarealen anhand der axialen Schnittbilder segmentiert. Der kortikale Anteil der Femurmetaphyse wurde halbautomatisch von der Computersoftware herausgerechnet und die Trabekel-ROI anschließend manuell auf einen geringen Abstand

zur endokortikalen Oberfläche nachbearbeitet. Die ROI der Kortikalisabschnitte wurde per Hand umfahren, um gezielt Trabekelausläufer auszuschließen. Für die Untersuchung des Lendenwirbels wurde das komplette trabekuläre Volumen des Wirbelkörpers unter Ausschluss der Primärspangisa an den Wachstumsplatten als VOI (Abb. 11) und die ROI manuell mit einem geringen Abstand zur endokortikalen Oberfläche definiert.

Bei dem Vorgang der Binarisierung wurden die Bilder aus Grauwerten zu Schwarz-Weiß-Bildern transformiert, um Knochen von Nicht-Knochen zu unterscheiden. Dabei wurde für die Analyse von kortikalem und trabekulärem Knochen mit separaten Schwellenwerten (Thresholds) gearbeitet. Für die trabekulären Bereiche des Wirbelkörpers und des Femurs wurden die Grauwerte zwischen 110-255 analysiert. Die morphologische Analyse der Femurkortikalis beinhaltete Grauwerte von 80-255, die Untersuchung der Porosität im distaldiaphysären Bereich 140-255 und im mittlediaphysären Abschnitt 155-255.

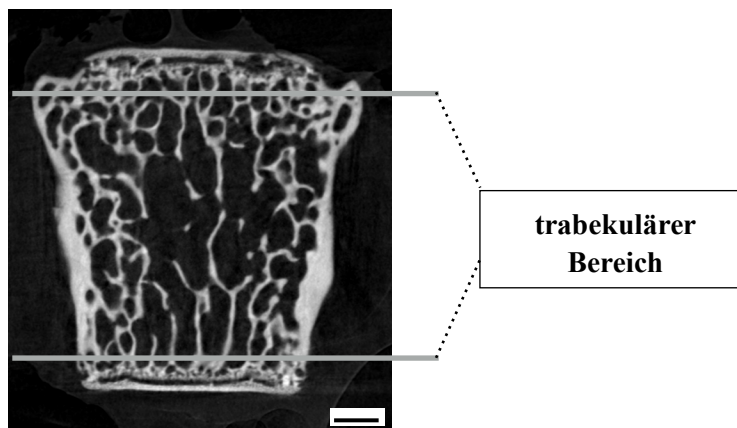


Abb. 11: Schematische Darstellung des Wirbelkörpers im μ CT.

Der Wirbelkörper L1 ist im Frontalschnitt dargestellt. Das Volume-of-Interest (VOI) beinhaltet das gesamte Trabekelvolumen des Wirbelkörpers unter Ausschluss der Primärspangiosa an der Grund- und Deckplatte. Maßstab 400 μ m.

Bildanalyse

Die Methode der μ CT erlaubte die 3D-Analyse der Knochenstrukturen aus den VOI-Datensätzen und die Messung der Calciumhydroxylapatitdichte der Knochenbereiche. Zur Charakterisierung der trabekulären Region des Knochens wurden folgende Parameter bestimmt: bone volume/tissue volume (BV/TV), bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp) und trabecular number (Tb.N) sowie die Konnektivität der Knochenarchitektur beschreibenden Parameter trabecular

pattern factor (Tb.Pf) und structure model index (SMI). Die kortikalen Regionen wurden durch die Parameter cortical area (Ct.Ar), tissue area (Tt.Ar) und dem Verhältnis beider (Ct.Ar/Tt.Ar) wie auch der porosity total (Po.tot) und der cortical thickness (Ct.Th) beschrieben.

Die Analyse der Mineralsalzdichte des Knochens wurde durch die mitgeführten Kalibrierungsphantome möglich. Individuelle Schwankungen während des Scans wurden durch das Mitführen der Phantome bei jeder einzelnen Probe beglichen. Die BMD, welche sich sowohl auf den mineralisierten trabekulären Knochen als auch auf das ihn umgebenden Weichteilgewebe bezieht, wurde hierbei von der tissue mineral density (TMD) unterschieden, welche lediglich die Dichte des mineralisierten Knochens wiedergibt.

2.5 Real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

RNA Extraktion

Der Thorakalwirbel Th10 der Versuchstiere wurde für die Isolierung der RNA nach der Euthanasie in RNA-Later (Ambion Applied Biosystems) fixiert und bei -80 °C aufbewahrt. Um das Gewebe des Wirbels zu homogenisieren und die Zellen zu lysieren, wurde dieser zuerst mit einer Keramikkugel und 1 ml QIAzol Lysisreagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) in der Schwingmühle MM400 (Retsch, Haan, Deutschland) zerkleinert und für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform (Chloroform 99 %, Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO, USA) und gründlichem Mischen fand nach der anschließenden Zentrifugation (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nierenstein, Deutschland) bei 14000 revolutions per minute (rpm) und 4 °C für 15 min die Phasentrennung der Probe statt. Daraufhin wurde die RNA in der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge 70 % Ethanol (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) untergemischt. Im Anschluss daran wurde das RNA-Ethanol-Gemisch auf eine RNeasy Mini Spin Column (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen) aufgetragen und für 15 Sekunden (s) bei 8000 relative centrifugal force und Raumtemperatur zentrifugiert. Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurde die an die Spin Column gebundene RNA mit verschiedenen Puffern (Qiagen) gewaschen. Letztlich wurde die sich an der Säule anhaftende RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser

(Qiagen) eluiert und spektrometrisch die Konzentration und Reinheit der Probe mithilfe des Nanodrop®-Spectrophotometers (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt. Das Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Die zuvor isolierte RNA wurde mithilfe der reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die folgenden Schritte wurden mit dem Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Um die Kontamination der Probe mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden zu Anfang 3 µl Wipeout-Buffer (Qiagen) mit 750 ng RNA und RNase-freiem Wasser (Qiagen) auf ein Gesamtvolumen von 21 µl angesetzt und bei 42 °C im Thermocycler (TC-3000, Techne, Bibby Scientific, USA) für 5 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf 14 µl für die reverse Transkription (RT+) und 7 µl für die Negativkontrolle (RT-) aufgeteilt. Der RT-Mastermix für die cDNA-Synthese wurde aus 1 µl RT-Primer Mix, 4 µl 5x-Quantiscript RT-Puffer und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase (Qiagen) zusammengesetzt. Zudem wurde der RT-Mastermix für die Negativkontrolle angesetzt, in dem sich 0,5 µl RT-Primer Mix, 2 µl 5x-Quantiscript RT-Puffer und 0,5 µl RNase-freies Wasser befand. Nachdem der jeweilige RT-Mastermix zur RNA hinzugegeben wurde, fand die reverse Transkription für 30 min bei 42 °C im Thermocycler statt. Schließlich wurden die Enzyme Reverse Transkriptase und DNase bei einer dreiminütigen Inkubation bei 95 °C inaktiviert und die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

PCR-Etablierung

Für die Durchführung einer real-time RT-PCR wurden Primer für die Genabschnitte von SOST, RANKL, OPG und nAChR $\alpha 9$ gesucht und auf ihre Effizienz geprüft. Die Primer für die Genabschnitte von ALP, CtsK, Cx43 und Col1 $\alpha 1$ sowie das Referenzgen β -Actin lagen bereits etabliert vor. Tabelle 1 zeigt die Informationen zu den Primern, deren Sequenzen als forward (F) und revers (R) angegeben werden.

Tab.1 Primer

Primer	Accession-number	Sequenz	Länge (Basenpaare)
ALP intronspannend	NM_007431.2	F: TCA-GCT-AAT-GCA- CAA-TAT-CAA-GG R: TCC-ACA-TCA-GTT- CTG-TTC-TTC-G	87
β-Actin intronspannend	NM_007393.3	F: TGT-TAC-CAA-CTG- GGA-CGA-CA R: GGG-GTG-TTG-AAG- GTC-TCA-AA	165
Col1α1 intronspannend	NM_007742.3	F: TGG-CAT-CCC-TGG- ACA-GCC-TG R: ATG-GGG-CCA-GGC- ACG-GAA-AC	144
CtsK intronspannend	NM_007802.3	F: GAG-GCG-GCT-ATA- TGA-CCA-CT R: CTT-TGC-CGT-GGC- GTT-ATA-CA	119
Cx43 nicht intronspannend	NM_010288.3	F: TGC-TTC-CTC-TCA- CGT-CCC-AC R: CGC-GAT-CCT-TAA- CGC-CCT-TG	127
nAChR α9 intronspannend	NM_00108110.4	F: CAG-GTC-ACG-CTC- TCC-CAG R: CCG-TCA-TAC-TGG- TCT-CGA-TCC	122
OPG intronspannend	NM_008764	F: ACT-TCA-TCG-AAA-GCA- CCC-TGT R: TGG-TAG-GAA-CAG-CAA- ACC-TGA	181
RANKL intronspannend	NM_011613	F: TCC-TGT-ACT-TTC- GAG- CGC-AG R: TCA-GGT-AGT-GTG- TCT- TCA-CTC-TC	136
SOST intronspannend	NM_024449.6	F: GCC-TCC-TCC-TGA- GAA-CAA-CC R: GGC-ATG-GGC-CGT- CTG-TC	143

Basierend auf publizierten mRNA-Sequenzen der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>) wurden Primersequenzen für SOST, RANKL, OPG und nAChR $\alpha 9$ ausgewählt und entworfen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Die Stemloopbildung in den ausgewählten Basensequenzen wurde mithilfe folgender Internetseite (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) überprüft. Letztlich wurden die Primer von der Firma MWG Biotech (MWG, Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Um für die Effizienzmessung einen möglichst großen Gehalt an Template in der Probe vorliegen zu haben, wurde in einer „nested“ PCR ein größerer Basenpaarabschnitt der gewünschten Gensequenz im Thermocycler amplifiziert und in einer Gelelektrophorese auf die erwartete Fragmentgröße überprüft. Daraufhin wurden die PCR-Produkte mit dem Qiaquick Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und zur Bestimmung der Effizienz der real-time Primer eingesetzt.

Für die Erstellung einer Standardreihe wurde eine beliebige cDNA der Maus mit dem 1:200000 verdünnten PCR-Produkt angereichert, um die Standardkurve über ca. CP 15 bis CP 30 zu etablieren. Hierfür wurde aus der angereicherten cDNA eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten angefertigt. Jede Verdünnungsstufe wurde in der real-time RT-PCR einer Doppelbestimmung unterzogen, die Negativkontrolle in Einfachbestimmung durchgeführt. Der Mastermix wurde aus je 0,2 μ l des entsprechenden Primers mit 0,8 μ l RNase-freiem Wasser (Qiagen) und 5 μ l Quantifast (Quantifast SYBR Green PCR Kit, Qiagen) hergestellt. Zu diesen 6 μ l Mastermix wurden 4 μ l Standard bzw. RNase-freies Wasser in die Glaskapillaren (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert und für 20 s bei 2000 rpm zentrifugiert (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nierenstein, Deutschland). Im LightCycler 2.0 (Roche, Basel, Schweiz) durchliefen die Proben eine fünfminütige Denaturierung bei 95 °C. Schließlich folgten 40 Zyklen, in denen nach erneuter Denaturierung für 10 s bei 95 °C die Primerhybridisierung (Annealing) und die Elongation für 30 s bei 60 °C erfolgten. Am Ende der Elongation wurde die Fluoreszenz der jeweiligen Probe gemessen.

Mit der LightCycler-Software (Version 4.1, Roche) wurde für jede Probe die Analyse der Schmelzkurve durchgeführt. Bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung um 0,1 °C pro s auf 95 °C wurde die Fluoreszenz der Probe gemessen. Die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA wurden durch den Temperaturanstieg gespalten

und der mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Je nach Zusammensetzung und Länge der Basensequenz variiert die Schmelztemperatur und Schmelzkurve und lässt die Unterscheidung spezifischer DNA-Fragmente von unspezifisch amplifizierten Fragmenten, wie Primerdimeren, zu. Die Effizienz der Primer wurde an einer Standardkurve der jeweiligen Verdünnungsreihe abgelesen. Die linear-logarithmische Standardkurve ergab für den SOST-Primer (Abb. 12) eine Effizienz von 2,027 und für den nAChR α 9-Primer von 2,045. Bei einem Wert von 2 kann von der Verdopplung der DNA pro PCR-Zyklus ausgegangen werden, wohingegen Werte größer 2 durch eventuelle Fehler in der Erstellung der Verdünnungsreihe oder durch die Bildung von Primerdimeren entstehen können.

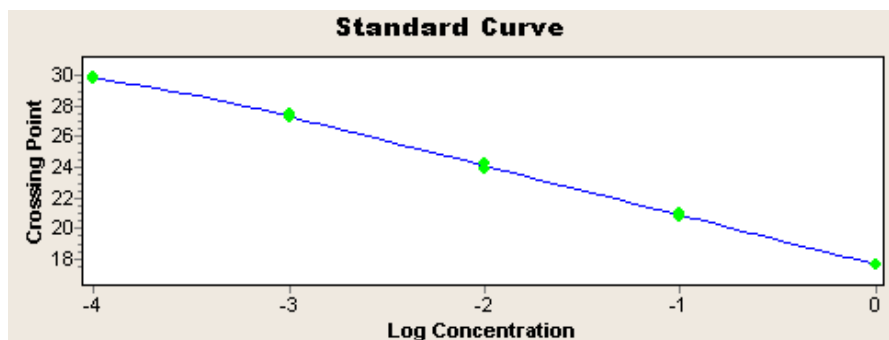


Abb. 12: Effizienzbestimmung der Primer.

Die Effizienzbestimmung wird anhand der Standardkurve von SOST veranschaulicht und beträgt im vorliegenden Beispiel 2,027.

Real-time RT-PCR

Die erfolgreiche Herstellung der cDNA und Etablierung der Primer ermöglichte nun die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Wirbelkörper Th10 im LightCycler 2.0 (Roche). Für die Messung der Expression von ALP, CtsK, Col 1 α 1, Cx 43, OPG und RANKL wurde die cDNA der Proben 1:10 verdünnt, wogegen für SOST und nAChR α 9 1:4 verdünnte cDNA eingesetzt wurde. Die Primer wurden aus je 10 μ l Forward Primer und Reverse Primer (20 μ M) auf 80 μ l RNase-freies Wasser (Qiagen) angesetzt. Für jede cDNA wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die RT-negativen Kontrollen wurden nur bei dem nicht intronspannenden Primer Cx43 verwendet und in Einfachbestimmung gemessen. Zusätzlich wurde je eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstelle von cDNA nur RNase-freies Wasser hinzugefügt wurde. Die Herstellung des Mastermix und der Ablauf der real-time RT-PCR erfolgte wie oben beschrieben.

Die LightCycler-Software (Version 4.1, Roche) erfasste die Daten der real-time RT-PCR und erstellte für jede Probe eine Schmelzkurve (Abb. 13) und eine Amplifikationskurve (Abb. 14). Die Analyse der Schmelzkurve zeigte die Reinheit des amplifizierten DNA-Fragments auf. In der Amplifikationskurve ließ sich anhand des CP erkennen, wie viele Zyklen die RT-PCR bis zum Verlassen der Hintergrundfluoreszenz durchlaufen hat. Je weniger Zyklen dazu nötig waren, umso größer war der Gehalt an Template in der Probe. Um die Analyse des jeweiligen Zielgens an der allgemeinen Aktivität der untersuchten Gewebeprobe zu relativieren, wurde der CP-Wert des Referenzgens (β -Actin) vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert. Die errechneten Δ CP-Werte erlaubten den Vergleich der Tiere miteinander. Darüber hinaus wurde bei der Berechnung des $\Delta\Delta$ CP-Werts der Δ CP-Wert der KO-Tiere in Bezug zum Δ CP-Mittelwert der WT-Tiere gesetzt. $2^{-\Delta\Delta$ CP} wurde als relative Expression abgebildet.

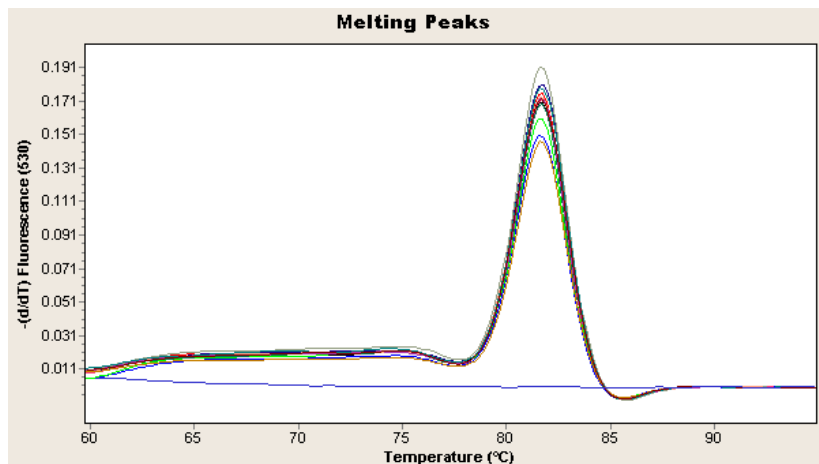


Abb. 13: Schmelzpunktkurven der real-time RT-PCR.

Die Schmelzpunktkurven der real-time RT-PCR von RANKL zeigen ein übereinstimmendes Maximum bei ca. 82°C.

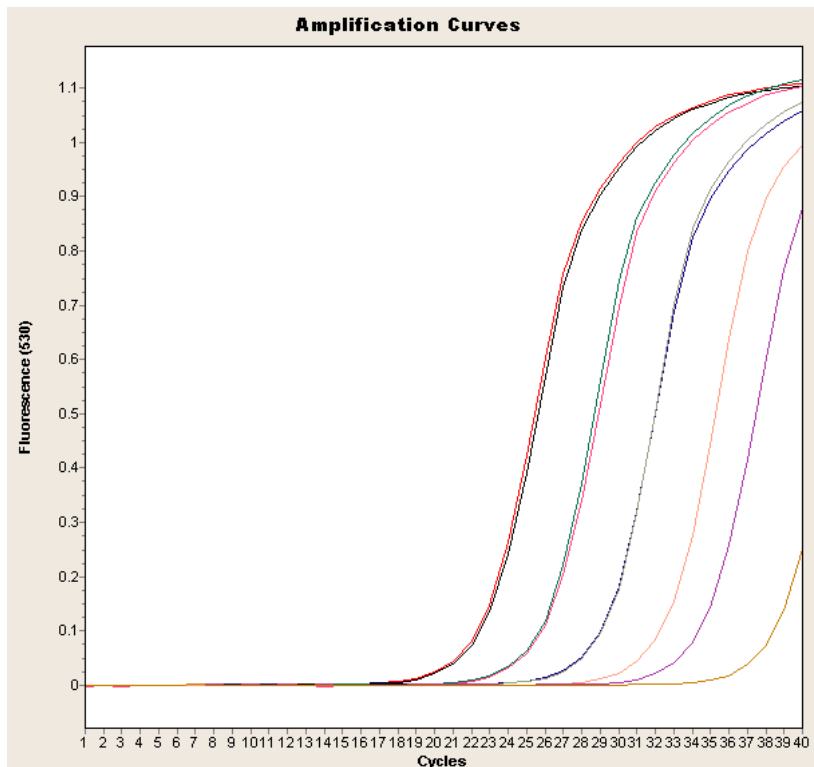


Abb. 14: Amplifikationskurven der real-time RT-PCR.

Die Abbildung veranschaulicht die Amplifikationskurven des Produkts nAChR $\alpha 10$. Der Zyklus, ab dem die Vervielfältigung des DNA-Abschnittes sich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt, wird crossing point (CP) genannt.

2.6 Histologische Färbungen und Histomorphometrie

Im Folgenden werden die technischen Durchführungen der Einbettungen und Färbungen dargestellt. Die histomorphometrischen Analysemethoden wurden an den Empfehlungen orientiert (Dempster et al., 2013).

Paraffineinbettung

Bevor die histologischen Färbungen an den Schnitten des Lumbalwirbels L3 durchgeführt werden konnten, wurden die Proben nach der Euthanasie der Tiere fixiert, entkalkt und in Paraffin eingebettet. Die Enzym- und Stoffwechselprozesse der Gewebeproben wurden mit 4 % Phosphat-gepuffertem PFA (Roth) über Nacht bei 4 °C durch den Vorgang der Proteinvernetzung unterbrochen. Nach mehrmaligem Spülen in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben für die Paraffineinbettung zur Erweichung des Knochens mithilfe von 10 % Ethylendiamin-

tetraessigsäure (Merck) für 7 Tage entkalkt. Nach verschiedenen Entwässerungsschritten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) und mit der Inkubation in Xylol (Roth) wurden die Präparate im Leica-Paraffin-Einbettautomaten TP1050 (Leica, Bensheim, Deutschland) in flüssiges Paraffin überführt und anschließend eingebettet. Daraufhin wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Leica) von den Paraffinblöcken 4-5 µm dünne Schnitte angefertigt.

Technoviteinbettung

Für das Erstellen von Schnitten mineralisierter Knochenpräparate wurden die Proben des Lumbalwirbels L1, die bereits den µCT-Scan durchlaufen hatten, wie folgt in Technovit 9100 (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet. Die in PFA fixierten Proben wurden gründlich mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4 (Merck) gespült und über 16 Tage in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Stockmeier) und mit Inkubation in Xylol (Roth) unter Rütteln entwässert. Bei jedem Schritt wurde mehrfach täglich für je 10 min ein Vakuum von -200 mbar im Exsikkator erzeugt, um die Trocknung zu optimieren. In den drei Schritten der Primärfiltration wurde mit stabilisierter Basislösung Methylmethacrylat im 1:1 Gemisch mit Xylol, stabilisierter Basislösung mit Härter A (Dibenzylperoxid, Dicyclohexylphthalat) und entstabilisierter Basislösung mit Härter B (N,N,3,5-Tetramethylanilin) gearbeitet. Die Infiltration mit entstabilisierter Basislösung, Polymethylmethacrylat und Härter A vollendete die Polymerisation. Am Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Leica) wurden letztlich 4-5 µm dünne Schnitte hergestellt.

Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden durch eine zweimalige Inkubation in Xylol (Roth) für je 5 min entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %, Stockmeier) schließlich in Aqua dest gewässert. Daraufhin wurde die Kernfärbung mit filtrierter Mayers Hämalaun-Färbelösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 8 min durchgeführt und die Proben anschließend mit Aqua dest abgespült und unter fließendem Leitungswasser für weitere 10 min zur Fixierung der Färbung gebläut. Die Bindegewebefärbung mit 1 % Eosin (Eosin G, Merck) wurde nach einminütiger Einwirkzeit durch das Abspülen der Objektträger mit Aqua dest gestoppt.

Mit der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) und der zweimaligen Xylol-Inkubation für 5 min wurden die Proben entwässert und mit Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Enzymhistochemie

Für die enzymhistochemische Färbung der ALP, welche sich extrazellulär an Osteoblasten und Matrixvesikeln befindet, wurden die Gewebeschnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Als Negativkontrolle wurde je ein Objektträger einer α 9WT- und α 10WT-Maus für 30 s mit 20 % Essigsäure inkubiert und dreimalig für 5 min in Aqua dest gespült. Anschließend wurden alle Objektträger 10 min mit 0,1 M Tris-Puffer pH 9,4 (Roth) gespült und das filtrierte Phosphatase-Substrat, bestehend aus 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat und Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (KPL, Gaithersburg, MD, USA) auf die Proben getropft. Nach der 45-minütigen Inkubation in einer feuchten Kammer mit einer Temperatur von 37 °C wurden die Objektträger abgeklopft und dreimalig für 5 min in Aqua dest gespült. Die Gegenfärbung mit filtrierte Kernschwarz-Aluminiumsulfat (Roth) wurde nach zehnminütiger Einwirkzeit mit einem dreimaligen Spülvorgang in Aqua dest für je 5 min stabilisiert. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer Inkubation in Xylol wurden die Proben mithilfe von Depex (Serva) mit einem Deckglas versehen.

Die Färbung der TRAP zum Nachweis der Osteoklasten fand nach anfänglichem Entparaffinieren und Rehydrieren wie folgt statt. Mit einer zehnminütigen Inkubation in 0,1 M Natrium-Acetatpuffer pH 5,2 (Merck) wurde ein saures Milieu geschaffen. Währenddessen wurde Färbelösung A, bestehend aus 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 125 μ l N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich) mit Lösung B aus 57,5 mg Natriumtartrat (di-Natriumtartrat-Dihydrid, Merck) und 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR Salt, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) gemischt. Die gemischte Färbelösung wurde anschließend auf die Gewebeschnitte pipettiert und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 45 min inkubiert. Nach dem Abklopfen und dreimaligen Spülen in Aqua dest für je 5 min erfolgte die einminütige Gegenfärbung mit filtrierte Hämatoxylin (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) und das Bläuen für 10 min unter Leitungswasser. Anschließend wurden die Proben nach einem erneuten Spülvorgang in Aqua dest für 5 min mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckt.

Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Antikörper mit ihrer Affinität zum jeweiligen Epitop genutzt, um Zellen durch ihre spezifischen Proteine zu charakterisieren. Die Sclerostin-Antikörper markieren das antigene Glykoprotein Sclerostin, welches von Osteozyten sezerniert wird. Zu Beginn wurden die Proben in Xylol, 100 % Aceton und einem Gemisch aus Aceton und Waschpuffer Tris-NaCl (TBS, pH 7,4) mit 0,025 % Triton-X 100 (Roth) entparaffiniert und die Bedingungen des Reaktionsmilieus durch mehrmaliges Spülen in Waschpuffer optimiert. Um die fixierungsbedingte Vernetzung der Proteine aufzuheben, wurden die Antigene mit 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0) für 60 min bei 60 °C demaskiert. Nach einem Spülvorgang in Waschpuffer wurde die endogene Peroxidase mit in Waschpuffer verdünntem 3 % Wasserstoffperoxid (Merck) in einer fünfminütigen Inkubation blockiert. Daraufhin wurde erneut mit Waschpuffer gespült und der primäre polyklonale Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper Sclerostin (1:100 verdünnt, abcam, Cambridge, UK) aufgetropft und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für 10 min mit Mäuseserum in TBS und 1 % bovinem Serum-Albumin (BSA) geblockt und die Objektträger abgeklopft. Im Anschluss wurde der Horseradish-Peroxidase markierte sekundäre Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Dako EnVision + System, Peroxidase K4010, Glostrup, Dänemark) aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese mit dem Spülen in Waschpuffer und Aqua dest gestoppt. Mit dem DAB+-Substratsystem (Dako), bestehend aus 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und einem wasserstoffperoxidhaltigem Substratpuffer, wurden die spezifisch gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe für 5 min gefärbt, welche unter dem Lichtmikroskop als rotbraunes Endprodukt sichtbar wurden. An mehrere Spülvorgänge mit Aqua bidest und dest wurde die einminütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Shandon) und das Bläuen in Leitungswasser für 10 min angeschlossen. Schließlich wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in Xylol entwässert und mit Depex (Serva) eingedeckt.

Cx43 ist eines der am häufigsten und in Form von Connexonen und Gap-Junctions vorkommenden Transmembranproteine in Knochenzellen. Ein Präparat des Herzmuskels von Ratten, welcher in Glanzstreifen Cx43 enthält, wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Gewebeschnitte für die Cx43-Antikörperfärbung wurden analog der oben beschriebenen Sclerostin-Färbung entparaffiniert und mit Aceton und Waschpuffer,

Citratpuffer und Wasserstoffperoxid vorbehandelt. Die Inkubation mit dem primären polyklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper Cx43 (1:100 verdünnt, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Nach mehrmaligem Spülen in Waschpuffer wurde der sekundäre Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:500 verdünnt, Vector, Burlingame, CA, USA) aufgebracht. Nach der Inkubation für 30 min wurde der Färbeprozess mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasesystem Vectastain Elite ABC-Kit (PK-6100, Vector), welches aus 500 µl TBS, 5 µl Reagenz A und 5 µl Reagenz B besteht, für 30 min vorbereitet. Es folgte eine fünfminütige Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat Nova Red (SK-4800, Vector), welches 5 ml Aqua dest, 3 Tropfen Reagenz 1 sowie je 2 Tropfen Reagenz 2, Reagenz 3 und Wasserstoffperoxid beinhaltet. Mithilfe des Peroxidasesubstrats Nova Red wurden die Färbereaktion vollendet und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels rotbraunen Farbsignalen sichtbar. Mithilfe der Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Shandon), Dehydrieren und Eindecken mit Depex (Serva) wurde der Versuch abgeschlossen.

Kossa-van-Gieson-Färbung

Die Differenzierung von mineralisierter Knochenmatrix und Osteoid erfolgte durch die Kossa-van-Gieson-Färbung, bei welcher der Austausch von Ca^{2+} -Ionen in Carbonaten und Phosphaten durch Silber-Ionen stattfindet. Die Technovit 9100 fixierten Proben wurden mit einer dreimaligen Inkubation in 2-Methoxyethyl-Acetat (Merck) für 10 min entplastet und nach einer absteigenden Alkoholreihe in Aqua bidest rehydriert. Für 3 % Silbernitrat wurden 3 g Silbernitrat in 100 ml Aqua bidest angesetzt. Infolge einer dreiminütigen Inkubation mit 3 % Silbernitrat (Sigma-Aldrich) und dreimaligem Spülen in Aqua bidest wurden die Objektträger für 1 min zur Reduktion des Silbers mit 10 % Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung (Merck) inkubiert, welches zuvor aus 10 g Natriumcarbonat, 25 ml 37% Formaldehyd und 100 ml Aqua bidest vorbereitet wurde. Nach einem Spülvorgang mit Leitungswasser folgte die Fixierung der Färbung für 5 min mit 5 % Natriumthiosulfat (Merck), für welches 5 g Natriumthiosulfat auf 100 ml Aqua bidest gelöst wurde. Die Reaktion wurde in Aqua dest abgestoppt, um anschließend die achtminütige Gegenfärbung mit Methylgrün (Roth) durchzuführen, mit der eine kurzfristige Kernfärbung erzielt wurde. Die Proben wurden ebenfalls in Leitungswasser und anschließend in Aqua dest gespült und daraufhin 6 min mit Weigerts-Eisen-

Hämatoxylin (Teil A+B, Roth) inkubiert. Weigerts-Eisen-Hämatoxylin sorgte für die dauerhafte Kernfärbung in einem schwarzbraunen Farbton. Nach erneutem Spülen in Leitungswasser wurden die Objektträger für 5 min mit der Van-Gieson-Mixtur (Chroma, Münster, Deutschland) zur Darstellung des Collagens und Bindegewebes versetzt und letztlich über eine kurze Passage von wenigen Sekunden in 96 % und 100 % Alkohol sowie zweimalig 5 min in Xylol mit Depex (Serva) eingedeckt.

Histomorphometrie

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Mikroskop Axiophot-2 (Zeiss, Jena, Deutschland) und der aufgesetzten Digitalkamera (Leica DC 500, Leica, Bensheim, Deutschland) in verschiedenen Vergrößerungen und mithilfe der Software Leica IM1000 (Version 4.0, Leica Microsystems, Cambridge, UK) abfotografiert. Die Fotobearbeitung und maßstabgerechte Skalierung wurde mit Adobe Photoshop CS5 (Version 5, Adobe, San Jose, CA, USA), ImageJ 1.48v (Schneider et al., 2012) und TrapHisto (van 't Hof et al., 2017) durchgeführt.

Als ROI wurde der trabekuläre Bereich des Lendenwirbelkörpers L3 mit einem geringen Abstand zur Endokortikalis definiert und histomorphometrisch analysiert. Die Präparate der Standardfärbung HE wurden auf den Parameter bone area/tissue area (B.Ar/T.Ar), die Präparate der ALP-Färbung auf den Parameter ALP perimeter/bone perimeter (ALP.Pm/B.Pm) untersucht. Mithilfe der Software TrapHisto (van't Hof et al., 2017) wurden folgende Parameter an den TRAP-gefärbten Schnitten analysiert (Abb. 15): number of osteoclasts/bone perimeter (N.Oc/B.Pm), osteoclast perimeter/bone perimeter (Oc.Pm/B.Pm). In den immunhistochemisch gefärbten Sclerostin-Präparaten wurde der Parameter Sclerostin-positive osteocytes/bone area (Scl.Ot/B.Ar) und an den Kossa-van-Gieson Schnitten der Parameter osteoid area/bone area (O.Ar/B.Ar) quantifiziert.

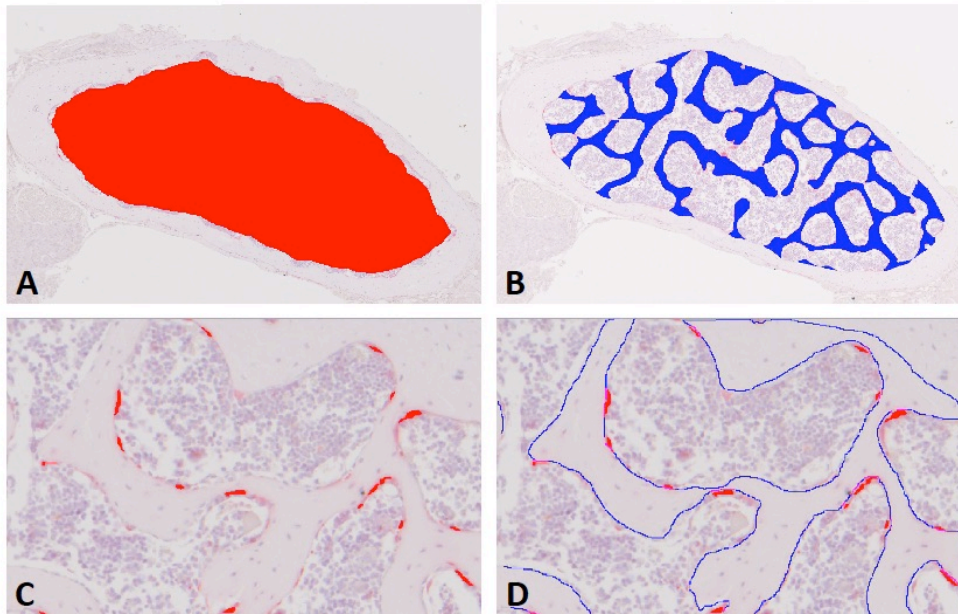


Abb. 15: Schematische Abfolge der Arbeitsschritte in der Histomorphometrie.

(A) Festlegen der trabekulären Region des Lendenwirbelkörpers mit geringem Abstand zur Endokortikalis als Region-of-Interest (ROI). (B) Definition der Fläche der Trabekel als bone area (B.Ar). (C) Farbassoziierte Erkennung der Osteoklasten im Programm TrapHisto. (D) Darstellung des Trabekelperimeters (bone perimeter, B.Pm, blaue Linie) und Perimeter der Osteoklasten (osteoclast perimeter, Oc.Pm, pinke Linie), die direkt am Knochen anliegen.

2.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Der Lendenwirbelkörper L4 wurde für die Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop nach der Präparation in Yellow-Fix-Lösung fixiert. Dieses Fixiergemisch bestehend aus 2 % PFA (Roth) in 0,01 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4), 2 % Glutardialdehyd (Roth) und 0,02 % Pikrinsäure (Sigma-Aldrich) dient der Vernetzung der Proteine. Nach gründlichem Spülen mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2-7,4, Roth) wurde 1 % Osmiumtetroxid-Lösung (Roth) in 0,1 M Cacodylatpuffer (Roth) als zweite Fixierlösung für 2 Stunden hinzugefügt, um besonders Lipide und Zellmembranen zu stabilisieren und kontrastieren. Anschließend wurden die Präparate nach einem erneuten Spülvorgang mit 0,1 M Cacodylatpuffer (Roth) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol p.a., Sigma-Aldrich) entwässert und dreimal für je 15 min in Xylol (Roth) inkubiert. Da im Elektronenmikroskop Hochvakuumbedingungen herrschen, die Wasser verdunsten und in den Präparaten Schrumpffartefakte entstehen lassen, muss nach der Entwässerung das noch enthaltene Wasser der Probe durch das Epoxidharz Epon (Serva) ersetzt werden. So erfolgte über einen Zeitraum von 6 Tagen

die Inkubation mit schrittweiser Veränderung des Mischverhältnisses von Xylol (Roth) und Epon (Serva) bis hin zu reinem Epon. In einem Exsikkator mit einem Unterdruck von -600 mbar wurden die Proben jeweils über Nacht aufbewahrt.

Die polymerisierten Epon-Probenblöcke wurden mit dem Ultratrim (Reichert, Leica, Wetzlar, Deutschland) zugeschnitten, um dann mit dem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert, Leica) erste Semidünnschnitte anfertigen zu können. Semidünnschnitte dienen neben der Kontrolle des Anschnitts des eingebetteten Präparats auch der besseren Orientierung und Fokussierung auf den zu untersuchenden Bereich. Die 0,5 µm dünnen Schnitte wurden 15 s mit Toluidinblau (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) und 5 s mit Safranin O (Merck) gefärbt. Die 60-90 nm starken Ultradünnschnitte wurden ebenfalls mithilfe des Ultramikrotoms (Ultracut Reichert, Leica, Wetzlar, Deutschland) hergestellt und auf Kupfernetze aufgetragen. Beide Dünnschnitttechniken wurden mit Diamantmessern (Diatome, Bienne, Schweiz) angefertigt. Da die alleinige Kontrastierung mit Osmiumtetroxid vor der Eponeinbettung nicht ausreicht, wurden die Präparate im automatischen Kontrastierungsinstrument (Leica EM AC20, Leica Microsystems) mit Uranylacetat (Science Services, München, Deutschland) und Bleicitrat (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) nochmals kontrastiert. Im Transmissionselektronenmikroskop (LEO EM 912, LEO Elektron Microscopy Ltd, Cambridge, England) erzeugte Elektronenstrahlen werden an den Strukturen des Präparats gebeugt und erzeugen so Abbildungen, die mit dem digitalen Kameraaufsatz (Slow-Scan CCD-Camera, Olympus, Münster, Deutschland) fotografiert werden.

Besonderes Interesse galt der Morphologie der Osteozyten. Insgesamt wurden 255 Osteozyten von fünf $\alpha 9$ KO-Tieren, 177 Osteozyten von fünf $\alpha 9$ WT-Tieren, eine Anzahl von 102 Osteozyten von drei $\alpha 10$ KO- sowie 114 Osteozyten von drei $\alpha 10$ WT-Tieren verblindet ausgewertet und anhand eines Scoringsystems in drei Kategorien eingeteilt. In die Beurteilung gingen folgende Kriterien ein: Größe des perizellulären Raums, Morphologie der Zelle und des Zellkerns sowie der Zell- und der Kernmembran, Auftreten von Vakuolen. In Kategorie 1 wurden gesunde, aktive Osteozyten zugeordnet, während Osteozyten mit Zeichen der Zelldegeneration in Kategorie 2 eingestuft wurden. Sterbende Osteozyten und leere Osteozytenlakunen wurden mit Kategorie 3 beziffert.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS (Version 23, SPSS Institute Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Im Anschluss an einen Kolmogorow-Smirnow-Test zur Überprüfung der Normalverteilung erfolgte ein t-Test oder ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SD angegeben. Ein P-Wert von $\leq 0,05$ wurde als Signifikanzlevel definiert. Die Graphen wurden mit Prism (Version 6.02, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt und in Form von Box-Whisker-Plots dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Manipulation im genetischen Hintergrund von $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Tieren wurde ein Vergleich zwischen den Mausstämmen nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Biomechanik

Direkt im Anschluss an die Euthanasie wurde das Körpergewicht aller Mäuse bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die $\alpha 9$ KO-Tiere mit $25,16 \pm 1,70$ g signifikant leichter waren als ihre zugehörigen WT mit $27,86 \pm 2,27$ g ($p \leq 0,018$, Abb. 16A). Zwischen den $\alpha 10$ KO- und WT-Tieren ließ sich kein relevanter Unterschied verzeichnen.

Im Drei-Punkt-Biegetest wurde das linke Femur eines jeden Tieres auf die biomechanischen Eigenschaften Biegesteifigkeit und Maximalkraft getestet. Die Biegesteifigkeit als Maß der Elastizität eines Knochens stellte sich bei den $\alpha 9$ KO-Tieren mit $2597,17 \pm 169,08$ Nmm² gegenüber den $\alpha 9$ WT-Tieren mit $2944,63 \pm 96,27$ Nmm² hochsignifikant vermindert dar ($p \leq 0,001$, Abb. 16B). Die Kraft, die eine Fraktur der Diaphyse des Femurs verursacht, spiegelt die Biegefestigkeit des Knochens wider. Bereits bei einer Kraft von $9,33 \pm 0,41$ N frakturierten die Femora der $\alpha 9$ KO-Tiere, wohingegen die Knochen der $\alpha 9$ WT-Mäuse erst bei einer Kraft von $10,65 \pm 0,61$ N brachen ($p \leq 0,001$, Abb. 16C). Die $\alpha 10$ KO-Tiere unterschieden sich in beiden Parametern nicht signifikant von ihren WT.

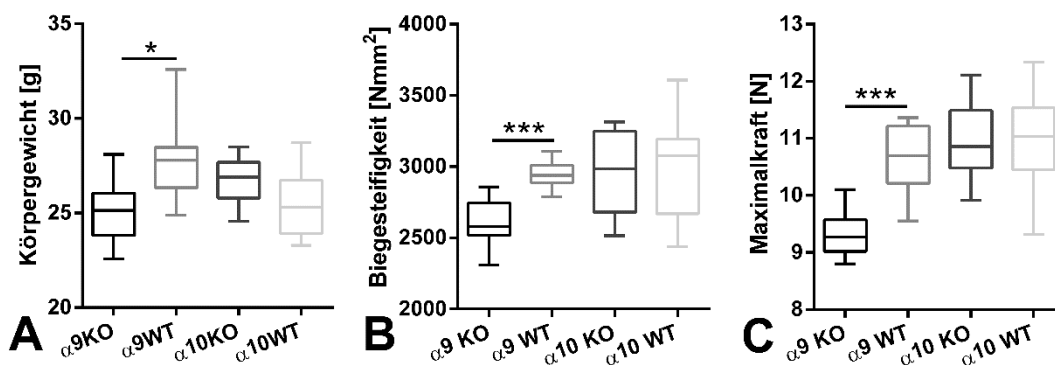


Abb. 16: Körpergewicht und Biomechanik.

Box-Whisker-Plots der Ergebnisse des t-Tests des (A) Körpergewichts, der (B) Biegesteifigkeit und (C) Maximalkraft. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. Graphik modifiziert nach Baumann et al., 2019.

3.2 μ CT

3.2.1 Femur

Das rechte Femur der Versuchstiere wurde im μ CT auf seine morphologischen und densitometrischen Eigenschaften untersucht. Die trabekulären Anteile der distalen Femurmetaphyse (Abb. 17) sowie die Kortikalisbereiche zweier unterschiedlicher Höhen der Diaphyse wurden auf ihre Mikrostruktur analysiert. Zusätzlich wurden die BMD der Spongiosa und die TMD der Kortikalis bestimmt.

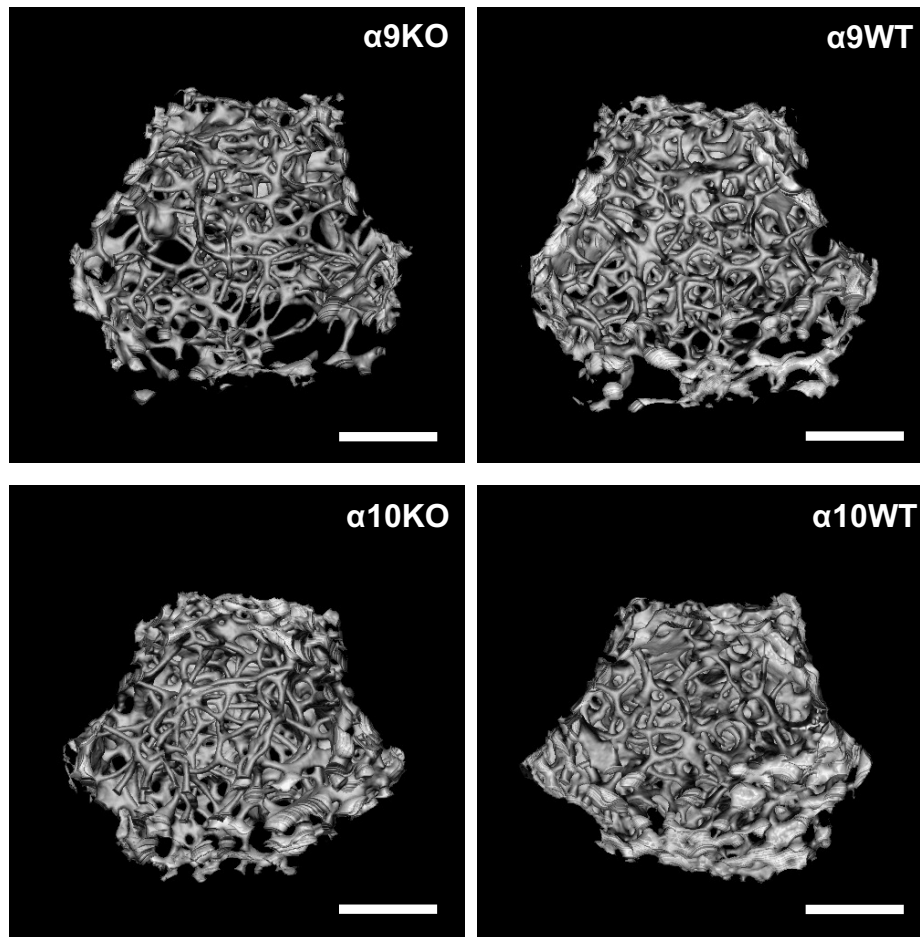


Abb. 17: 3D-Rekonstruktion der trabekulären Femurmetaphyse.

Das Trabekelwerk der distalen Femurmetaphyse ist mit der Ansicht von kranial veranschaulicht. Maßstab 600 μ m.

Das Trabekelwerk der distalen Metaphyse der $\alpha 9$ KO-Mäuse zeigte im Mittel ein geringeres BV/TV von $8,03 \pm 1,27$ % im Vergleich zu $9,43 \pm 0,75$ % der $\alpha 9$ WT-Mäuse, deren Vergleich sich statistisch nicht signifikant erwies ($p = 0,065$, Abb. 18A). Dagegen stellte sich die Tb.Th der $\alpha 9$ KO-Tiere verglichen mit der der WT als hochsignifikant vermindert heraus ($p \leq 0,007$, Abb. 18B). Die Werte der Tb.Sp (Abb. 18C) und der Tb.N

unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen der $\alpha 9$ KO- und WT-Mäuse. Der Parameter BS/BV zeigte Mittelwerte um $96,6 \pm 3,19 \text{ mm}^{-1}$ der $\alpha 9$ KO- und $91,41 \pm 1,86 \text{ mm}^{-1}$ der $\alpha 9$ WT-Mäuse, womit ein signifikant höherer Wert für die Knochen der $\alpha 9$ KO-Tiere vorliegt ($p \leq 0,005$, Abb. 18D). Die Verbindung der trabekulären Strukturen untereinander, die sogenannte Konnektivität, kann mithilfe des inversen Parameters Tb.Pf quantifiziert werden. Der Tb.Pf der $\alpha 9$ KO-Tiere ergab mit einem höheren Mittelwert von $31,03 \pm 2,39 \text{ mm}^{-1}$ im Gegensatz zum Mittelwert der WT-Tiere von $27,13 \pm 1,24 \text{ mm}^{-1}$ das Bild einer vermehrt diskonnektierten Trabekelstruktur (Abb. 18E). Das Ergebnis erwies sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ als statistisch signifikant. Wie auch der Tb.Pf dient der SMI der Beschreibung der Trabekelform, von der funktionelle Eigenschaften abgeleitet werden können. Der SMI beziffert mit Werten zwischen 0 und 3, ob die vorliegenden Strukturen eher parallelen Platten (0) oder zylindrischen Säulen (3) ähneln (Hildebrand et al. 1997). Mit einem mittleren SMI von $2,12 \pm 0,07$ besaßen die $\alpha 9$ KO-Tiere im Vergleich zu ihren WT-Mäusen mit Werten von $2,02 \pm 0,05$ vermehrt säulenartige Strukturelemente ($p \leq 0,01$, Abb. 18F). Die $\alpha 10$ KO-Mäuse unterschieden sich statistisch von ihren zugehörigen WT lediglich in der Tb.Sp ($p \leq 0,003$, Abb. 18C) und im erhöhten SMI ($p \leq 0,028$, Abb. 18F).

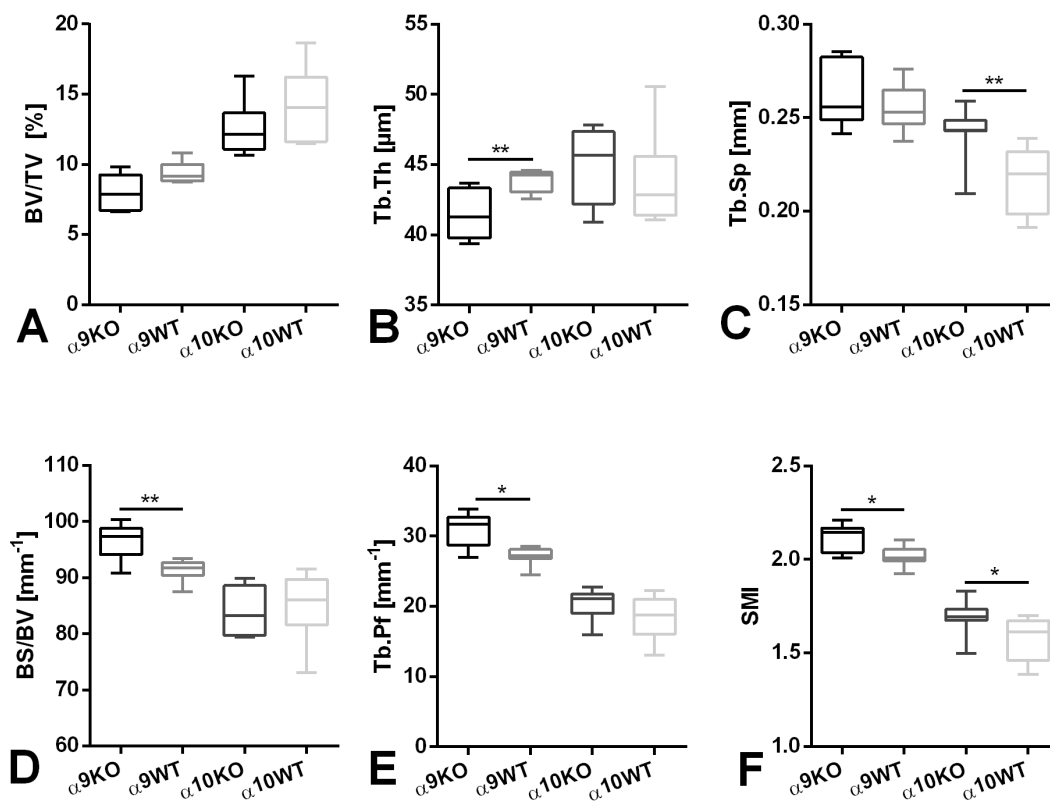


Abb. 18: Morphologie der Spongiosa des Femurs im μCT .

Box-Whisker-Plots der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der die Knochenmorphologie der distalen Femurmetaphyse beschreibenden Parameter bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular pattern factor (Tb.Pf) und structure model index (SMI). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Baumann et al., 2019.

Für spongiöse Knochenbereiche wird die BMD bestimmt, bei der der mineralisierte Knochen sowie das ihn umgebende Knochenmark und Bindegewebe auf den gemittelten Mineralsalzgehalt geprüft werden. Der Vergleich der BMD-Werte im Mann-Whitney-Test ergab in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf deren korrespondierende WT-Mäuse (Abb. 19). Die Berechnung des Z-Scores, bei dem die BMD-Werte der KO-Tiere auf die Werte gesunder, gleichaltriger WT-Tiere bezogen werden, zeigte bei den α_9 KO-Tieren eine SD von -1,09 und bei den α_{10} KO-Tieren eine SD von -0,76. Damit liegen beide Versuchsgruppen oberhalb der Grenze zur Osteoporose ($\text{SD} < -2,5$) (Tella und Gallagher, 2014).

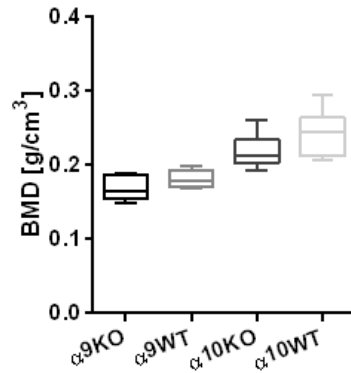


Abb. 19: BMD der Spongiosa des Femurs.

Box-Whisker-Plot der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der bone mineral density (BMD) der trabekulären Femurmetaphyse. Quelle: Baumann et al., 2019.

Die Femurkortikalis wurde im Bereich der Diaphyse und im Übergang der Diaphyse zur Metaphyse, hier als distaldiaphysär bezeichnet, gemessen. Zweidimensional wurde neben der Ct.Ar und Tt.Ar auch das Verhältnis beider (Ct.Ar/Tt.Ar) bestimmt. Sowohl die distaldiaphysären (Abb. 20G, H) als auch die mittdiaphysären Kortikalisproben (Abb. 21G, H) der $\alpha 9$ KO-Tiere wiesen signifikant geringere Werte der Ct.Ar (distaldiaphysär $p \leq 0,001$, Abb. 20A; mittdiaphysär $p \leq 0,01$, Abb. 21A) und Tt.Ar (distaldiaphysär $p \leq 0,015$, Abb. 20B; mittdiaphysär $p \leq 0,001$, Abb. 21B) auf, jedoch errechnete sich im Verhältnis beider Flächen (Ct.Ar/Tt.Ar, Abb. 20C und Abb. 21C) kein statistisch signifikanter Unterschied.

In einer dreidimensionalen Messung wurde der prozentuale Anteil an Poren (Po.tot) und die Ct.Th festgestellt. Die totale Porosität setzt das Volumen nicht solider Objekte (Poren) in ein Verhältnis zum Knochenvolumen. Im Übergang der Metaphyse zur Diaphyse konnte kein statistischer Unterschied in der Porosität zwischen den $\alpha 9$ KO- und WT-Tieren errechnet werden (Abb. 20D). Im Gegensatz dazu wies der mittdiaphysäre Bereich der $\alpha 9$ KO-Tiere mit einem Mittelwert von $0,06 \pm 0,08$ % verglichen mit dem ihrer WT von $0,18 \pm 0,13$ % eine geringere Porosität auf ($p \leq 0,021$, Abb. 21D). Die Ct.Th der Kortikalis beschreibt den mittleren Durchmesser eines soliden Objekts. In der Gruppe der $\alpha 9$ KO-Tiere ließ sich statistisch kein Unterschied der Ct.Th zu den korrespondierenden WT ermitteln (Abb. 20E und Abb. 21E).

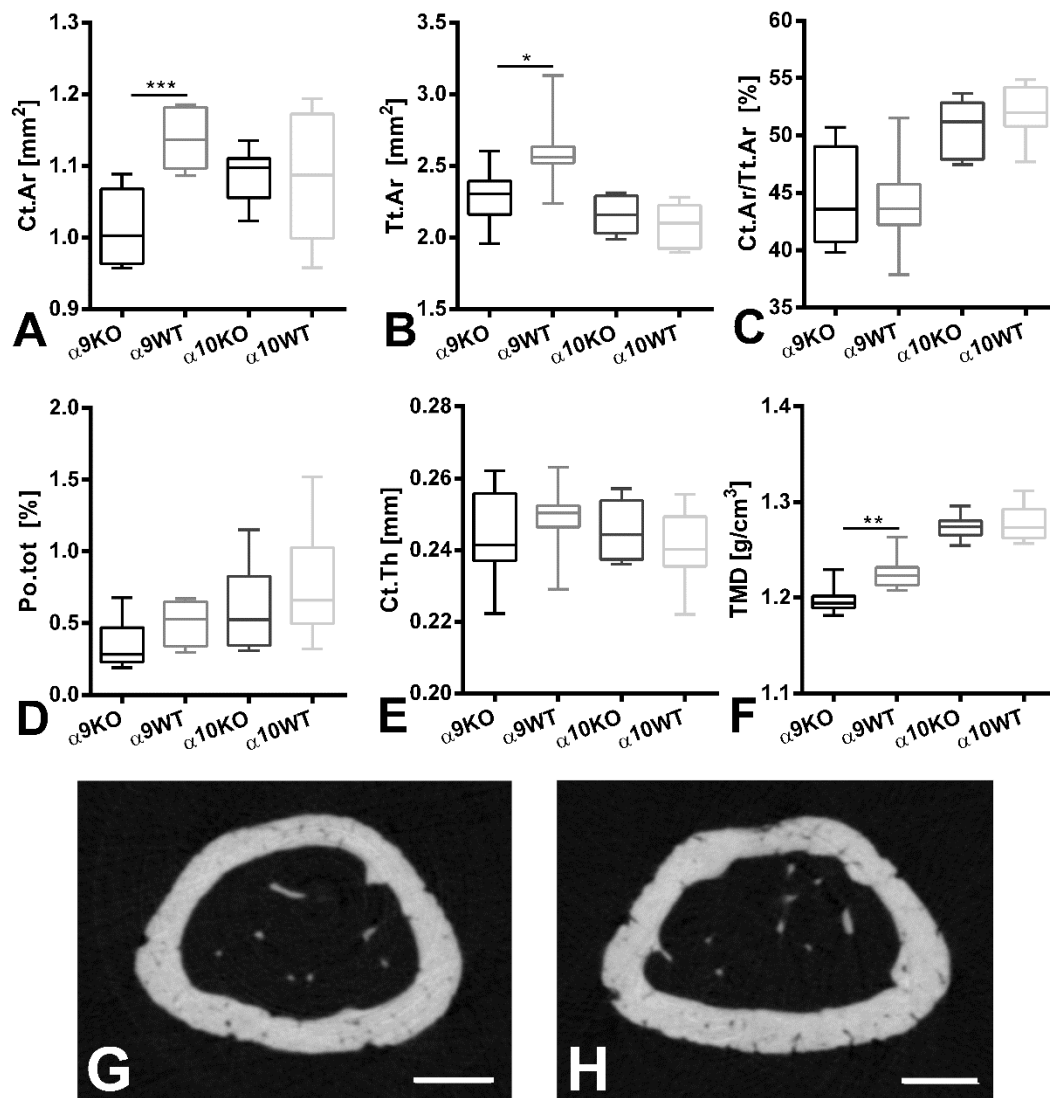


Abb. 20: Morphologie und TMD der Kortikalis der distalen Diaphyse im μ CT.

Box-Whisker-Plots der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der Morphologie der Kortikalis im distaldiaphysären Abschnitt anhand der Parameter cortical area (Ct.Ar), tissue area (Tt.Ar), porosity total (Po.tot) und cortical thickness (Ct.Th). Die Werte der tissue mineral density (TMD) beschreiben die Mineralsalzdichte der mineralisierten Knochenmatrix in diesem Bereich. Exemplarisch sind Transversalschnitte der Kortikalis von (G) α 9KO und (H) α 9WT gezeigt. Maßstab 400 μ m. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

Anders als bei der Bestimmung der BMD wird bei der TMD-Messung lediglich die Dichte des mineralisierten Knochens quantifiziert. Die TMD beider Kortikalisbereiche lag in der Gruppe der α 9KO-Mäuse im statistischen Test signifikant unterhalb der Werte der zugehörigen WT-Mäuse (distaldiaphysär $p \leq 0,005$, Abb. 20F; mittlediaphysär

$p \leq 0,002$, Abb. 21F). Zwischen den $\alpha 10$ KO-Tieren und ihren WT waren keine Unterschiede in der Beschaffenheit der Kortikalis im distaldiaphysären (Abb. 20) und mittlediaphysären Bereich (Abb. 21) zu verzeichnen.

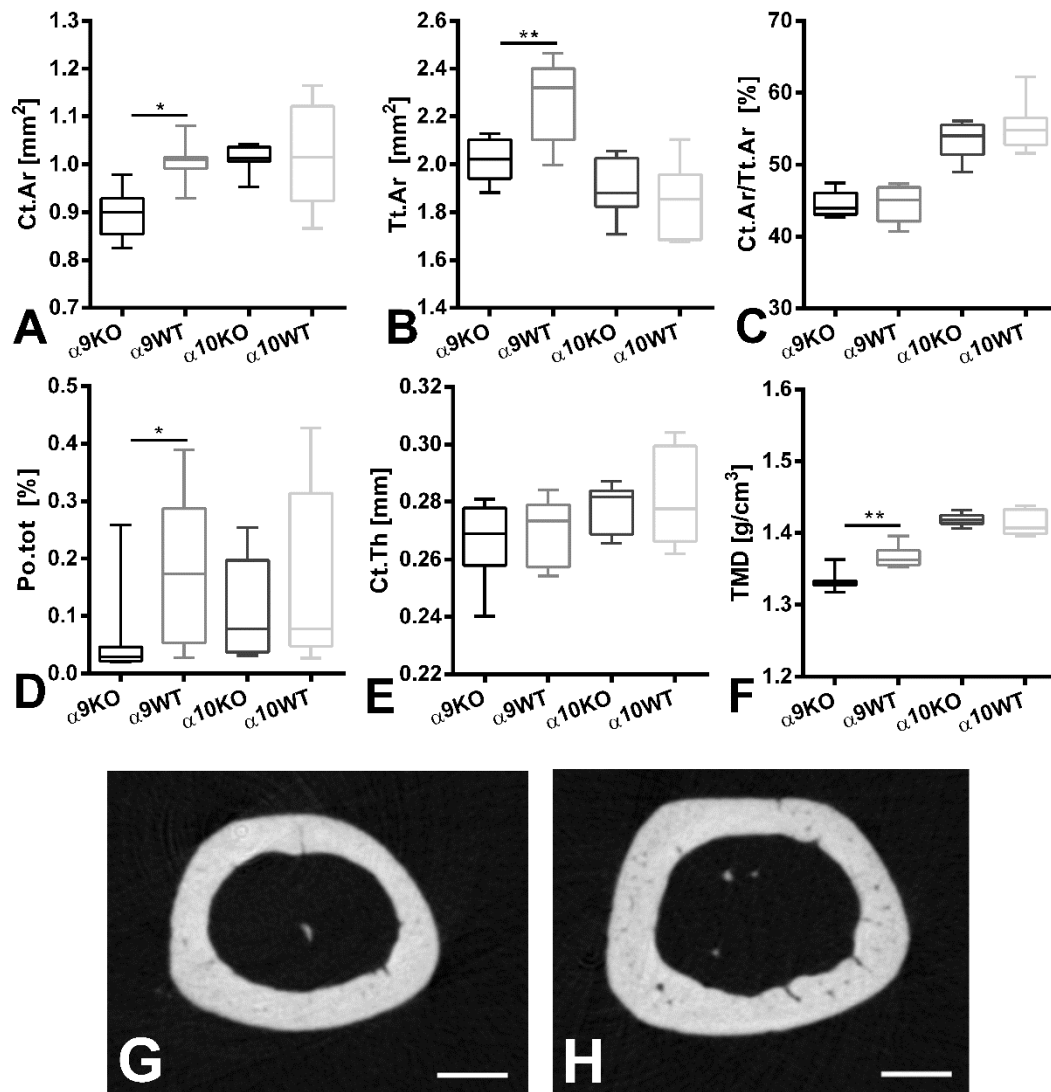


Abb. 21: Morphologie und TMD der Kortikalis der Mittlediaphyse im μCT .

Box-Whisker-Plots der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der Morphologie der Kortikalis im mittlediaphysären Abschnitt anhand der Parameter cortical area (Ct.Ar), tissue area (Tt.Ar), porosity total (Po.tot) und cortical thickness (Ct.Th). Die Werte der tissue mineral density (TMD) beschreiben die Mineralsalzdichte der mineralisierten Knochenmatrix in diesem Bereich. Exemplarisch sind Transversalschnitte der Kortikalis von (G) $\alpha 9$ KO und (H) $\alpha 9$ WT gezeigt. Maßstab 400 μm . * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Baumann et al., 2019.

3.2.2 Wirbelkörper

Das Trabekelwerk des Lendenwirbelkörpers L1 wurde vollständig von der Grund- zur Deckplatte analysiert (Abb. 22). Neben den morphologischen Parametern wurde wie auch im Femur die BMD des spongiösen Knochenabschnitts bestimmt.

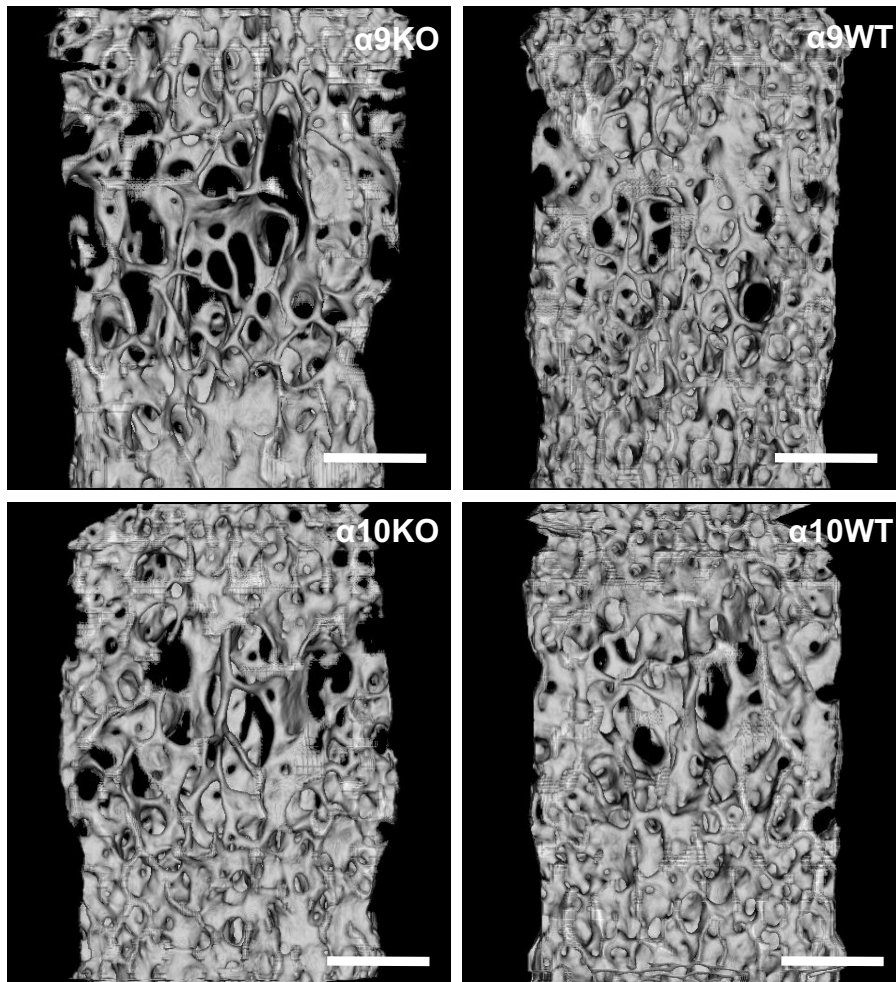


Abb. 22: 3D-Rekonstruktion des Trabekelwerks des Lendenwirbelkörpers L1.

Der Lendenwirbelkörper L1 wird mit der Ansicht von ventral dargestellt. Maßstab 600 μm .

Das BV/TV der Wirbelkörper der $\alpha 9\text{KO}$ -Tiere unterschied sich mit $22,93 \pm 2,50$ % nicht signifikant vom dem seiner WT mit einem Mittelwert von $25 \pm 1,68$ % (Abb. 23A). Auch die Tb.Th (Abb. 23B) sowie die Tb.Sp (Abb. 23C), BS/BV (Abb. 23D) und Tb.N ergaben zwischen den $\alpha 9\text{KO}$ - und WT-Tieren keine statistischen Differenzen. Dem hingegen errechneten sich Werte des Tb.Pf von $7,21 \pm 1,66 \text{ mm}^{-1}$ ($\alpha 9\text{KO}$) und $3,96 \pm 1,90 \text{ mm}^{-1}$ ($\alpha 9\text{WT}$), deren Vergleich einen statistisch signifikanten Unterschied ergab ($p \leq 0,001$, Abb. 23E). Des Weiteren lag der SMI in der Gruppe der $\alpha 9\text{WT}$ -Tiere bei einem

Mittelwert von $0,79 \pm 0,14$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ signifikant unterhalb der Werte der $\alpha 9\text{KO}$ -Tiere mit $1,06 \pm 0,09$ (Abb. 23F). Die Wirbelkörper der $\alpha 10\text{KO}$ -Tiere wiesen in den gemessenen morphologischen Parametern keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zu ihren WT auf.

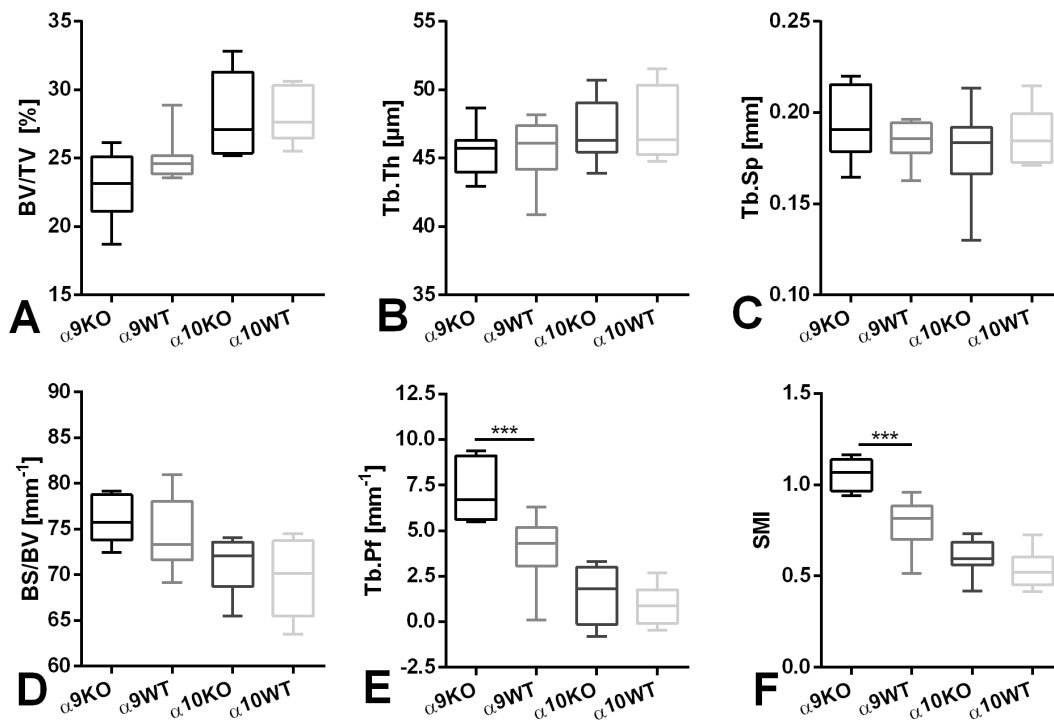


Abb. 23: Morphologie der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers im μCT .

Mithilfe von Box-Whisker-Plots werden die Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der Knochenmorphologie des trabekulären Bereichs des Lendenwirbelkörpers L1 anhand folgender Parameter graphisch dargestellt: bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular pattern factor (Tb.Pf) und structure model index (SMI) beschrieben. *** $p \leq 0,001$. Quelle: Baumann et al., 2019.

Bei der Analyse des Mineralsalzgehalts (BMD) im Lendenwirbelkörper ließen sich in beiden KO-Stämmen im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 24). Der ermittelte Z-Score der $\alpha 9\text{KO}$ -Tiere lag bei einer SD von -1,19 und in der Gruppe der $\alpha 10\text{KO}$ -Tiere bei einer SD von -0,21. Folglich sind die Wirbelkörper beider Gruppen nicht als osteoporotisch einzustufen (Tella und Gallagher, 2014).

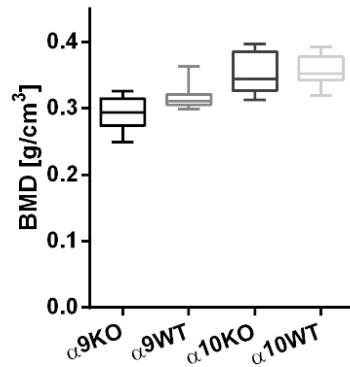


Abb. 24: BMD der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers.

Box-Whisker-Plot der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der bone mineral density (BMD) des Lendenwirbelkörpers L1. Quelle: Baumann et al., 2019.

3.3 Histomorphometrie

Die HE-gefärbten Proben wurden histomorphometrisch auf das Verhältnis der Trabekelfläche zur Gewebefläche (bone area/tissue area, B.Ar/T.Ar) des spongiösen Bereichs des Wirbelkörpers ausgewertet. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 25).

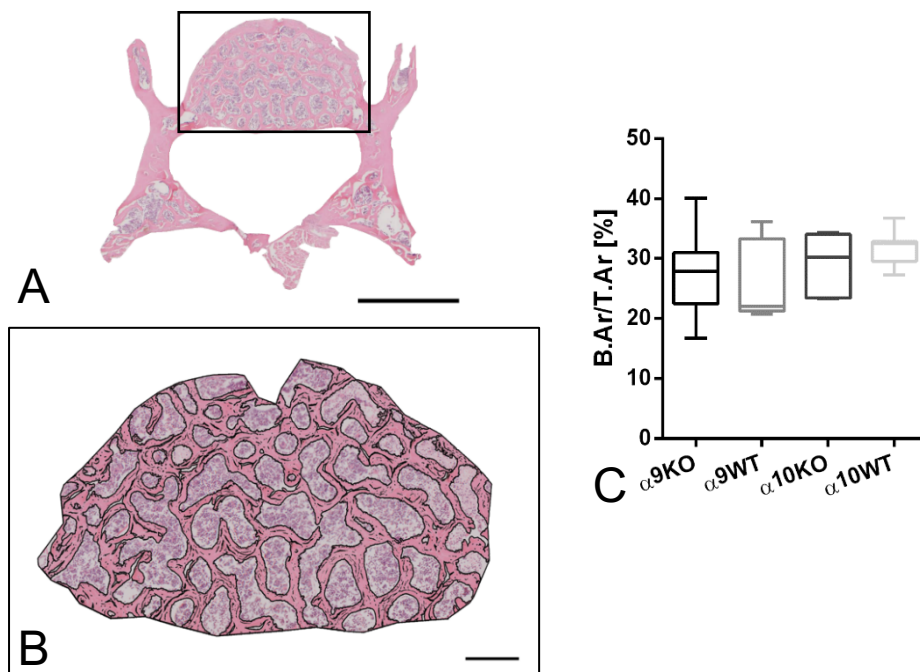


Abb. 25: Histomorphometrie der Trabekelfläche des Lendenwirbelkörpers.

(A) Übersicht eines Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Transversalschnitts des Wirbels L3 einer α9WT-Maus. Maßstab 1 mm. (B) Im Bereich des Wirbelkörpers wurde nach Ausschluss der Kortikalis die Fläche der Trabekel ins Verhältnis zur Gesamtfläche (bone area/tissue area, B.Ar/T.Ar) gesetzt. Maßstab 200 µm. (C) Box-Whisker-Plot der Ergebnisse von B.Ar/T.Ar.

3.4 Osteoblasten

Die Aktivität der Osteoblasten wurde molekularbiologisch und histologisch mit anschließenden histomorphometrischen Messungen bestimmt. ALP als typisches Markerenzym für prämaturre Osteoblasten wird in Vesikeln nach extrazellulär sezerniert und wirkt bei der Mineralisierung mit. In der Enzymhistochemie ist die ALP an der tief violetten Färbung der Osteoblasten und ihrer umgebenden Knochenoberfläche zu erkennen. Beim Vergleich der Präparate der $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Tiere war die violette Färbung der $\alpha 9$ KO und $\alpha 9$ WT wesentlich geringer ausgeprägt als bei den $\alpha 10$ KO und $\alpha 10$ WT (Abb. 26A, B). Die Messung des relativen ALP-Perimeters (ALP.Pm/B.Pm) zeigte keine statistischen Unterschiede in den Gruppen der $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere im Vergleich zu ihren entsprechenden WT-Tieren (Abb. 26C). Bei der real-time RT-PCR stellte sich ein signifikant verminderter Gehalt an ALP mRNA in der Gruppe der $\alpha 10$ KO-Tiere ($-6,16 \pm -0,59$ $-\Delta$ CP) verglichen mit den $\alpha 10$ WT-Tieren ($-5,57 \pm -0,36$ $-\Delta$ CP, $p \leq 0,05$, Abb. 26D) heraus, während sich die Werte der $\alpha 9$ KO-Mäuse nicht von ihren WT unterschieden ($\alpha 9$ KO: $-6,41 \pm -0,54$ $-\Delta$ CP; $\alpha 9$ WT: $-6,02 \pm -0,47$ $-\Delta$ CP, Abb. 26D).

Osteoblasten tragen mit der Synthese von Collagen zur Bildung der organischen Knochenmatrix bei. Auf mRNA-Level wurde in den Proben der $\alpha 9$ KO-Mäuse eine signifikante Reduktion von $Col1\alpha 1$ ($-1,38 \pm -0,68$ $-\Delta$ CP) im Vergleich zu den Proben der $\alpha 9$ WT-Mäuse ($-0,68 \pm -0,35$ $-\Delta$ CP, $p \leq 0,05$, Abb. 26E) gemessen. Für die relative Expression der $Col1\alpha 1$ mRNA der $\alpha 9$ KO errechnete sich ein Wert von 0,68. Unterschiede in der Collagensynthese der $\alpha 10$ -Tiere waren nicht zu finden.

Bei der Ablagerung der organischen Matrix wird das Osteoid gebildet, welches im Verlauf mineralisiert wird. Nach der Durchführung der Kossa-van-Gieson-Färbung (Abb. 27A) wurde histomorphometrisch die Osteoidfläche zur mineralisierten Knochenfläche ins Verhältnis gesetzt (osteoid area/bone area, O.Ar/B.Ar) (Abb. 27B). Die Ergebnisse dieser Messung zeigten weder in der Gruppe der $\alpha 9$ - noch der $\alpha 10$ -Tiere im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT statistische Unterschiede.

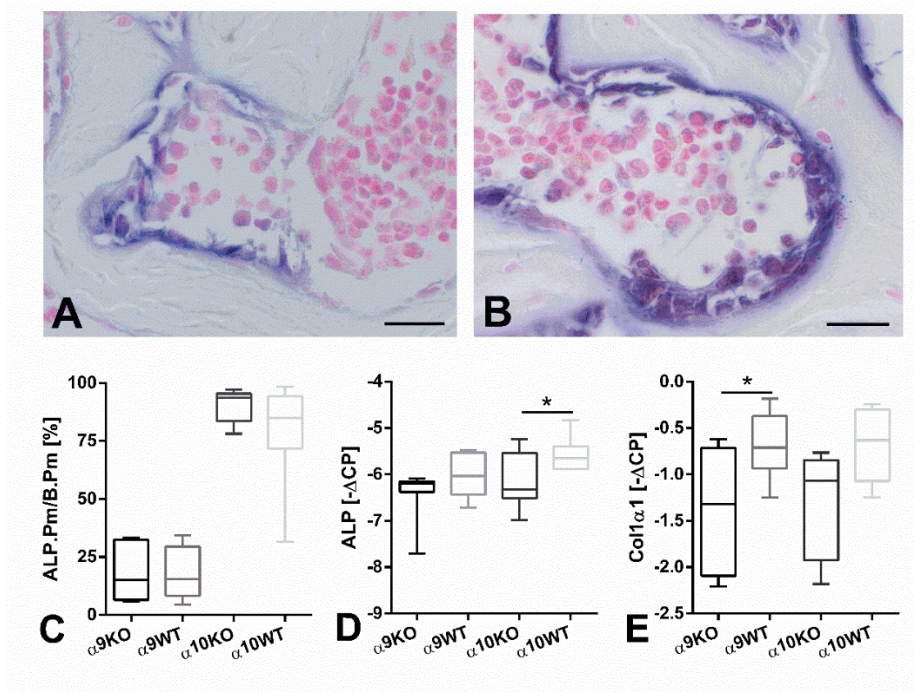


Abb. 26: ALP und Col1 $\alpha 1$ in Osteoblasten.

Die enzymhistochemische Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) am Beispiel eines Präparats einer (A) $\alpha 9$ WT- und (B) $\alpha 10$ KO-Maus. Maßstab 20 μ m. Box-Whisker-Plots der (C) histomorphometrischen Ergebnisse des ALP-positiven Perimeters im Verhältnis zum Knochenperimeter (ALP perimeter/bone perimeter, ALP.Pm/ B.PM) sowie der mRNA-Expression von (D) ALP und (E) Collagen1 $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$). Die mRNA-Expression ist in der Einheit $-\Delta$ CP dargestellt. Umso negativer der $-\Delta$ CP-Wert, desto geringer der mRNA-Gehalt des jeweiligen Targets. Mann-Whitney-Test, * $p \leq 0,05$. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

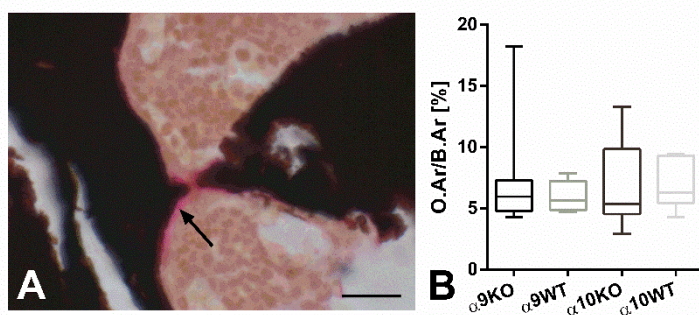


Abb. 27: Histomorphometrie der Osteoidfläche.

(A) Die Kossa-van-Gieson-Färbung wurde zur Differenzierung zwischen mineralisiertem Knochen (dunkelbraun) und Osteoid (rosafarben, Pfeil) an Schnitten des ersten Lendenwirbelkörpers durchgeführt. Maßstab 20 μ m. (B) Der Box-Whisker-Plot zeigt die Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der histomorphometrischen Analyse der relativen Osteoidfläche (osteoid area/bone area, O.Ar/B.Ar). Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

3.5 Osteozyten

Neben der molekularbiologischen und histologischen Analyse wurden die Osteozyten auch morphologisch mithilfe der TEM untersucht. Osteozyten und Osteoblasten nutzen Hemikanäle und Gap-Junctions zur Kommunikation, welche zum überwiegenden Anteil aus dem Protein Cx43 bestehen. Mit der real-time RT-PCR wurde eine verminderte Expression von Cx43 in Proben von α 9KO im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT (KO: $-7,07 \pm -0,62$ $-\Delta$ CP, WT: $-6,38 \pm -0,49$ $-\Delta$ CP, $p \leq 0,028$, Abb. 28A) gemessen, wohingegen die Gruppe der α 10KO-Tiere keine Regulation von Cx43 auf mRNA-Level (KO: $-6,71 \pm -0,65$ $-\Delta$ CP, WT: $-6,32 \pm -0,25$ $-\Delta$ CP, Abb. 28A) aufwies. Die relative Expression von Cx43 der α 9KO betrug 0,67 im Vergleich zu den α 9WT. Immunhistochemisch waren Cx43-positive Signale, gekennzeichnet an der rotbraunen Färbung, mit makulärem und fibrillärem Muster in unmittelbarer Umgebung der in die Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten im spongiosen und kortikalen Knochen zu finden (Abb. 28B). Der polyklonale Antikörper gegen Cx43 hatte ebenfalls an das Zytoplasma von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten sowie an hämatopoetische Vorläuferzellen, wie Megakaryozyten, und eine geringe Anzahl an Kapillaren und Gefäße gebunden. Als Positivkontrolle wurde ein Präparat des Herzmuskels einer Ratte verwendet, welcher besonders in den Glanzstreifen Cx43 enthält (Abb. 28C). Abweichungen des eben beschriebenen Färbungsmusters konnten bei den hier untersuchten Mausstämmen nicht beobachtet werden.

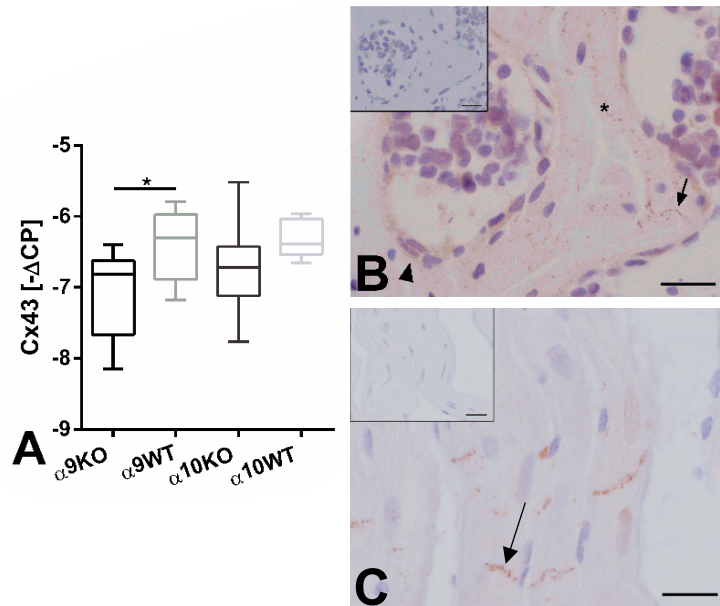


Abb. 28: Connexin43 in Osteozyten.

(A) Box-Whisker-Plot der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der Connexin (Cx43) mRNA-Expression in der real-time RT-PCR. * $p \leq 0,05$. (B) Bei der immunhistochemischen Färbung sind Cx43-positive Signale an der rotbraunen Färbung zu erkennen. Ein fibrilläres Muster zeichnete sich in der Nähe von Osteozyten ab (Pfeil). Ebenso sind positive Signale in Osteoblasten zu beobachten (Pfeilkopf). (C) Als Positivkontrolle wurde ein Präparat des Herzmuskels der Ratte verwendet, welcher besonders in den Glanzstreifen Cx43 enthält (Pfeil). Die Insets stellen die Negativkontrolle dar, bei der statt dem primären Antikörper nur die Antikörper-Verdünnungslösung inkubiert wurde. Maßstab 20 μm . Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

Die Regulation des Knochenremodelings wird u. a. durch das Protein Sclerostin gesteuert, welches im *SOST*-Gen in Osteozyten verschlüsselt ist. Die Expression von SOST, die mithilfe der real-time RT-PCR untersucht wurde, war in den Gruppen der $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Tiere nicht statistisch signifikant verändert ($\alpha 9\text{KO}$: $-7,48 \pm -0,32$ $-\Delta\text{CP}$, WT: $-7,73 \pm -0,33$ $-\Delta\text{CP}$; $\alpha 10\text{KO}$: $-7,57 \pm -0,53$ $-\Delta\text{CP}$, WT: $-7,25 \pm -0,41$ $-\Delta\text{CP}$, Abb. 29A). Nach der immunhistochemischen Färbung von Sclerostin wiesen lediglich einige Osteozyten das bräunliche Signal auf. Häufig waren Sclerostin-positive Osteozyten direkt neben Sclerostin-negativen Osteozyten lokalisiert (Abb. 29C). Die Berechnung von Scl.Ot/B.Ar ergab keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 29B).

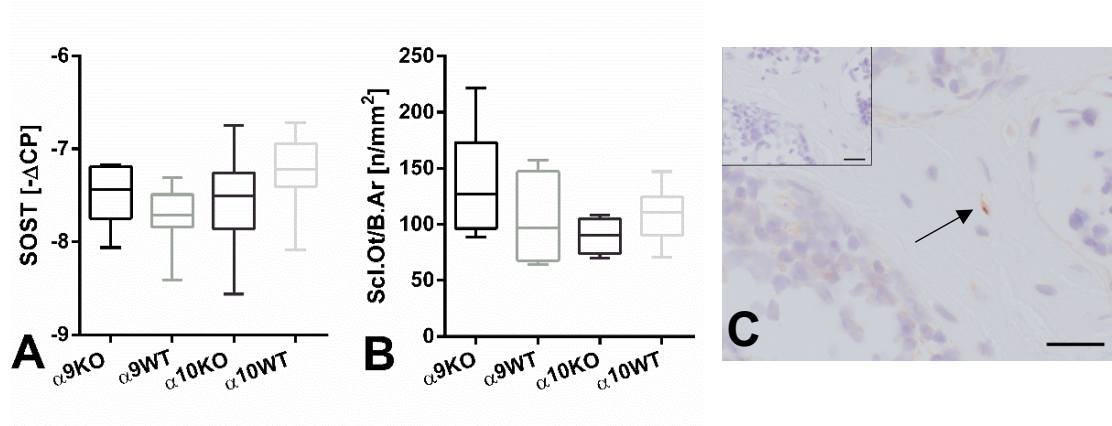


Abb. 29: SOST/Sclerostin in Osteozyten.

(A) Box-Whisker-Plots der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der SOST mRNA-Expression in der real-time RT-PCR und (B) der Anzahl Sclerostin-positiver Osteozyten in Relation zur Trabekelfläche (Sclerostin-positive osteocytes/bone area, Scl.Ot/B.Ar). (C) Bei der immunhistochemischen Färbung sind Sclerostin-positive Signale an der braunen Färbung zu erkennen. Ein Sclerostin-positiver Osteozyt ist von mehreren Sclerostin-negativen Osteozyten umgeben (Pfeil). Das Inset stellt die Negativkontrolle dar. Maßstab 20 μm . Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

Als Hauptquelle für RANKL und OPG nehmen Osteozyten Einfluss auf das Vorantreiben oder Ausbremsen der Osteoklastogenese. Bei Experimenten der real-time RT-PCR wurde die Expression von RANKL und OPG bestimmt. Während sich die Gruppen nicht in ihrer RANKL-Expression unterschieden, wiesen die $\alpha 10\text{KO}$ -Tiere verminderte mRNA-Level von OPG ($-6,75 \pm -0,47 -\Delta\text{CP}$) im Vergleich zu den $\alpha 10\text{WT}$ -Tieren auf ($-5,83 \pm -0,49 -\Delta\text{CP}$, $p \leq 0,002$, Abb. 30B). Die relative Expression des Verhältnisses von RANKL und OPG betrug im Mittel 1,05 in der Gruppe der $\alpha 9\text{KO}$ und 1,49 in der Gruppe der $\alpha 10\text{KO}$ (Abb. 30 C).

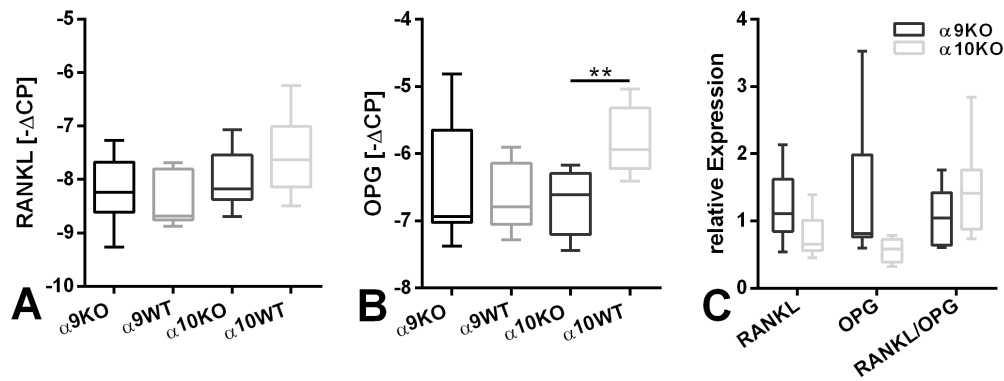


Abb. 30: RANKL und OPG in Osteozyten.

Box-Whisker-Plots der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der mRNA-Expression von (A) receptor activator NF-kB ligand (RANKL) und (B) Osteoprotegerin (OPG) sowie (C) die relative Expression der Parameter. ** $p \leq 0,01$.

Mit der TEM gelang die Untersuchung der Ultrastruktur der Osteozyten, bestehend aus der Beurteilung des perizellulären Raums des Osteozyten in seiner Lakune, der Morphologie der Zytoplasmamembran, des Zellkerns und der Zellkernmembran sowie das Vorhandensein von Vakuolen (Abb. 31). Mithilfe eines Scoringssystems wurde die Morphologie der Osteozyten in Kategorie 1 - gesunde Osteozyten, Kategorie 2 - degenerierende Osteozyten und Kategorie 3 - sterbende Osteozyten eingeteilt. Die Osteozyten der Gruppe der α9KO-Mäuse wiesen im Mann-Whitney-Test eine signifikant erhöhte Anzahl an degenerierenden und sterbenden Osteozyten verglichen mit den α9WT-Mäusen ($p \leq 0,001$) auf. Lediglich 18,43 % der Osteozyten der α9KO-Tiere waren Kategorie 1 zuzuordnen, 56,47 % Kategorie 2 und 25,1 % Kategorie 3, während 41,24 % der Gruppe der α9WT-Tiere zu Kategorie 1 eingegliedert wurden, 47,46 % zu Kategorie 2 und 11,3 % zu Kategorie 3 (Abb. 32). Zwischen den Osteozyten der α10KO- und α10WT-Mäuse wurden keine statistisch signifikante Veränderung im Kruskal-Wallis-Test beobachtet.

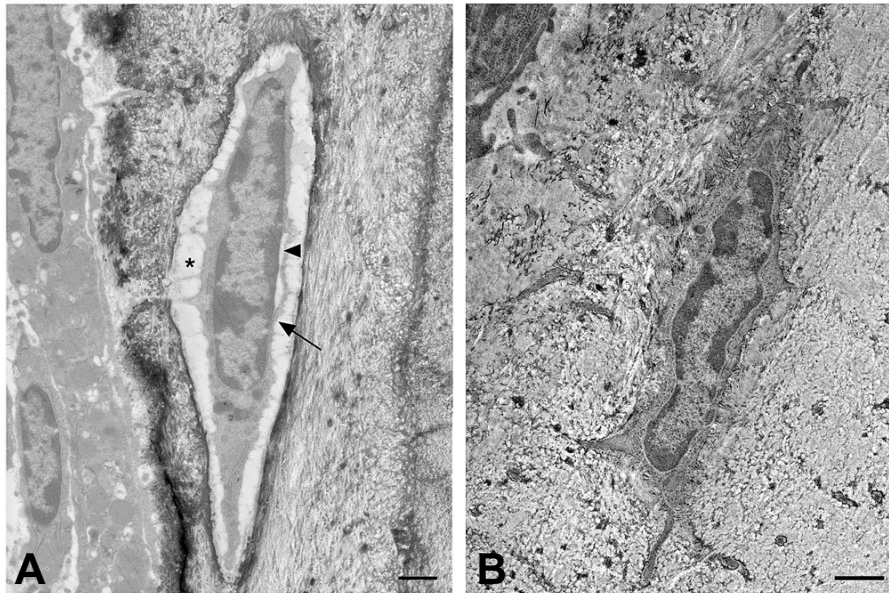


Abb. 31: Ultrastruktur der Osteozyten in der TEM.

TEM-Bilder der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers L4. (A) Morphologisch stellt sich ein $\alpha 9$ KO-Osteozyt mit erweitertem perizellulären Raum (*), Faltung der Zytoplasmamembran (Pfeil) und Erweiterung der Kerndoppelmembran (Pfeilkopf) dar und entspricht Kategorie 2, während (B) ein $\alpha 9$ WT-Osteozyt keine dieser Anzeichen für den Beginn einer Zelldegeneration zeigt und Kategorie 1 widerspiegelt. Maßstab 2 μ m. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

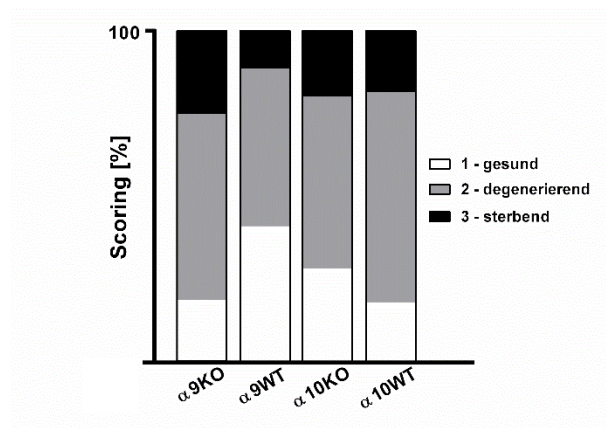


Abb. 32: Balkendiagramm der Ultrastruktur der Osteozyten in der TEM.

Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der Osteozyten in die jeweiligen Kategorien bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Osteozyten. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

3.6 Osteoklasten

In der Enzymhistochemie wurden die aktiven Osteoklasten mithilfe der TRAP-Färbung sichtbar gemacht und im Anschluss einer histomorphometrischen Analyse unterzogen. Sowohl der Parameter N.Oc/B.Pm ($\alpha 9$ KO: $5,81 \pm 2,07 \text{ mm}^{-1}$, WT: $4,52 \pm 2,58 \text{ mm}^{-1}$,

α 10KO: $5,42 \pm 2,52 \text{ mm}^{-1}$, WT: $7,53 \pm 2,21 \text{ mm}^{-1}$, Abb. 33A) als auch der Parameter Oc.Pm/B.Pm (α 9KO: $10,43 \pm 4,54$, WT: $9,23 \pm 7,25$; α 10KO: $8,25 \pm 5,89$, WT: $15,29 \pm 6,85$, Abb. 33B) wiesen keine Unterschiede zwischen den α 9KO- und α 9WT-Tieren oder den α 10KO- und α 10WT-Tieren auf. Molekularbiologisch wurde die Expression von CtsK bestimmt. Weder in den Gruppen der α 9KO- noch in den Gruppen der α 10KO-Mäuse waren Unterschiede am Gehalt von CtsK mRNA im Vergleich zu ihren WT-Mäusen zu messen (α 9KO: $-2,50 \pm -0,60 \text{ } \Delta\text{CP}$, WT: $-2,46 \pm -0,37 \text{ } \Delta\text{CP}$; α 10KO: $-2,15 \pm -0,48 \text{ } \Delta\text{CP}$, WT: $-1,93 \pm -0,38 \text{ } \Delta\text{CP}$, Abb. 33C).

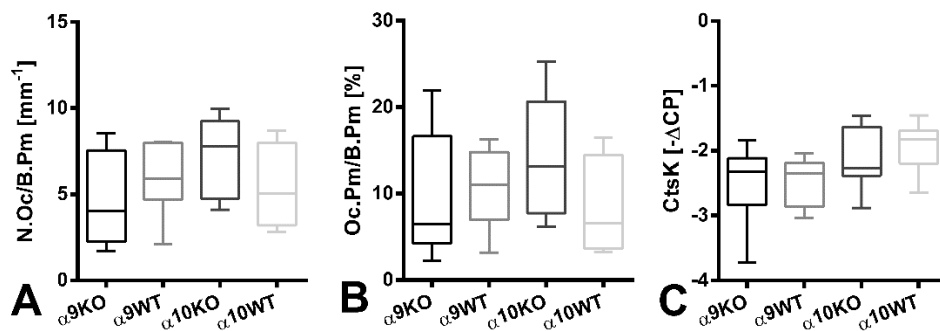


Abb. 33: TRAP und CtsK in Osteoklasten.

Box-Whisker-Plots der histomorphometrischen Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der Osteoklastenparameter (A) number of osteoclasts/bone perimeter (N.Oc/B.Pm), (B) osteoclast perimeter/bone perimeter (Oc.Pm/B.Pm). (C) Ergebnisse der mRNA-Expression von CathepsinK (CtsK). Quelle: Baumann et al., 2019.

3.7 Expression der Untereinheit α 9 in α 10KO- und α 10WT-Tieren

Die Formation eines nAChR aus α 9- und α 10-Untereinheiten ergibt α 9-Homopentamere oder α 9 α 10-Heteropentamere. Um die Expression von α 9-Untereinheiten bei α 10KO-Tieren zu testen, wurde der mRNA-Gehalt aus den Proben der Wirbelkörper bestimmt. Unterschiede in der Expression der α 9-Untereinheiten in α 10KO-Tieren wurden nicht beobachtet (α 10KO: $-14,44 \pm -0,88 \text{ } \Delta\text{CP}$, α 10WT: $-14,06 \pm -1,02 \text{ } \Delta\text{CP}$, Abb. 34).

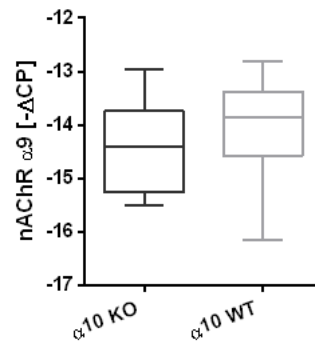


Abb. 34: Genexpression der Untereinheit $\alpha 9$ in $\alpha 10$ KO- und $\alpha 10$ WT-Tieren.

Box-Whisker-Plot der Ergebnisse (Mann-Whitney-Test) der mRNA-Expression von nAChR $\alpha 9$ in Proben der $\alpha 10$ KO- und $\alpha 10$ WT-Mäuse.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Charakterisierung des Knochenstatus von KO-Mäusen, welche entweder eine Deletion der $\alpha 9$ - oder der $\alpha 10$ -Untereinheit der nAChR aufwiesen, im Vergleich mit ihren korrespondierenden WT-Mäusen. Der Grundstein dieser Arbeit wurde mit dem Nachweis der Komponenten des cholinergen Systems im Knochen und der Expression der Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ von nAChR in murinen und humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen gelegt (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). Untersuchungen, bei denen positive Effekte auf die Proliferation und Vitalität von Osteoblasten und Osteozyten durch ACh verzeichnet wurden, zeigten die Relevanz des cholinergen Systems im Knochen (Sato et al., 2010; Ma et al., 2014). Im Rahmen von systemischen Knochenerkrankungen, wie Osteoporose, wurden Unterschiede in der Genexpression von nAChR $\alpha 10$ in osteogen differenzierten MSC nachgewiesen (Zablotni et al., 2015), welche das Interesse, die Funktion der Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ im Knochenremodeling zu charakterisieren, in den Fokus rücken. Darüber hinaus haben Untersuchungen der Knochenphänotypen von Mäusen mit einer Mutation der nAChR $\alpha 2$ oder $\alpha 7$ das Wissen über den Einfluss der nAChR auf den Knochenmetabolismus erweitert (Bajayo et al., 2012; Lips et al., 2015b; Mandl et al., 2016; Mito et al., 2017).

Vor diesem Hintergrund wurde der Knochenphänotyp der Kortikalis und des Trabekelwerks anhand von biomechanischen, morphologischen und densitometrischen Tests zur Beschreibung der Knochenstärke, Geometrie, Architektur und Mineralsalzdichte bestimmt. Diese wurden von histologischen und histomorphometrischen Analysen sowie von molekularbiologischen Untersuchungen ergänzt, um die Funktion und Aktivität der Knochenzellen genauer zu definieren. Abschließend wurde die Ultrastruktur der Osteozyten mithilfe der TEM untersucht. Die Studie wurde mit Tieren im Alter von 16–20 Wochen durchgeführt, da sie ab diesem Alter als adult eingestuft werden (Klein et al., 2001). Die Verwendung weiblicher Tiere begründet sich in ihrer erhöhten Anfälligkeit für Stoffwechsel- und Knochenerkrankungen im Gegensatz zu männlichen Artgenossen (Guggenbuhl, 2009).

4.1 Funktionelle und strukturelle Defizite der Kortikalis der $\alpha 9$ KO-Tiere

Kortikale Stärke und Geometrie

Die Auswertung der biomechanischen, morphologischen und densitometrischen Eigenschaften der Kortikalis des Knochens erfolgte mittels Drei-Punkt-Biegetest und μ CT. Die Materialeigenschaften des Knochens werden durch die Zusammensetzung aus organischer sowie anorganischer Matrix und Wasser bestimmt. Bei der Vorbereitung und Durchführung des biomechanischen Tests wurde auf das Feuchthalten der Knochenproben geachtet, da der Gehalt an Wasser die Sprödigkeit des Knochens bedingt. Eine Dehydrierung des Knochens resultiert in einer gesteigerten Brüchigkeit, während eine Hydrierung die Belastbarkeit des Knochens um das 2,5-fache steigern kann (Liebschner und Keller, 2005; Nyman et al., 2006). Im Drei-Punkt-Biegetest, der als Methode zur Untersuchung von langen Röhrenknochen der Maus weit verbreitet ist, wurden die biomechanische Stabilität der Diaphyse des Femurknochens getestet und die Parameter Biegesteifigkeit und Maximalkraft aus der Kraftverformungskurve bestimmt (Jepsen et al., 2015). Die Maximalkraft, die auf die Femurdiaphyse einwirkt und eine Fraktur auslöst, wird dabei als der präziseste Parameter für die Beurteilung der biomechanischen Eigenschaft angesehen. Die Messung der Biegesteifigkeit, bei der der Grad der elastischen Verformung des Knochens bei ansteigender Krafteinwirkung ermittelt wird, korreliert stark mit der Maximalkraft und ist allerdings von der methodischen Ausführung abhängig (Leppänen et al., 2008). Beide Parameter geben Rückschlüsse auf die Morphologie der Kortikalis und die Materialeigenschaften des Knochens (Jepsen et al., 2015). Im Gegensatz zu den Tieren der $\alpha 10$ -Gruppen präsentierten die $\alpha 9$ KO-Tiere eine hoch signifikant reduzierte Biegesteifigkeit und Maximalkraft im Vergleich zu ihren $\alpha 9$ WT-Mäusen. Die verminderte Biegesteifigkeit geht auf eine erhöhte elastische Deformierung des Knochens unter Krafteinwirkung zurück und wird durch den Grad der Mineralisierung des Knochens geprägt (Follet et al., 2004). Ein erhöhter Gehalt an Hydroxylapatit sorgt für eine größere Steifigkeit des Knochens, der die auf ihn einwirkenden Kompressionskräfte besser toleriert. Darüber hinaus verliert der Knochen an biomechanischer Kompetenz, wenn die Mineralisierung einen gewissen Grad hin zur Sprödigkeit übersteigt (Boivin et al., 2008). In der gegenwärtigen Studie ergab die Messung der TMD beider Abschnitte der Kortikalis des Femurs in der μ CT erniedrigte Werte in der Gruppe der $\alpha 9$ KO- verglichen mit der Gruppe der $\alpha 9$ WT-Tiere. Die reduzierten biomechanischen Parameter können durch eine

verminderte Mineralisierung, gemessen im Vergleich zu Kalibrierungsphantomen, hervorgerufen sein. Für die Charakterisierung der Stärke der Kortikalis ist neben der Messung der Mineralsalzdichte auch die Analyse der Geometrie und der Architektur notwendig. Zur Geometrie zählen die kortikale Fläche (Ct.Ar) und die das gesamte Gewebe einschließende Fläche (Tt.Ar) (Abb. 35). Beide Messungen der kortikalen Flächen zeigten signifikant verminderte Werte der Ct.Ar und Tt.Ar in den Knochen der α 9KO-Tiere, während sich das Verhältnis beider Flächen (Ct.Ar/Tt.Ar) und die kortikale Dicke (Ct.Th) nicht zwischen den Gruppen unterschied. Assoziiert zur Knochenquerschnittsfläche beeinflusst der Durchmesser des Knochenquerschnitts die Widerstandsfähigkeit eines Röhrenknochens, auf den Biegungs- oder Torsionskräfte einwirken. Ein größerer Durchmesser der Kortikalis bessert die Widerstandsfähigkeit des Knochens (Bouxsein und Seeman, 2009). Wird geschlussfolgert, dass eine reduzierte kortikale Fläche mit einem geringeren Querschnittsdurchmesser der Kortikalis einhergeht, kann dies als weiterer Grund für die eingeschränkte biomechanische Kompetenz der Kortikalis der Diaphyse der α 9KO-Femora genannt werden.

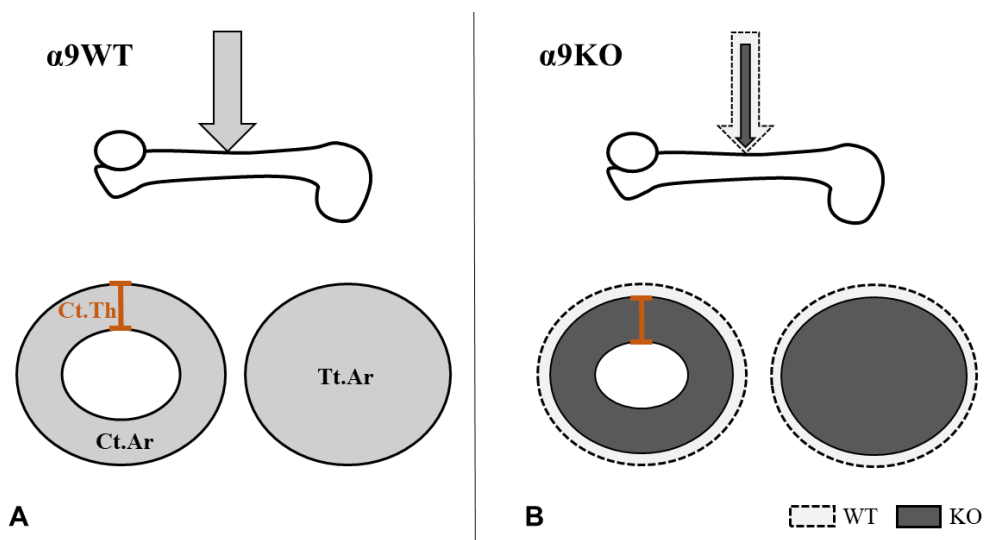


Abb. 35: Geometrie der Kortikalis der α 9KO und α 9WT-Tiere.

(A) Beim Drei-Punkt-Biegetest wird Kraft auf die Femurdiaphyse ausgeübt. Der Parameter cortical area (Ct.Ar) beschreibt die kortikale Fläche, während tissue area (Tt.Ar) die gesamte Fläche innerhalb der periostalen Begrenzung beinhaltet. Cortical thickness (Ct.Th) beschreibt die kortikale Dicke. (B) Die Femora der α 9KO-Tiere frakturierten bereits bei einer geringeren Kraft, welche auf die Femurdiaphyse ausgeübt wurde. Im Vergleich zu den WT-Tieren (gestrichelte Linie) zeigte die kortikale Geometrie der α 9KO eine verkleinerte Ct.Ar und Tt.Ar bei unveränderter Ct.Th.

Porosität der Kortikalis

Neben dem bereits oben erwähnten Parameter Ct.Th kann die Architektur der Kortikalis weiterführend durch den Parameter Porosität beschrieben werden. Allgemein werden Poren der Kortikalis in humanen Proben in drei Größenordnungen unterteilt. Poren mit einem Radius von ca. $0,01\ \mu\text{m}$ sind zwischen Hydroxylapatitkristallen und Collagenfibrillen zu finden, während Poren in einer Größenordnung von $0,15\text{-}0,55\ \mu\text{m}$ Kanalikuli mit osteozytären Dendriten und Poren mit einem Radius von $3\text{-}10\ \mu\text{m}$ durch die Lakunen der Osteozyten gebildet werden. Poren von Havers- und Volkmannkanälen mit Gefäßen und Nerven belaufen sich auf einem Radius von $20\text{-}25\ \mu\text{m}$ (Benalla et al., 2014; Cowin und Cardoso, 2015). Analog stellt sich die Porosität der Mausekortikalis aus Poren der Kanalikuli (Radius: $0,05\text{-}0,5\ \mu\text{m}$) und Lakunen (Radius: $2,5\text{-}10\ \mu\text{m}$), aus vaskulären Poren (Radius: $5\ \mu\text{m}$) und Makroporen (Radius: $25\ \mu\text{m}$) zusammen (Jepsen et al., 2015). Die Kortikalis der Maus ist im Gegensatz zu der des Menschen nicht aus Havers- und Volkmannkanälen aufgebaut. Die Non-Haverskanäle bei Nagetieren sind simple vaskuläre Kanäle im kompakten Knochen, die nicht von konzentrischen Lamellen umhüllt sind und in Erosionstunneln und Lakunen verlaufen (Enlow, 1962). In Übereinstimmung mit den Werten unserer $\alpha 9\text{WT-}$, $\alpha 10\text{KO-}$ und $\alpha 10\text{WT-}$ Mäuse wird in der Literatur die Porosität des Femurs verschiedener Mausstämmen zwischen $0,8 \pm 0,2\ \%$ bis $4,8 \pm 1,5\ \%$ beziffert (Cowin und Cardoso, 2015). Der Mittelwert der Porosität im mittlediaphysären Bereich der $\alpha 9\text{KO-}$ Tiere erreichte mit $0,06 \pm 0,08\ \%$ signifikant erniedrigte Werte. Die Porosität des distaldiaphysären Abschnitts der Kortikalis betrug im Mittel $0,35\text{-}0,77\ \%$ und zeigte sich zwischen den Gruppen ohne Signifikanz. Bei einer Bild-Pixel-Größe von $5,69\ \mu\text{m}$ in unserer $\mu\text{CT-}$ Untersuchung wurde die Porosität kleinster Poren von Collagen-Hydroxylapatit und den Kanalikuli der Osteozyten nicht erfasst. Da der Prozentanteil an Poren stark von der Auflösung und der Festlegung des Thresholds abhängt, ist der wahre Wert der Porosität der hier untersuchten Tiere höher zu erwarten (Palacio-Mancheno et al., 2014). Die reduzierte Porosität der mittlediaphysären Femurkortikalis der $\alpha 9\text{KO}$ lässt den Schluss zu, dass bei geringerem Anteil an vaskulären Poren, Lakunen und gegebenenfalls Kanalikuli eine Beeinträchtigung des osteozytären Netzwerks vorliegt. Die in den Poren strömende interstitielle Flüssigkeit stellt die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff zu den Zellkörpern der Osteozyten sicher. Ist die Organisation und die Versorgung des Netzwerks geringwertiger, so sind Einschränkungen in der Funktion der Osteozyten plausibel. In diesem Zusammenhang

kann die Detektion mechanischer und hormoneller Signale, ihre Umwandlung und Kommunikation behindert sein. Konkordant dazu wurde eine altersabhängige Reduktion des Volumens der Osteozytenlakunen und der kanalikulären Porosität der Femurkortikalis an humanen Proben gezeigt und eine Beeinträchtigung der Kommunikation der Osteozyten und ihrer mechanosensorischen und -transduktiven Funktion diskutiert (Ashique et al., 2017).

In den vaskulären Poren und Makroporen der Kortikalis befinden sich neben Gefäßen auch Nervenfasern sowie MSC und sich differenzierende Osteoblasten. Bisher existieren keine Daten über die Expression von nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$ in Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Gefäßen des Knochens. Glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen in der Plazenta von Ratte und Mensch exprimierten $\alpha 9$ und $\alpha 10$, während $\alpha 10$ zusätzlich in der thorakalen Aorta detektiert wurde (Brüggmann et al., 2002; Lips et al., 2005). Der akute Effekt von Nikotin auf glatte Muskelzellen von bspw. zerebralen oder mesenterialen Arterien wurde aufgrund der NO-Freisetzung als vasodilatierend beschrieben (Toda und Toda, 2010). Die Gefäße der Tibia hingegen reagierten nach zweiwöchiger Nikotingabe auf exogen zugeführtes Norepinephrin mit einer stärkeren Vasokonstriktion als Gefäße von Ratten, welche anstelle von Nikotin eine Placebolösung subkutan injiziert bekamen (Feitelson et al., 2003). Die in den Poren befindlichen Nervenfasern lassen sich durch die immunhistochemische Färbung der VAcHT als cholinerge Nervenfasern identifizieren (Bajayo et al., 2012). Nach derzeitigem Stand konnte das Vorhandensein von nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$ in Neuronen verschiedener Hirnregionen und in Spinalganglien nachgewiesen werden, im Knochen bisher jedoch nicht (Elgoyhen et al., 1994; Lips et al., 2002; Lykhmus et al., 2017).

Die reduzierte biomechanische Belastbarkeit des Femurs der Mäuse mit $\alpha 9$ -Deletion gibt Hinweise auf eine Funktionseinschränkung und verminderte Knochenstärke. Veränderungen der kortikalen Geometrie hin zu einer verkleinerten mineralisierten Fläche und die insgesamt verminderte TMD der Kortikalis der $\alpha 9$ KO-Tiere, die an beiden untersuchten Positionen der Femurdiaphyse herausgestellt worden sind, kommen als Ursache für die eingeschränkte biomechanische Kompetenz der Femora in Betracht. Die Messung einer verminderten Porosität der mittlediaphysären Femurkortikalis der $\alpha 9$ KO-Tiere kann als Reduktion der Osteozytendichte und Gefäßversorgung gedeutet werden. Die biomechanische, morphologische und densitometrische Analyse der Femora der $\alpha 10$ KO-Tiere stellte keine Unterschiede im Vergleich zu ihren Kontrolltieren heraus.

Eine Regulation der kortikalen Geometrie und Mineralsalzdichte der $\alpha 10$ KO-Tiere konnte nicht gezeigt werden.

4.2 Beeinträchtigung der Architektur der Trabekel der $\alpha 9$ KO-Tiere

Mineralsalzdichte und Knochenvolumenfraktion des Trabekelwerks

Konträr zur eingeschränkten biomechanischen Kompetenz der $\alpha 9$ KO-Mäuse der gegenwärtigen Studie wiesen weibliche, 16 Wochen alte nAChR $\alpha 7$ KO-Mäuse im Drei-Punkt-Biegetest eine signifikant erhöhte Biegesteifigkeit auf (Lips et al., 2015b). Diese gesteigerte Belastbarkeit der Kortikalis der Femurdiaphyse kann durch die erhöhten geometrischen Parameter Ct.Ar, Ct.Ar/Tt.Ar und Ct.Th begründet sein. Nennenswert sind hierbei die nicht signifikant veränderten Werte der BMD, die mittels DXA-Untersuchung der Wirbelsäule, des linken Femurs und des gesamten Körpers ermittelt wurden (Lips et al., 2015b). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte wiederum erhöhte BMD-Werte des Femurs von 8 Wochen alten $\alpha 7$ KO-Mäusen im Vergleich zu ihren WT (Mito et al., 2017). Neben dem Altersunterschied der untersuchten Tiere wurde die DXA-Messung der Arbeitsgruppe um Mito segmentiert vorgenommen, indem die BMD an 20 Positionen des Femurs von proximal nach distal detektiert wurde und zusätzlich ein mittlerer BMD errechnet wurde (Mito et al., 2017). Bei der Durchführung einer DXA-Messung wird ein zweidimensionales Projektionsbild erstellt und ein arealer BMD-Wert angegeben, bei dem umliegendes Gewebe zwangsläufig mit einbezogen wird. Die neuere Methode, das quantitative CT, ermöglicht eine dreidimensionale, volumetrische Messung, bei der kortikale und trabekuläre Abschnitte getrennt voneinander und neben dem Mineralsalzgehalt auch die Geometrie und Architektur der jeweiligen Struktur analysiert werden kann. Im klinischen Setting ist eine DXA-Messung im Vergleich zum quantitativen CT jedoch einfacher verfügbar, kostengünstiger und mit einer geringeren Strahlenbelastung assoziiert (Tatoń et al., 2013). Die Umsetzung der μ CT-Untersuchung an den Knochen der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit toleriert die zeitaufwendige Durchführung mit hoher Strahlenbelastung und profitiert von der höheren Auflösung knöcherner Strukturen mit einer Bild-Pixel-Größe von 5,69 μ m. Durch die Verwendung von Kalibrierungsphantomen mit definierten Massenkonzentrationen an Calciumhydroxylapatit wurde den Voxeln der μ CT-Bilder die Dichte des mineralisierten Gewebes zugeordnet. Neben Calciumhydroxylapatit sind kleine Mengen an Carbonat,

Magnesium und sauren Phosphaten in der Mineralphase zu finden, die jedoch aufgrund ihres geringen Anteils am Gesamtmineral bei der Messung der Mineralsalzdichte vernachlässigt werden können (Clarke, 2008). Die Bestimmung der BMD der trabekulären Strukturen des Lendenwirbelkörpers L1 und der distalen Femurmetaphyse ergab in beiden untersuchten Regionen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den $\alpha 9$ KO- und $\alpha 9$ WT-Tieren sowie zwischen den $\alpha 10$ KO- und $\alpha 10$ WT-Tieren. Diese Ergebnisse sind konform zu den unveränderten Werten der Knochenvolumenfraktion (BV/TV) (Kim und Henkin, 2015). Gestützt werden diese Ergebnisse auch durch die Auswertung der prozentualen Trabekelfläche des Wirbelkörpers in der klassischen Histomorphometrie an zweidimensionalen Schnitten, welche einer HE-Färbung unterzogen wurden. Die Analyse der B.Ar/T.Ar erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zusammenfassend liegen keine Veränderungen der quantitativen Eigenschaften (BMD, BV/TV) der trabekulären Knochenabschnitte von Wirbelkörper und Femurmetaphyse der $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere vor.

Architektur der Trabekel

Entgegen der unauffälligen Werte der BMD und BV/TV war die Architektur des Trabekelwerks der $\alpha 9$ KO-Tiere auffällig verändert. Das Trabekelwerk ist aufgrund seines großen Anteils an Knochenoberfläche ein wichtiger Schauplatz des Remodelings (Baron, 2000). Bereits kleine Modifikationen des Remodelings machen sich zunächst in der Struktur des Trabekelwerks, gekennzeichnet in Tb.N, Tb.Th und Tb.Sp, bemerkbar. Eine Reduktion der Tb.N ist dabei als weitaus negativerer Effekt auf die Knochenstärke zu sehen als die isolierte Dickenabnahme der Trabekel, da das Fehlen eines Trabekels mit der Schwächung der Konnektivität der gesamten Struktur einhergeht und eine geringere Widerstandsfähigkeit bei Belastung zur Folge hat (Burr und Akkus, 2014; Silva und Gibson, 1997). Typische Veränderungen einer Reduktion der Tb.N und eines Anstiegs der Tb.Sp wurden zusammen mit einer Reduktion der BV/TV bei osteoporotischen Knochen gesehen (Torres-del-Pliego et al., 2013). Entgegengesetzt imponierte die trabekuläre Morphologie der $\alpha 7$ KO-Mäuse in einer vorteilhafteren Architektur mit erhöhten Werten der BV/TV, Tb.Th, Tb.N und erniedrigten Werten der Tb.Sp und SMI, die zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften beitrugen (Lips et al., 2015b; Mandl

et al., 2016; Mito et al., 2017). In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich die Knochen der $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere nicht in BV/TV, Tb.N oder Tb.Sp von ihren Kontrolltieren. Die Dickenabnahme der Trabekel der $\alpha 9$ KO-Tiere im metaphysären Bereich des distalen Femurs ist gemeinsam mit den erhöhten Parametern BS/BV, Tb.Pf und SMI als Minderung der Mikroarchitektur zu betrachten (Abb. 36). Die Femurproben der $\alpha 10$ KO-Tiere zeigten mit erhöhten Werten der Tb.Sp und des SMI geringfügige Veränderungen der Trabekelstruktur. Die Parameter BS/BV, Tb.Pf und SMI beschreiben die Qualität des Trabekelnetzwerks, die sich aus der Form der einzelnen Trabekel und ihrer Verbindung miteinander, der Konnektivität, zusammensetzt. Eine Vergrößerung der Knochenoberfläche gegenüber dem Knochenvolumen zusammen mit der eher säulenartigen Trabekelform in einem zunehmend diskonnektierten Trabekelnetzwerk geht mit Einschränkungen der biomechanischen Belastbarkeit einher. Konkave Oberflächenstrukturen des Knochens, die einem niedrigen Tb.Pf entsprechen, gelten als Zeichen für gut miteinander verbundene Elemente, wohingegen konvexe Oberflächen mit erhöhten Werten des Tb.Pf, wie sie in der Spongiosa postmenopausaler Frauen gemessen wurden, eher diskonnektierte, isolierte Gefüge darstellen (Hahn et al., 1992). Analog dazu verweist der erhöhte mittlere SMI der $\alpha 9$ KO-Tiere auf das Vorhandensein von vermehrt stab- anstatt plattenähnlichen Strukturelementen. Während parallele Platten eher für einen stabileren Knochenaufbau sprechen, deuten vermehrt vorhandene zylindrische Säulen auf einen eher osteoporotischen Phänotyp hin (Hildebrand und Rüegsegger, 1997). Auffallend war, dass sich die morphologischen Parameter und die BMD des Trabekelwerks des Lendenwirbelkörpers zwischen den untersuchten Versuchsgruppen nicht unterschieden. Lediglich Tb.Pf und SMI waren in den Knochen der $\alpha 9$ KO-Tiere hochgradig erhöht. In Versuchen mit einem Mausmodell zum Thema senile Osteoporose wurde ein Anstieg der Parameter Tb.Pf und SMI verzeichnet. Im Detail wurden der Verlust interkonnektierter Trabekel und eine erhöhte Anzahl von Perforationen plattenähnlicher Strukturen beobachtet. Die Form der Trabekel ähnelte dem Bild dünner, länglicher Röhren. Aus einer geringeren Anzahl an Osteoprogenitorzellen und einer gesteigerten endostalen Knochenresorption im Alterungsprozess, der an den SAMP6-Mäusen untersucht wurde, ging die Tendenz zu einer reduzierten Knochenstärke hervor. Die Konstellation gleicht damit dem humanen Setting im Alterungsprozess (Chen et al., 2009; Chen und Kubo, 2012).

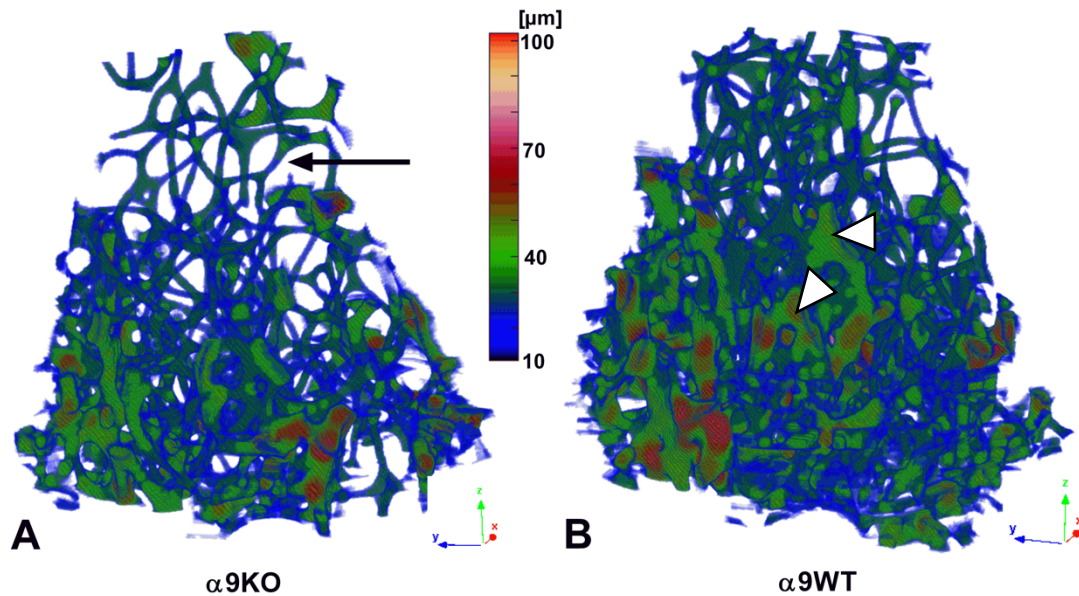


Abb. 36: 3D-farbcodiertes Modell der trabekulären Dicke der Femurmetaphyse.

Die Rekonstruktion der Trabekel der distalen Femurmetaphyse einer (A) $\alpha 9$ KO- und (B) $\alpha 9$ WT-Maus als 3D-Modell wurde mit dem Parameter trabecular thickness (Tb.Th) assoziiert. Während blaufarbene Trabekel eine Dicke von ca. 10-20 μm aufweisen, repräsentieren grüne Bereiche ca. 40 μm starke Trabekel. Das Modell der $\alpha 9$ KO-Maus besitzt einen größeren Anteil an länglichen, dünnen Trabekeln (Pfeil). Im Modell der $\alpha 9$ WT-Maus sind vermehrt grünfarbene, plattenähnliche Strukturen (Pfeilkopf) sichtbar. Quelle: Baumann et al., 2019.

Zusammenfassend ist es eindrucksvoll, dass unabhängig der quantitativen Eigenschaften (BMD, BV/TV) des spongiösen Knochens eine Veränderung der trabekulären Mikrostruktur der $\alpha 9$ KO-Tiere vorzufinden war. Diese war durch eine Dickenabnahme der Trabekel und dem Vorhandensein einer eher diskonnektierten Trabekelstruktur mit einem größeren Anteil an säulenartigen Strukturelementen bei unveränderter Trabekelanzahl gekennzeichnet. Die Merkmale eines typisch osteoporotischen Knochenphänotyps mit Reduktion von BMD, BV/TV und Tb.N sind anhand der Ergebnisse der μCT -Untersuchung nicht vorzufinden. Die übereinstimmenden Ergebnisse der eingeschränkten Architektur der Trabekel in der Femurmetaphyse und dem Lendenwirbelkörper sprechen für einen systemischen Effekt der $\alpha 9$ -Deletion auf den Knochenstoffwechsel. Die feinjustierte Abstimmung des Remodelings durch Osteozyten ist Grundvoraussetzung für die Stärke des Knochens und seine Kompensationsfähigkeiten, mechanische Belastung und Mikroverletzungen auszugleichen und zu reparieren. Die Hypothese, dass Rezeptoren mit der Untereinheit

$\alpha 9$ eine Rolle für die physiologische Osteozytenfunktion und Knochenhomöostase besitzen, wird nachfolgend weiter erörtert.

Das Trabekelwerk der $\alpha 10$ KO-Tiere zeigte nur geringfügige Beeinträchtigungen ihrer Architektur im Bereich der distalen Femurmetaphyse. Schlussfolgernd wurden keine Unterschiede in den morphologischen und densitometrischen Eigenschaften der trabekulären Bereiche der $\alpha 10$ KO-Tiere im Vergleich zu ihren Kontrolltieren herausgestellt.

4.3 Keine Regulation der Osteoklasten der $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere

Der Auf- und Umbau der azellulären Knochenmatrix wird durch die Aktivität und die Interaktion der Knochenzellen bestimmt. Wie die bisher beschriebene eingeschränkte biomechanische Funktion und veränderte Struktur der Knochen der $\alpha 9$ KO-Tiere durch Veränderungen auf zellulärer Ebene begründet werden können, wird folgend betrachtet. Der Anstieg der Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten und die gesteigerte Osteoklastenaktivität, gemessen an der Genexpression von CtsK, in Knochen von nAChR $\alpha 2$ KO- und mAChR M₃R KO-Mäusen resultierte in einer reduzierten Knochenmasse und eingeschränkten biomechanischen Eigenschaften (Bajayo et al., 2012; Lips et al., 2015a). Entgegengesetzt ging die erhöhte Knochenmasse von nAChR $\alpha 7$ KO-Mäusen in-vivo und in-vitro mit erniedrigten Knochenresorptionsparametern einher (Lips et al., 2015b; Mandl et al., 2016; Mito et al., 2017). In der vorliegenden Studie wurde eine enzymhistochemische Färbung der TRAP mit anschließender histomorphometrischer Analyse durchgeführt und mittels real-time RT-PCR die Expression von CtsK untersucht. Weder die Zahl noch die Auflagefläche der am Knochen liegenden Osteoklasten waren im Verhältnis zum Perimeter der Trabekel in beiden untersuchten Gruppen unterschiedlich. Ebenso wurde molekularbiologisch kein Unterschied am mRNA-Gehalt von CtsK der Wirbelkörper ermittelt. Folglich liegt kein Hinweis auf den Einfluss der Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ auf die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten vor.

4.4 Verminderte mRNA-Expression von Collagen in Osteoblasten der α 9KO-Tiere

Veränderungen im Knochenremodeling, welche das Gleichgewicht zwischen Resorption und Formation von Knochen zugunsten der Resorption beeinträchtigen, ergeben eine katabole Stoffwechsellage. Da die Osteoklastenaktivität in den Knochen der α 9KO- und α 10KO-Tiere nicht als überschießend einzustufen ist, ist die Vermutung einer Beeinträchtigung der Knochenformation naheliegend. Prämaturre Osteoblasten synthetisieren einen großen Anteil an ALP, welche die Synthese anorganischer Knochenmatrix durch die Hydrolyse von Pyrophosphaten in PO_4^{3-} -Monomere unterstützt. Das Enzym ist membrangebunden auf der extrazellulären Seite von Osteoblasten und abgeschnürten Matrixvesikeln zu finden (Hasegawa, 2018). Die Genexpression von ALP zeigte zwischen den α 9KO- und ihren WT-Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Die Proben der α 10KO-Tiere hingegen beinhalteten einen verminderten mRNA-Gehalt an ALP, welcher keine Entsprechung in den histomorphometrischen und densitometrischen Ergebnissen fand. Die Ergebnisse der enzymhistochemischen ALP-Färbung an Schnitten des Wirbelkörpers zeigten keine Veränderungen des ALP-positiven Trabekelperimeters im Verhältnis zum gesamten Knochenperimeter (ALP.Pm/B.Pm) in beiden KO-Gruppen im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT. Im Gegensatz zu der intensiveren Färbung der ALP in Proben der α 10- war eine geringe Färbeintensität in Proben der α 9-Tiere auffällig. Da die Mausstämme jedoch getrennt voneinander gezüchtet wurden und Unterschiede in der Manipulation des genetischen Hintergrundes vorliegen, ist ein Vergleich zwischen diesen Stämmen unterlassen worden. Der Vorgang der Mineralisierung ist ein feinabgestimmter Prozess, welcher von Proteinen, wie ALP und DMP-1, und dem Vorhandensein von ausreichend Substrat abhängig ist. Bei der primären Mineralisierung wird Hydroxylapatit in das Scaffold organischer Matrix abgelagert. Sekundär erfolgt ein Reifungsprozess, bei dem sowohl die Anzahl als auch die Größe der Mineralkristalle ansteigen und die Steifigkeit des Knochens verbessern (Golub, 2009). In Situationen, in denen ein hoher Knochenumsatz mit einer unausgeglichene Balance von Knochenformation zugunsten der Knochenresorption stattfindet, kann die vollständige und effiziente sekundäre Mineralisierung eingeschränkt sein. Daraus ergeben sich neben der Reduktion der Knochensteifigkeit auch Auswirkungen auf die Vernetzung der Collagenfibrillen (Viguet-Carrin et al., 2006).

Die Synthese der organischen Knochenmatrix mit ihrer Hauptkomponente Collagen Typ 1 ist eine weitere Aufgabe von Osteoblasten und jungen Osteozyten. Zur Beurteilung der prozentualen Osteoidfläche wurde die Kossa-van-Gieson-Färbung durchgeführt, welche keine Veränderungen zwischen den Gruppen offenbarte. Einerseits ist der Anteil an Osteoid im Knochen während des konventionellen Remodelings im Gegensatz zum Remodeling nach Fraktur sehr gering. Andererseits ist die Limitation der histomorphometrischen Analyse zu bedenken. Eine Collagenfaser besteht aus drei Polypeptidketten, die aus zwei pro- $\alpha 1$ -(*Col1 α 1*)-Ketten und einer pro- $\alpha 2$ -(*Col1 α 2*)-Kette eine Triplehelix bilden (Vicary et al., 2017). Dieses Pro-Collagen wird posttranslational modifiziert und nach extrazellulär sezerniert, wo nach Abtrennen der N- und C-terminalen Propetide die Formation von Collagenfibrillen stattfindet. Mithilfe von Lysyloxidasen entstehen intermolekulare und interfibrilläre Vernetzungen. Der Aufbau und die Anordnung der Collagenfibrillen bilden die Grundlage für die Ablagerung und Verteilung von Mineral. Während die anorganische Matrix für die Steifigkeit des Knochens sorgt, verkörpert die organische Matrix die Fähigkeiten, Energie zu absorbieren und sich zu verformen, wobei die Orientierung der Collagenfasern an die Richtung der einwirkenden Kraft angepasst wird (Viguet-Carrin et al., 2006). Im Mausmodell der senilen Osteoporose präsentierten SAMP6-Mäuse spröde und schwache Knochen, deren Collagenfibrillen im Vergleich zu Kontrolltieren weniger longitudinal angeordnet waren und für eine erhöhte Brüchigkeit der Knochen verantwortlich gemacht wurden (Silva et al., 2006). Bei Versuchen mit Ratten, bei denen eine postmenopausale Osteoporose durch eine Ovariectomie induziert wurde, fanden sich Veränderungen in der organischen Knochenmatrix von Wirbelkörpern. Neben weniger kompakt organisierten Collagenfibrillen wurde immunhistochemisch eine inhomogene Verteilung von Collagen Typ 1 beschrieben (Daghma et al., 2018). Mäuse mit einer Mutation des mAChR M₃R, die einen osteoporotischen Phänotypen präsentierten, wiesen eine signifikant verminderte Expression von *Col1 α 1* und *Col1 α 2* auf (Kliemann et al., 2012; Lips et al., 2015a). Im Rahmen der familiär gehäuften Osteoporose wurden Veränderungen der Collagenstruktur, welche mit einem Polymorphismus der Sp1-Bindungsstelle des *Colla1*-Gens in Verbindung gebracht wurden, thematisiert (Viguet-Carrin et al., 2006). Dieser Polymorphismus bewirkt die gesteigerte Transkription des *Colla1*-Gens im Gegensatz zur Transkription von *Colla2*. Das veränderte Verhältnis der Collagenketten wird als potentieller Einflussfaktor in der Pathogenese osteoporotischer Frakturen diskutiert (Mann et al., 2001). In der gegenwärtigen Studie wiesen die Proben der $\alpha 9$ KO-

Tiere eine signifikant verminderte mRNA-Expression von $\text{Col1}\alpha 1$ auf, wohingegen sich die Werte der $\alpha 10\text{KO}$ - nicht von ihren WT-Mäusen unterschieden. Knochen von Mäusen mit einer Deletion des nAChR $\alpha 7$, die eine gesteigerte Knochenmasse aufwiesen, zeigten keine Regulation der Collagenexpression (Kliemann et al., 2012). Bei Experimenten mit Meerschweinchen, welchen über vier Wochen täglich Nikotin subkutan injiziert wurde, zeigten sich in ihrer Haut weniger kompakt angeordnete Collagenbündel mit einer erhöhten Anzahl an interfibrillären Lücken (Eltony und Ali, 2017). Bei in-vitro-Versuchen wurden die $\alpha 3$ nAChR dermalen Fibroblasten durch Nikotin zur Expression von Collagen Typ 1 stimuliert (Arredondo et al., 2003). Vicary und Mitarbeiter demonstrierten an immunhistochemischen Gewebeschnitten von Mäusen, welche 8–12 Wochen Nikotin über das Trinkwasser konsumierten, eine gesteigerte Collagensynthese in unmittelbarer Nähe zu Luftwegen und Gefäßen. Genauer beschrieben sie die stimulierenden Effekte von Nikotin auf die Proliferation von Fibroblasten der Lunge und deren Expression und Freisetzung von Matrixproteinen, darunter Collagen Typ 1 und Fibronectin, via $\alpha 7$ nAChR. Zudem verzeichneten sie eine Aktivierung der Proliferationssignale, welche durch eine erhöhte Phosphorylierung von extracellular signal-regulated kinases (ERK) und mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3) nachgewiesen wurde (Vicary et al., 2017). Der Einfluss von Nikotin auf humane Osteoblasten in-vitro wurde als dosisabhängiger Effekt beschrieben. Hohe Nikotinkonzentrationen führten zu einer verminderten Genexpression von $\text{Collagen1}\alpha 1$ (Kim et al., 2012; Rothem et al., 2009). Da Nikotin an nAChR $\alpha 9$ antagonistisch wirkt (Sgard et al., 2002), ist ein indirekter Effekt von Nikotin auf die Collagenexpression möglich. Um dieser Hypothese nachzugehen, könnten zukünftige in-vitro Versuche mit osteogen differenzierten Kulturen von MSC adulter $\alpha 9$ -Tiere den Einfluss von Nikotin auf die Aktivität der Osteoblasten und die Collagenexpression untersuchen. Die Veränderung der Collagenexpression in den Osteoblasten der adulten $\alpha 9\text{KO}$ -Tiere könnte die Basis für Verschlechterungen der Mineralisierung der Kortikalis und der Architektur der Trabekel im μCT sowie die gesteigerte Brüchigkeit im Drei-Punkt-Biegetest bilden. Eine cholinerge Regulation der Collagensynthese in Knochen, vermittelt durch nAChR $\alpha 9$ auf Osteoblasten, ist vorstellbar.

4.5 Beeinträchtigung der Morphologie und Funktion der Osteozyten in α 9KO-Tieren

Im Netzwerk der Osteozyten trägt das Transmembranprotein Cx43 zur interzellulären Kommunikation und zum Austausch kleiner Moleküle, wie ATP und PGE₂, und Ionen mit der extrazellulären Umwelt bei. Neben der Kontaktaufnahme zwischen Osteozyten und Osteoblasten via Gap-Junctions kommt den Connexonen, die als Hemikanäle der Kommunikation mit dem Extrazellulärraum dienen, wichtige Funktionen für das Detektieren mechanischer Belastung und das Überleben der Osteozyten zu (Xu et al., 2015). Die Etablierung eines Mausmodells mit einer konstitutiven homozygoten Deletion von Cx43 ist aufgrund der essenziellen Bedeutung bei der Erregungsausbreitung in Kardiomyozyten erschwert. Modelle mit transgenen Tieren, deren Cx43-Mutationen durch verschiedene Promotoren ins Genom inseriert wurden, variieren in ihrem knöchernen Phänotyp abhängig vom Promotor (Moorer und Stains, 2017). Mäuse mit einer Cx43-Deletion durch einen Col1 α 1-Promotor präsentierten eine verminderte Knochenstärke mit reduzierter BMD und Ct.Th (Xu et al., 2015). Eine Cx43-Deletion mit dem Promotor Dermo1/Twist2 resultierte in desorgansierter collagener Matrix, welche die Knochenqualität negativ beeinflusste (Moorer und Stains, 2017). Transgene Mäuse mit einer Cx43-Deletion über einen DMP-1-Promoter zeigten eine erhöhte Apoptoserate der Osteozyten und eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten mit konsekutiv verstärkter Knochenresorption besonders an endokortikalen Oberflächen bei gleichzeitiger periostaler Knochenformation (Davis et al., 2017). Auf zellulärer Ebene werden die Effekte von Cx43 via ERK, PKA, β -Catenin sowie Proteinkinase C- δ (PKC- δ) vermittelt, welche nachfolgend die Aktivität von Runx2 stimulieren und die Apoptose von Osteozyten hemmen (Moorer und Stains, 2017). Zudem ist Cx43 in Osteozyten an der Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beteiligt, indem β -Catenin stabilisiert wird und in den Zellkern transloziert, wo es an Transkriptionsfaktoren für Wnt-assoziierte Gene bindet und u. a. die Expression von OPG erhöht (Bivi et al., 2013). In der gegenwärtigen Studie wurde aus den Proben des Brustwirbelkörpers Th10 eine real-time RT-PCR zur Analyse der Cx43 mRNA durchgeführt, welche eine verminderte Expression von Cx43 in α 9KO-Tieren zeigte, während Cx43 in α 10KO-Tieren nicht reguliert wurde. Der Nachweis von Cx43 Protein gelang immunhistochemisch. Cx43-positive Signale waren mit makulärem und fibrillärem Muster überwiegend in der Nähe von Osteozyten zu beobachten, deren Dendriten Hemikanäle und Gap-Junctions

exprimierten. Zusätzlich waren positive Signale in Osteoblasten, Megakaryozyten des Knochenmarks und in Gefäßen zu erkennen. Zusammenfassend sorgt Cx43 besonders in kortikalen Knochenanteilen für die Förderung der Differenzierung der Osteoblasten und der Vitalität der Osteozyten, für die Koordination der Ablagerung organischer Knochenmatrix und die Mäßigung der Osteoklastogenese. Basierend auf der Veränderung zellulärer Komponenten wird die strukturelle Komponente der azellulären Knochenmatrix, besonders die kortikale Geometrie, durch Cx43 geprägt (Moorer und Stains, 2017) und kann als Grund für die Veränderungen des Knochenphänotyps der α 9KO-Tiere in Betracht kommen.

Bei einem Funktionsverlust der Gap-Junctions zeigten York et al. (2016), dass die Expression von Sclerostin bei übersteigerter physiologischer Belastung des Knochens anstieg. Schlussfolgernd sprachen sie der interzellulären Kommunikation durch Gap-Junctions eine bedeutende Rolle für die Regulation des Remodelings zu (York et al., 2016). Im Rahmen einer Krafteinwirkung auf den Knochen, bei der mechanische in biochemische Signale transformiert werden, wird die Knochenformation durch das Herunterregulieren der *SOST*-Expression in Osteozyten gefördert (Niedźwiedzki und Filipowska, 2015). Robling et al. (2008) demonstrierten an Mäusen, welche einer gesteigerten mechanischen Belastung der Ulna unterzogen wurden, eine Reduktion an *SOST* auf mRNA-Level und Sclerostin auf Proteinlevel (Robling et al., 2008). Das Glykoprotein Sclerostin als antagonistischer Ligand des LRP 5-Rezeptors unterbindet die knochenanabole Signalvermittlung über den Wnt/ β -Catenin-Weg. Weiterführende Versuche wiesen auf einen direkten Einfluss der Wnt/LRP 5-vermittelten Signalkaskade bei der mechanisch vermittelten Knochenformation hin (Akhter et al., 2004; Sawakami et al., 2006). Experimente einer Überexpression von *SOST* in transgenen Mäusen bildeten einen Rückgang der Osteoblastenaktivität und folglich auch der Knochenformation ab (Winkler et al., 2003). In klinischen Studien an postmenopausalen Frauen wurde der positive Effekt einer Therapie mit dem Sclerostin-Antikörper Blozosumab durch das Ansteigen der BMD im Bereich der Lendenwirbelsäule und der Hüfte gezeigt (McColm et al., 2014; Recker et al., 2015). Poole und Mitarbeiter wiesen Sclerostin-positive Osteozyten umgeben von reichlich mineralisierter Matrix entfernt der aktiven Knochenoberfläche nach (Poole et al., 2005). In der gegenwärtigen Untersuchung wurden übereinstimmende Ergebnisse in der Immunhistochemie gezeigt. Vorwiegend tief eingebettete Osteozyten erwiesen sich als Sclerostin-positiv, wobei ein Teil der

benachbarten Osteozyten kein positives Signal für Sclerostin aufzeigten. Die histomorphometrische Auswertung Sclerostin-positiver Osteozyten in Relation zur Trabekelfläche (Scl.Ot/B.Ar) sowie die durchgeführte real-time RT-PCR zur Untersuchung der *SOST*-Expression stellten keine Unterschiede zwischen den Gruppen heraus. Für die Analyse der mRNA wurde der gesamte Wirbelkörper Th10 in der Schwingmühle zerkleinert. Da die mechanische Belastung des Knochens je nach Lokalisation innerhalb des Wirbelkörpers variiert, verschwimmen mögliche lokale Unterschiede bei der Verwendung des Wirbelkörpers in seiner Gesamtheit (Schulte et al., 2011). Neben der Rolle bei der Mechanotransduktion wird die Expression von *SOST* metabolisch durch Hormone und inflammatorische Mediatoren beeinflusst. Während PGE_2 und PTH die Expression von *SOST* vermindert, wird sie durch $\text{TNF}\alpha$ hochreguliert (Chen et al., 2015).

Die Ultrastruktur der Osteozyten wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei waren eine verringerte Anzahl vitaler Osteozyten und eine Zunahme degenerierender und sterbender Osteozyten sowie leerer Osteozytenlakunen in Präparaten der $\alpha 9\text{KO}$ -Tiere zu verzeichnen, während die Osteozyten der $\alpha 10\text{KO}$ -Tiere ihren WT glichen. Fehlende mechanische Belastung sowie Veränderungen humoraler und hormoneller Einflüsse führen zu Veränderungen des Proteinsynthesemusters, begünstigen die Apoptose von Osteozyten und locken Osteoklasten zur Knochenresorption an. Zentraler Mediator der Resorption ist RANKL, welcher vorrangig von Osteozyten synthetisiert wird und an RANK-Rezeptoren auf Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen bindet (Nakashima et al., 2011). Das Ködern von RANKL durch OPG verhindert die RANKL-vermittelte Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten (Yasuda et al., 1998). Das Verhältnis von RANKL und OPG wird zur Beschreibung der Balance von Resorption und Knochenformation genutzt. Mito und Mitarbeiter (2017) bestimmten an WT-Mäusen den Serumgehalt von OPG und RANKL nach Nikotingabe und nach Durchführung einer Vagotomie. WT-Mäuse mit Vagotomie und $\alpha 7\text{KO}$ -Mäuse präsentierten einen verminderten RANKL/OPG-Quotienten zugunsten der Knochenformation (Mito et al., 2017). Konform dazu wurde in-vitro eine Senkung der RANKL-assoziierten Stimulation der Osteoklastogenese in murinen $\alpha 7\text{KO}$ -Zellen nachgewiesen (Mandl et al., 2016). Inverse Ergebnisse mit einer Erhöhung des Quotienten von RANKL/OPG ergaben sich bei WT-Mäusen nach Nikotinapplikation (Mito et al., 2017). Experimente mit Osteozyten-ähnlichen Zellen zeigten ebenso einen stimulierenden Effekt von ACh auf die

RANKL-Synthese (Ma et al., 2014). Die $\alpha 9$ KO- und $\alpha 10$ KO-Tiere wiesen im Vergleich zu ihren jeweiligen WT keine Regulation der RANKL-Expression auf. Der verminderte Gehalt an OPG mRNA in $\alpha 10$ KO-Tieren spiegelte sich nicht im Verhältnis der relativen Expression von RANKL und OPG wider. Da bei der real-time RT-PCR die Gesamtheit der Zellen des Wirbelkörpers, Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten, Bone-Lining-Zellen, Endothelzellen, Knochenmarkszellen und Knorpelzellen untersucht wurde, ist eine Unschärfe der Messung im Vergleich zu Versuchen mit Osteozytenreinkulturen zu bedenken. Zudem ist ein kongruenter Verlauf des Gehalts an mRNA und Protein nicht zwangsläufig vorzufinden, sodass abweichende Ergebnisse entstehen können und den Vergleich zu Untersuchungen von Serumanalysen erschweren (Delgado-Calle et al., 2017). In-vivo Versuche an Ratten, deren Maxilla einer Expansion unterzogen wurden, zeigten die cholinerge Regulation des Knochenremodelings. Nach drei Tagen Expansion war eine gesteigerte Expression von ACh und nAChR $\alpha 10$ sowie eine Reduktion des Verhältnisses von RANKL und OPG als Zeichen der gehemmten Knochenresorption und damit forcierten Knochenformation zu verzeichnen. Che et al. (2016) demonstrierten somit eine Beteiligung des cholinergen Systems am Knochenremodeling durch die Regulation von RANKL und OPG. Darüber hinaus sprachen sie ACh eine Rolle im Rahmen der Knochenformation zu (Che et al., 2016).

In Zusammenschau der Ergebnisse ist die Funktion der Osteozyten, das Knochenremodeling und die Mineralhomöostase aufrechtzuerhalten und zu koordinieren, in den $\alpha 9$ KO-Tieren als eingeschränkt zu betrachten. Dies begründet sich in der erhöhten Anzahl degenerierender und sterbender Osteozyten in der TEM und der reduzierten Expression von Cx43. Veränderungen in der Cx43 Expression, welche die Vitalität der Osteozyten und ihre Funktionen bei Kommunikation und Mechanotransduktion bedingen, können Alterationen der Collagensynthese und Mineralisierung hervorbringen. In der Folge sind Einschränkungen der Qualität der Knochenmatrix möglich, ehe es zum Verlust reiner Knochenmasse kommt.

4.6 Cholinerge Regulation des Knochenstoffwechsels durch nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien deuten auf einen Einfluss der $\alpha 9$ -Untereinheit der nAChR auf die Funktion der Osteozyten und Osteoblasten hin. Neben der Veränderung der Ultrastruktur der Osteozyten der $\alpha 9$ KO-Tiere mit verstärktem Auftreten von Zeichen der Zelldegeneration wurde eine verminderte Expression von Cx43 gemessen. Das Transmembranprotein Cx43 ist für die Vitalität, Mechanotransduktion und Kommunikation der Osteozyten essenziell. Die Interaktion mit knocheneigenen Zellen und Zellen anderen Ursprungs ist wesentlich von der Homöostase der Osteozyten abhängig. Remodeling und Mineralisierung werden durch Veränderungen des Expressionsmusters und der Aktivität der Zellen beeinflusst. Die verminderte Collagenexpression der Osteoblasten der $\alpha 9$ KO-Mäuse kann als Grund für die minderwertigere Trabekelarchitektur im Vergleich zu ihren Kontrolltieren in Betracht kommen. Eine Beeinflussung des Expressionsmusters sowie der Anzahl und Aktivität der Osteoklasten wurde in der Gruppe der $\alpha 9$ KO-Tiere nicht beobachtet. Die Relevanz der vorliegenden $\alpha 9$ -Deletion auf den Stoffwechsel sowie die Stärke des Knochens wird aufgrund der Ergebnisse des Drei-Punkt-Biegetests und der μ CT-Untersuchung deutlich. Die Femora der $\alpha 9$ KO-Tiere präsentierten eine eingeschränkte biomechanische Knochenstärke sowie reduzierte Werte der geometrischen Parameter und TMD der Kortikalis, welche eine geringere Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit zur Folge haben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 37 veranschaulicht.

Die Knochen der $\alpha 10$ KO-Mäuse zeigten keine relevanten Veränderungen des Knochenstoffwechsels, welche sich in biomechanischen, morphologischen und densitometrischen Parametern widerspiegeln. Nachdem Morley und Mitarbeiter im vergangenen Jahr ein $\alpha 9\alpha 10$ -Doppel-KO-Mausmodell etabliert haben, ist eine Analyse des Knochenstatus dieser Tiere ein interessantes Ziel einer weiteren Studie (Morley et al., 2017).

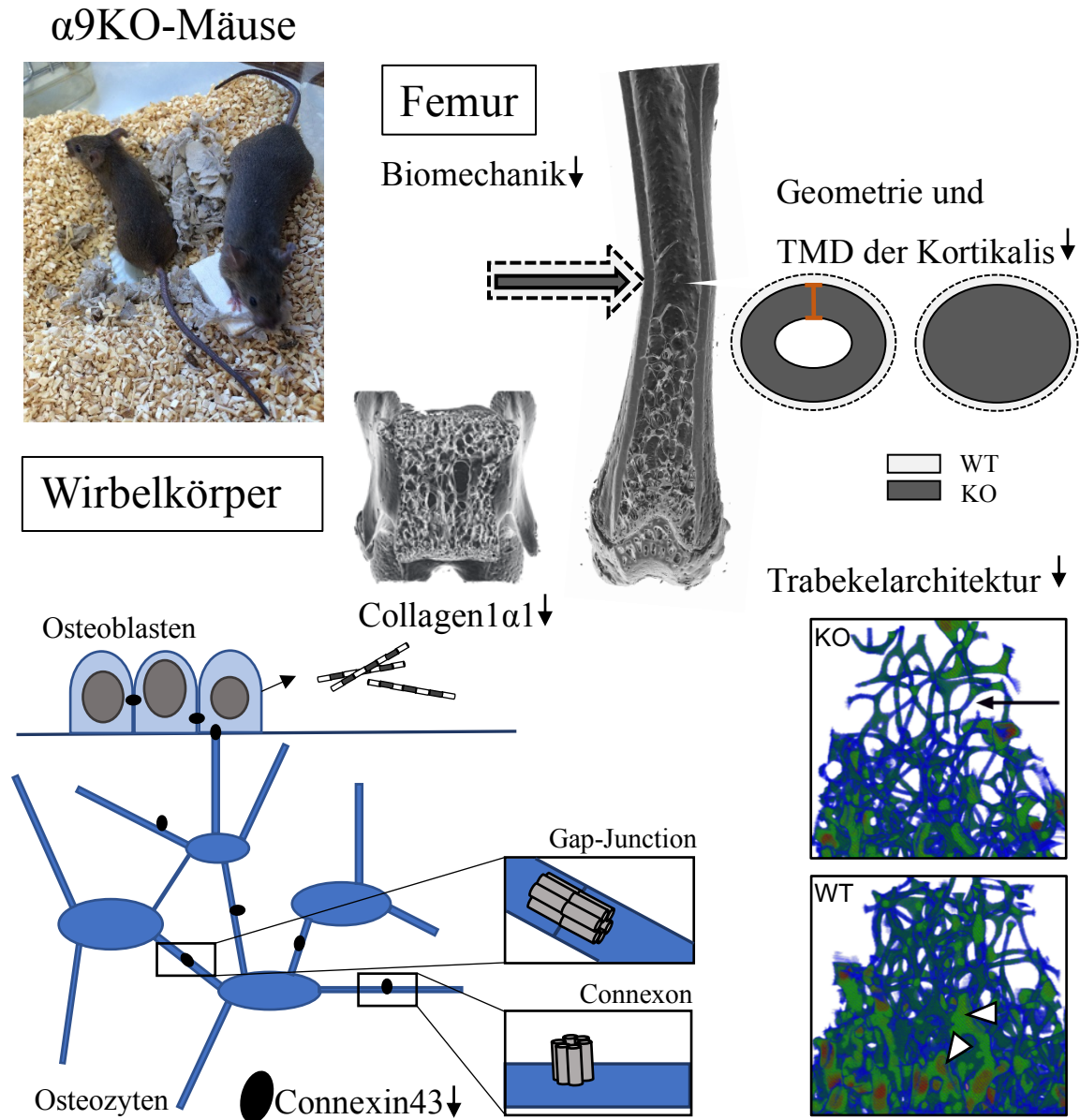


Abb. 37: Knochenphänotyp der α 9KO-Mäuse.

Die Knochen der α 9KO-Mäuse präsentierten eine reduzierte biomechanische Kompetenz sowie eine veränderte Geometrie und Mineralsalzdichte (tissue mineral density, TMD) der Kortikalis der Femurdiaphyse. Im Vergleich zu den α 9WT-Tieren (gestrichelte Linie) war die kortikale Fläche (linker Transversalschnitt) und die gesamte Gewebefläche innerhalb der periostalen Begrenzung (rechter Transversalschnitt) bei den α 9KO-Tieren verkleinert (dunkelgrau eingefärbte Areale). Die Architektur des Trabekelwerks der α 9KO-Mäuse beinhaltete dünnere und vermehrt stabähnliche Trabekel (Pfeil), während die Kontrolltiere einen größeren Anteil an plattenähnlichen Trabekeln aufwiesen (Pfeilköpfe). Die verminderte Expression von Connexin43 in Osteozyten und Osteoblasten kann ein Zeichen der Alterationen der Zell-Zell-Kommunikation via Gap-Junctions sein und die Vitalität der Osteozyten, die sich durch den Austausch mit der extrazellulären Umwelt via Connexonen prägt, mindern. Die reduzierte mRNA-Expression von Collagen1 α 1 kann zu Beeinträchtigungen der Synthese organischer Knochenmatrix beitragen. Abbildung modifiziert nach Baumann et al., 2019.

Das verringerte Körpergewicht der $\alpha 9$ KO-Mäuse kann durch einen geringeren Anteil an Fett-, Muskel- und/oder Knochengewebe begründet sein. Im vorhandenen konstitutiven KO-Modell können Veränderungen des Aktivitätsstatus und der Muskelkraft durch mögliche Veränderungen im zentralen Nervensystem der $\alpha 9$ KO- oder $\alpha 10$ KO-Tiere nicht ausgeschlossen werden. Bei Inaktivitätszuständen bis hin zur Degeneration von Muskeln kann der Knochenstatus folglich beeinträchtigt sein (Moreira et al., 2014). In weiterführenden Versuchen wurden die $\alpha 9$ KO-Mäuse einem Hängetest ausgesetzt, bei dem die Dauer des Festhaltens an einem 55 cm hoch gespannten Stahlseil gemessen wurde. Zwischen den $\alpha 9$ KO- und ihren WT-Tieren ergaben sich hierbei keine Unterschiede (Baumann et al., 2019). Neben der Regulation von Aktivität, Stress- und Affektverhalten ist das zentrale Nervensystem auch an der Modifikation hormoneller Regelkreise beteiligt. Die pulsatile Hormonausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse hat nicht zuletzt Einfluss auf die Homöostase des Knochens und die Funktion der Knochenzellen. Mohammadi und Mitarbeiter zeigten bei $\alpha 9\alpha 10$ KO-Mäusen eine Störung der zirkadianen Rhythmik aufgrund einer schwach erhaltenen monophasischen Aktivität in der Nacht, welche in Fehlregulationen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse enden können (Mohammadi et al., 2017). Obwohl bereits 1994 die Expression von $\alpha 9$ nAChR im Bereich der Adenohypophyse beschrieben wurde, ist deren Funktion bisher unklar (Elgoyhen et al., 1994). Sowohl die Expression von Thyroidhormontransportern und Rezeptoren für Thyroidhormone und Thyroidea-stimulierendes Hormon in Osteoblasten und Osteoklasten als auch Veränderungen des Remodelings aufgrund einer Hypo- oder Hyperthyreose sind bekannt (Gogakos et al., 2010). Inwiefern eine cholinerge Modifikation des Regelkreises stattfindet, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

An der Kontaktfläche zwischen Knochenzellen und hämatopoetischen Zellen wird vom System der Osteoimmunologie gesprochen. Hierbei ist insbesondere das Zytokinmilieu ausschlaggebend, welches durch das Zusammenspiel aller im Knochen befindlichen Zellpopulationen entsteht. Osteoklasten als Zellen hämatopoetischen Ursprungs differenzieren sich aus Monozyten im Rahmen einer erhöhten Expression von RANK. Neben TNF α fördern IL-1, IL-6 und IL-10 die RANKL-assoziierte Stimulation der Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten (Weitzmann, 2017). Die Expression der Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ der nAChR in Immunzellen und ihren Vorläuferzellen, die aus murinen Knochenmarkszellen kultiviert wurden, wurde von St-Pierre und Mitarbeitern

gezeigt. Eine Behandlung dieser Zellen mit Nikotin hatte eine erniedrigte Anzahl an Monozyten und eine gehemmte Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1 β und IL-12) zur Folge (St-Pierre et al., 2016). Hecker und Mitarbeiter beschrieben die ATP-abhängige Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten, welche durch ACh via nAChR α 7, α 9 und α 10 inhibiert wurde (Hecker et al., 2015). Bei der Abwesenheit von α 9 ist die Freisetzung von IL-1 β nicht gehemmt und kann seine inhibitorische Wirkung auf die Funktion von Osteoblasten, collagene und non-collagene Proteine zu synthetisieren, ausüben (Stashenko et al., 1987). Somit ist ein indirekter cholinerges Effekt bei der Interaktion von Immun- und Knochenzellen bspw. auf die Funktion von Osteoblasten (Collagenexpression) und Osteozyten (Expression von Cx43) zu spekulieren.

Die Bildung von nAChR als α 9-Homopentamer oder α 9 α 10-Heteropentamer geht mit Unterschieden in der Funktionalität einher. Eine Zusammensetzung aus α 9- und α 10-Untereinheiten wird als hundertfach funktionaler beschrieben (Sgard et al., 2002). Studien, in denen lediglich α 9KO-Tiere untersucht werden, postulierten einen Funktionsverlust von α 9 α 10 in Abwesenheit von α 9, da α 10 allein nicht zur Formation eines funktionellen Rezeptors in der Lage ist (Chernyavsky et al., 2007; Mohammadi et al., 2017). Dementgegen wurde die Lokalisation von α 7- und α 10-Untereinheiten in unmittelbarer Nähe in verschiedenen Regionen des Gehirns und in sympathischen Ganglien beschrieben (Lips et al., 2006; Lykhmus et al., 2017). Zudem wurde die verminderte Expression von α 7 in α 10KO-Tieren nachgewiesen und das Vorkommen eines gewebespezifischen α 7 α 10-Heteropentamers spekuliert (Lykhmus et al., 2017). In der gegenwärtigen Studie wurde die Expression von nAChR α 9 in α 10KO-Tieren bestimmt. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede der α 9-Expression im Vergleich zu den α 10WT-Tieren, sodass eine Veränderung der Expression von α 9 in den Knochen adulter α 10KO-Mäuse nicht angenommen werden kann. Für zukünftige Studien ist die Analyse der Expression von α 7 in α 9KO- und α 10KO-Tieren von Interesse, um den Hinweisen eines α 7 α 10-Heteropentamers nachzugehen.

In der Literatur gibt es hinreichende Hinweise auf die Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels und der Frakturheilung sowie das gehäufte Auftreten von osteoporotischen Frakturen bei Patienten mit Nikotinkonsum (Kallala et al., 2013; Kanis et al., 2005). Sasaki et al. (2018) untersuchten den Knochenstatus von Mäusen, welche Zigarettenrauch über einen Zeitraum von 4, 20 oder 40 Wochen nasal inhalierten. Auffallend war, dass die Wirbelkörper der Tiere abseits der unveränderten

Knochenmasse eine Verschlechterung der Qualität der Trabekelnanostruktur aufwiesen. Im Detail wurden Beeinträchtigungen der Anordnung der Collagenfibrillen und die Ausrichtung der Hydroxylapatitkristalle beschrieben (Sasaki et al., 2018). Inwiefern dieser Effekt jedoch durch die direkte oder indirekte Einwirkung von inhalativ verabreichtem Nikotin oder durch weitere Inhaltsstoffe der Zigaretten entsteht, bleibt unklar. Nicht zu vernachlässigen ist ebenso der Einfluss von Zigarettenkonsum auf die endotheliale Dysfunktion und die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System (Sasaki et al., 2018; Toda und Toda, 2010). Eine damit verbundene Minderversorgung des Knochens kann zu Beeinträchtigungen der Zellfunktionen und nachfolgend der Matrixqualität und der Architektur des Knochens beitragen. Mit dem Wissen über den antagonisierenden Effekt von Nikotin auf nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$ (Sgard et al., 2002) sind weiterführende Untersuchungen des pharmakologischen Profils und speziell des Einflusses von Nikotin auf die Aktivität der Osteoblasten und auf ihre Collagenexpression in-vitro von großem Interesse. Darüber hinaus ist die Analyse der Qualität organischer und anorganischer Matrix wünschenswert.

Die Rolle des non-neuronal cholinergen Systems und der Einfluss der aus $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten aufgebauten nAChR werden derzeit in verschiedenen Themengebieten (chronischer Schmerz, Inflammation, maligne Erkrankungen) erforscht (Fararjeh et al., 2018; Hone und McIntosh, 2018; Huang et al., 2017; Liu et al., 2017; Richter et al., 2018; Zhou et al., 2018). Therapiestrategien, welche die Signalvermittlung über nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$ hemmen, erlangen zunehmend klinische Relevanz, wie bspw. bei der Therapie von Neuropathien aufgrund von Oxaliplatin-haltiger Chemotherapie (Romero et al., 2017). Auch in der Therapie systemischer Knochenerkrankungen besteht das Anliegen, weitere Pharmaka zu entwickeln, welche die Knochenformation fördern. Inwieweit ACh als lokales Signalmolekül an der Regulation des Remodelings beteiligt ist, muss in weiteren Studien herausgearbeitet werden.

4.7 Limitation der Studie

Diese Studie wurde mit genetisch modifizierten Mäusen durchgeführt. Aufgrund einer konstitutiven Mutation weist die Gesamtheit der Zellen des Organismus eine Deletion der nAChR $\alpha 9$ oder $\alpha 10$ auf. Eventuelle Kompensationsmechanismen, die während der Entwicklung des Organismus durch das vollständige Fehlen der jeweiligen Rezeptoruntereinheit entstehen, sind ungewiss. Organspezifische Effekte sind aufgrund von nervalen, hormonellen und humoralen Einflüssen erschwert zu konkretisieren. Des Weiteren sind im Tiermodell „Maus“ die Variablen Fortbewegung (Maus als Vierbeiner) und physikalische Aktivität, welche unter Käfighaltung verändert sein kann, zu bedenken.

Die Untersuchung der Knochen erfolgte mit sowohl deskriptiven als auch funktionellen Verfahren. Der Drei-Punkt-Biegetest prüft als funktioneller Test die Widerstandsfähigkeit des Knochens gegen Krafteinwirkung und dient der Ableitung einer physiologischen Relevanz. Bei der Drei-Punkt-Biegemessung erfolgt bei fixiertem proximalem Femur und austariert aufliegenden distalen Kondylen die Krafteinwirkung auf die Diaphyse des Femurs. Im Gegenteil zum Vier-Punkt-Biegetest oder Torsionstest wird bei der Durchführung des Drei-Punkt-Biegetests die Kraft sehr fokussiert und weniger gleichmäßig über die Länge des Knochens appliziert, sodass der Knochen eventuell nicht an seiner schwächsten Stelle frakturiert (Brodt et al., 1999). Bei der Ausrichtung des Femurs in der Messvorrichtung wurde eine definierte Länge des Hebelarms festgelegt, während eine Standardisierung anhand der Femurlänge zu reflektieren ist. Weiterhin ist die Abhängigkeit der biomechanischen Parameter von der Körpergröße, die durch Körperlänge, Körpergewicht, Body-Mass-Index oder Knochenlänge beschrieben werden können, zu bedenken (Jepsen et al., 2015).

Die radiologische Untersuchung der Knochen mittels μ CT ist ein deskriptives Verfahren, das zur Charakterisierung der Geometrie und Architektur von Kortikalis und Trabekel dient. Quantitative und qualitative Aussagen tragen zur Beschreibung der azellulären Knochenmatrix bei, während Aussagen über die Funktionalität und Zellaktivität nicht möglich sind. Die Auswertung der μ CT-Daten erfolgt durch die Definition von Thresholds, ab welchem Grauwert Knochen von Nicht-Knochen unterschieden wird. Zudem ist die Methode von der Auflösung abhängig. Bspw. wird für eine umfassende Beurteilung vaskulärer und lakunärer Porosität der Kortikalis von Nagetieren eine Auflösung von 1–2 μ m isotroper Voxelgröße als erstrebenswert angesehen (Palacio-Mancheno et al., 2014). Unterschiede in Auflösung und Festlegung des Thresholds

können die Vergleichbarkeit von Studien beeinflussen. Die Bestimmung von Dichtewerten der Proben gelang mithilfe von Kalibrierungsphantomen. Hierbei fand die Zuordnung der Hounsfield-Units der entsprechenden Voxel zum jeweilig definierten Dichtewert statt. Die Dichtebestimmung eines Knochenvolumens spiegelt jedoch nur quantitative Eigenschaften der Mineralisierung wider. Um neben der densitometrischen Messung auch die Qualität der Mineralisierung zu beurteilen, müssten Verfahren zur Bestimmung der Größe und Organisation von Mineralkristallen durchgeführt werden.

Histologische Färbungen an zweidimensionalen Gewebeschnitten repräsentieren nur einen kleinen Ausschnitt einer komplexen Struktur. Artefakte durch die Fixierung und Einbettung sowie Unterschiede in der Höhe des Anschnitts des Präparates beeinflussen die Vergleichbarkeit der Proben. Zusammenfassend kann die Histologie funktionelle Aussagen treffen, sollte aber immer gemeinsam mit anderen Methoden bewertet werden. In der Immunhistochemie wurde die Negativkontrolle durch das Fernbleiben des primären Antikörpers durchgeführt. Auf eine Präadsorptionskontrolle, bei der ein spezifisches Peptid an den primären Antikörper bindet und das Binden an das spezifische Antigen im Schnitt verhindert, wurde verzichtet.

In der Molekularbiologie wurde die Expression verschiedener Zielgene auf mRNA-Level untersucht, während Messungen auf Proteinlevel nur im Rahmen immunhistochemischer Färbungen von Cx43 und Sclerostin durchgeführt wurden. Weiterführend könnte die Proteinaktivität von ALP und TRAP mittels funktioneller Assays bestimmt und die Serumanalyse von Collagenabbauprodukten wie Procollagen Typ 1 N-terminales Propeptid und C-terminales-Telopeptid durchgeführt werden. Zusätzlich sind Analysen der Anordnung und Orientierung von Collagenfibrillen zur Bewertung qualitativer Aspekte in zukünftigen Analysen wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Die Beschreibung der Komponenten des cholinergen Systems im Knochen und die Expression von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) mit den Untereinheiten $\alpha 9$ ($\alpha 9$) und $\alpha 10$ ($\alpha 10$) in murinen und humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen bilden die Basis dieser Arbeit (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). Die Zusammensetzung von nAChR aus $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten kann als $\alpha 9$ -Homopentamer oder $\alpha 9\alpha 10$ -Heteropentamer erfolgen. Der Nachweis einer verminderten Expression von nAChR $\alpha 10$ in Osteoblasten von Patientinnen mit Osteoporose (Zablotni et al., 2015) zeigt die Relevanz der Charakterisierung der Funktion der jeweiligen Untereinheit im Knochenremodeling.

Die Knochen von jeweils acht weiblichen, adulten Knockout-(KO) Mäusen mit einer Deletion der nAChR $\alpha 9$ oder $\alpha 10$ wurden im Vergleich zu ihren korrespondierenden Wildtyp-(WT)-Tieren folgenden Untersuchungen unterzogen: Drei-Punkt-Biegetest, Mikro-Computertomographie (μ CT), Histologie, Enzym- und Immunhistochemie, real-time Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion, Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Im Drei-Punkt-Biegetest zeigte sich eine reduzierte biomechanische Belastbarkeit des Femurs der $\alpha 9$ KO- im Vergleich zu den $\alpha 9$ WT-Mäusen, während sich die Parameter Biegesteifigkeit und Maximalkraft der Knochen der $\alpha 10$ -Tiere nicht voneinander unterschieden. Verminderte Werte der Calciumhydroxylapatitdichte (TMD) und der geometrischen Parameter (Ct.Ar, Tt.Ar) der Kortikalis wurden in zwei verschiedenen Bereichen der Femurdiaphyse der $\alpha 9$ KO-Tiere im μ CT gemessen. Im Trabekelwerk des Lendenwirbelkörpers und der distalen Femurmetaphyse der $\alpha 9$ KO-Mäuse wurden ein Abfall der trabekulären Dicke (Tb.Th) und ein Anstieg der Parameter bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular pattern factor (Tb.Pf) und structure model index (SMI) nachgewiesen. Auf zellulärer Ebene wurde eine Reduktion der mRNA-Expression von Collagen1 $\alpha 1$ und Connexin43 der $\alpha 9$ KO-Tiere gemessen. Eine Veränderung der Parameter für Osteoklasten lag weder bei $\alpha 9$ KO- noch $\alpha 10$ KO-Tieren vor. Bei der Untersuchung der Ultrastruktur der Osteozyten in der TEM wurde eine erhöhte Anzahl degenerierender und sterbender Osteozyten in der Gruppe der $\alpha 9$ KO- im Vergleich zur Gruppe der $\alpha 9$ WT-Mäuse beobachtet. Die Ultrastruktur der Osteozyten der $\alpha 10$ KO-Mäuse unterschied sich nicht von ihren Kontrolltieren.

Die Knochen der $\alpha 9$ KO-Mäuse präsentierten Veränderungen der biomechanischen Kompetenz, der Knochenstruktur und der Expression von Markern für Osteoblasten sowie Osteozyten. In Abwesenheit von $\alpha 9$ wurde der Beginn einer morphologischen Degeneration der Osteozyten sowie eine Reduktion der Expression von Connexin43 und Collagen1 α 1 beobachtet. Veränderungen der Connexin43 Expression beeinflussen die Vitalität der Osteozyten sowie ihre Funktionen bei der Mechanotransduktion und Kommunikation. In der Folge könnte dies zusammen mit der Reduktion der Collagenexpression in den Osteoblasten der $\alpha 9$ KO-Tiere die Basis für die beobachtete Minderung der kortikalen Mineralisierung und die Veränderung der trabekulären Architektur bilden. Letztlich wirkt sich eine $\alpha 9$ -Deletion auf die qualitativen und quantitativen Eigenschaften der Knochenmatrix sowie auf die biomechanische Belastbarkeit der Knochen aus. Eine Regulation der Biomechanik, Morphologie und Mineralsalzdichte der kortikalen und spongiösen Knochenareale der $\alpha 10$ KO-Tiere konnte nicht gezeigt werden. Ebenso lag kein Hinweis auf den Einfluss der nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 10$ auf die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf einen Einfluss der nAChR, welche $\alpha 9$ -Untereinheiten beinhalten, bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Osteozyten und Osteoblasten hin, die für den feinregulierten Ablauf von Remodeling und Mineralisierung essenziell sind.

6 Summary

The description of the components of the cholinergic system in bone and the expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) containing subunits $\alpha 9$ ($\alpha 9$) and $\alpha 10$ ($\alpha 10$) in murine and human osteoblast-like cells form the basis of this work (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). nAChR $\alpha 9$ and $\alpha 10$ subunits can be composed as $\alpha 9$ -homopentamer or $\alpha 9\alpha 10$ -heteropentamer. The detection of reduced expression of nAChR $\alpha 10$ in osteoblasts of patients with osteoporosis (Zablotni et al., 2015) demonstrates the relevance of the characterization of nAChR subunits.

The following tests were performed for bones from each of eight adult female knockout (KO) mice with a deletion of nAChR $\alpha 9$ or $\alpha 10$ in comparison to their corresponding wild-type (WT) animals: three-point bending test, micro-computed tomography (μ CT), histology, enzyme and immunohistochemistry, real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction and transmission electron microscopy (TEM).

The three-point bending test showed a reduced biomechanical bending stiffness and maximal breaking force of the $\alpha 9$ KO femur compared to $\alpha 9$ WT, while the biomechanical parameters of the $\alpha 10$ animals were indistinguishable. Reduced values of tissue mineral density (TMD) and cortical geometric parameters (Ct.Ar, Tt.Ar) were measured in two different areas of the $\alpha 9$ KO femoral diaphysis in μ CT. Also, a decrease in trabecular thickness (Tb.Th) and an increase bone surface/bone volume (BS/BV), trabecular pattern factor (Tb.Pf) and structure model index (SMI) were detected in trabecular bone of the lumbar vertebrae as well as the distal femoral metaphysis of the $\alpha 9$ KO. On the cellular level, mRNA expression of collagen1 $\alpha 1$ and connexin43 of $\alpha 9$ KO was reduced. There was no change in osteoclast parameters for either $\alpha 9$ KO or $\alpha 10$ KO. The evaluation of the ultrastructure of osteocytes in TEM showed an increased number of degenerating and dying osteocytes in the group of $\alpha 9$ KO compared to the group of $\alpha 9$ WT. The ultrastructure of $\alpha 10$ KO osteocytes did not differ from their control animals.

Bones of $\alpha 9$ KO mice presented changes in biomechanical properties, bone structure and expression of markers for osteoblasts and osteocytes. In the absence of $\alpha 9$, the onset of morphological degeneration of the osteocytes and a reduction of the expression of connexin43 and collagen1 $\alpha 1$ were observed. Changes in connexin43 expression are known to alter the vitality of osteocytes as well as their functions in mechanotransduction and communication. These findings, combined with the reduction in collagen expression

in $\alpha 9$ KO osteoblasts, could provide the basis for the reduction of cortical mineralization and change in trabecular architecture. Finally, a deletion of the subunit $\alpha 9$ affects the qualitative and quantitative properties of bone matrix as well as the biomechanical resilience of bones. An alteration of the biomechanics, morphology and mineral salt density of the cortical and cancellous bone in $\alpha 10$ KO animals could not be demonstrated. Additionally, there was no indication of influence of nAChR $\alpha 9$ and $\alpha 10$ on osteoclastic numbers and activity. The results of the present study suggest a regulating effect of nAChR, which contain $\alpha 9$ subunits, in maintaining homeostasis of osteocytes and osteoblasts, which are essential for the well-functioning course of remodeling and mineralization.

7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptoren
ALP	alkaline phosphatase, alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
B.Ar/T.Ar	bone area/tissue area, relative Trabekelfläche
BMP	bone morphologic proteins
BMD	bone mineral density, Knochenmineralsalzdichte, welche in spongiösen Knochenarealen gemessen wird
BS/BV	bone surface/bone volume, relative Knochenoberfläche
bspw.	beispielsweise
BV/TV	bone volume/tissue volume, Knochenvolumenfraktion
Ca^{2+}	Calcium
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CP	crossing point
CT	Computertomographie
CTL	choline transporter-like, Cholintransporter-ähnlich
CtsK	CathepsinK
Ct.Ar	cortical area, kortikale Fläche
Ct.Th	cortical thickness, kortikale Dicke
Cx43	Connexin43
DMP-1	dentine matrix protein-1
DXA	dual-energy X-ray absorptiometry
ENPP-1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FGF-23	fibroblast growth factor-23
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
IGF-1	insuline-like growth factor-1
IL	Interleukin
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
INF	Interferon

K ⁺	Kalium
KO	Knockout
LKS	lakunokanalikuläres System
LRP	low density lipoprotein receptor-related proteins
μ	Mikro
mAChR	muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein
min	Minute
MMP	matrix metalloprotease, Matrixmetalloprotease
MSC	mesenchymale Stammzellen
Na ⁺	Natrium
nAChR	nikotinische Acetylcholinrezeptoren
NFATc1	nuclear factor of activated T-cells 1
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffoxid
N.Oc/B.Pm	number of osteoclasts/bone perimeter, relative Osteoklastenanzahl
O.Ar/B.Ar	osteoid area/bone area, relative Osteoidfläche
Oc.Pm/B.Pm	osteoclast perimeter/bone perimeter, relativer Resorptionsperimeter
OCT	organic cation transporter, organische Kationentransporter
OPG	Osteoprotegerin
PCR	polymerase-chain-reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PEX	phosphate-regulating neutral endopeptidase
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC-δ	Proteinkinase C-δ
PLC	Phospholipase C
PO ₄ ³⁻	Phosphat
Po.tot	porosity total, prozentuale Porosität
PTH	Parathormon
RANK	rezeptor activator of NF-κB
RANKL	rezeptor activator NF-κB ligand
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
ROI	Region-of-Interest, zweidimensionaler Bereich, der untersucht wird

rpm	revolutions per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
Runx2	runt-related transcription factor 2
s	Sekunde
ScI.Ot/B.Ar	sclerostin-positive osteocytes/bone area, relative Anzahl Sclerostin-positiver Osteozyten
SD	Standardabweichung
SIBLING	small integrin binding ligand N-glycosylated- proteins
Smad3	mothers against decapentaplegic homolog 3
SMI	structure model index, Strukturparameter
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMD	tissue mineral density, Knochenmineralsalzdichte, welche in kortikalen Knochenarealen gemessen wird
TNF α	tumor necrosis factor alpha
Tt.Ar	tissue area, gesamte Gewebefläche innerhalb der periostalen Begrenzung
Tb.N	trabecular number, Anzahl der Trabekel
Tb.Pf	trabecular pattern factor, Konnektivitätsparameter
Tb.Sp	trabecular separation, Abstand der Trabekel voneinander
Tb. Th	trabecular thickness, Trabekeldicke
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase, Tartrat-resistente saure Phosphatase
u. a.	unter anderem
VACHT	vesicular ACh transporter, vesikuläre Acetylcholintransporter
VOI	Volume-of-Interest, dreidimensionaler Bereich, der untersucht wird
WT	Wildtypen

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 3D-Rekonstruktion eines Lendenwirbels L1.....	2
Abb. 2: Morphologie und Aktivität der Osteoblasten.....	6
Abb. 3: Ultrastruktur von Osteoblast und Osteozyt.....	8
Abb. 4: Morphologie und Aktivität der Osteoklasten.....	11
Abb. 5: Ultrastruktur eines Osteoklasten.....	12
Abb. 6: Schemazeichnung der nAChR $\alpha 9$ und $\alpha 9\alpha 10$	16
Abb. 7: Vorbereitung und Durchführung des Drei-Punkt-Biegetests.....	24
Abb. 8: Schematische Kraftverformungskurve.....	25
Abb. 9: Berechnung der Biegesteifigkeit.....	25
Abb. 10: Schematische Darstellung des Femurs im μ CT.....	27
Abb. 11: Schematische Darstellung des Wirbelkörpers im μ CT.....	28
Abb. 12: Effizienzbestimmung der Primer.....	33
Abb. 13: Schmelzpunktkurven der real-time RT-PCR.....	34
Abb. 14: Amplifikationskurven der real-time RT-PCR.....	35
Abb. 15: Schematische Abfolge der Arbeitsschritte in der Histomorphometrie.....	41
Abb. 16: Körpergewicht und Biomechanik.....	44
Abb. 17: 3D-Rekonstruktion der trabekulären Femurmetaphyse.....	45
Abb. 18: Morphologie der Spongiosa des Femurs im μ CT.....	47
Abb. 19: BMD der Spongiosa des Femurs.....	48
Abb. 20: Morphologie und TMD der Kortikalis der distalen Diaphyse im μ CT.....	49
Abb. 21: Morphologie und TMD der Kortikalis der Mittladiaphyse im μ CT.....	50
Abb. 22: 3D-Rekonstruktion des Trabekelwerks des Lendenwirbelkörpers L1.....	51
Abb. 23: Morphologie der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers im μ CT.....	52
Abb. 24: BMD der Spongiosa des Lendenwirbelkörpers.....	53
Abb. 25: Histomorphometrie der Trabekelfläche des Lendenwirbelkörpers.....	53
Abb. 26: ALP und Col1 α 1 in Osteoblasten.....	55
Abb. 27: Histomorphometrie der Osteoidfläche.....	55
Abb. 28: Connexin43 in Osteozyten.....	57
Abb. 29: SOST/Sclerostin in Osteozyten.....	58
Abb. 30: RANKL und OPG in Osteozyten.....	59
Abb. 31: Ultrastruktur der Osteozyten in der TEM.....	60
Abb. 32: Balkendiagramm der Ultrastruktur der Osteozyten in der TEM.....	60

Abb. 33: TRAP und CtsK in Osteoklasten.	61
Abb. 34: Genexpression der Untereinheit $\alpha 9$ in $\alpha 10$ KO- und $\alpha 10$ WT-Tieren.	62
Abb. 35: Geometrie der Kortikalis der $\alpha 9$ KO und $\alpha 9$ WT-Tiere.....	65
Abb. 36: 3D-farbcodiertes Model der trabekulären Dicke der Femurmetaphyse.....	71
Abb. 37: Knochenphänotyp der $\alpha 9$ KO-Mäuse.	81
 7.3 Tabellenverzeichnis	
Tab. 1 Primer.....	31

8 Literaturverzeichnis

- Akhter, M.P., Wells, D.J., Short, S.J., Cullen, D.M., Johnson, M.L., Haynatzki, G.R., Babij, P., Allen, K.M., Yaworsky, P.J., Bex, F., Recker, R.R., 2004. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone* 35, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.02.018>
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Amarasekara, D.S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., Rho, J., 2018. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* 18, e8. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>
- Arana-Chavez, V.E., Bradaschia-Correa, V., 2009. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.007>
- Arredondo, J., Hall, L.L., Ndoye, A., Nguyen, V.T., Chernyavsky, A.I., Bercovich, D., Orr-Urtreger, A., Beaudet, A.L., Grando, S.A., 2003. Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine. *Lab. Investig.* 83, 207–225. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000053917.46614.12>
- Ashique, A.M., Hart, L.S., Thomas, C.D.L., Clement, J.G., Pivonka, P., Carter, Y., Mousseau, D.D., Cooper, D.M.L., 2017. Lacunar-canalicular network in femoral cortical bone is reduced in aged women and is predominantly due to a loss of canalicular porosity. *Bone Rep.* 7, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.06.002>
- Bajayo, A., Bar, A., Denes, A., Bachar, M., Kram, V., Attar-Namdar, M., Zallone, A., Kovács, K.J., Yirmiya, R., Bab, I., 2012. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15455–15460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206061109>
- Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., Dioszegi, M., Dikkers, F.G., Hilderling, P., Willems, P.J., Verheij, J.B.G.M., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foerzler, D., Van Hul, W., 2002. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J. Med. Genet.* 39, 91–97. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.2.91>
- Baron, R., 2000. Anatomy and ultrastructure of bone – histogenesis, growth and

- remodeling, in: De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K.R., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Baron, R., Kneissel, M., 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* 19, 179–192. <https://doi.org/10.1038/nm.3074>
- Baumann, L., Kauschke, V., Vikman, A., Dürselen, L., Krasteva-Christ, G., Kampschulte, M., Heiss, C., Yee, K.T., Vetter, D.E., Lips, K.S., 2019. Deletion of nicotinic acetylcholine receptor alpha9 in mice resulted in altered bone structure. *Bone* 120, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.11.003>
- Beckmann, J., Lips, K.S., 2013. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* 92, 286–302. <https://doi.org/10.1159/000355835>
- Bellido, T., Plotkin, L.I., Bruzzaniti, A., 2014. Chapter 2 - Bone cells, in: Burr, D.B., Allen, M.R. (Eds.), *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp. 27–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00002-2>
- Benalla, M., Palacio-Mancheno, P.E., Fritton, S.P., Cardoso, L., Cowin, S.C., 2014. Dynamic permeability of the lacunar-canalicular system in human cortical bone. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 13, 801–812. <https://doi.org/10.1007/s10237-013-0535-7>
- Bivi, N., Pacheco-Costa, R., Brun, L.R., Murphy, T.R., Farlow, N.R., Robling, A.G., Bellido, T., Plotkin, L.I., 2013. Absence of Cx43 selectively from osteocytes enhances responsiveness to mechanical force in mice. *J. Orthop. Res.* 31, 1075–1081. <https://doi.org/10.1002/jor.22341>
- Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L.G., Meunier, P.J., Delmas, P.D., 2008. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* 43, 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.05.024>
- Bouxsein, M.L., 2003. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporos. Int.* 14 Suppl 5, S118-127. <https://doi.org/10.1007/s00198-003-1489-x>
- Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., Müller, R., 2010. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>

- Bouxsein, M.L., Seeman, E., 2009. Quantifying the material and structural determinants of bone strength. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 23, 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2009.09.008>
- Brodth, M.D., Ellis, C.B., Silva, M.J., 1999. Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties. *J. Bone Miner. Res.* 14, 2159–2166. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.12.2159>
- Brüggmann, D., Lips, K.S., Pfeil, U., Haberberger, R.V., Kummer, W., 2002. Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem. Cell Biol.* 118, 441–447. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0475-2>
- Brunkow, M.E., Gardner, J.C., Van Ness, J., Paepers, B.W., Kovacevich, B.R., Prohl, S., Skonier, J.E., Zhao, L., Sabo, P.J., Fu, Y., Alisch, R.S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P., Mulligan, J., 2001. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 577–589. <https://doi.org/10.1086/318811>
- Buckley, K.A., Hipkind, R.A., Gartland, A., Bowler, W.B., Gallagher, J.A., 2002. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Bone* 31, 582–590. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(02\)00877-3](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(02)00877-3)
- Buisson, B., Bertrand, D., 1998. Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Physiol. Paris* 92, 89–100. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(98\)80144-7](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(98)80144-7)
- Bull, H., Murray, P.G., Thomas, D., Fraser, A.M., Nelson, P.N., 2002. Acid phosphatases. *Mol. Pathol. MP* 55, 65–72. <https://doi.org/10.1136/mp.55.2.65>
- Burr, D.B., Akkus, O., 2014. Chapter 1 - Bone morphology and organization, in: Burr, D.B., Allen, M.R. (Eds.), *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp. 3–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00001-0>
- Carrasco-Serrano, C., Criado, M., 2004. Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1. *FEBS Lett.* 566, 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.049>
- Che, X., Guo, J., Wang, L., Miao, C., Ge, L., Tian, Z., Wang, J., 2016. Involvement of the nonneuronal cholinergic system in bone remodeling in rat midpalatal suture

- after rapid maxillary expansion. *BioMed Res. Int.*
<https://doi.org/10.1155/2016/8106067>
- Chen, H., Kubo, K., 2012. Segmental variations in trabecular bone density and microstructure of the spine in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Exp. Gerontol.* 47, 317–322.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.01.005>
- Chen, H., Senda, T., Kubo, K., 2015. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med. Mol. Morphol.* 48, 61–68.
<https://doi.org/10.1007/s00795-015-0099-y>
- Chen, H., Zhou, X., Emura, S., Shoumura, S., 2009. Site-specific bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Exp. Gerontol.* 44, 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.09.009>
- Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Vetter, D.E., Grando, S.A., 2007. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp. Cell Res.* 313, 3542–3555.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.011>
- Chikova, A., Grando, S.A., 2011. Naturally occurring variants of human $\alpha 9$ nicotinic receptor differentially affect bronchial cell proliferation and transformation. *PLoS One* 6, e27978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027978>
- Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 Suppl 3, S131-139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Cowin, S.C., Cardoso, L., 2015. Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue. *J. Biomech.* 48, 842–854.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.12.013>
- Dachverband Osteologie e.V., 2018. Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern - Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. 2017. Verfügbar: https://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%20Osteoporose%202017_end.pdf, Zugriff am 21.11.2018.
- Daghma, D.E.S., Malhan, D., Simon, P., Stötzel, S., Kern, S., Hassan, F., Lips, K.S., Heiss, C., El Khassawna, T., 2018. Computational segmentation of collagen fibers in bone matrix indicates bone quality in ovariectomized rat spine. *J. Bone Miner. Metab.* 36, 297–306. <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0844-5>

- Dale, H.H., 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6, 147–190.
- Datta, H.K., Ng, W.F., Walker, J.A., Tuck, S.P., Varanasi, S.S., 2008. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* 61, 577–587. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868>
- Davis, H.M., Pacheco-Costa, R., Atkinson, E.G., Brun, L.R., Gortazar, A.R., Harris, J., Hiasa, M., Bolarinwa, S.A., Yoneda, T., Ivan, M., Bruzzaniti, A., Bellido, T., Plotkin, L.I., 2017. Disruption of the Cx43/miR21 pathway leads to osteocyte apoptosis and increased osteoclastogenesis with aging. *Aging Cell* 16, 551–563. <https://doi.org/10.1111/accel.12586>
- Delgado-Calle, J., Sato, A.Y., Bellido, T., 2017. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone* 96, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.007>
- Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., Parfitt, A.M., 2013. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>
- Eimar, H., Tamimi, I., Murshed, M., Tamimi, F., 2013. Cholinergic regulation of bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 13, 124–132.
- Ek-Rylander, B., Andersson, G., 2010. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Exp. Cell Res.* 316, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.10.019>
- Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., Clement, K., Vaisse, C., Karsenty, G., 2005. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434, 514–520. <https://doi.org/10.1038/nature03398>
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S., 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90555-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90555-x)
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., Boulter, J., 2001. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3501–3506. <https://doi.org/10.1073/pnas.051622798>

- Eltony, S.A., Ali, S.S., 2017. Histological study on the effect of nicotine on adult male guinea pig thin skin. *Anat. Cell Biol.* 50, 187–199. <https://doi.org/10.5115/acb.2017.50.3.187>
- Enlow, D.H., 1962. Functions of the haversian system. *Am. J. Anat.* 110, 269–305. <https://doi.org/10.1002/aja.1001100305>
- En-Nosse, M., Hartmann, S., Trinkaus, K., Alt, V., Stigler, B., Heiss, C., Kilian, O., Schnettler, R., Lips, K.S., 2009. Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. *Cell Tissue Res.* 338, 203–215. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0871-1>
- Fararjeh, A.-F.S., Tu, S.-H., Chen, L.-C., Cheng, T.-C., Liu, Y.-R., Chang, H.-L., Chang, H.-W., Huang, C.-C., Wang, H.-C.R., Hwang-Verslues, W.W., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., 2018. Long-term exposure to extremely low-dose of nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induce non-malignant breast epithelial cell transformation through activation of the $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathway. *Environ. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/tox.22659>
- Feitelson, J.B.A., Rowell, P.P., Roberts, C.S., Fleming, J.T., 2003. Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. *J. Orthop. Res.* 21, 497–502. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00235-8)
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C., Meunier, P.J., 2004. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 34, 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.012>
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J.A., Duarte, J.A., 2014. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 44, 37–53. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>
- Fucile, S., Sucapane, A., Eusebi, F., 2006. Ca^{2+} permeability through rat cloned $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 39, 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.12.002>
- Gahring, L.C., Rogers, S.W., 2006. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J.* 7, E885-894.

- <https://doi.org/10.1208/aapsj070486>
- Gallagher, J.A., 2004. ATP P2 receptors and regulation of bone effector cells. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 4, 125–127.
- Gogakos, A.I., Duncan Bassett, J.H., Williams, G.R., 2010. Thyroid and bone. *Arch. Biochem. Biophys.* 503, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.021>
- Goggin, P.M., Zygalkakis, K.C., Oreffo, R.O., Schneider, P., 2016. High-resolution 3D imaging of osteocytes and computational modelling in mechanobiology: insights on bone development, ageing, health and disease. *Eur. Cell. Mater.* 31, 264–295. <https://doi.org/10.22203/ecm.v031a18>
- Golub, E.E., 2009. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1592–1598. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.09.006>
- Grando, S.A., 1997. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2, 41–48. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.1997.10>
- Grando, S.A., Pittelkow, M.R., Schallreuter, K.U., 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1948–1965. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700151>
- Guggenbuhl, P., 2009. Osteoporosis in males and females: Is there really a difference? *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 76, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.10.001>
- Hadjidakis, D.J., Androulakis, I.I., 2006. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>
- Hahn, M., Vogel, M., Pompesius-Kempa, M., Delling, G., 1992. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13, 327–330. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(92\)90078-b](https://doi.org/10.1016/8756-3282(92)90078-b)
- Hasegawa, T., 2018. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem. Cell Biol.* 149, 289–304. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1646-0>
- Hecker, A., Küllmar, M., Wilker, S., Richter, K., Zakrzewicz, A., Atanasova, S., Mathes, V., Timm, T., Lerner, S., Klein, J., Kaufmann, A., Bauer, S., Padberg, W., Kummer, W., Janciauskiene, S., Fronius, M., Schweda, E.K.H., Lochnit, G., Grau, V., 2015. Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit atp-induced il-1 β release. *J. Immunol.* 195, 2325–2334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974>

- Hildebrand, T.O.R., Rügsegger, P., 1997. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 1, 15–23. <https://doi.org/10.1080/01495739708936692>
- Hollenhorst, M.I., Lips, K.S., Weitz, A., Krasteva, G., Kummer, W., Fronius, M., 2012. Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate k^+ -dependent cl^- secretion in mouse tracheal epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 106–114. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0171OC>
- Hone, A.J., McIntosh, J.M., 2018. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS Lett.* 592, 1045–1062. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12884>
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., Kawashima, K., 2003. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* 72, 1745–1756. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02478-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02478-5)
- Huang, L.-C., Lin, C.-L., Qiu, J.-Z., Lin, C.-Y., Hsu, K.-W., Tam, K.-W., Lee, J.-Y., Yang, J.-M., Lee, C.-H., 2017. Nicotinic acetylcholine receptor subtype α -9 mediates triple-negative breast cancers based on a spontaneous pulmonary metastasis mouse model. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00336>
- Hurst, R., Rollema, H., Bertrand, D., 2013. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 137, 22–54. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.012>
- Indurthi, D.C., Pera, E., Kim, H.-L., Chu, C., McLeod, M.D., McIntosh, J.M., Absalom, N.L., Chebib, M., 2014. Presence of multiple binding sites on α 9 α 10 nAChR receptors alludes to stoichiometric-dependent action of the α -conotoxin, Vc1.1. *Biochem. Pharmacol.* 89, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.02.002>
- Jepsen, K.J., Silva, M.J., Vashishth, D., Guo, X.E., van der Meulen, M.C.H., 2015. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *J. Bone Miner. Res.* 30, 951–966. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2539>
- Kallala, R., Barrow, J., Graham, S.M., Kanakaris, N., Giannoudis, P.V., 2013. The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin. Drug Saf.* 12, 209–233. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.770471>

- Kamer, A.R., El-Ghorab, N., Marzec, N., Margarone, J.E., Dziak, R., 2006. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int. J. Mol. Med.* 17, 121–127. <https://doi.org/10.3892/ijmm.17.1.121>
- Kanis, J.A., 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos. Int.* 4, 368–381.
- Kanis, J.A., Johnell, O., Oden, A., Johansson, H., De Laet, C., Eisman, J.A., Fujiwara, S., Kroger, H., McCloskey, E.V., Mellstrom, D., Melton, L.J., Pols, H., Reeve, J., Silman, A., Tenenhouse, A., 2005. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos. Int.* 16, 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00198-004-1640-3>
- Kerschnitzki, M., Kollmannsberger, P., Burghammer, M., Duda, G.N., Weinkamer, R., Wagermaier, W., Fratzl, P., 2013. Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *J. Bone Miner. Res.* 28, 1837–1845. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1927>
- Kim, B.-S., Kim, S.-J., Kim, H.-J., Lee, S.-J., Park, Y.-J., Lee, J., You, H.-K., 2012. Effects of nicotine on proliferation and osteoblast differentiation in human alveolar bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Life Sci.* 90, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.10.019>
- Kim, Henkin, J., 2015. Micro-computed tomography assessment of human alveolar bone: bone density and three-dimensional micro-architecture. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 17, 307–313. <https://doi.org/10.1111/cid.12109>
- Klein, R.F., Shea, M., Gunness, M.E., Pelz, G.B., Belknap, J.K., Orwoll, E.S., 2001. Phenotypic characterization of mice bred for high and low peak bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 16, 63–71. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.1.63>
- Kliemann, K., Kneffel, M., Bergen, I., Kampschulte, M., Langheinrich, A.C., Dürselen, L., Ignatius, A., Kilian, O., Schnettler, R., Lips, K.S., 2012. Quantitative analyses of bone composition in acetylcholine receptor M3R and alpha7 knockout mice. *Life Sci.* 91, 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.024>
- Komori, T., 2016. Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17122045>
- Lee, C.-H., Huang, C.-S., Chen, C.-S., Tu, S.-H., Wang, Y.-J., Chang, Y.-J., Tam, K.-W., Wei, P.-L., Cheng, T.-C., Chu, J.-S., Chen, L.-C., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., 2010. Overexpression and activation of the $\alpha 9$ -nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1322–1335.

- <https://doi.org/10.1093/jnci/djq300>
- Leppänen, O.V., Sievänen, H., Järvinen, T.L.N., 2008. Biomechanical testing in experimental bone interventions--May the power be with you. *J. Biomech.* 41, 1623–1631. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.017>
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D., 2005. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 19883–19887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413274200>
- Liebschner, M.A.K., Keller, T.S., 2005. Hydraulic strengthening affects the stiffness and strength of cortical bone. *Ann. Biomed. Eng.* 33, 26–38. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-8960-0>
- Lips, K.S., Brüggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S.A., Kummer, W., 2005. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* 26, 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.009>
- Lips, K.S., Kneffel, M., Willscheid, F., Mathies, F.M., Kampschulte, M., Hartmann, S., Panzer, I., Dürselen, L., Heiss, C., Kauschke, V., 2015a. Altered ultrastructure, density and cathepsin K expression in bone of female muscarinic acetylcholine receptor M3 knockout mice. *Int. Immunopharmacol.* 29, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.012>
- Lips, K.S., König, P., Schätzle, K., Pfeil, U., Krasteva, G., Spies, M., Haberberger, R.V., Grando, S.A., Kummer, W., 2006. Coexpression and spatial association of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and alpha10 in rat sympathetic neurons. *J. Mol. Neurosci.* MN 30, 15–16. <https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:15>
- Lips, K.S., Pfeil, U., Kummer, W., 2002. Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 115, 1–5. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00274-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00274-9)
- Lips, K.S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschiepfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I., Schwantes, U., Koepsell, H., Kummer, W., 2007. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur. Urol.* 51, 1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.10.028>
- Lips, K.S., Yanko, Ö., Kneffel, M., Panzer, I., Kauschke, V., Madzharova, M., Henss, A., Schmitz, P., Rohnke, M., Bäuerle, T., Liu, Y., Kampschulte, M., Langheinrich, A.C., Dürselen, L., Ignatius, A., Heiss, C., Schnettler, R., Kilian, O., 2015b. Small changes in bone structure of female $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16, 5. <https://doi.org/10.1186/s12891-015->

0459-8

- Liu, Q., Whiteaker, P., Morley, B.J., Shi, F.-D., Lukas, R.J., 2017. Distinctive roles for $\alpha 7^*$ - and $\alpha 9^*$ -nicotinic acetylcholine receptors in inflammatory and autoimmune responses in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00287>
- Ljusberg, J., Wang, Y., Lång, P., Norgård, M., Dodds, R., Hultenby, K., Ek-Rylander, B., Andersson, G., 2005. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 280, 28370–28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502469200>
- Loewi, O., 1922. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflugers Arch.* 193, 201–213. <https://doi.org/10.1007/BF02331588>
- Luo, L., Bennett, T., Jung, H.H., Ryan, A.F., 1998. Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J. Comp. Neurol.* 393, 320–331. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19980413\)393:3%3C320::aid-cne5%3E3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19980413)393:3%3C320::aid-cne5%3E3.0.co;2-3)
- Lykhmus, O., Voytenko, L.P., Lips, K.S., Bergen, I., Krasteva-Christ, G., Vetter, D.E., Kummer, W., Skok, M., 2017. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ and $\alpha 10$ subunits are expressed in the brain of mice. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00282>
- Ma, Y., Li, X., Fu, J., Li, Y., Gao, L., Yang, L., Zhang, P., Shen, J., Wang, H., 2014. Acetylcholine affects osteocytic MLO-Y4 cells via acetylcholine receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 384, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.021>
- Mandl, P., Hayer, S., Karonitsch, T., Scholze, P., Györi, D., Sykoutri, D., Blüml, S., Mócsai, A., Poór, G., Huck, S., Smolen, J.S., Redlich, K., 2016. Nicotinic acetylcholine receptors modulate osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* 18, 63. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0961-x>
- Mann, V., Hobson, E.E., Li, B., Stewart, T.L., Grant, S.F., Robins, S.P., Aspden, R.M., Ralston, S.H., 2001. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J. Clin. Invest.* 107, 899–907. <https://doi.org/10.1172/JCI10347>
- McColm, J., Hu, L., Womack, T., Tang, C.C., Chiang, A.Y., 2014. Single- and multiple-dose randomized studies of blosozumab, a monoclonal antibody against sclerostin, in healthy postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 29, 935–943.

- <https://doi.org/10.1002/jbmr.2092>
- Mito, K., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, K., Nitta, E., Iwama, A., Matsumoto, M., Nakamura, M., Sato, K., Miyamoto, T., 2017. The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass. *Sci. Rep.* 7, 45597. <https://doi.org/10.1038/srep45597>
- Mohammadi, S.A., Burton, T.J., Christie, M.J., 2017. $\alpha 9$ -nAChR knockout mice exhibit dysregulation of stress responses, affect and reward-related behaviour. *Behav. Brain Res.* 328, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.005>
- Moorer, M.C., Stains, J.P., 2017. Connexin43 and the intercellular signaling network regulating skeletal remodeling. *Curr. Osteoporos. Rep.* 15, 24–31. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0345-4>
- Moreira, L.D.F., Oliveira, M.L. de, Lirani-Galvão, A.P., Marin-Mio, R.V., Santos, R.N. dos, Lazaretti-Castro, M., 2014. Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58, 514–522. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000003374>
- Morley, B.J., Dolan, D.F., Ohlemiller, K.K., Simmons, D.D., 2017. Generation and characterization of $\alpha 9$ and $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice on a *c57bl/6j* background. *Front. Neurosci.* 11, 516. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00516>
- Mulari, M., Vääräniemi, J., Väänänen, H.K., 2003. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* 61, 496–503. <https://doi.org/10.1002/jemt.10371>
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., Penninger, J.M., Takayanagi, H., 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* 17, 1231–1234. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>
- Niedźwiedzki, T., Filipowska, J., 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J. Mol. Endocrinol.* 55, R23-36. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0067>
- Nyman, J.S., Roy, A., Shen, X., Acuna, R.L., Tyler, J.H., Wang, X., 2006. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *J. Biomech.* 39, 931–938. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.01.012>

- Palacio-Mancheno, P.E., Larriera, A.I., Doty, S.B., Cardoso, L., Fritton, S.P., 2014. 3D assessment of cortical bone porosity and tissue mineral density using high-resolution μ CT: effects of resolution and threshold method. *J. Bone Miner. Res.* 29, 142–150. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2012>
- Peng, H., Ferris, R.L., Matthews, T., Hiel, H., Lopez-Albaitero, A., Lustig, L.R., 2004. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci.* 76, 263–280. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.031>
- Plotkin, L.I., 2014. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front. Physiol.* 5, 131. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00131>
- Plotkin, L.I., Bivi, N., 2014. Chapter 3 - Local regulation of bone cell function, in: Burr, D.B., Allen, M.R. (Eds.), *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp. 47–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00003-4>
- Plotkin, L.I., Stains, J.P., 2015. Connexins and pannexins in the skeleton: gap junctions, hemichannels and more. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 2853–2867. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1963-6>
- Poole, K.E.S., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., Reeve, J., 2005. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 19, 1842–1844. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4221fje>
- Recker, R.R., Benson, C.T., Matsumoto, T., Bolognese, M.A., Robins, D.A., Alam, J., Chiang, A.Y., Hu, L., Krege, J.H., Sowa, H., Mitlak, B.H., Myers, S.L., 2015. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.* 30, 216–224. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2351>
- Richter, K., Sagawe, S., Hecker, A., Küllmar, M., Askevold, I., Damm, J., Heldmann, S., Pöhlmann, M., Ruhrmann, S., Sander, M., Schlüter, K.-D., Wilker, S., König, I.R., Kummer, W., Padberg, W., Hone, A.J., McIntosh, J.M., Zakrzewicz, A.T., Koch, C., Grau, V., 2018. C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control atp-mediated monocytic inflammasome activation. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01604>
- Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldridge, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E., Turner, C.H., 2008. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of

- Sost/sclerostin. *J. Biol. Chem.* 283, 5866–5875.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M705092200>
- Romero, H.K., Christensen, S.B., Di Cesare Mannelli, L., Gajewiak, J., Ramachandra, R., Elmslie, K.S., Vetter, D.E., Ghelardini, C., Iadonato, S.P., Mercado, J.L., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., 2017. Inhibition of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E1825–E1832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621433114>
- Röntgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Göckelmann, M., Jermendy, P., Amling, M., Schinke, T., Claes, L., Ignatius, A., 2010. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J. Orthop. Res.* 28, 1456–1462. <https://doi.org/10.1002/jor.21148>
- Rothem, D.E., Rothem, L., Soudry, M., Dahan, A., Eliakim, R., 2009. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J. Bone Miner. Metab.* 27, 555–561. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0075-5>
- Sasaki, M., Chubachi, S., Kameyama, N., Sato, M., Haraguchi, M., Miyazaki, M., Takahashi, S., Nakano, T., Kuroda, Y., Betsuyaku, T., Matsuo, K., 2018. Effects of long-term cigarette smoke exposure on bone metabolism, structure, and quality in a mouse model of emphysema. *PloS One* 13, e0191611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191611>
- Sato, T., Abe, T., Chida, D., Nakamoto, N., Hori, N., Kokabu, S., Sakata, Y., Tomaru, Y., Iwata, T., Usui, M., Aiko, K., Yoda, T., 2010. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Lett.* 584, 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.001>
- Sawakami, K., Robling, A.G., Ai, M., Pitner, N.D., Liu, D., Warden, S.J., Li, J., Maye, P., Rowe, D.W., Duncan, R.L., Warman, M.L., Turner, C.H., 2006. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 281, 23698–23711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601000200>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulte, F.A., Lambers, F.M., Kuhn, G., Müller, R., 2011. In vivo micro-computed tomography allows direct three-dimensional quantification of both bone formation and bone resorption parameters using time-lapsed imaging. *Bone* 48, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.10.007>

- Sgard, F., Charpentier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D., Besnard, F., 2002. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol. Pharmacol.* 61, 150–159. <https://doi.org/10.1124/mol.61.1.150>
- Shi, Y., Oury, F., Yadav, V.K., Wess, J., Liu, X.S., Guo, X.E., Murshed, M., Karsenty, G., 2010. Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab.* 11, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.01.005>
- Silva, M.J., Brodt, M.D., Wopenka, B., Thomopoulos, S., Williams, D., Wassen, M.H.M., Ko, M., Kusano, N., Bank, R.A., 2006. Decreased collagen organization and content are associated with reduced strength of demineralized and intact bone in the SAMP6 mouse. *J. Bone Miner. Res.* 21, 78–88. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050909>
- Silva, M.J., Gibson, L.J., 1997. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. *Bone* 21, 191–199. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(97\)00100-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(97)00100-2)
- Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Rooney, M.L., Desjardins, L.A., Heeley, J.D., 1987. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 2, 559–565. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020612>
- Stone, K.L., Seeley, D.G., Lui, L.-Y., Cauley, J.A., Ensrud, K., Browner, W.S., Nevitt, M.C., Cummings, S.R., Osteoporotic Fractures Research Group, 2003. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the study of osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1947–1954. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.11.1947>
- St-Pierre, S., Jiang, W., Roy, P., Champigny, C., LeBlanc, É., Morley, B.J., Hao, J., Simard, A.R., 2016. Nicotinic acetylcholine receptors modulate bone marrow-derived pro-inflammatory monocyte production and survival. *PloS One* 11, e0150230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150230>
- Tatoń, G., Rokita, E., Wróbel, A., Korkosz, M., 2013. Combining areal DXA bone mineral density and vertebrae postero-anterior width improves the prediction of vertebral strength. *Skeletal Radiol.* 42, 1717–1725. <https://doi.org/10.1007/s00256-013-1723-3>

- Tella, S.H., Gallagher, J.C., 2014. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142, 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.008>
- Tien, D., Ohara, P.T., Larson, A.A., Jasmin, L., 2003. Vagal afferents are necessary for the establishment but not the maintenance of kainic acid-induced hyperalgesia in mice. *Pain* 102, 39–49. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00336-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00336-6)
- Toda, N., Toda, H., 2010. Nitric oxide-mediated blood flow regulation as affected by smoking and nicotine. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.042>
- Torres-del-Piiego, E., Vilaplana, L., Güerri-Fernández, R., Diez-Pérez, A., 2013. Measuring bone quality. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, 373. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0373-8>
- van 't Hof, R.J., Rose, L., Bassonga, E., Daroszewska, A., 2017. Open source software for semi-automated histomorphometry of bone resorption and formation parameters. *Bone* 99, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.03.051>
- Verbitsky, M., Rothlin, C.V., Katz, E., Elgoyhen, A.B., 2000. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39, 2515–2524. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00124-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00124-6)
- Vetter, D.E., Katz, E., Maison, S.F., Taranda, J., Turcan, S., Ballesteros, J., Liberman, M.C., Elgoyhen, A.B., Boulter, J., 2007. The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20594–20599. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708545105>
- Vetter, D.E., Liberman, M.C., Mann, J., Barhanin, J., Boulter, J., Brown, M.C., Saffioti-Kolman, J., Heinemann, S.F., Elgoyhen, A.B., 1999. Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23, 93–103. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80756-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80756-4)
- Vicary, G.W., Ritzenthaler, J.D., Panchabhai, T.S., Torres-González, E., Roman, J., 2017. Nicotine stimulates collagen type I expression in lung via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Respir. Res.* 18, 115. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0596-8>
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P.D., 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* 17, 319–336. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9>
- Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B., El Haj, A.J., 2001. Nicotinic

- regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 28, 603–608. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00427-6](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00427-6)
- Weitzmann, M.N., 2017. Bone and the immune system. *Toxicol. Pathol.* 45, 911–924. <https://doi.org/10.1177/0192623317735316>
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1558–1571. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Racké, K., 1999. The cholinergic “pitfall”: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 198–205. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03016.x>
- Whittaker, V.P., 1963. Identification of acetylcholine and related esters of biological origin, in: Koelle, G.B. (Ed.), *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-642-99875-1_1
- Winkler, D.G., Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M.E., Latham, J.A., 2003. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 22, 6267–6276. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg599>
- Xu, H., Gu, S., Riquelme, M.A., Burra, S., Callaway, D., Cheng, H., Guda, T., Schmitz, J., Fajardo, R.J., Werner, S.L., Zhao, H., Shang, P., Johnson, M.L., Bonewald, L.F., Jiang, J.X., 2015. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. *J. Bone Miner. Res.* 30, 436–448. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2374>
- Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., Klemenhausen, K.C., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Guo, X.E., Tecott, L.H., Mann, J.J., Hen, R., Horvath, T.L., Karsenty, G., 2009. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138, 976–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.051>
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor

- (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139, 1329–1337. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5837>
- York, S.L., Sethu, P., Saunders, M.M., 2016. Impact of gap junctional intercellular communication on MLO-Y4 sclerostin and soluble factor expression. *Ann. Biomed. Eng.* 44, 1170–1180. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1376-6>
- Zablotni, A., Dakischew, O., Trinkaus, K., Hartmann, S., Szalay, G., Heiss, C., Lips, K.S., 2015. Regulation of acetylcholine receptors during differentiation of bone mesenchymal stem cells harvested from human reaming debris. *Int. Immunopharmacol.* 29, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.021>
- Zhou, H., Shi, B., Jia, Y., Qiu, G., Yang, W., Li, J., Zhao, Z., Lv, J., Zhang, Y., Li, Z., 2018. Expression and significance of autonomic nerves and $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor in colorectal cancer. *Mol. Med. Rep.* 17, 8423–8431. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8883>

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Originalarbeit

Baumann L., Kauschke V., Vikman A., Dürselen L., Krasteva-Christ G., Kampschulte M., Heiss C., Yee K.T., Vetter D.E., Lips K.S., 2019. Deletion of nicotinic acetylcholine receptor alpha9 in mice resulted in altered bone structure. *Bone* 120, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.11.003>

9.2 Kongressbeiträge/ Posterpräsentation

Baumann L., Kauschke V., Dürselen L., Kovtun A., Kampschulte M., Heiss C., Lips K.S. Gendefizienz des nikotinischen alpha9 Acetylcholinrezeptors im Knockout-Mausmodell führt zu Veränderung der Knochenstruktur. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. 25.-28.10.2016, Berlin. (Verleihung des Posterpreises in der Sektion Grundlagenforschung.)

Baumann L., Kauschke V., Kovtun A., Dürselen L., Lips K.S. Alteration in bone status of adult female nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha9 and 10 knockout mice. von-Behring-Röntgen-Symposium „Bone Disorders and New Treatment Concepts“. 9.-10.10.2015, Gießen.

10 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

11 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin S. Lips für die großartige Möglichkeit, meine Dissertation im Labor für experimentelle Unfallchirurgie zu schreiben. Besonders möchte ich mich für die hervorragende Betreuung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit, die Unterstützung bei der Teilnahme am DKOU in Berlin und der gemeinsamen Publikation bedanken. Danke für die stets motivierende, hilfsbereite Art und das offene Ohr! An dieser Stelle gilt mein Dank auch der DFG für die Förderung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79, Teilprojekt B7.

Für die Züchtung und Bereitstellung der Mäuse sowie die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten des Instituts für Anatomie und Zellbiologie möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer sowie Herrn Martin Bodenbenner meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Heiß und allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Unfallchirurgie gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung dieses Projektes. Ein besonderer Dank für ihren unermüdlichen Einsatz gilt Frau Dr. Vivien Kauschke, Frau Olga Dakischew und Frau Ivonne Bergen. Des Weiteren danke ich herzlich Frau Ida Oberst, Frau Annette Stengel, Frau Martina Fink und Herrn Rainer Braun für die Einarbeitung in labortechnische Methoden und Frau Dr. Ursula Sommer für die Einarbeitung in die Histomorphometrie und die Durchführung der TEM-Aufnahmen.

Herrn PD Dr. Marian Kampschulte und Frau Gunhild Martels aus dem Labor für experimentelle Radiologie möchte ich meinen Dank für die Durchführung der μ CT-Untersuchung sowie die Einarbeitung und Hilfestellung bei der Datenanalyse ausdrücken. Für die Möglichkeit der Durchführung biomechanischer Tests danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Dürselen vom Institut für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik des Universitätsklinikums Ulm. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Vikman und Frau Patricia Horny für die Unterstützung bei der Durchführung und Datenanalyse der biomechanischen Tests.

Nicht zuletzt geht ein besonderer Dank an meine Familie, meinen Freund und meine Freunde, die mich während meines Studiums und darüber hinaus jederzeit unterstützt haben.