

# **Der Einfluss der Tryptophan-Hydroxylase 2 auf den Knochenstoffwechsel des Femurs am Rattenmodell**

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

vorgelegt von Sogl, Yannick Julian  
aus Karlsruhe

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,  
Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Tag der Disputation: 16.11.2021

*Meiner Familie gewidmet.*

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Ein kurzer Überblick .....	1
1.2	Anatomie und Physiologie des Knochens.....	2
1.2.1	Makroskopische Anatomie des Knochens .....	2
1.2.2	Die extrazelluläre Matrix des Knochens .....	3
1.2.3	Mikroskopische Knochenarchitektur .....	3
1.2.4	Die knochenformierende Zellreihe.....	4
1.2.5	Osteoklasten .....	6
1.2.6	Knochenumbau: „ <i>Bone Remodeling</i> “ .....	7
1.2.7	Knochenzell-Interaktionen .....	8
1.3	Endokrine Regulation des Knochenstoffwechsels .....	9
1.4	Osteoporose .....	10
1.5	Serotoninsynthese und Serotoninwirkung .....	12
1.5.1	5-HT-Synthese, -Speicherung und -Abbau.....	12
1.5.2	5-HT-Vorkommen im Körper .....	14
1.5.3	Lokale und endokrine 5-HT-Wirkung mithilfe der Tph1.....	15
1.5.4	5-HT-Wirkung durch die Tph2 .....	16
1.6	Hypothese und Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Studiendesign und Versuchstiere .....	21
2.2	Euthanasie, Probengewinnung und -vorbereitung .....	22
2.3	<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)</i> .....	23
2.4	Fixierung und Einbettung für die Kryopräparationstechnik.....	23
2.5	Schnitttherstellung mittels Gefriermikrotom .....	24
2.6	Histologische Färbungen.....	24
2.7	Fotomikroskopie.....	25
2.8	Histomorphometrie mittels ImageJ .....	26
2.8.1	Analyse der Von Kossa / Van Gieson-Färbung .....	26

## Inhaltsverzeichnis

2.8.2	Ermittlung der Trabekelparameter .....	29
2.8.3	Semi-automatische Auswertung der Silbernitrat-Färbung.....	30
2.8.4	Analyse der ALP-Färbung .....	31
2.8.5	Semi-automatische Auswertung der TRAP-Färbung .....	31
2.9	Statistik .....	33
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Erhöhte BMD bei KO.....	35
3.2	Erhöhter Anteil mineralisierter Knochenmatrix bei KO .....	37
3.3	Der Einfluss der Tph2 auf die Trabekeldicke ist altersabhängig .....	39
3.4	Stetiger Anstieg der ALP-Aktivität mit dem Alter bei KO .....	41
3.5	KO übersteigt WT in der Osteozyten-Quantität.....	44
3.6	Anzahl und Aktivität der Osteoklasten sind bei KO erniedrigt .....	48
4	Diskussion.....	52
4.1	KO zeigt erhöhte BMD .....	53
4.2	Das VNS als Vermittler zwischen Tph2 und dem Knochenstoffwechsel .....	54
4.3	Die Knochenzellen .....	57
4.4	Limitationen.....	63
4.5	Fazit und Ausblick .....	65
5	Zusammenfassung.....	68
6	Summary.....	69
7	Abkürzungsverzeichnis .....	70
8	Abbildungsverzeichnis.....	72
9	Tabellenverzeichnis.....	73
10	Literaturverzeichnis .....	75
11	Anhang.....	94
11.1	Fixations- und Einbettungsprotokoll.....	94
11.2	Färbeprotokoll Von Kossa-/ Van Gieson-Färbung .....	95
11.3	Färbeprotokoll Silbernitrat-Färbung .....	96
11.4	Färbeprotokoll ALP-Färbung .....	98

## Inhaltsverzeichnis

11.5	Färbeprotokoll TRAP-Färbung .....	99
11.6	ImageJ Makros.....	102
11.6.1	ROI-Auswertung.....	102
11.6.2	Binärbild mit Schwellenwert-Auswahl zur Trabekeldickenbestimmung	110
11.6.3	Binärbild zur Bestimmung der Knochenfläche bei der TRAP-Färbung.	110
11.7	Ergebnistabellen .....	112
11.7.1	Bestimmung der BMD mittels DXA.....	112
11.7.2	Analyse der mineralisierten Knochenmatrix.....	112
11.7.3	Quantifizierung der Trabekeldicke .....	113
11.7.4	Untersuchung der Osteoblasten-Aktivität .....	113
11.7.5	Vergleich der Osteozyten-Quantität.....	114
11.7.6	Analyse der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität .....	116
12	Publikationsverzeichnis und Förderungen .....	117
13	Ehrenwörtliche Erklärung .....	118
14	Danksagung .....	119

### **1 Einleitung**

#### **1.1 Ein kurzer Überblick**

Im folgenden Abschnitt sollen zu Beginn die Anatomie und Physiologie des Knochengewebes beschrieben werden. Sie sind für das Verständnis von Pathogenese und Pathophysiologie des Knochenschwunds essenziell. Dargestellt werden in diesem Rahmen der aktuelle Wissensstand des Knochenumbaus sowie die Regulation des Knochenstoffwechsels durch parakrine Zell-Kommunikation und auf endokriner Ebene. Im darauffolgenden zweiten Einleitungsteil wird auf den Stoffwechsel des Serotonins mit Synthese, Speicherung und Abbau eingegangen. Hervorgehoben werden die Schrittmacherenzyme, was sie voneinander unterscheidet und was dies für Auswirkungen auf den Serotoninhaushalt hat. Es werden einige bereits bekannte Eigenschaften von Serotonin betrachtet und Zusammenhänge mit neuropsychiatrischen Erkrankungen beschrieben. Die Einleitung mündet in der Formulierung der zentralen Fragestellung und der Forschungshypothese, die einen Bogen zwischen beiden Einleitungsabschnitten spannt.

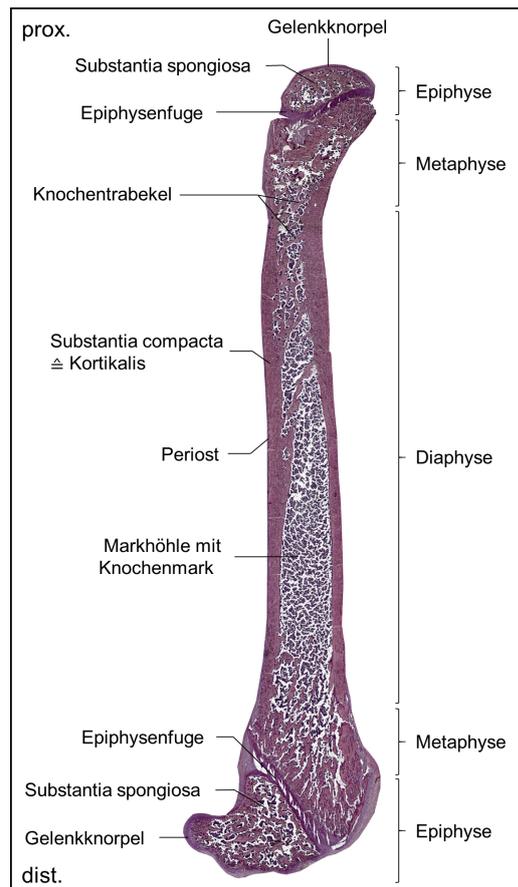
## 1.2 Anatomie und Physiologie des Knochens

### 1.2.1 Makroskopische Anatomie des Knochens

Das menschliche Skelett wird aus 210 Knochen gebildet (Drenckhahn, 2008, S. 266–267). Zusammen mit dem Knorpel bildet es als Stützgewebe den passiven Teil des Bewegungsapparats (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 148). Die Enden langer Röhrenknochen wie die des Femurs werden über einen Schaft (Diaphyse) verbunden (Abb. 1). Die artikulierenden Flächen sind beidseits mit Gelenkknorpel überzogen und liegen der Epiphyse auf (Drenckhahn, 2008, S. 266–267). Zwischen Epiphyse und Metaphyse liegt die dem Längenwachstum dienende Epiphysenfuge, die mit zunehmendem Alter verknöchert (Drenckhahn, 2008, S. 266–267).

Die Diaphyse besteht hauptsächlich aus dichtem kortikalen Knochen (Kortikalis, auch Kompakta) (Clarke, 2008). Die Spongiosa, als schwammähnliche Binnenstruktur des Knochens, ist vor allem im epi- und metaphysären Knochenbereich vorzufinden und wird aus den vielen Knochenbälkchen (Trabekel) gebildet, welche sich entsprechend ihrer auf sie wirkenden Zug- und Druckbeanspruchung trajektorieell ausrichten (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 135). Im Bereich des Trabekelknochens ist die Kortikalis relativ gering ausgeprägt (Clarke, 2008). Die Markhöhle wird von Knochenmark ausgefüllt, welches auf Höhe der Epi- und Metaphysen hauptsächlich der Blutbildung

dient (rotes Knochenmark) und bei der Diaphyse aufgrund starker Verfettung als gelbes Knochenmark bezeichnet wird (Drenckhahn, 2008, S. 266–267). Der Knochen ist von einer Knochenhaut (Periost) überzogen (Drenckhahn, 2008, S. 266–267). Knochengewebe setzt sich aus Knochenzellen und extrazellulärer Matrix zusammen, wobei bei letzterer mineralisiertes von nicht-mineralisiertem Extrazellulargewebe unterschieden werden kann (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 138).



**Abbildung 1: Anatomie des Femurs.** Sagittalschnitt durch das linke Femur einer Ratte. Eigene Darstellung, H.E.-Färbung, Beschriftung orientiert an Abb. 5.3-16(b) aus Drenckhahn, 2008, S. 266.

### 1.2.2 Die extrazelluläre Matrix des Knochens

Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix bestimmt die mechanischen Eigenschaften des Knochens (Alford *et al.*, 2015). Sie hat einen Wassergehalt von 10–20 %, die wasserfreie extrazelluläre Matrix setzt sich aus anorganischer (mineralisierter, ca. 70 %) und organischer Matrix (ca. 30 %) zusammen (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 138). Die organische Extrazellulärmatrix besteht zum weit größten Teil aus Kollagenfibrillen des Typs 1 mit geringen Mengen an Kollagen Typ 3, 5 und nicht-fibrillären Kollagenen (Clarke, 2008). Zu den restlichen 10 % der nicht-kollagenen Matrixbestandteilen zählen neben Proteoglykanen auch Glykoproteine, Lipide und einige weitere Proteine (Bonucci, 2012). Die organische Matrixkomponente erhält die Knochenelastizität und Zugfestigkeit (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 134). Die mineralisierte Matrix ist Ursache der hohen Knochenfestigkeit (Alford *et al.*, 2015). Hauptbestandteile sind Hydroxylapatit-Kristalle ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), ein kleiner Anteil der Mineralsubstanz wird aus Kalzium-Karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), Kalziumhydrogen-Phosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ) sowie weiteren Anionen und Kationen gebildet (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 134). Die Menge an Kalzium im Knochengewebe eines 70 kg schweren Erwachsenen kann auf ungefähr 1 kg geschätzt werden (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 134).

### 1.2.3 Mikroskopische Knochenarchitektur

Bei der Knochenhistologie kann zwischen vorläufigem Geflechtknochen und reifem Lamellenknochen unterschieden werden (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 184–185). Die Architektur ist von der räumlichen Orientierung der Kollagenfibrillen abhängig. Bei Geflechtknochen sind die Kollagenfibrillen ungeordnet ausgerichtet (Welsch und Kummer, 2018, S. 141). Dieser kommt immer dann vor, wenn Knochengewebe neu erzeugt wird, beispielsweise als primäres Knochengewebe während der Ossifikation. Früher oder später wird jeder Geflechtknochen in den stabileren, ausdifferenzierten Lamellenknochen überführt (Welsch und Kummer, 2018, S. 139). Aufgebaut ist Lamellenknochen aus miteinander verbundenen, 3–7  $\mu\text{m}$  dicken und mineralisierten Knochenlamellen, bei denen die Kollagenfibrillen einer Lamelle in gleicher Richtung orientiert sind (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 136; Welsch und Kummer, 2018, S. 140). In der Kompakta dominiert die in Längsrichtung orientierte Osteon-Architektur, bei der 4–20 so genannter Speziallamellen konzentrisch um eine Lichtung verlaufen (Havers-Kanal, Durchmesser 20–30  $\mu\text{m}$ ) (Welsch und Kummer, 2018, S. 140). Quergeschnitten ähneln die Osteone der Jahresring-Struktur eines Baumstamms. In den Havers-Kanälen durchziehen Gefäße die Kompakta, wobei sie sich auch aufteilen und orthogonal in den dann als Volkmann-Kanäle bezeichneten Lichtungen verlaufen

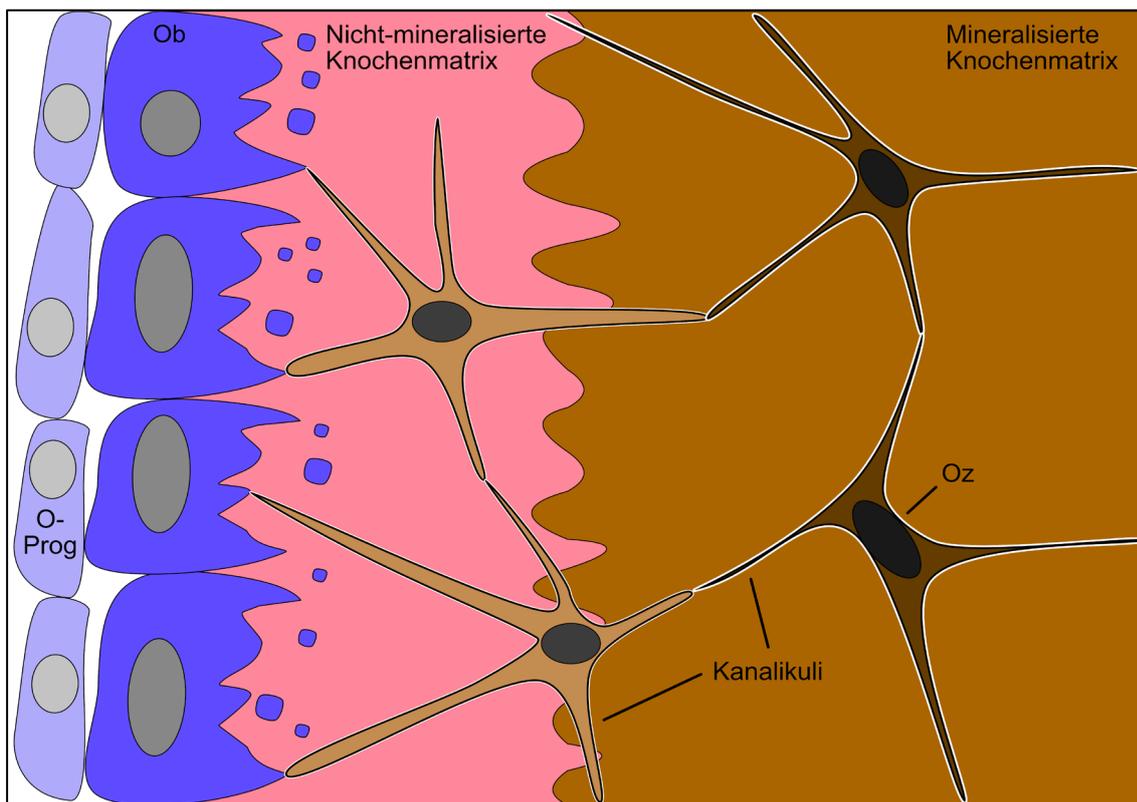
können (Welsch und Kummer, 2018, S. 140). Aufgrund des ständigen Knochenumbaus finden sich zwischen den Osteonen als Schaltlamellen bezeichnete Residuen ersetzter und durchbauter Osteone (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 194–195). Die äußere und innere Kompakta-Grenze wird von Generallamellen umgeben (Welsch und Kummer, 2018, S. 140). Die gefäßlosen Spongiosatrabekel werden durch parallel zur Trabekelrichtung orientierten Trabekellamellen gestützt (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 137). Eine Osteon-Architektur ist nur bei großen Trabekeln zu erkennen. Die stark vaskularisierte und innervierte Knochenhaut (Periost) besteht aus dem *Stratum fibrosum* und *Stratum osteogenicum* (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 193). Sowohl der Spongiosa als auch der Innenseite des Havers-Kanals liegen flache Knochendeckzellen (endostale Saumzellen) auf und bilden die zelluläre Hauptkomponente des Endosts (Welsch und Kummer, 2018, S. 140).

### **1.2.4 Die knochenformierende Zellreihe**

Zur Gruppe der knochenbildenden Zellreihe gehören die Osteoblasten und Osteozyten (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 186). Osteoblasten sind einkernige, kubische, für die Knochenmatrix-Bildung verantwortliche Zellen mit starker Positivität für alkalische Phosphatase (ALP) (Kular *et al.*, 2012). Sie entstehen über Zwischenstufen aus im Knochenmark lokalisierten Osteoprogenitor-Zellen, die wiederum aus mesenchymalen Stammzellen regeneriert werden (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 189). Zur Knochenbildung synthetisieren reife Osteoblasten zuerst organische Matrixkomponenten (nicht-mineralisierte Knochenmatrix, auch Osteoid genannt), hauptsächlich bestehend aus Kollagen Typ 1 sowie weiteren nicht-kollagenen Proteinen (Kular *et al.*, 2012). Matrixvesikel werden vom Osteoblasten-Zellkörper abgeschnürt (Anderson, 2003). Durch die enzymatische Aktivität der ALP wird Phosphat bereitgestellt, das sich im Vesikellumen mit Kalzium verbindet und auskristallisiert (Anderson, 2003). Sobald die Matrixvesikel platzen, lagern sich die Kristalle den Kollagenfibrillen an (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 189–190). Reife Osteoblasten können nach der Knochenbildung drei Wege einschlagen: 1.: Sie gehen in Apoptose (die Mehrzahl). 2.: Sie ruhen als flache endostale Saumzellen, die dort vorkommen, wo weder Knochenbildung noch -resorption stattfindet. Oder 3.: Sie entwickeln sich zu in die mineralisierte Matrix eingelagerten Osteozyten (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 189–190). Neben morphologischen Zell-Änderungen (Soma-Verkleinerung um ungefähr 70 % und zahlreiche Dendriten-Ausbildung) passt sich auch die Protein-Expression an (Mikuni-Takagaki *et al.*, 1995; Rupp *et al.*, 2018). ALP und die Synthese von Kollagen Typ 1 werden herunterreguliert. Die spindelförmigen Osteozyten sind vollständig von mineralisierter Matrix umgeben und stehen über Dendriten in Kontakt mit Blutgefäßen,

## Einleitung

endostalen Saumzellen sowie aktiven Osteoblasten (Abb. 2) (Rupp *et al.*, 2018). Zwischen Dendriten und der mineralisierten Knochenmatrix liegt ein kleiner, nicht-mineralisierter Spalt (Rupp *et al.*, 2018). Dieses lakuno-kanalikuläre Netzwerk sichert einerseits die Nährstoffversorgung, andererseits dient es als Sensor zur Erfassung mechanischer Knochenbeanspruchung. Der Aufgabe können Osteozyten nachkommen, indem sie mechanischen Stress in der mineralisierten Matrix via Transmembranproteine erfassen und weitergeben, außerdem können Scherkräfte durch Flüssigkeitsbewegung im lakuno-kanalikulären Netzwerk für die Mechanotransduktion erfasst werden (Rupp *et al.*, 2018). Anpassungsvorgänge an veränderte biomechanische Beanspruchung können somit in die Wege geleitet werden. Als Koordinatoren des Knochenstoffwechsels sind sie hormonell aktiv (s. u.) (Rupp *et al.*, 2018). Weiterhin können Osteozyten Knochen abbauen (osteozytäre Osteolyse) (Wysolmerski, 2012). Dies spielt insbesondere bei der Laktation in der Schwangerschaft zur Bereitstellung von Kalzium eine Rolle.



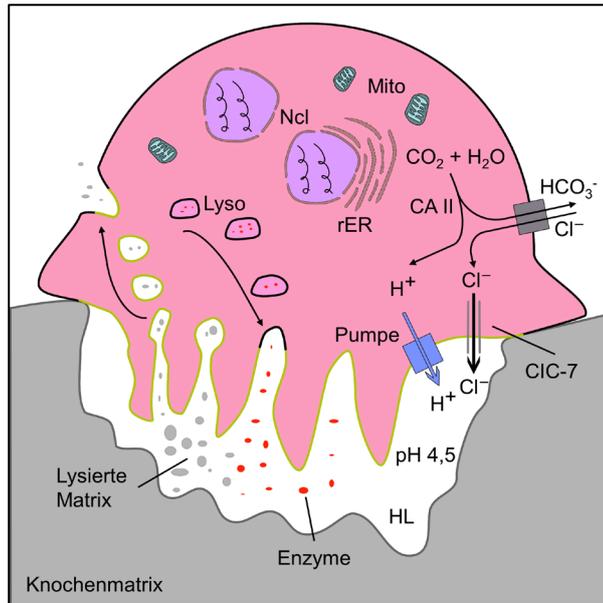
**Abbildung 2: Skizzierte Entwicklungsschritte knochenformierender Zellen.**

ALP-positive Osteoblasten (Ob) entwickeln sich aus Osteoprogenitor-Zellen (O-Prog) und synthetisieren Knochenmatrix. Auf dem Weg zum spindelförmigen Osteozyten (Oz) umgeben sie sich in nicht-mineralisierter Knochenmatrix, verkleinern ihre Somata (hellbraune Zelle) und bilden Dendriten aus. Von Ob abgeschnürte Vesikel (blaue Kreise) platzen und die Knochenmatrix mineralisiert. Oz sind in mineralisierter Knochenmatrix eingebettet. Über ihre in Kanalikuli liegenden Dendriten sind sie mit Nachbarzellen in Kontakt (Lakuno-kanalikuläres Netzwerk). Eigene Darstellung, orientiert an Abb. 3A aus Dallas *et al.*, 2013.

### 1.2.5 Osteoklasten

Die auf Resorption spezialisierten Osteoklasten entstehen über Zwischenstufen (Progenitorzellen) aus dem monozytären Phagozytosesystem des Knochenmarks (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 140), deren Entwicklung zur reifen Zelle mittels des Monozytenkolonien-stimulierenden Faktors (M-CSF) der Osteozyten induziert wird (Welsch und Kummer, 2018, S. 137). Osteoklasten sind Verwandte der Makrophagen, besitzen mehrere Zellkerne (bis zu 15) und können 150 µm groß werden. Sie sind azidophil und enthalten reichlich Organellen, die für den Resorptionsvorgang benötigt werden (z. B. Mitochondrien, Lysosomen, raues endoplasmatisches Retikulum) (Welsch und Kummer, 2018, S. 137). Aktiv resorbierende Osteoklasten sind durch Polarität gekennzeichnet: Mit einer apikalen, zur Resorption spezialisierten und einer basolateralen, zum Gefäßsystem orientierten

Membran (Cappariello *et al.*, 2014). Getrennt werden diese Bereiche durch die Versiegelungszone, bei der Zellausläufer die Verbindung der extrazellulären Matrix an die zytosolischen Aktinfilamente vermitteln (Cappariello *et al.*, 2014). Im apikalen Bereich bildet die Plasmamembran einen Faltenaum



**Abbildung 3: Osteoklastäre Knochenresorption.**

Darstellung der Arbeitsweise eines Osteoklasten. Für Details siehe Text. Ncl = Nucleoli, rER = raues endoplasmatisches Retikulum, *Ruffled Border* als gelbe Plasmamembran schematisiert, Lyso = Lysosomen, CA II = Carboanhydrase II, CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid, H<sub>2</sub>O = Wasser, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Hydrogencarbonat.

Enzyme als rote Ovale dargestellt, z. B. Cathepsin K, TRAP; Graue Ovale = Matrixfragmente: Sie werden nach basolateral transzytiert. Mito = Mitochondrien, Cl<sup>-</sup> wird über einen Anionenaustauscher (graues Viereck) aufgenommen und gelangt mithilfe des CIC-7-Kanal in die Howship-Lakune (HL). H<sup>+</sup> wird via H<sup>+</sup>-ATPasen aktiv in die HL transportiert (Pumpe). Eigene Darstellung, orientiert an Abb. 1 aus Soysa und Alles 2016.

(*Ruffled Border*) aus und vergrößert dadurch die resorptive Oberfläche (Abb. 3) (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 192). Diese resorptive Zellmembran ist reich an H<sup>+</sup>-ATPasen, wodurch Protonen in die zwischen *Ruffled Border* und extrazellulärer Matrix gelegene Howship-Lakune gepumpt werden können (Cappariello *et al.*, 2014). Die H<sup>+</sup>-Ionen werden hierfür von der zytosolischen Carboanhydrase II bereitgestellt (Soysa und Alles, 2016). Salzsäure entsteht lakunär, indem Chloridionen den Protonen durch das Transmembranprotein CIC-7 folgen (Soysa und Alles, 2016). Es resultiert ein pH von ungefähr 4,5 (Cappariello *et al.*, 2014). Die Säure führt zur Lyse der mineralisierten Knochenmatrix. Die Kalziumionen werden durch Kalziumkanäle aufgenommen und zur basolateralen Seite transzytiert (Drenckhahn und Kugler, 2008,

S. 141). Durch den Mineralabbau werden organische Matrixbestandteile freigelegt, welche durch lysosomale saure Hydrolasen wie Cathepsin K abgebaut werden (Cappariello *et al.*, 2014). Auch die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein lysosomales Enzym, wobei ihre Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Cappariello *et al.*, 2014). Gezeigt werden konnte allerdings, dass die TRAP mit dem Resorptionsvorgang korreliert und ein Mausmodell mit einem Knockout der TRAP skelettale Abnormalitäten mit verstärkter Knochendichte zeigte (Hayman, 2008). Neben ihrer Phosphatase-Aktivität kann sie zusätzlich reaktive Sauerstoffspezies (Hydroxyl-Radikale) bei neutralem pH generieren, die zum Abbau organischer Knochenmatrix beitragen (Halleen *et al.*, 2003).

### 1.2.6 Knochenumbau: „*Bone Remodeling*“

Der Knochen wird zeitlebens umgebaut. Es wird angenommen, dass ungefähr 10 % der gesamten Knochenmasse jährlich ersetzt wird (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 197). Knochenumbau hat das Ziel, Knochenmaterial zu erneuern und Anpassungen an veränderte Belastungen herbeizuführen (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 197). Auch Kalziumionen können hierdurch bereitgestellt werden (Drenckhahn und Kugler, 2008, S. 145).

In dieser Studie wurde hauptsächlich der trabekuläre Knochen betrachtet. Infolgedessen werden auch nur Knochenumbauprozesse in der Spongiosa ausführlich beschrieben. Knochenumbau wird von den Osteozyten koordiniert, die über das lakuno-kanalikuläre Netzwerk mit den Osteoblasten und -klasten in Verbindung stehen (Abb. 2 und Abb. 9) (Katsimbri, 2017). Eine knochenumbauende Einheit (*basic multicellular units*, BMU) wird aus nacheinander arbeitenden Osteoklasten und Osteoblasten gebildet und von endostalen Saumzellen überspannt, wodurch sich eine abgeschirmte Umbauzone ausbildet (Delaisse, 2014; Katsimbri, 2017).

Der Knochenumbauzyklus beginnt mit der Aktivierungsphase, bei der unter anderem Osteozyten mechanische Beanspruchung wahrnehmen und diese in biologische Signale übersetzen (Bonewald, 2007; Raggatt und Partridge, 2010). Als Folge heben sich die endostalen Saumzellen von der Knochenmatrix ab und Osteoklasten werden rekrutiert (Katsimbri, 2017). In der anschließenden Resorptionsphase bauen Osteoklasten die Knochenmatrix ab (Raggatt und Partridge, 2010). Einkernige „Umkehrzellen“ unklarer Ätiologie [ggf. monozytär (Tran Van *et al.*, 1982) oder osteoblastär / endostale Saumzellen (Everts *et al.*, 2002)] entfernen Kollagenreste (Raggatt und Partridge, 2010). Die Umkehrphase bezeichnet den Wechsel von der Resorptions- zur Neubildungsphase (Delaisse, 2014). Sie wird von aktiven Osteoblasten bestimmt, die Knochengewebe in der ehemaligen Howship-Lakune aufbauen (Raggatt und Partridge, 2010).

### 1.2.7 Knochenzell-Interaktionen

Der Knochen ist ein sehr stoffwechselaktives Organ. Im physiologischen Optimalfall halten sich Knochenaufbau und -abbau die Waage (Homöostase) (Kular *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2018). Imbalance zwischen Resorptions- und Neubildungsphase kann zu reduzierter Knochenmasse (Osteoporose) oder erhöhter Knochenmasse (Osteopetrose) führen. Durch Zell-Interaktionen innerhalb der BMU wird diese Homöostase erhalten (Sims und Martin, 2014).

#### Der Einfluss von Osteoblasten auf Osteoklasten

Über das Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1) können Osteoklasten von Osteoblasten an den Ort des Knochenumbaus gelockt werden (Chen *et al.*, 2017; Graves *et al.*, 1999). Osteoblasten sezernieren M-CSF, das an seinen passenden Rezeptor der Makrophagen und Osteoklastenvorläufer bindet, sie zur Ausdifferenzierung anregt und deren Apoptose verhindert (Chen *et al.*, 2017; Lacey *et al.*, 1994; Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990; Woo *et al.*, 2002). Darüber hinaus induziert M-CSF die Expression des Rezeptor-Aktivators von NF- $\kappa$ B (RANK) (Chen *et al.*, 2017). RANK ist ein von Osteoklasten(-Vorläuferzellen) exprimiertes Transmembranprotein und gehört zur Rezeptor-Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) (Hsu *et al.*, 1999), dessen Ligand (RANKL) von Osteoblasten transmembranär angeboten und auch sezerniert wird (Ikeda *et al.*, 2001). Bindet RANKL an RANK, wird die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Cathepsin K- und TRAP-exprimierenden reifen Osteoklasten induziert (Boyle *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist RANKL imstande, zytoskelettale Veränderungen reifer Osteoklasten zu induzieren, die zur Knochenresorption benötigt werden (Burgess *et al.*, 1999).

Wie auch RANK gehört Osteoprotegerin (OPG) der TNF-Familie an (Kearns *et al.*, 2008). Als löslicher Köderrezeptor bindet es RANKL und vermag dessen Wirkung an RANK zu unterbinden (Chen *et al.*, 2017). Das von Osteoblasten produzierte OPG inhibiert die Osteoklastogenese *in vitro* sowie die Knochenresorption *in vivo* und nimmt daher eine wichtige Rolle der Osteoklasten-Regulation ein (Boyle *et al.*, 2003; Udagawa *et al.*, 2000). Studien legen nahe, dass das RANKL/OPG-Verhältnis bestimmt, ob die Knochenbildung oder die -resorption überwiegt (Fazzalari *et al.*, 2001; Grimaud *et al.*, 2003; Kearns *et al.*, 2008).

### **Der Einfluss von Osteoklasten auf Osteoblasten**

Auf die Resorptionsphase der Osteoklasten folgt die Neubildungsphase der Osteoblasten (Sims und Martin, 2015).

Durch die osteoklastären Resorptionsvorgänge treten Matrixproteine zutage, welche die Osteoblasten-Migration und -Differenzierung induzieren (Sims und Martin, 2015). Hierbei scheinen der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und die Insulin-ähnlichen Wachstumshormone (IGF) 1 und 2 eine Rolle zu spielen (Bonewald und Mundy, 1990; Hayden *et al.*, 1995; Martin und Sims, 2005). Diese freigelegten Kopplungsfaktoren werden durch den niedrigen pH der Howship-Lakune aktiviert (Martin und Sims, 2005; Oreffo *et al.*, 1989).

Direkt beeinflussen Osteoklasten die Osteoblastenaktivität mittels sekretierter Moleküle wie beispielsweise Ligand 10b des Wingless-Int-1-Signalwegs (Wnt10b) (Pederson *et al.*, 2008). Die Kaskade induziert die Expression von Transkriptionsfaktoren zur Förderung der Osteoblastogenese und verstärkt das Überleben der knochenformierenden Zellreihe (Bennett *et al.*, 2005; Khosla *et al.*, 2008).

### **Der Einfluss von Osteozyten auf Osteoblasten und Osteoklasten**

Als Koordinatoren des Knochenumbaus können Osteozyten parakrine Proteine exprimieren und so die Aktivität der Osteoblasten und -klasten beeinflussen (Tatsumi *et al.*, 2007). Sie legen fest, welche Knochenstelle von einer BMU umgebaut werden soll (Matsuo und Irie, 2008). So sezernieren Osteozyten beispielsweise Sklerostin und das Dickkopf-verwandte Protein 1, die den Wnt10b/ $\beta$ -catenin-Signalweg und folglich die Osteoblastogenese hemmen (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

## **1.3 Endokrine Regulation des Knochenstoffwechsels**

Einfluss auf die BMU wird nicht nur lokal durch Zell-Interaktionen genommen. In die Knochenhomöostase wird vor allem auch im Rahmen der Regulation des Kalzium- und Mineralhaushalts hormonell eingegriffen (Felsenberg, 2016b, S. 3014–3015).

Calcitonin aus den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse hemmt Osteoklasten und reduziert dadurch die Kalziumfreisetzung (Siggelkow, 2016, S. 3027–3028). Parathormon (PTH) der Nebenschilddrüsen dient der Aufrechterhaltung der extrazellulären Kalziumkonzentration (Siggelkow, 2016, S. 3025). Es hemmt einerseits die Sklerostin-Synthese und begünstigt dadurch den Knochenaufbau. Andererseits induziert PTH die RANKL-Bildung, was eine Osteoklasten-Aktivierung zur Folge hat (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 200). Längerfristig wird zur Beibehaltung der Kalziumhomöostase durch PTH auch in der Niere die Bildung von 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Calcitriol) induziert (Siggelkow, 2016, S. 3025). Calcitriol sorgt für eine

Bereitstellung von Kalzium beispielsweise durch Steigerung der enteralen Kalziumresorption und renal-tubulären Rückresorption (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 200). Sexualhormone wie Androgene und Östrogene vermindern den osteozytären Zelluntergang und reduzieren sowohl die Osteoklastogenese als auch deren Aktivierung (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 200). Weiterhin vermag es Östrogen, die Apoptose der Osteoklasten zu induzieren (Chen *et al.*, 2017). Androgene und Östrogene wirken somit dem Knochenabbau entgegen.

Ob die BMU zum Knochenanabolismus oder -katabolismus tendiert, ist auch altersabhängig. Die mit der Kindheit verbundenen Wachstumsphasen gehen mit strukturellen Anpassungen des Knochens einher (Weaver *et al.*, 2016). Die Knochenhomöostase ist in Richtung Aufbau verschoben und die Knochenmasse nimmt zu (Weaver *et al.*, 2016). Nach Erreichen eines Höchstwerts sinkt sie wieder mit zunehmendem Alter (Weaver *et al.*, 2016). Dieser Zeitpunkt maximaler Knochenmasse ist geschlechts- und knochenabhängig (Berger *et al.*, 2010). Er ließ sich mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*, DXA) am Schenkelhals jeweils kurz nach beziehungsweise mit Erreichen der Geschlechtsreife bestimmen und lag bei Frauen im Alter von 16–19 Jahren und bei Männern im Alter von 17–19 Jahren (Berger *et al.*, 2010).

### **1.4 Osteoporose**

Im gesunden erwachsenen Knochen halten sich Knochenbildung und -abbau die Waage (Zhu *et al.*, 2018). Tendiert die BMU über längere Zeit in Richtung Resorption, kann das einen systemischen Verlust von Knochenmasse bedingen, verbunden mit einer Verschlechterung der Trabekelarchitektur (Hernlund *et al.*, 2013). Als Folge resultiert erhöhtes Frakturrisiko (Hernlund *et al.*, 2013). Klassische Manifestationsorte osteoporotischer Frakturen sind Wirbelkörper, Hüfte beziehungsweise Schenkelhals, distaler Radius und proximaler Humerus (Hernlund *et al.*, 2013). Klinische Relevanz gewinnt die Osteoporose daher durch das Auftreten von Knochenbrüchen mit hohem Versorgungsaufwand für das Gesundheitssystem (Häussler *et al.*, 2007).

Eintrittspunkte in die Frakturrisiko-Spirale der Osteoporose gibt es viele. Unter ätiologisch primär beziehungsweise idiopathisch werden die postmenopausalen sowie senilen Osteoporosen subsumiert (Bartl, 2011, S. 37). Aber auch Grunderkrankungen wie beispielsweise Malassimilationssyndrome, endokrine Krankheiten und die medikamentöse Therapie mit Kortikosteroiden können Ursache der Osteoporose sein (Cosman *et al.*, 2014). Sie wird dann als sekundäre Osteoporose bezeichnet (Bartl, 2011, S. 37–41).

## Einleitung

In Deutschland waren im Jahr 2003 7,8 Millionen Menschen im Alter ab 50 Jahren an Osteoporose erkrankt (Häussler *et al.*, 2007). Das entsprach einer Prävalenz von 26 %. Mit dem Alter steigt auch die Prävalenz, Frauen erkranken dabei deutlich häufiger als Männer (ca. 4 : 1) (Häussler *et al.*, 2007). Diagnostiziert wird Osteoporose radiologisch mittels DXA als Standardmethode (Felsenberg, 2016a, S. 3055).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Osteoporose über den *T-Score* (Kanis, 2007, S. 7). Er bezeichnet eine in der DXA um  $\leq -2,5$  Standardabweichungen (*Standard deviation*, SD) vom Durchschnitt abweichende Knochendichte (*Bone Mineral Density* in  $\text{g}/\text{cm}^2$ , BMD) (Kanis, 2007, S. 7). Als Mittelwert-definierende Referenzgruppe dient dabei eine Kohorte junger Erwachsener desselben Geschlechts und derselben Ethnie (Felsenberg, 2016a, S. 3055). Ein *T-Score* von -1 entspricht folglich einer SD von -1. Liegt der *T-Score* zwischen -1 und -2,5, wird per definitionem von Osteopenie gesprochen (Felsenberg, 2016a, S. 3049). Interessanterweise entstehen ca. 50 % aller Hüftfrakturen postmenopausaler Frauen im Alter von 60–94 Jahren bereits bei reduzierten, osteopenen BMD-Werten (Pasco *et al.*, 2006). Nach Pasco und Kollegen ist es deshalb von besonderer Wichtigkeit, bereits das Augenmerk auf die Prävention von Zuständen reduzierter Knochendichte zu legen (Pasco *et al.*, 2006).

Einige Risikofaktoren sind für das Entstehen der Osteopenie / Osteoporose bereits erfasst: Epilepsie und die Antiepileptika-Medikation, Parkinson-Syndrom, Depression und die Therapie mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*, SSRI) *etc.* (Cosman *et al.*, 2014). Eine mehrjährige Kohorten-Studie an 5008 über 50 Jahre alten Frauen und Männern konnte eine um -4 % erniedrigte BMD der Hüfte beschreiben, bei täglicher Einnahme von SSRI (Richards *et al.*, 2007). Eine Meta-Analyse epidemiologischer Studien konnte an der Hüfte eine signifikante Reduktion der BMD um  $-0,052 \text{ g}/\text{cm}^2$  bei depressiven Patienten gegenüber Gesunden belegen (Wu *et al.*, 2009). Überlegungen zu dem Zusammenhang zwischen Depressionen, deren Therapie und Osteoporose gibt es einige, zusammengefasst in einer Übersichtsarbeit von Cizza *et al.* (Cizza *et al.*, 2009). Darin werden veränderter Hormonhaushalt, das Immunsystem oder das vegetative Nervensystem (VNS) genannt. Von gesicherten Kausalketten kann allerdings nicht die Rede sein.

Therapiert wird die Osteoporose laut S3-Leitlinie durch Ernährungs- und Mobilisierungstherapien als Basismaßnahmen, die dem Erhalt der Muskulatur, Koordination und der generellen körperlichen Verfassung dienen (Kurth *et al.*, 2017, S. 142–149). Die Einleitung einer spezifischen medikamentösen Therapie ist im Expertenkonsens bei allen Konstellationen einer Osteoporose mit deutlich erhöhtem Frakturrisiko indiziert (Kurth *et al.*, 2017, S. 150). Nur einige Präparate seien genannt: Anwendung bei proximalen Femurfrakturen finden vor allem Bisphosphonate wie

Alendronat (Kurth *et al.*, 2017, S. 163–177). Aber auch der monoklonale Antikörper Denosumab, der die Bindung von RANKL an RANK inhibiert (Cummings *et al.*, 2009), kann laut S3-Leitlinie unter bestimmten Voraussetzungen eingesetzt werden (Kurth *et al.*, 2017, S. 182). In der experimentellen Forschung wurde am Mausmodell auch durch Hemmung der Serotoninsynthese im Gastro-Intestinal-Trakt (GIT) durch das Präparat LP533401 ein neuartiger Ansatz zur Therapie der Osteoporose beschrieben (Yadav *et al.*, 2010).

### 1.5 Serotoninsynthese und Serotoninwirkung

Serotonin (lat. *Serum* + gr. *Tonus*; 5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wurde 1948 erstmalig aus Rinderserum isoliert, namentlich genannt und dabei als Vasokonstriktor beschrieben (Rapport *et al.*, 1948). Ein paar Jahre später wurde dargestellt, dass das in den enterochromaffinen Zellen (EZ) des GIT bis dato genannte „Enteramin“ dem 5-HT identisch sei (Erspamer und Asero, 1952). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass 5-HT bei vielen somatischen wie psychiatrischen Stoffwechselwegen und Pathologien eine zentrale Rolle einnimmt (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Walther und Bader, 2003).

#### 1.5.1 5-HT-Synthese, -Speicherung und -Abbau

Das biogene Amin 5-HT wird intrazellulär aus der essenziellen Aminosäure L-Tryptophan (Trp) in zwei Schritten gebildet (Abb. 4A). Im ersten Schritt wird Trp durch die geschwindigkeitsbestimmende Tryptophan-Hydroxylase (Tph) zu 5-Hydroxy-L-Tryptophan (5-HTP) hydroxyliert und daraufhin durch die aromatisierte L-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD) zu 5-HT dekarboxyliert (Kriegebaum *et al.*, 2010a). Es sind zwei Tph-Isoformen bekannt: Tph1 und Tph2 (Walther und Bader, 2003). Während Tph1 peripher zu finden ist, dominiert Tph2 im Zentral-Nervensystem (ZNS) (Walther und Bader, 2003). Strukturell unterscheiden sich Tph1 und Tph2 zwar in den n-terminalen regulatorischen Domänen, insgesamt besitzen sie aber eine zu 71 % übereinstimmende Aminosäuresequenz (Kriegebaum *et al.*, 2010a; Walther und Bader, 2003).

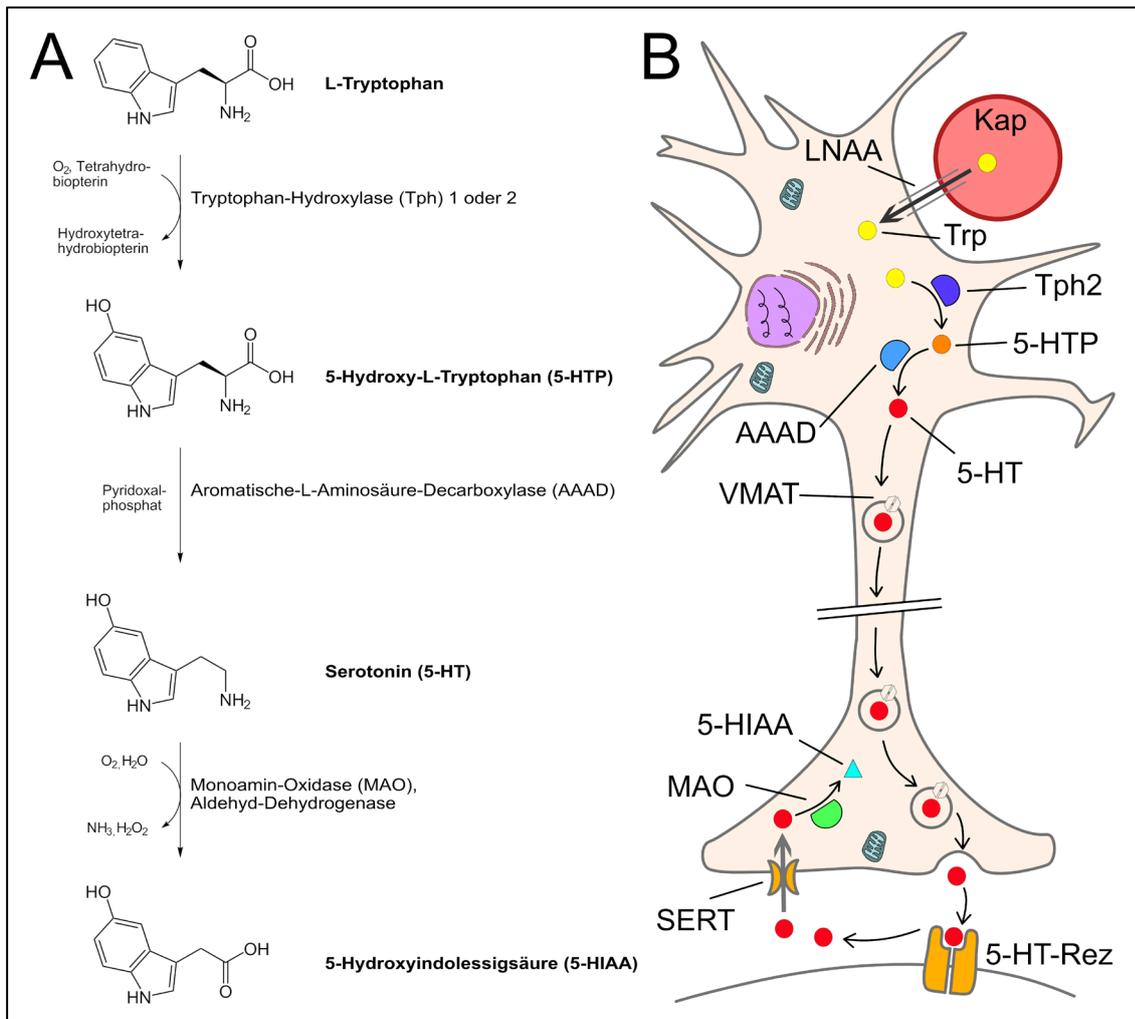
Gespeichert und transportiert wird 5-HT intrazellulär in vesikulären Monoamin-transportern (VMAT) 1 und 2 (Kriegebaum *et al.*, 2010a; Peter *et al.*, 1995). Sein Abbau erfolgt durch die Monoamin-Oxidasen (MAO) A und B zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd, aus dem nach Wasserstoff-Abspaltung durch die Aldehyd-Dehydrogenase 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) entsteht (Kriegebaum *et al.*, 2010a). Letzteres kann renal eliminiert werden (Kriegebaum *et al.*, 2010a).

5-HT wird durch seine polare Monoamin-Struktur am Übertritt der Blut-Hirn-Schranke (BHS) gehindert (Hardebo *et al.*, 1979; Kriegebaum *et al.*, 2010a). Zur 5-HT-Synthese wird Trp durch den Transporter großer neutraler Aminosäuren (LNAA) über die BHS

## Einleitung

nach intrazellulär aufgenommen (Abb. 4B) (Singh und Ecker, 2018). Nach der Sekretion bindet 5-HT an postsynaptische 5-HT-Rezeptoren und rezirkuliert aktiv über 5-HT-Transporter (SERT) (Torres *et al.*, 2003).

Aktuell sind 14 verschiedene 5-HT-Rezeptoren bekannt, die sich in sieben Familiensubtypen untergliedern und die unterschiedliche 5-HT-Wirkung vermitteln (Kroeze und Roth, 1998).



**Abbildung 4: 5-HT-Synthese und -Sekretion.**

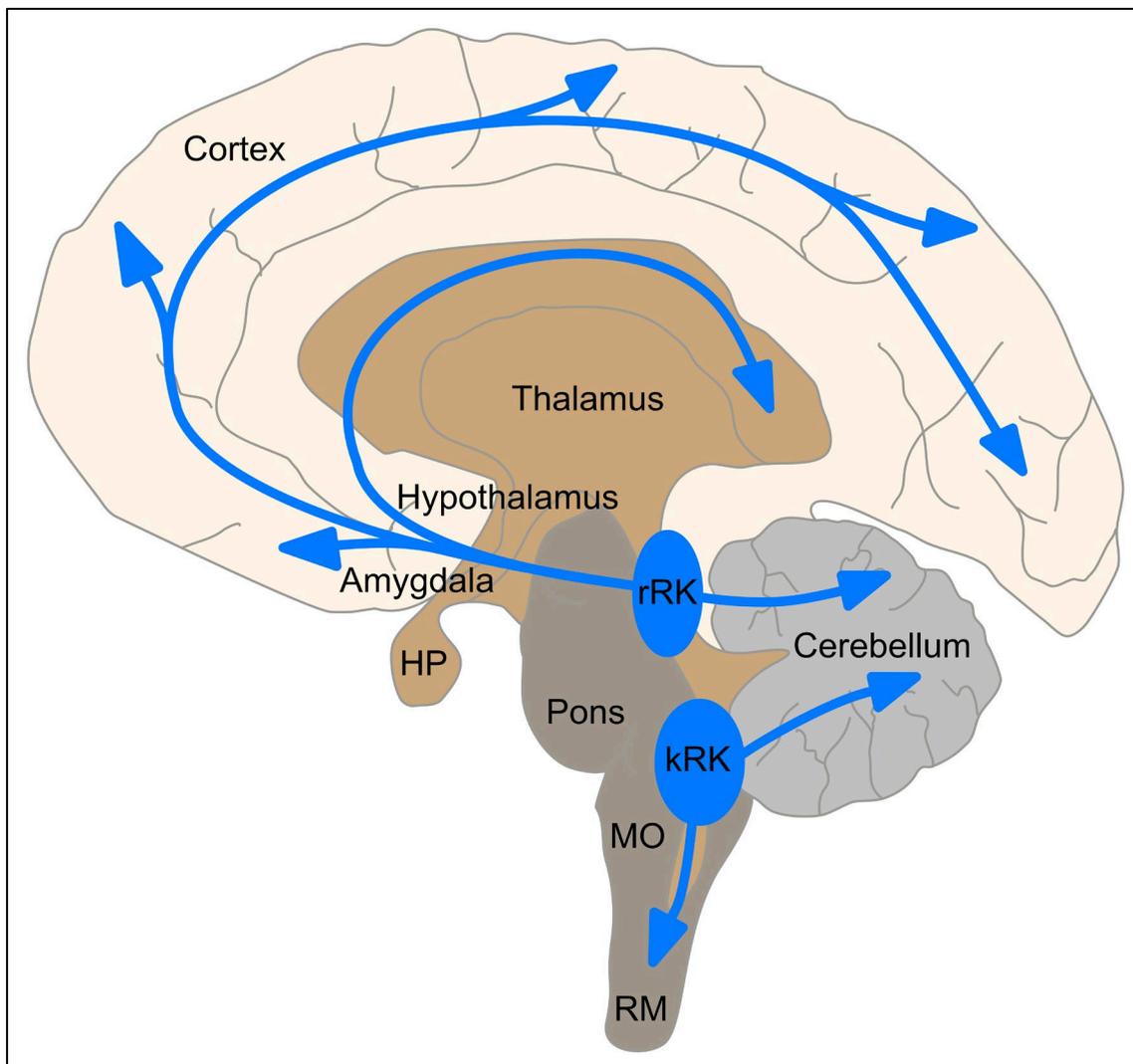
**A:** Mit Tetrahydrobiopterin sowie O<sub>2</sub> als Kosubstrate katalysiert das Schrittmachereenzym Tryptophan-Hydroxylase (Tph) 1 oder 2 die Bildung von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), welches daraufhin durch die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD) zu Serotonin (5-HT) umgewandelt wird. Abgebaut wird 5-HT durch die Monoamin-Oxidase (MAO) und die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA). Modifiziert nach: „Biosynthese von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT“) aus [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serotonin\\_Biosynthese.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serotonin_Biosynthese.svg); Stand: 19.02.2021

**B:** Schema eines serotonergen Neurons mit synaptischem Spalt. L-Tryptophan (Trp) wird über Transporter großer neutraler Aminosäuren (LNAA) aus den Kapillaren (Kap) aufgenommen. 5-HT entsteht danach analog zu A. Es wird mithilfe von vesikulären Monoamintransportern (VMAT) axonal transportiert. Nach Vesikelfreisetzung in den synaptischen Spalt bindet 5-HT an postsynaptische 5-HT-Rezeptoren (5-HT-Rez) und entfaltet seine Wirkung. 5-HT rezirkuliert über Serotonin-Transporter (SERT) und wird über MAO zu 5-HIAA abgebaut. Eigene Darstellung, nicht maßstabsgetreu, orientiert an Abb. 1-1 (links) aus Kriegebaum, 2009, S. 2.

### 1.5.2 5-HT-Vorkommen im Körper

#### 5-HT im Gehirn entsteht durch Tph2.

Die Neurone des serotonergen Systems liegen paramedian in den Raphe-Kernen B1–B9 des Hirnstamms und verteilen sich über Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata. Dabei lassen sich ein kaudaler (B1–B4) und ein rostraler (B5–B9) Raphe-Komplex unterscheiden (Dahlström und Fuxe, 1964; Kriegebaum *et al.*, 2010a; Walther und Bader, 2003). In diesen ZNS-Bereichen ist die Tph2 nachweisbar (Gutknecht *et al.*, 2009). Serotonerge Nervenzellen ziehen von dort in andere Hirnregionen (Abb. 5). Dadurch partizipiert das 5-HT-System an der Regulation von Neuropsychologie und Kognition (Kriegebaum *et al.*, 2010a). Durch Projektionen zum Hypothalamus kann 5-HT das VNS beeinflussen (Yadav *et al.*, 2009).



**Abbildung 5: Das 5-HT-System im ZNS.**

Schema des 5-HT-Systems im humanen Gehirn (Sagittalschnitt). Die 5-HT-Neurone liegen paramedian in den Raphe-Komplexen des Hirnstamms und ziehen von dort in andere Hirnbereiche. rRK = rostraler Raphe-Komplex, kRK = kaudaler Raphe-Komplex, HP = Hypophyse, MO = Medulla Oblongata, RM = Rückenmark. Eigene Darstellung, orientiert an „Serotonergic neurons“ von Lynch & Jähnichen (2010): [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serotonergic\\_neurons.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serotonergic_neurons.svg) (Stand: 19.02.2021)

### **5-HT in peripheren Körperregionen entsteht durch Tph1.**

Wenngleich zentrales 5-HT der Tph2 äußerst wichtig für die Physiologie des Menschen zu sein scheint, stellt es dennoch nur einen Bruchteil des 5-HTs im gesamten Körper dar. 95 % des körpereigenen 5-HTs wird durch die EZ des GIT bereitgestellt (Erspamer, 1954; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Tyce, 1990), synthetisiert durch die Tph1 (Côté *et al.*, 2003). Letztere wird unter anderem in Zellen peripherer Organe des GITs, Thymus', Bluts und der Zirbeldrüse exprimiert (Côté *et al.*, 2003; Gutknecht *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Walther und Bader, 2003). Die Neurone des enterischen Nervensystems stellen hierbei jedoch eine Ausnahme dar und bilden 5-HT mittels Tph2 (Côté *et al.*, 2007; Neal *et al.*, 2009).

#### **1.5.3 Lokale und endokrine 5-HT-Wirkung mithilfe der Tph1**

Da in dieser Studie der Einfluss der Tph2 untersucht werden soll, wird im Folgenden die Tph1-vermittelte periphere 5-HT-Wirkung zusammengefasst dargestellt.

Das von den EZ in den Blutkreislauf abgegebene 5-HT wird zum Großteil von den Blutplättchen (BP) aufgenommen und intrazellulär gespeichert (Jonnakuty und Gragnoli, 2008). Sie distribuieren das meiste 5-HT im Blutkreislauf (Jonnakuty und Gragnoli, 2008). Im Rahmen der Hämostase wird 5-HT von aktivierten BP sezerniert und verstärkt über 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren die BP-Ansammlung (Côté *et al.*, 2004). Ein Mausmodell mit Tph1-Knockout zeigte im Vergleich zu Tph1-Wildtyp eine eingeschränkte Hämostase (Walther *et al.*, 2003b). Am Gefäßsystem führt 5-HT zur Vasokonstriktion (Kaumann und Levy, 2006; Meyer *et al.*, 2008) oder -Dilatation, abhängig von Rezeptor und Lokalisation (Glusa und Pertz, 2000).

5-HT ist an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt (Paulmann *et al.*, 2009). Es findet sich neben Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und soll bei der Blutzucker-Regulation mitwirken (Paulmann *et al.*, 2009).

Im GIT wirkt 5-HT sekretions- und kontraktilitätsfördernd (Ahlman, 1985). Intraluminale Druckerhöhung führt zur EZ-vermittelten 5-HT-Sekretion (Bulbring und Crema, 1959). Von EZ abstammende Karzinoidtumoren bilden hohe Mengen an 5-HT und führen zu verstärkter Peristaltik und Diarrhöe (Ahlman, 1985). Auch das Leberwachstum und die Leberregeneration scheint 5-HT im Blutkreislauf hormonell zu beeinflussen (Lesurtel *et al.*, 2006). Eine endokrine Aufgabe übernimmt 5-HT auch über lokale Beeinflussung des Knochenstoffwechsels. Nach Yadav *et al.* zeigte peripheres 5-HT einen über den 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor hemmenden Einfluss auf die Osteoblastenproliferation, der mit dem Wnt10b/ $\beta$ -catenin-Signalweg zusammenhängen soll (Yadav *et al.*, 2008).

In dieser Studie wurde jedoch der Einfluss neuronalen 5-HTs auf den Knochenstoffwechsel untersucht.

#### 1.5.4 5-HT-Wirkung durch die Tph2

Neuronales 5-HT scheint ebenfalls an der Regulation von Körper und Geist beteiligt zu sein. Fasern der rostralen 5-HT-Raphe-Komplexe ziehen unter anderem zum Großhirn, zum Hypothalamus, zur Amygdala oder zu den Basalganglien (Abb. 5) und sind dadurch beispielsweise an der Kontrolle von Kognition, Körpertemperatur, Appetit, Schlaf-Wach-Rhythmus, Erbrechen und Sexualverhalten beteiligt (Lesch *et al.*, 2012; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Neurone des kaudalen Raphe-Komplexes projizieren zum Rückenmark und Kleinhirn (Abb. 5), wodurch sie in die Modulation der Motorik, der Schmerzverarbeitung und des VNS miteinbezogen sind (Lesch *et al.*, 2012; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Das VNS besteht aus zwei weitgehend gegensätzlich arbeitenden Systemen, dem sympathischen (Sympathikus) und dem parasympathischen Nervensystem (Parasympathikus) (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 156). Die Ursprungsneurone des Sympathikus sind thorakolumbal in den Seitenhörnern des Rückenmarks lokalisiert (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 156). Nach Verschaltung im *Truncus Sympathikus* ziehen die postganglionären Fasern zu den Endorganen und beteiligen sich an Organfunktionen, die den Körper auf Angriffs-, Abwehr- oder Fluchtreaktionen im Sinne eines „*Flight or Fight*“ vorbereiten (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 156–159). Hierzu zählen mittels Aktivierung  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren zum Beispiel die Steigerung der Herzfrequenz und -kraft, Bronchodilatation, Mydriasis sowie die Hemmung des GIT (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 156–159). Der Parasympathikus hat seinen Ursprung kraniokaudal im Hirnstamm (zum Beispiel *Ncl. Dorsalis n. vagi*) und Sakralmark und zieht zur Innervation mittels muskarinergere M-Rezeptoren in Richtung Endorgane (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 159–160). Er ist Antagonist des Sympathikus und stellt den Körper auf „*Rest and Digest*“ ein (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 160). Der Parasympathikus wirkt beispielsweise negativ ino- und chronotrop, erhöht die Speichel- und Magensaftsekretion und verstärkt die GIT-Peristaltik (Huggenberger *et al.*, 2019, S. 161).

Veränderungen im neuronalen 5-HT-System werden mit der Pathogenese psychischer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Lesch *et al.*, 2012). Die Hypothese, dass Depressionen mit erniedrigten 5-HT-Spiegeln korrelieren könnten, wurde schon vor vielen Jahren aufgestellt (Kriegebaum *et al.*, 2010b; Meltzer, 1990). Mittlerweile haben sich daher Medikamente, welche in die zentralnervöse 5-HT-Regulation eingreifen (zum Beispiel SSRI), in der Therapie von Depressionen (Schneider und Härter, 2015), Angst- und Zwangsstörungen (Craske und Stein, 2016; Veale und Roberts, 2014) durch randomisierte kontrollierte Studien als Erstlinien-Präparate etabliert. Eine deutliche Zunahme verordneter SSRI-Tagesdosen ist zu verzeichnen (Klauber *et al.*, 2013, S. 12), trotz eines nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungsprofils (Rizzoli *et al.*, 2012).

## Einleitung

Tph2-Genpolymorphismen (Einzelnukleotid-Polymorphismen, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) konnten bei Menschen beispielsweise mit Depressionen (Zill *et al.*, 2004a), Persönlichkeitsstörungen (Gutknecht *et al.*, 2007), bei Suizidanten (Zill *et al.*, 2004b) aber auch bei Patienten mit Erkrankungen des autistischen Spektrums (Yang *et al.*, 2012) in Verbindung gebracht werden (Gutknecht *et al.*, 2009).

Die G1463A-Mutation beispielsweise resultiert dabei in einer um 80 % reduzierten 5-HT-Syntheseleistung der Tph2, die mit der Entwicklung einer unipolaren Depression assoziiert ist (Zhang *et al.*, 2005). Untersuchungen an einem Tph2-Mausmodell mit männlichen Knockout-Mäusen zeigten deutlich verändertes Verhalten mit erhöhter Aggressivität, reduzierter Ängstlichkeit und Depression-ähnlichem Verhalten verglichen mit Wildtyp (Mosienko *et al.*, 2012). Die pharmakologische Beeinflussung der Tph2 zur Therapie psychiatrischer Erkrankungen wird in der Literatur bereits diskutiert (Matthes *et al.*, 2010).

Ein veränderter neuronaler 5-HT-Haushalt konnte auch an Kindern mit einer Autismus-Spektrum-Störung gezeigt werden (Chugani *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang konnte im Speziellen ein Tph2-Mausmodell verdeutlichen, dass sich die experimentelle Knockout-Gruppe sowohl durch Defizite in der Kommunikation als auch durch wiederholendes und zwanghaftes Verhalten von Wildtyp unterscheidet (Kane *et al.*, 2012). Bei der Autismus-Spektrum-Störung handelt es sich laut AWMF S3-Leitlinie um eine tiefgreifende Entwicklungsstörung, die sich durch „altersunabhängige Defizite in der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie eingeschränkte, repetitive Verhaltensmuster, Interessen oder Aktivitäten“ (Freitag und Vogeley, 2016, S. 13) als Leitsymptome darstellt.

Dass 5-HT-assoziierte psychiatrische Erkrankungen auch die Patienten-Physis beeinflussen, wird bei Betrachtung depressiver Patienten mit somatischem Syndrom greifbar. Einige Symptome seien kurz genannt: Frühmorgendliches Erwachen und Morgentief, Interessens-, Appetits-, Gewichts- sowie Libidoverlust (Schneider und Härter, 2015, S. 31). Neuronal synthetisiertes 5-HT der Tph2 könnte daher auch an der Regulation metabolischer Stoffwechselwege beteiligt sein (Lesch *et al.*, 2012). Forscher bemerkten an einem Tph2-Mausmodell eine Tendenz von Knockout zu reduziertem Körpergewicht gegenüber Wildtyp (Gutknecht *et al.*, 2008; Savelieva *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte auch in mehreren Tph2-Tiermodellen ein gegenüber Wildtyp niedrigerer Körperfettanteil beschrieben werden (Brommage *et al.*, 2015; Savelieva *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2009). Neben Veränderungen im Körperfettanteil konnte am Tph2-Mausmodell auch eine Fragilität der Körpertemperatur bei Knockout beobachtet werden, durch welche sie stärker bei niedriger Außentemperatur als ihre Wildtyp-Vergleichsgruppe zu Hypothermie tendierten (Alenina *et al.*, 2009).

## Einleitung

Beeinflussbarkeit der Körperphysiologie durch einen Knockout der Tph2 am Mausmodell ließ sich auch bei Betrachtung des Blutdrucks, der Herzfrequenz sowie des Schlafbedürfnisses annehmen (Alenina *et al.*, 2009). Bei einem Tph2-Tierexperiment an 14 Tage alten Knockout-Ratten konnten ähnliche Beobachtungen an Herzfrequenz und Blutdruck beschrieben werden (Magnusson und Cummings, 2017).

Alenina *et al.* stellten an einem Tph2-Mausmodell eine postnatal beginnende Wachstumsretardierung bei Knockout fest (Alenina *et al.*, 2009). Es lässt sich folglich vermuten, dass der Knochenstoffwechsel mit der Aktivität der Tph2 zusammenhängen könnte. Entsprechend sind dieser Frage auch bereits zwei Forschergruppen nachgegangen, die einen Einfluss des 5-HT-Systems auf den Knochenstoffwechsel durch einen Knockout der Tph2 an Mausmodellen untersuchten (Brommage *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2009). Ihre Ergebnisse sind jedoch konträr und der Zusammenhang bis dato noch nicht geklärt.

## 1.6 Hypothese und Fragestellung

Mit dieser Pilotstudie soll der Einfluss der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel des Femurs im Tierversuch untersucht werden. Wachstumsretardierung bei Knockout eines Tph2-Mausmodells (Alenina *et al.*, 2009) gibt Hinweise darauf, dass das neuronale 5-HT-System an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt sein könnte.

Veränderungen im Knochenstoffwechsel, die mit einer durch einen Knockout der Tph2 bedingten neuronalen 5-HT-Defizienz in Verbindung gebracht werden, wurden bisher nur an Tph2-Knockout-Mausmodellen beschrieben (Alenina *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2009). Im Rattenmodell wurde dieser mögliche Zusammenhang bisher nicht untersucht. Zwar finden sich generell in der Literatur auch wenige Tph2-Knockout-Rattenmodelle (Brivio *et al.*, 2018; Magnusson und Cummings, 2017), die spezielle Betrachtung des Knochenstoffwechsels war aber nie Teil dieser Rattenversuche. In der Studie dieser Dissertation wird deshalb ein Rattenmodell untersucht.

Die Tatsache, dass sowohl einige mentale Erkrankungen (Cizza *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2015; Barnhill *et al.*, 2017) als auch eine medikamentöse Therapie mit SSRI (Richards *et al.*, 2007; Rizzoli *et al.*, 2012) als Risikofaktoren für Osteoporose gelten, hebt die Relevanz der Dissertation für die medizinische Forschung hervor. Dass im Speziellen eine pharmakologische Beeinflussung der Tph2 zur Therapie psychiatrischer Erkrankungen bereits diskutiert wird (Matthes *et al.*, 2010), unterstreicht die klinische Bedeutsamkeit zusätzlich. Das Verständnis von Zusammenhängen des neuronalen 5-HT-Systems mit somatischen Stoffwechselfvorgängen ist essenziell, um Wirkung und Nebenwirkung solcher Präparate beurteilen zu können.

Die osteoporotisch bedingte proximale Femurfraktur zeigt eine hohe Mortalität (Center *et al.*, 1999) und Morbidität (Felsenberg, 2016a, S. 3050). Es wird deshalb in dieser Studie der Fokus auf das Femur gelegt.

Die skelettale Physiologie ist bei Ratten und Menschen in weiten Teilen ähnlich, sodass Rattenmodelle als Grundlage für humane Osteoporose-Studien dienen können (Magnusson und Cummings, 2017).

Die zentrale Fragestellung der Studie dieser Dissertation lautet:

***Hat die Tph2, als Schrittmacherenzym der neuronalen 5-HT-Synthese, einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel des linken Rattenfemurs?***

Die Forschungshypothese (H1) ist: Die Tph2 beeinflusst den Knochenstoffwechsel.

Die Nullhypothese (H0) heißt: Die Tph2 beeinflusst den Knochenstoffwechsel nicht.

Die unabhängige Variable (Wildtyp vs. Knockout) soll den Einfluss darstellen.

Operationalisiert wird die abhängige Variable durch die Hauptzielparameter: BMD in der DXA-Methode und mineralisierte Knochenmatrix in der Histomorphometrie.

## Einleitung

Die Sekundärparameter sollen explorativ Mediatoren, Auffälligkeiten und / oder sonstige Zusammenhänge zwischen der Tph2 und dem Knochenstoffwechsel aufzeigen. Die Pilotstudie dieser Dissertation soll langfristig dazu dienen, neue pharmakologische Angriffspunkte zur differenzierten Prophylaxe und Therapie der Osteoporose zu etablieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign und Versuchstiere

Zur Beurteilung des Einflusses der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel des linken Femurs wurden dunkle Agouti-Ratten untersucht. Die Femora der Versuchstiere und die Ratten wurden in einer Kooperation von dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft Berlin (MDC, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin) zur Verfügung gestellt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um genetisch veränderte Ratten, die im Rahmen von Verhaltensstudien im MDC generiert und gezüchtet wurden. Für die Knochenanalyse dieser Dissertation dienten nur diejenigen Tiere, die aufgrund der Zuchtbeendigung euthanasiert wurden. Dadurch konnte dem wissenschaftlichen Leitgedanken des 3-R-Prinzips von Tierversuchen gefolgt werden: *Replacement, Reduction, Refinement* (Russell und Burch, 1959).

Zucht, Haltung und Standort der Versuchstiere war das MDC. Verantwortlicher Tierversuchsleiter war Prof. Dr. Michael Bader. Die Versuchstiere wurden vom MDC unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen artgerecht versorgt. Sie wurden in Vierer-Käfigen gehalten und erhielten täglich ab 6 Uhr morgens einen künstlichen 12 / 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Raumtemperatur von 22 °C und die Luftfeuchtigkeit von ungefähr 80 % wurden konstant gehalten. Die Nager erhielten Zugang zu Futtermittel (Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum* (Brivio *et al.*, 2018).

Der Tierversuchsantrag vom 21.01.2014 (AZ: G 0047/14) wurde unter Beachtung von §8 des Tierschutzgesetzes am 15.07.2014 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin („LaGeSo“ Berlin, Turmstr. 21, 10559 Berlin) bewilligt.

Die Gesamtzahl der 106 Nagetiere teilten sich auf in 55 homozygote (+/+) Tph2-Wildtyp-Ratten und 54 homozygote Tph2-Doppel-Knockout-Ratten (-/-). Im Folgenden werden für Tph2(+/+) die Abkürzung „WT“ und für Tph2(-/-) die Abkürzung „KO“ verwendet.

Als erste Stichprobe dienten 35 Tiere zur Untersuchung mittels DXA, 71 Nagetiere bildeten die zweite Stichprobe und wurden für die histomorphometrische Analyse verwendet. Im Detail war der Versuchsaufbau wie folgt:

Für die DXA wurden männliche WT (n = 15) und männliche KO (n = 20) mit einer Altersspanne von 33–42 Wochen untersucht. Die Tiere wurden weiterhin in zwei Altersgruppen eingeteilt. Zum Zeitpunkt 1 erreichten die Laborratten ein Alter von 33–34 Wochen (WT: n = 8; KO: n = 9). Zum Zeitpunkt 2 waren die Laborratten 40–42 Wochen alt (WT: n = 7; KO: n = 11).

## Material und Methoden

Für die histologische Untersuchung dienten weibliche und männliche WT (n = 37) sowie weibliche und männliche KO (n = 34). Diese 71 Nagetiere wurden weiterhin in vier Altersgruppen eingeteilt, um für die Analyse der Sekundärparameter in der Histomorphometrie Veränderungen über die Zeit untersuchen zu können. Im Detail setzten sich die Altersgruppen zusammen:

Es wurden nach 6 Wochen männliche und weibliche (WT: n = 13, ♂ = 6, ♀ = 7; KO: n = 12, ♂ = 6, ♀ = 6), nach 16–17 Wochen weibliche (WT: n = 10, KO: n = 9), nach 28–29 Wochen weibliche (WT: n = 6, KO: n = 6) sowie nach 38–39 Wochen ebenfalls weibliche (WT: n = 8, KO: n = 7) Versuchstiere euthanasiert. Folglich wurden zwei Vergleichsgruppen (WT vs. KO) und für die histologische Analyse der Sekundärparameter zusätzlich jeweils vier Zeitpunkte gebildet: Zeitpunkt 1 = 6 Wochen, Zeitpunkt 2 = 16–17 Wochen, Zeitpunkt 3 = 28–29 Wochen und Zeitpunkt 4 = 38–39 Wochen.

Die Gen-Deletion bei KO wurde im MDC nach der Methode von Kaplan und Geurts durchgeführt (Geurts *et al.*, 2010; Kaplan *et al.*, 2016) und dort durch Genotypisierung überprüft.

Aufgrund von Schäden am Präparat, beispielsweise durch den Einbettungsvorgang, sind vier Femora in der histologischen Untersuchung ausgeschlossen worden (zwei bei 17 Wochen KO und zwei bei 29 Wochen KO).

### **2.2 Euthanasie, Probengewinnung und -vorbereitung**

Nach Aufzucht durch das MDC wurden die Versuchstiere wie oben beschrieben zu den entsprechenden Zeitpunkten euthanasiert. Hierfür wurden die Ratten im Tierversuchslabor des MDC zuerst per Isofluran-Inhalation narkotisiert und daraufhin durch CO<sub>2</sub>-Inhalation euthanasiert. Der Tod wurde durch Genickbruch sichergestellt. Tierschutzrechtliche Standards und veterinärmedizinische Expertise waren von Aufzucht über Tierhaltung bis Euthanasie von zentraler Wichtigkeit.

*Post mortem* wurden die Femora freipräpariert und entnommen, sodann überschüssiges Gewebe entfernt und daraufhin mittels Einfrierens bis zur Weiterverarbeitung im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen (ForMed, Aulweg 128, 35392 Gießen) konserviert. Die für die DXA vorgesehenen Versuchstiere wurden *in toto* tiefgefroren gelagert und transportiert.

### 2.3 Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Mithilfe der DXA können radiologisch Knochenveränderungen diagnostiziert werden (siehe Einleitung, Kap. 1.4). Durch die Methode kann der Mineralgehalt des Knochens bezogen auf die Körperfläche als BMD in  $\text{g}/\text{cm}^2$  bestimmt werden (Bartl, 2011, S. 83).

Die DXA wurde in der zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main (Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Deutschland) mit dem Gerät Lunar Prodigy (Fa. GE Healthcare GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

Die Laborratten wurden *post mortem* in Bauchlage untersucht (Abb. 6). Für die anschließende Messung wurde die entsprechende Software enCORE 2010 (Version 13.40, Fa. GE Healthcare GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Im Scanmodus Kleintier mit  $1,8 \mu\text{Gy}$  wurden acht Bereiche definiert, welche manuell in der Software eingezeichnet und einzeln analysiert wurden. Im Ergebnisteil wird dabei auf die Region 5 (linkes Femur) Bezug genommen.



**Abbildung 6: DXA-Gerät mit Versuchstier in Bauchlage.**  
Eigene Aufnahme.

### 2.4 Fixierung und Einbettung für die Kryopräparationstechnik

Die Knochenpräparate wurden mit vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Ziel des Fixationsverfahrens ist es, Zellen und Gewebe möglichst im ursprünglichen Zustand in Größe, Form und Antigenität *etc.* zu stabilisieren (Mulisch und Welsch, 2010, S. 87). Das Aufsättigen der Probe in einer Sucrose-Lösung dient der Kryoprotektion, sodass das Risiko für Zerplatz-Artefakte der Zellen oder des Gewebes beim Schockgefrieren minimiert werden kann (Mennerich, 2000, S. 26).

Die anschließende Einbettung der Probe dient der Reduktion von Konsistenzunterschieden des zu untersuchenden Feingewebes. Dies ist essenziell, um dünne Schnitte am Mikrotom adäquat herstellen zu können (Mulisch und Welsch, 2010, S. 105). In dieser Arbeit wurden die Femora in einem Spezialmedium SCEM-(L1) (Fa. SECTION-LAB Co. Ltd., Hiroshima, Japan) durch Schockgefrierung eingebettet. Materialien, Fixations- und Einbettungsprotokoll im Anhang (Kap. 11.1).

## 2.5 Schnittherstellung mittels Gefriermikrotom

Gefrierschnitte bieten sich besonders für enzym- und immunhistochemische Färbemethoden an (Lang, 2013, S. 153). Sie sind verglichen mit Paraffin- und Kunststoffeinfettung geringgradiger fixiert und daher reaktionsfreudiger. Qualitativ hochwertige Färbereigenschaft erhöht die Aussagekraft der Histomorphometrie und letztlich der Ergebnisse.

Zur Schnittherstellung wurde das Kryostat CM 3050 S (Fa. Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) verwendet. Als Klinge diente MX35 Premier+ (Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) mit einem Schnittwinkel von 34° und einer Länge von 80 mm. Zur Fixation des Präparatblocks am Gefriertisch diente das Medium SCEM-(L1) (Fa. SECTION-LAB Co. Ltd., Hiroshima, Japan).

Die 4 µm dicken Gefrierschnitte wurden mithilfe von Kawamoto's Film (Cryofilm Typ II C9, Fa. Section-Lab Co. Ltd., Hiroshima, Japan) vom Einbettungsblock auf dem Objektträger (SuperFrost Plus®, Fa. R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) nach der Kawamoto-Methode (Kawamoto und Kawamoto, 2014) überführt. Ziel war die Darstellung der Knochenstruktur im Längsschnitt (Abb. 1 und Abb. 7A).

Im Kryotom wurde auf eine konstante Innen- und Objektträgertemperatur von -25 °C geachtet. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

## 2.6 Histologische Färbungen

a. Die **Von Kossa / Van Gieson-Färbung** dient der Unterscheidung von nicht-mineralisierter Matrix / Osteoid (rot) zu mineralisierter Matrix (schwarz) im kalzifizierten Knochenschnitt (Abb. 7A) (El Khassawna *et al.*, 2013). Von Kossa weist dabei indirekt Kalzium nach (Lang, 2013, S. 234), während Van Gieson kollagene Fasern, Muskeln und Zytoplasma markiert (Lang, 2013, S. 212). Mithilfe der Von Kossa / Van Gieson-Färbung wurden weiterhin mittels Software die Trabekelparameter evaluiert.

Materialienliste und Färbeprotokoll im Anhang (Kap. 11.2).

b. Zur morphologischen Differenzierung der Osteozyten wurde die **Silbernitrat-Färbung** verwendet (El Khassawna *et al.*, 2017). Durch Prägung saurer Knochenmatrix-Proteine werden Osteozyten mit ihren kanalikulären Ausläufern dunkelbraun bis schwarz dargestellt (Abb. 9).

Materialienliste und Färbeprotokoll im Anhang (Kap. 11.3).

c. Die **(ALP)-Färbung** ist eine enzymhistochemische Färbung. Die Enzymhistochemie dient der Darstellung von speziellen Gewebe- und Zellstrukturen und identifiziert biologische Charakteristika (Lang, 2013, S. 253). Einem nachzuweisenden Enzym

wird ein spezifisches und anfänglich farbloses Substrat zugeführt, das nach Umwandlung zum Farbstoff wird und dadurch als Indikator dient (Lang, 2013, S. 254). Ebenso kann durch die Katalyse ein Interimsprodukt entstehen, das sich mit einer zusätzlichen Substanz zum farbigen Endprodukt vereinigt. Die ALP-Färbung weist die hydrolytische Spaltung von Orthophosphorsäureestern bei basischem pH (pH 9,2–9,8) des membrangebundenen Enzyms nach (Yoon *et al.*, 1988). Typischerweise lässt es sich in Leber, Dünndarm, Niere, Kapillaren, neutrophilen Granulozyten, Periost und bei der Knochenneubildung markieren (Mulisch und Welsch, 2010, S. 369). ALP-positives Gewebe [zum Beispiel Osteoblasten (Garnero und Delmas, 1997)] stellt sich bläulich-violett dar, während Kernechtrot-Aluminiumsulfat die kontrastreiche Gegenfärbung bildet (rosa).

Materialienliste und Färbeprotokoll im Anhang (Kap. 11.4).

- d. Die **(TRAP)-Färbung** ist eine enzymhistochemische Osteoklasten-Färbung, wenngleich die TRAP auch in anderen Geweben vorkommt (Burstone, 1959; Hayman, 2008). Saure Phosphatasen (AP) katalysieren die Hydrolyse von Estern der Orthophosphorsäure und haben ihr Geschwindigkeitsmaximum im niedrigen pH-Bereich. Beispielhafte Lokalisationen der AP sind: Lysosomale AP in Mastzellen, Makrophagen-AP in Leber, Milz, Lunge sowie die Tartrat-resistente AP der Osteoklasten (Bull, 2002). Tartrat inhibiert die Katalyse der AP, nicht jedoch bei der TRAP. Ein Anstieg osteoklastärer Aktivität wird in diesem Fall über einen gesteigerten Nachweis TRAP-positiver Zellen nachgewiesen (Bull, 2002). Naphthol-AS-TR-Phosphat wird durch die TRAP zu  $\alpha$ -Naphthol hydrolysiert (Lang, 2013, S. 258–259). Das Produkt verbindet sich mit Echtrotsalz zu einem roten Farbstoff. TRAP-negatives Gewebe wird durch Hämatoxylin bläulich-lila kontrastiert (Abb. 10).  
Materialienliste und Färbeprotokoll im Anhang (Kap. 11.5).

## 2.7 Fotomikroskopie

Für die Von Kossa / Van Gieson- sowie für die enzymhistochemischen Färbungen wurde das Fotomikroskop Leica DM5500 (Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland), die Digitalkamera Leica DCF 7000 T (Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland), sowie die Software LASX, (Version 3.0, Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) benutzt.

Die Silbernitrat-Färbung wurde mit dem Fotomikroskop Axioplan 2 (Fa. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), der Digitalkamera Leica DC 500 (Fa. Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Deutschland) und der Software Axio Vision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) fotografiert.

Während bei Von Kossa / Van Gieson und ALP Übersichtsaufnahmen ausgewertet wurden, dienten Silbernitrat und TRAP zur zellmorphologischen Detailanalyse. Die Färbungen wurden daher in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen (Tab. 1).

**Tabelle 1: Mikroskopische Vergrößerung bei der jeweiligen Färbung.**

Vergrößerung	Histologische Färbung
5-fach	Von Kossa / Van Gieson und TRAP
10-fach	ALP
20-fach	Silbernitrat
40-fach	TRAP
100-fach	TRAP und Silbernitrat

Die Bildbearbeitung und Histomorphometrie erfolgten mit den Programmen ImageJ (Version: 1.52b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) sowie Adobe Photoshop CS 2 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA).

Um über die Pixelanzahl der Fotografie die tatsächliche Größe der Aufnahme zu ermitteln, gelten die Umrechnungsfaktoren aus Tabelle 2.

**Tabelle 2: Umrechnungstabelle zur Bestimmung der Fotogröße.**

Vergrößerung	Zeiss Axioplan 2	Leica DM5500
5-fach	0,5 Pixel / $\mu\text{m}$	0,77 Pixel / $\mu\text{m}$
10-fach	1 Pixel / $\mu\text{m}$	1,55 Pixel / $\mu\text{m}$
20-fach	2 Pixel / $\mu\text{m}$	3,09 Pixel / $\mu\text{m}$
40-fach	3,8 Pixel / $\mu\text{m}$	6,17 Pixel / $\mu\text{m}$
100-fach		15,43 Pixel / $\mu\text{m}$

## 2.8 Histomorphometrie mittels ImageJ

Für die Histomorphometrie wurde das Programm ImageJ (Version: 1.52b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) verwendet. Die Termini in den folgenden Kapiteln beziehen sich auf ein Update der *American Society for Bone and Mineral Research* zur standardisierten Nomenklatur (Dempster *et al.*, 2013).

Zur Auswertung wurden die mikroskopischen Aufnahmen auf ihre Farbeigenschaften und -unterschiede untersucht.

### 2.8.1 Analyse der Von Kossa / Van Gieson-Färbung

Interessensregion (*Region of Interest*, ROI) war der proximale und distale epi- und metaphysäre Knochenabschnitt der linken Femora (Abb. 7).

Um den Anteil mineralisierter Knochenmatrix an der Gesamtknochenfläche zu bestimmen, wurde die Methode nach Malhan *et al.* (Malhan *et al.*, 2018) und das TWS ImageJ-Plugin „*Trainable Weka Segmentation*“ (Version 3.2.24) angewendet.

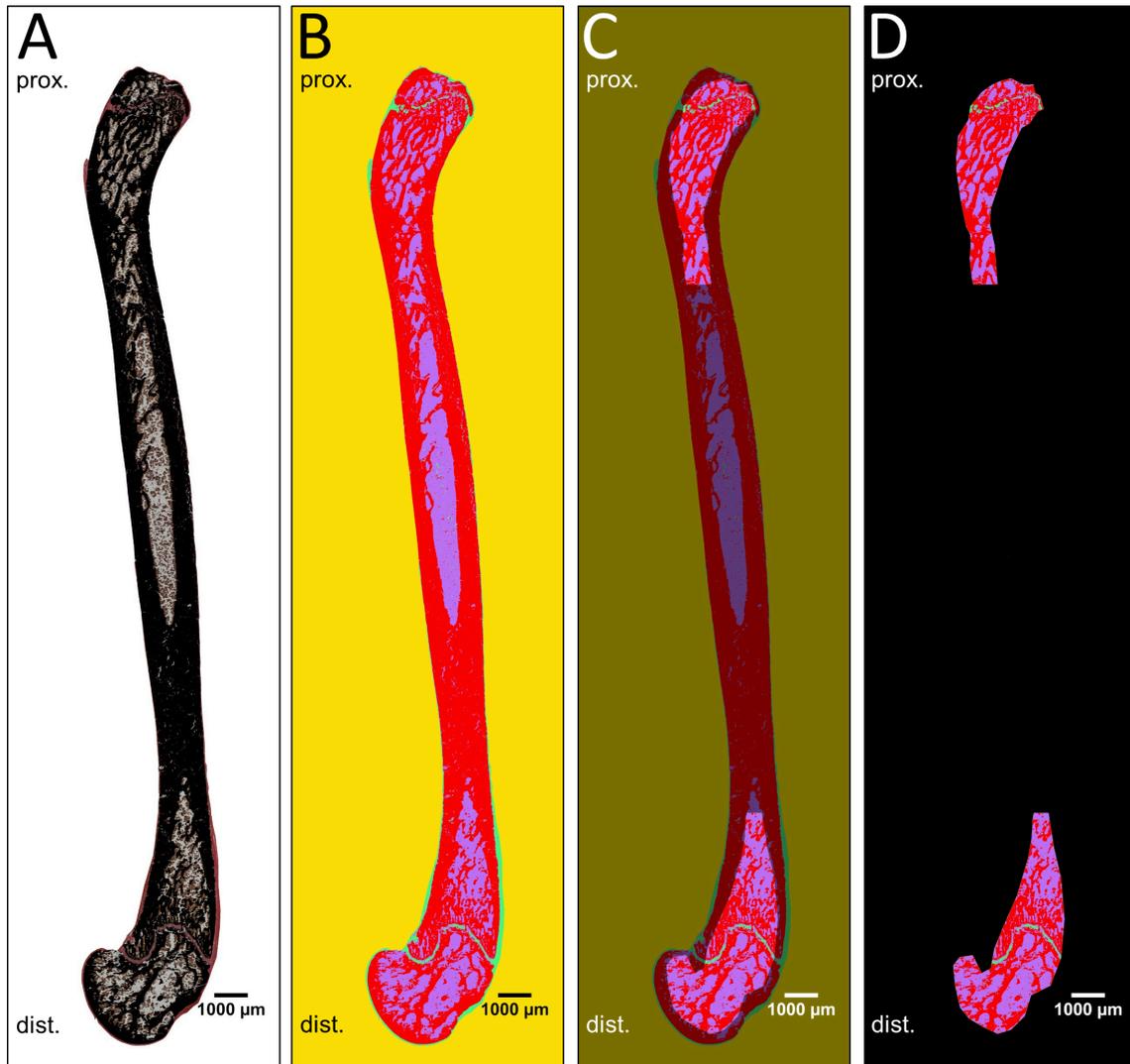
Es wurde dabei ein „*Classifier*“ definiert, der die Farben der Übersichtsaufnahme erkennt und als Ergebnis eine Bildkopie erstellt, die sich aus den im Plugin manuell definierten Farben zusammensetzt (Abb. 7). Der prozentuale Anteil der definierten Farben der Bildkopie kann so ermittelt werden.

**Folgende Klassen wurden definiert (Abb. 7):**

- 1) Mineralisierte Matrix: Schwarz in der Übersichtsaufnahme, rot im klassifizierten Bild.
- 2) Knochenmark und Hintergrund: grau / bräunlich in der Übersichtsaufnahme, lila im klassifizierten Bild.
- 3) Nicht-mineralisierte Matrix: Rot in der Übersichtsaufnahme, grün im klassifizierten Bild.
- 4) Weißer Hintergrund außerhalb des Knochens, gelb im klassifizierten Bild.

Für die automatische Analyse aller Objektträger derselben Färbung wurde das „*TWS\_automated.bsh*“-Skript der Methode nach Malhan *et al.* (Malhan *et al.*, 2018) verwendet und über das Dropdown-Menü *Utilities* gestartet. Hierfür wurden die „*Classifier*“- und „*Data.arff*“-Datei gespeichert.

Im nächsten Schritt wurden in den klassifizierten Übersichtsaufnahmen manuell in ImageJ die Kortikalis sowie die Diaphyse entfernt, sodass nur noch der trabekuläre Knochen der Meta- und Epiphyse resultiert (Abb. 7).



**Abbildung 7: Arbeitsschritte der Von Kossa / Van Gieson-Histomorphometrie.**

Eigene Darstellung.

**A:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Von Kossa / Van Gieson-Färbung in fünfzähliger Vergrößerung (Ratten-ID: 271/17, Femur in Sagittalebene, schwarz = mineralisiert, rot = nicht-mineralisiert, grau = Knochenmark, weiß=Hintergrund). prox. = proximal, dist. = distal.

**B:** Histomorphometrisch analysiertes Korrelat der Von Kossa / Van Gieson-Färbung. (Rot = mineralisiert, grün = nicht-mineralisiert, lila = Knochenmark, schwarz = Hintergrund).

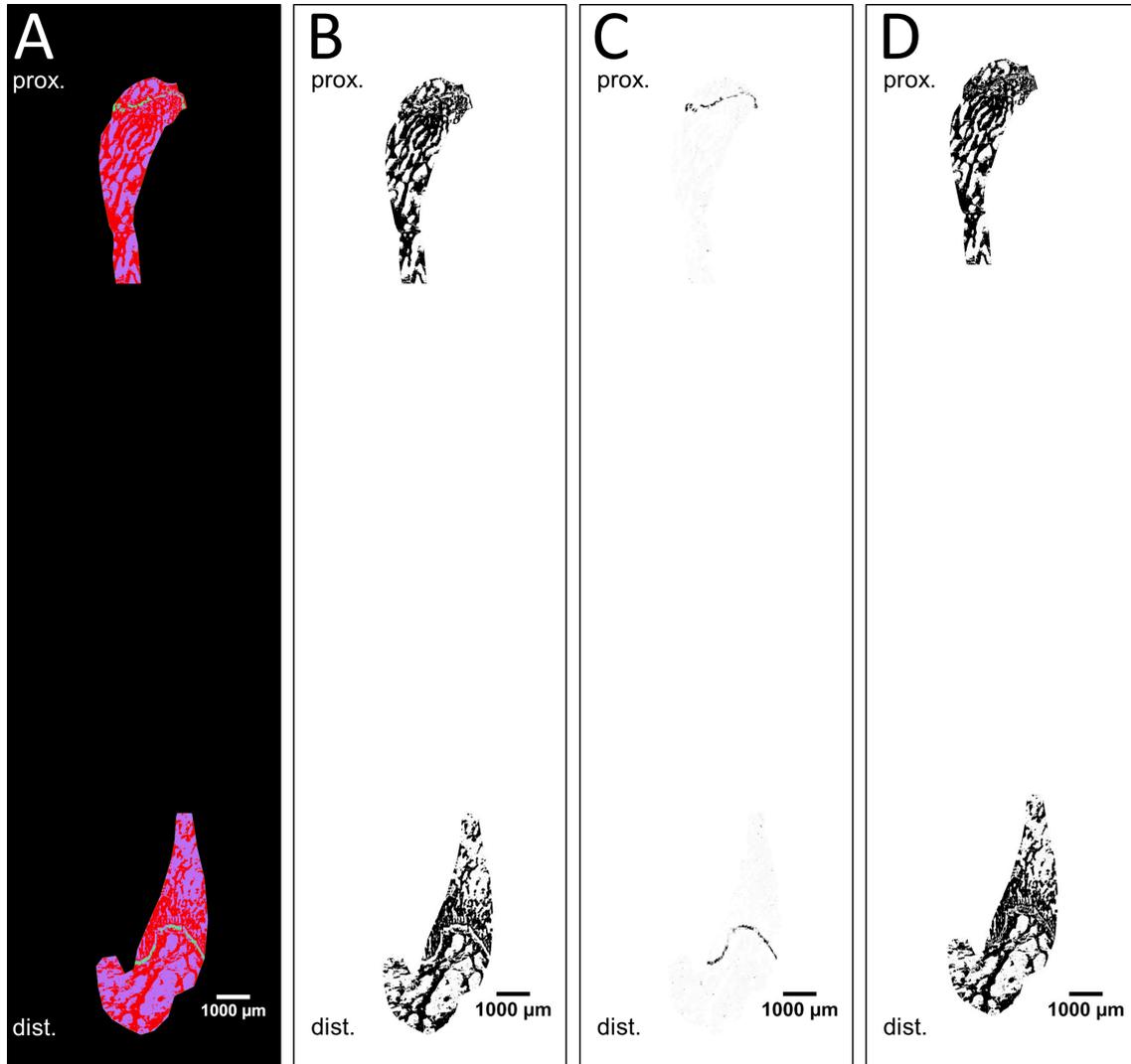
**C:** Darstellung der ROI im klassifizierten Bild B.

**D:** Darstellung der ROI, auf der die Ergebnisse basieren. Schwarz wird nicht ausgewertet.

Durch Analyse der Farbanteile mittels ImageJ-Makros „ROI\_Auswertung“ (Anhang, Kap. 11.6.1) erhält man die prozentuale Verteilung der mineralisierten und nicht-mineralisierten Matrix der jeweiligen ROI (Abb. 7D). Nach Multiplikation dieser Prozentangaben mit der Gesamtfläche der lichtmikroskopischen Aufnahme ergeben sich die absoluten Flächen der mineralisierten und nicht-mineralisierten Matrix der ROI. Beides addiert, definiert die Gesamtknochenfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ). Die Farbe Schwarz in der klassifizierten Aufnahme (Abb. 7D) geht nicht in die Berechnung und demzufolge auch nicht in die prozentuale Verteilung ein. Die Genehmigung zur Verwendung des Makros „ROI\_Auswertung“ wurde eingeholt.

### 2.8.2 Ermittlung der Trabekelparameter

Zur Bestimmung der Trabekelparameter wurde in den klassifizierten ROIs der Von Kossa / Van Gieson-Färbung (Abb. 7D = Abb. 8A) die mittlere Trabekeldicke kalkuliert.



**Abbildung 8: Vorbereitungen zur Analyse der Trabekeldicke.**

Eigene Darstellung.

**A:** Histomorphometrisch analysiertes Korrelat der Von Kossa / Van Gieson-Färbung (fünffache Vergrößerung, Ratten-ID: 271/17. Sagittalebene, rot = mineralisiert, grün = nicht-mineralisiert, lila = Knochenmark, schwarz = Hintergrund).

**B:** Binärabbildung mit selektiver Darstellung der mineralisierten Knochenmatrix. Schwarz in B entspricht der Farbe Rot in A.

**C:** Binärabbildung mit selektiver Darstellung der nicht-mineralisierten Knochenmatrix. Schwarz in C entspricht der Farbe Grün in A.

**D:** Fusionsbild von B und C. Schwarz in D entspricht der Trabekelfläche bestehend aus mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochenmatrix.

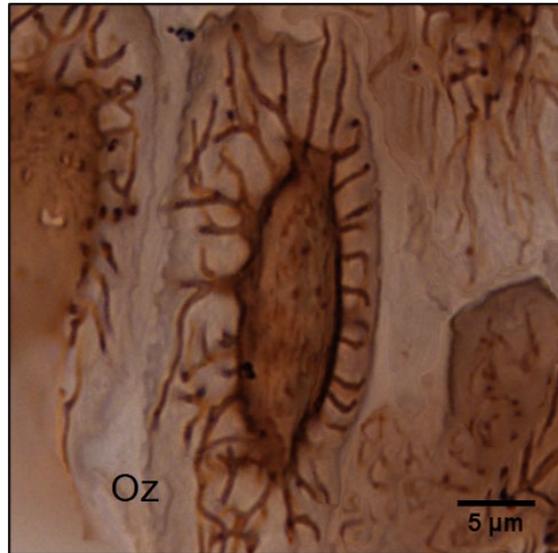
Der Schnitt wurde über die Auswahl des Schwellenwerts für die klassifizierten Farben Rot (Befehl *Threshold: 0 / 0*, Abb. 8B) und Grün (Befehl *Threshold: 3 / 3* Abb. 8C) in je ein binäres (schwarzweiß) Abbild umgewandelt (Anhang, Kap. 11.6.2).

Die beiden Schwarzweiß-Darstellungen (Abb. 8B und 8C) wurden zu einem neuen Bild derselben Größe fusioniert (Abb. 8D). Zur Bestimmung der Trabekeldicke wurde das

Plugin „*BoneJ-Thickness*“ via Makro „ROI\_Auswertung“ (Anhang, Kap. 11.6.1) verwendet. Das Plugin zieht nun von jedem schwarzen Pixel zentrifugal wachsende Kreise, bis die Rundung auf einen weißen Pixel trifft. Der Durchmesser aller Kreise entspricht der mittleren Trabekeldicke der ROI.

### 2.8.3 Semi-automatische Auswertung der Silbernitrat-Färbung

Um eine Aussage über die Osteozyten-Morphologie sowie die osteozytäre Gewebestruktur treffen zu können, wurde die Silbernitrat-Färbung angewendet. Mit einem Permanentmarker wurde die ROI auf dem Objektträger eingezeichnet und für die Mikroskopie kenntlich gemacht. Sie ist der epi- und metaphysäre Bereich beider Knochenenden des linken Femurs. Am Lichtmikroskop wurde die ROI in 20-facher Vergrößerung durchmustert. Die Histomorphometrie wurde mit ImageJ durchgeführt und das Plugin „*Cell Counter*“ verwendet.



**Abbildung 9: Ein spindelförmiger Osteozyt.** Mithilfe der Silbernitrat-Färbung wird ein Osteozyt (Oz, mittig im Bild) mit seinem lakuno-kanalikuläres Netzwerk sichtbar. Eigene Aufnahme.

Bei der Auswertung wurden drei Osteozyten-Subtypen mit Einschlusskriterien definiert:

- 1) Spindelförmige Osteozyten: länglicher, leicht dunkler Zellkörper; mehrere Osteozyten-Kanalikuli sichtbar (Abb. 9).
- 2) Leere Lakunen: heller Bereich / kein Zellkörper, wenige bis keine Kanalikuli angefärbt.
- 3) Runde Osteozyten: runder, leicht dunkler Zellkörper; mehrere Osteozyten-Kanalikuli sichtbar.

Die Anzahl der Osteozyten-Subtypen pro Foto wurde auf die Knochenfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) pro Foto normalisiert. Um die Knochenfläche zu bestimmen, wurden alle Aufnahmen in binäre Abbilder überführt. Nach der Methodik von Malhan *et al.* (Malhan *et al.*, 2018) analog zu Kap. 2.8.1 diente auch in diesem Fall das TWS ImageJ-Plugin „*Trainable Weka Segmentation*“, um einen „*Classifier*“ zu definieren:

- 1) Knochenfläche
- 2) Hintergrund

Mithilfe des „*TWS\_automated.bsh*“-Skripts wurde der prozentuale Schwarzanteil am Binärbild bestimmt, das mit der Fotofläche multipliziert die Knochenfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) ergibt.

#### **2.8.4 Analyse der ALP-Färbung**

Für die histomorphometrische Untersuchung der ALP-Färbung wurde zuerst überschüssig anhängendes Gewebe und auch das Knochenmark geweißt. Als ROI wurde manuell in ImageJ der Trabekelknochen im proximalen und distalen linken Femur ausgewählt. Die ROI wurde analog zu Kapitel 2.8.1 durch die Methode nach Malhan *et al.* (Malhan *et al.*, 2018) histomorphometrisch analysiert.

Im TWS ImageJ-Plugin „*Trainable Weka Segmentation*“ wurden folgende Klassen im „*Classifier*“ definiert:

- 1) ALP-positiver Knochen: blau in der Übersichtsaufnahme, rot im klassifizierten Bild.
- 2) Knochen: rosa in der Übersichtsaufnahme, grün im klassifizierten Bild.
- 3) Schnitt hintergrund: gräulich in der Übersichtsaufnahme, türkis im klassifizierten Bild.
- 4) Weißer Hintergrund außerhalb des Knochens, dargestellt in gelber Farbe im klassifizierten Bild.

Zur Berechnung des prozentualen Anteils der roten ALP-positiven Fläche des klassifizierten Bilds in der ROI diente das Makro „ROI\_Auswertung“ (Anhang, Kap. 11.6.1). Multipliziert mit dem Pixelverhältnis der lichtmikroskopischen Aufnahme ergab sich der ALP-positiv Bereich (in  $\mu\text{m}^2$ ). Dieser wurde auf die Gesamtknochenfläche des Schnitts normalisiert. Die Gesamtknochenfläche wurde in diesem Fall über Addition der Klassen 1) und 2) definiert.

#### **2.8.5 Semi-automatische Auswertung der TRAP-Färbung**

Zur Bestimmung der Osteoklasten-Quantität und -Aktivität wurde die TRAP-Färbung verwendet. Hierfür wurde zuerst manuell auf den Objektträgern mithilfe eines Permanentmarkers die ROI eingezeichnet. Sie ist der epi- und metaphysäre Bereich beider Knochenenden des linken Femurs.

Die ROI wurde in fünffacher sowie in 40-facher Vergrößerung fotografiert. Die fünffache Vergrößerung diente der Bestimmung der Gesamtknochenfläche und mit der 40-fachen Vergrößerung wurde die Quantifizierung vorgenommen.

Ein Osteoklast wurde gezählt und die *Ruffled Border* ausgemessen, wenn folgende Einschlusskriterien zwingend gleichzeitig erfüllt waren (Abb. 10):

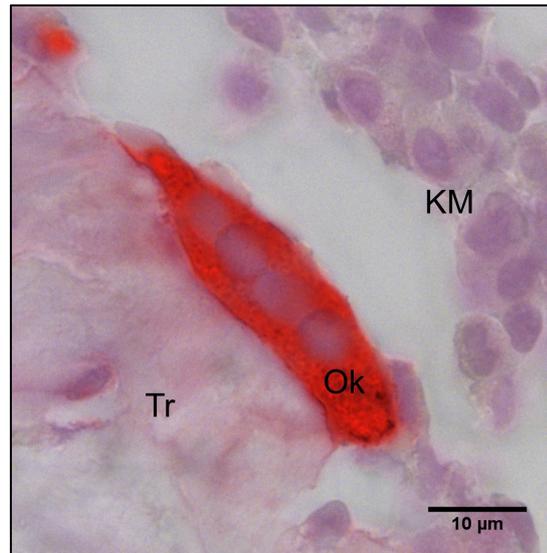
- 1) TRAP-positive Zelle (Rotfärbung)
- 2) Die Zelle liegt dem Knochen an.
- 3) Min. zwei Zellkerne sind sichtbar.

Als *Ruffled Border* gilt die dem Knochen anliegende Plasmamembran (Abb. 3) und wurde als Parameter für die Osteoklasten-Aktivität definiert (Stenbeck, 2002). Sowohl die absolute Anzahl der Osteoklasten als auch deren Aktivität wurden aufsummiert und auf die Gesamtknochenfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) normalisiert.

Zur Bestimmung der Gesamtknochenfläche

des Schnitts wurden überschüssiges Gewebe und das Knochenmark geweißt. Via Farbschwellenwert wurde ein Binärbild erstellt: schwarz = Knochen; weiß = Hintergrund (Anhang, Kap. 11.6.3).

Nach der Methodik analog zu Kap. 2.8.1. (Malhan *et al.*, 2018) wurde mittels TWS ImageJ-Plugin „*Trainable Weka Segmentation*“ ein „*Classifier*“ definiert und dieses sodann mithilfe des „*TWS\_automated.bsh*“-Skripts analysiert. Es resultiert die Gesamtknochenfläche des Schnitts in der ROI, auf die die Osteoklasten-Anzahl und die Länge der *Ruffled Border* normalisiert wurde.



**Abbildung 10: Ein TRAP-positiver Osteoklast.** Rot gefärbt und mittig abgebildet ist ein TRAP-positiver, dem Trabekelknochen (Tr) anliegender Osteoklast (Ok). Er enthält mehrere Zellkerne (sichtbar sind mindestens 4). Die dem Tr anliegende Zellmembran wird *Ruffled Border* genannt. KM = Knochenmark. Eigene Aufnahme.

## 2.9 Statistik

Die Studie dieser Dissertation wurde von Helge Hudel aus dem Institut für medizinische Informatik Gießen (Institutsleiter: Prof. Dr. med. Henning Schneider, Rudolf-Buchheim-Str. 6, 35392 Gießen) statistisch betreut.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS (IBM SPSS Statistics 25, IBM, Armonk, USA) verwendet.

Zunächst wurde die Streuung der Daten hinsichtlich des Vorliegens einer Normalverteilung mittels QQ-Plots untersucht. Die Analyse zeigte, dass es sich in keinem Fall um normalverteilte Ergebnisse handelte. Für die Auswertung wurden Hauptziel- und Sekundärparameter definiert. Bei der unabhängigen Stichprobe wurden die gemessenen Hauptzielparameter schließend statistisch mit einem Mann-Whitney-U-Test (M-W-U-Test) analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  gelegt. Nach Bonferroni-Korrektur ergibt sich ein  $\alpha = 0,025$ .

Bei den Hauptzielparametern wurde die Gesamtheit aller KO mit der Gesamtheit aller WT verglichen.

Die Sekundärparameter wurden explorativ analysiert. Zwar wurden auch hier zur Suche nach statistischen Hinweisen und Trends sowie zur Vergleichbarkeit mit internationaler Literatur M-W-U-Tests angewendet, auf statistische Signifikanz kann bei explorativen Analysen jedoch nicht geschlossen werden.

Neben der vergleichenden Betrachtung der Gesamtheit aller WT und KO wurden bei der Analyse der Sekundärparameter darüber hinaus die Altersgruppen untersucht, eingeteilt nach zwei (DXA-Methode) beziehungsweise vier (Histomorphometrie) Zeitpunkten.

Bei der deskriptiven Statistik wurde der Median betrachtet. Zum Vergleich mit internationaler Literatur wurde im Anhang zusätzlich der Mittelwert mit SD hinzugefügt.

Als Hauptzielparameter der Studie gelten:

- 1) BMD-Wert der radiologischen DXA-Methode
- 2) Prozentualer Anteil mineralisierte Knochenmatrix an der Gesamtknochenfläche in der histomorphometrisch analysierten Von Kossa / Van Gieson-Färbung

Sekundärparameter der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Mineralisierte Knochenmatrix in der Von Kossa / Van Gieson-Färbung eingeteilt nach Zeitpunkten
- 2) Quantifizierung der Trabekeldicke
- 3) Weitere Ergebnisse der DXA-Methode
- 4) Histomorphometrie der ALP-Färbung
- 5) Untersuchung der Osteozyten-Morphologie mittels Silbernitrat-Färbung
- 6) Messung der Osteoklasten-Quantität und -Aktivität mithilfe der TRAP-Färbung

## Material und Methoden

Durch Aufteilung der Studie in eine erste Stichprobe ( $n = 35$ ) zur *post mortalen* BMD-Analyse und eine zweite Stichprobe ( $n = 71$ ) zur histomorphometrischen Analyse des linken Femurs konnte die Unabhängigkeit der Hauptzielparameter voneinander gewährleistet werden. Um weiterhin noch explorativ die Sekundärparameter durch Bildung von Altersgruppen analysieren zu können, wurde die Stichprobengröße in der histologischen Studie erhöht. Es wurde die Expertise des Instituts für medizinische Informatik Gießen (Institutsleiter: Prof. Dr. med. Henning Schneider, Rudolf-Buchheim-Str. 6, 35392 Gießen) zurate gezogen.

Die Säulendiagramme im Ergebnisteil stellen den Median als Maß der zentralen Tendenz der jeweiligen Gruppe dar. Aufgrund der Betrachtung des Medians bei einer nicht-parametrischen, unabhängigen Stichprobe kann im Säulendiagramm kein Fehlerbalken angezeigt werden. Für Details zur deskriptiven Statistik wird auf die Ergebnistabellen verwiesen (Anhang, ab Kap. 11.7).

Ein signifikanter Unterschied bei der Untersuchung der Hauptzielparameter mit  $p < 0,025$  und ein statistischer Hinweis mit  $p < 0,05$  bei den Sekundärparametern dieser Studie wurde mit einem \* in den Abbildungen des Ergebnisteils hervorgehoben. Eine durchgezogene Linie hebt den statistischen Unterschied zwischen den Gruppen (WT vs. KO) und eine gestrichelte Linie einen statistischen Unterschied zwischen den Zeitpunkten derselben Gruppe hervor (beispielsweise Zeitpunkt 1 vs. Zeitpunkt 2 innerhalb von WT).

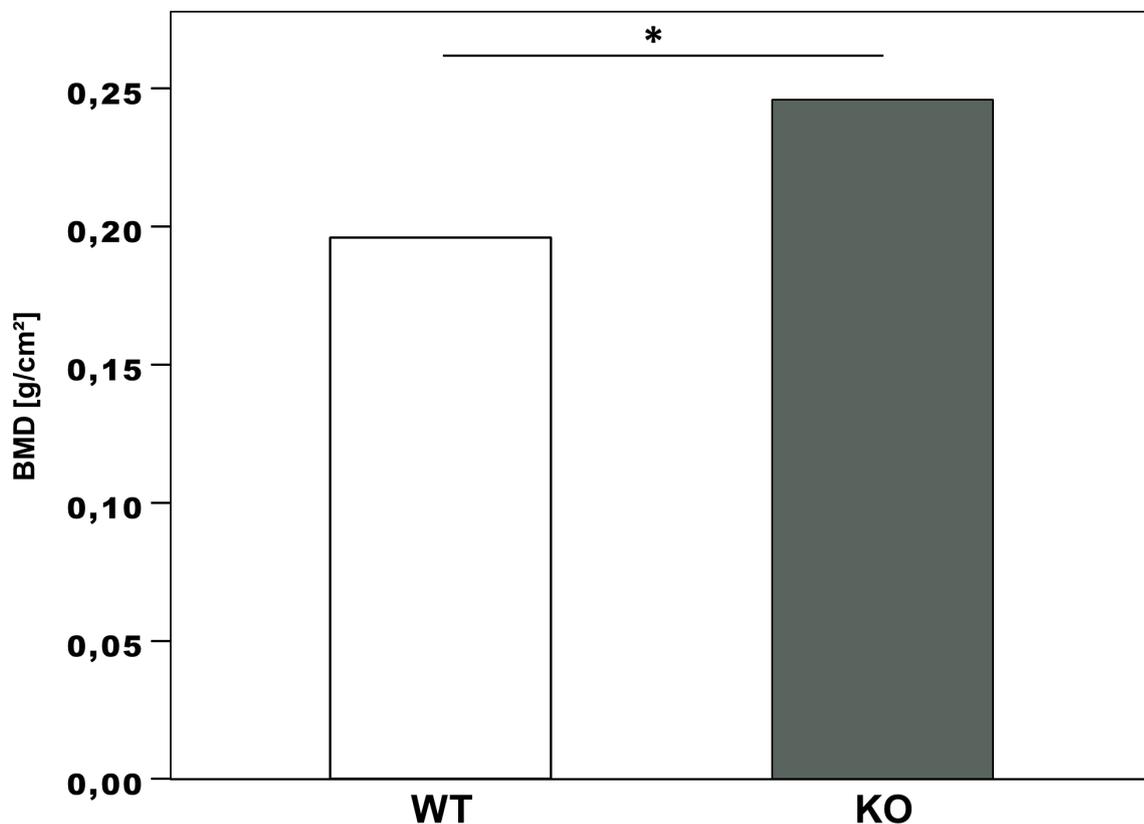
### 3 Ergebnisse

#### Ein Hinweis vorab:

Es soll nochmals kurz betont werden, dass einzig die beiden Hauptzielparameter (BMD WT vs. KO sowie mineralisierte Knochenmatrix WT vs. KO) schließend statistisch ausgewertet wurden. Alle weiteren sekundären Ergebnisse dieser Pilotstudie dienen der explorativen Datenanalyse. Bei Letzterem lieferte der M-W-U-Test bei  $p < 0,05$  nur „statistische Hinweise / Indizien“. Aus wissenschaftlich-statistischen Gründen kann jedoch nicht von „signifikant“ gesprochen werden kann, die Bedeutung ist aber ähnlich.

#### 3.1 Erhöhte BMD bei KO

Um Unterschiede in der Knochenbeschaffenheit zwischen WT und KO darzustellen, wurde zuerst das linke Femur radiologisch durch DXA-Messungen untersucht.



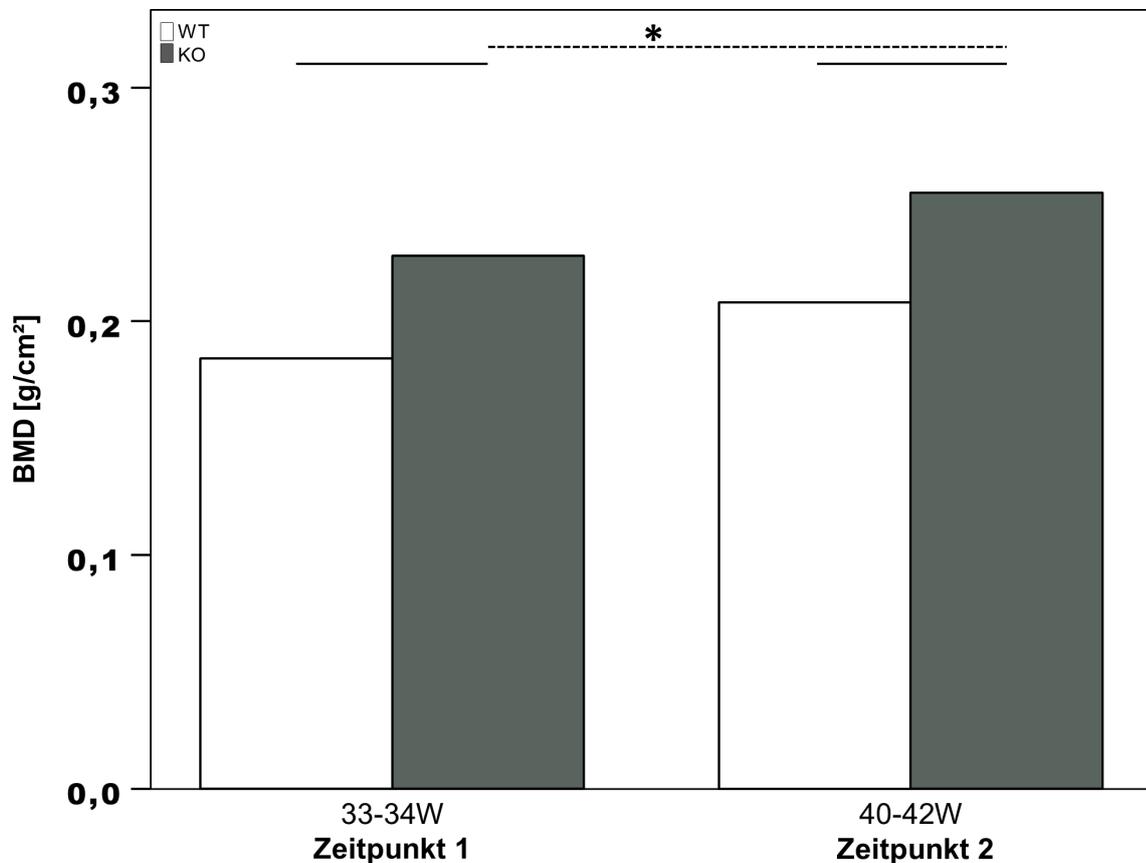
**Abbildung 11: Femorale BMD bei KO signifikant erhöht.**

Bei KO liegt die mediane BMD linker Femora ( $0,25 \text{ g/cm}^2$ ) mit  $p = 0,0000003$  signifikant über der von WT ( $0,2 \text{ g/cm}^2$ ). (\* =  $p < 0,025$  M-W-U-Test).

Im Vergleich zwischen WT und KO konnte ein erhöhter BMD-Wert bei KO bestimmt werden. Während bei WT ein BMD-Wert mit einem Median von  $0,2 \text{ g/cm}^2$  ermittelt werden konnte, ließ sich bei KO ein um  $0,05 \text{ g/cm}^2$  erhöhter Median mit  $0,25 \text{ g/cm}^2$  erheben (Abb. 11). Der Unterschied in diesem Hauptzielparameter ist mit  $p = 0,0000003$  signifikant.

## Ergebnisse

Als sekundäres Ergebnis dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob sich eine Erhöhung der BMD bei KO auch in verschiedenen Altersstufen zeigt. Es wurde deshalb die Stichprobe altersspezifisch explorativ analysiert.



**Abbildung 12: Die BMD war zu beiden Zeitpunkten bei KO gegenüber WT erhöht.**  
Zum Zeitpunkt 1 zeigte KO eine mediane BMD von 0,23 g/cm<sup>2</sup> und lag mit  $p < 0,05$  über gleichaltrigen WT (0,18 g/cm<sup>2</sup>). Auch zum Zeitpunkt 2 lag KO mit 0,26 g/cm<sup>2</sup> über WT mit 0,21 g/cm<sup>2</sup> mit  $p < 0,05$ . (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Sowohl zum ersten im Alter von 33–34 Wochen wie auch zum zweiten Zeitpunkt im Alter von 40–42 Wochen präsentierte KO eine erhöhte BMD gegenüber WT (Abb. 12). Hierfür konnten mit  $p = 0,001$  (Zeitpunkt 1 WT vs. KO) sowie mit  $p = 0,000063$  (Zeitpunkt 2 WT vs. KO) Hinweise gefunden werden. Im Alter von 33–34 Wochen ließ sich bei WT ein Median von 0,18 g/cm<sup>2</sup> und bei KO von 0,23 g/cm<sup>2</sup> bestimmen. Im Alter von 40–42 Wochen ließen sich hingegen für WT 0,21 g/cm<sup>2</sup> sowie für KO 0,26 g/cm<sup>2</sup> ermitteln. Innerhalb der Zeitpunkte ließ sich ein Anstieg der BMD ( $\Delta = 0,03$  g/cm<sup>2</sup>) von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 sowohl bei WT als auch bei KO errechnen. Für diesen Anstieg konnte bei KO mit  $p = 0,002$  ein statistischer Hinweis gefunden werden.

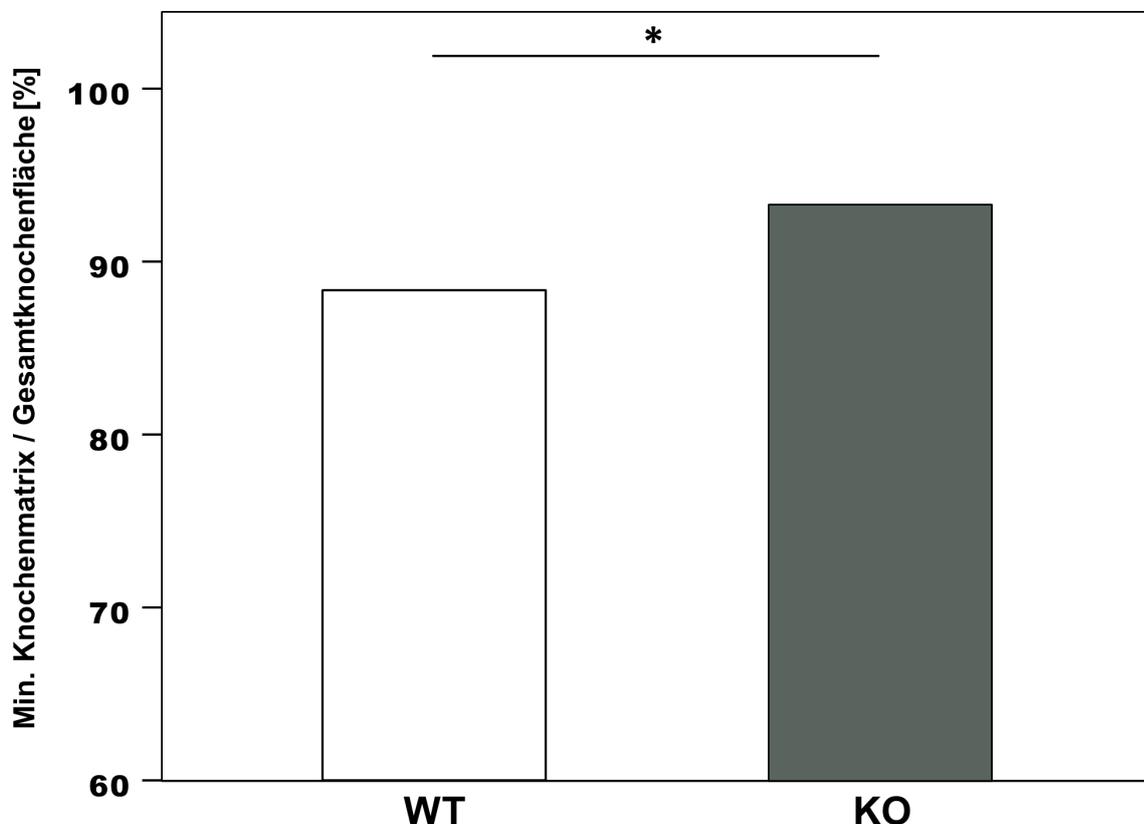
Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 18 und Tab. 19) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

## Ergebnisse

Um zu klären, ob die radiologisch festgestellten Differenzen zwischen KO und WT auch feingeweblich nachvollzogen werden können, wurden histologische Färbungen angefertigt und mithilfe von Histomorphometrie analysiert.

### 3.2 Erhöhter Anteil mineralisierter Knochenmatrix bei KO

Um Parallelen zur radiologisch bestimmten BMD ziehen zu können, wurde mit der Von Kossa / Van Gieson-Färbung die mineralisierte Knochenmatrix histologisch dargestellt. Sie ermöglicht es, den prozentualen Anteil mineralisierter Knochenmatrix an der Gesamtknochenfläche histomorphometrisch zu berechnen. Die ROI ist definiert als der trabekuläre Knochen des proximalen und distalen sowie epi- und metaphysären linken Femurs (Abb. 7).



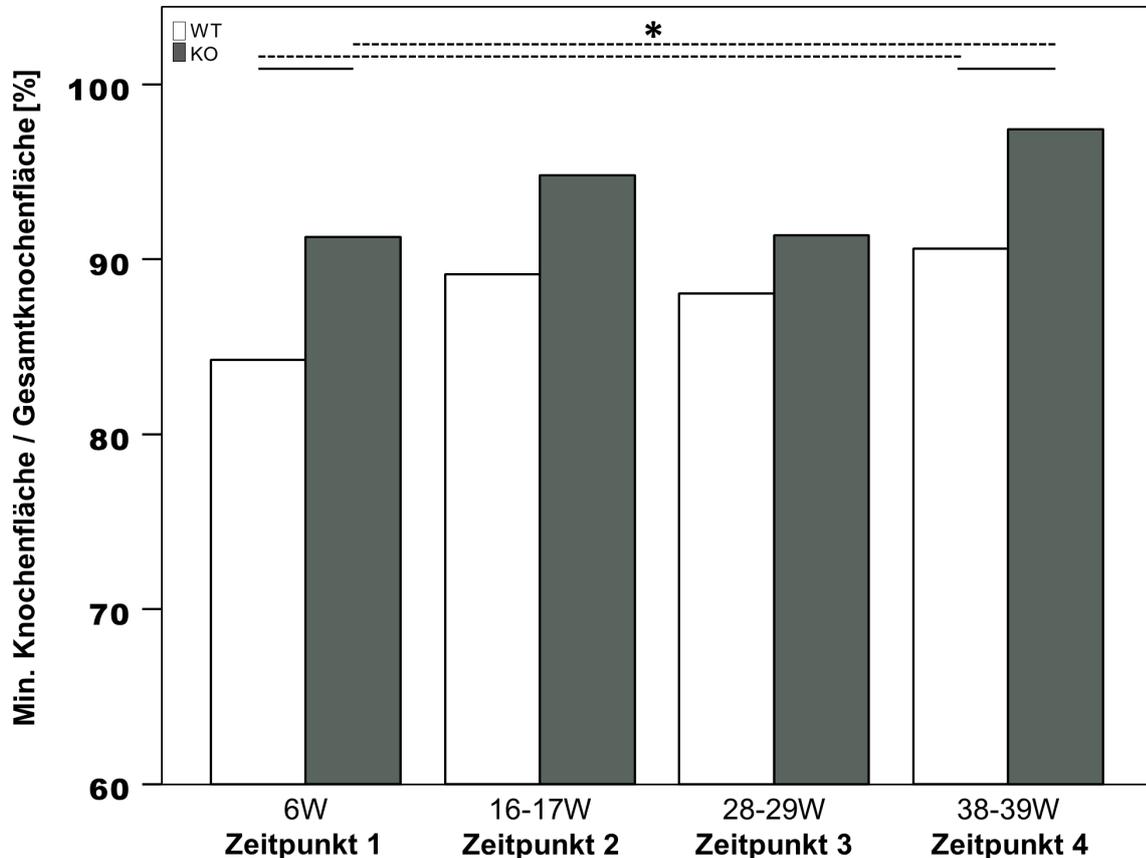
**Abbildung 13: Der Anteil der mineralisierten Knochenmatrix war bei KO signifikant erhöht.**

Der Median der mineralisierten (min.) Knochenmatrix ist bei KO mit 93,32 % gegenüber WT mit 88,39 % mit  $p = 0,001$  signifikant erhöht. (\* =  $p < 0,025$  M-W-U-Test).

Im Vergleich zwischen WT und KO konnte ein erhöhter prozentualer Anteil an mineralisierter Knochenmatrix bei KO bestimmt werden. Während sich bei WT eine mineralisierte Knochenmatrix pro Gesamtknochenfläche mit einem Median von 88,36 % ermitteln ließ, konnte bei KO ein um 4,96 % erhöhter Median mit 93,32 % erhoben werden. Der Unterschied ist mit  $p = 0,001$  signifikant (Abb. 13).

## Ergebnisse

Um einen tieferen Eindruck von der Entwicklung der mineralisierten Knochenmatrix mit dem Rattenalter zu erhalten, wurde die Stichprobe sekundär nach Zeitpunkten aufgeteilt und mit der Von Kossa / Van Gieson-Färbung histomorphometrisch explorativ untersucht.



**Abbildung 14: Zu allen Zeitpunkten war der Anteil mineralisierter Knochenfläche bei KO gegenüber WT erhöht.**

Mithilfe der Von Kossa / Van Gieson-Färbung ließ sich zu den vier Zeitpunkten bei KO ein höherer Anteil mineralisierter (min.) Knochenfläche pro Gesamtknochenfläche bestimmen, verglichen mit WT. Im Alter von 6 Wochen sowie im Alter von 38–39 Wochen konnten statistische Hinweise mit  $p < 0,05$  gefunden werden. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Bei allen Vergleichsgruppen zeigte KO gegenüber WT des gleichen Zeitpunkts eine erhöhte mediane mineralisierte Knochenmatrix, normalisiert auf die Gesamtknochenfläche. Zum Zeitpunkt 1 mit 6 Wochen lag der prozentuale Anteil der mineralisierten Knochenmatrix bei KO im Median bei 91,28 % und bei WT bei 84,25 %. Statistische Hinweise auf diesen Trend sind mit  $p = 0,022$  gegeben (Abb. 14). In der ältesten Vergleichsgruppe des Zeitpunkts 4 erreichte KO einen Median von 97,42 % und lag 6,83 % über der entsprechenden relativen mineralisierten Knochenmatrix von 90,59 % bei WT. Der kleine p-Wert ( $p = 0,001$ ) im Vergleich zwischen WT und KO des Zeitpunkts 4 unterstützt diese Tendenz. Innerhalb von WT stieg der Anteil mineralisierter Knochenmatrix an der Gesamtknochenfläche von Zeitpunkt 1 bis zum Zeitpunkt 4 an und erreichte im Zuchalter von 38 Wochen den gemessenen Höchstwert.

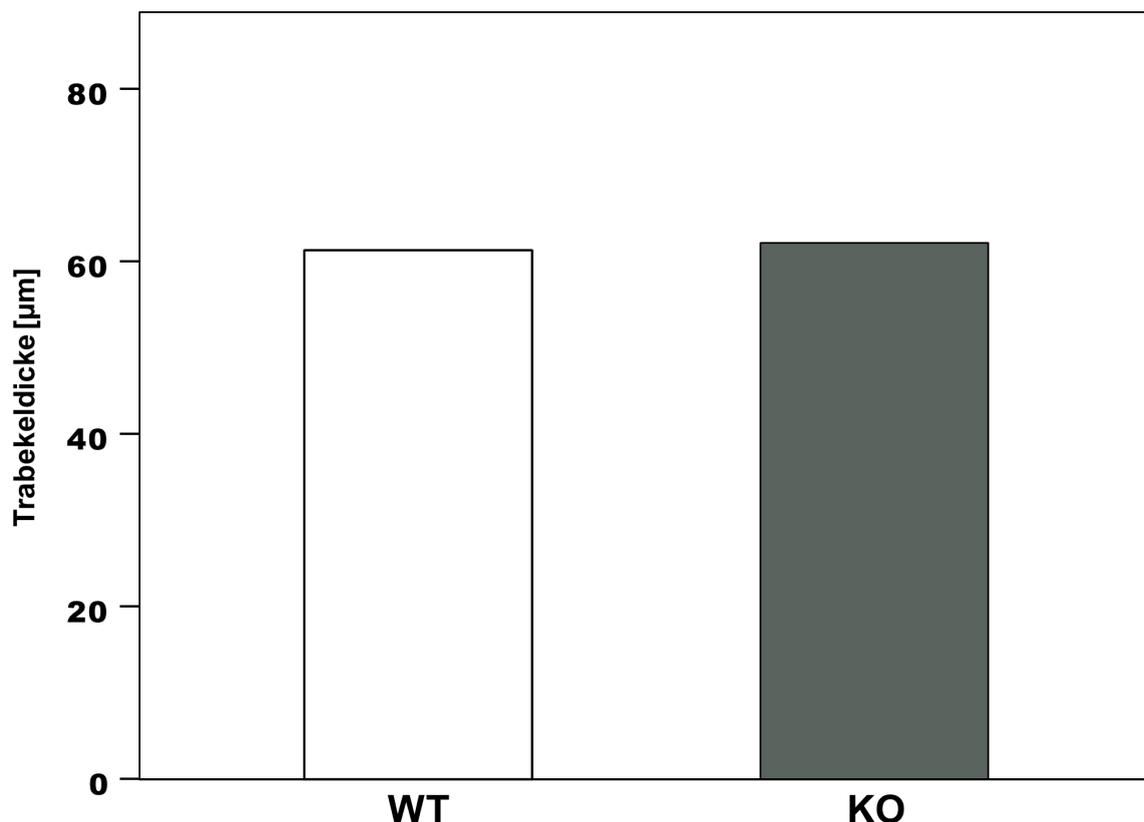
## Ergebnisse

Mit  $p = 0,03$  konnte hierfür ein Hinweis geliefert werden (Abb. 14). Der Anteil mineralisierter Knochenmatrix an der Gesamtknochenfläche nahm bei KO wie auch bei WT von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 4 um 6,14 % zu. Auch bei KO zeigte sich ein Höchstwert im Alter von 39 Wochen. Für die Zunahme an mineralisierter Knochenmatrix pro Gesamtknochenfläche von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 4 existiert bei KO mit  $p = 0,000159$  ein statistischer Hinweis.

Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 20 und Tab. 21) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

### 3.3 Der Einfluss der Tph2 auf die Trabekeldicke ist altersabhängig

Es konnte radiologisch bei KO gegenüber WT eine höhere BMD nahegelegt werden, und histologisch zeigte KO im Vergleich zu WT ebenfalls einen höheren Anteil an mineralisierter Knochenmatrix bezogen auf die Gesamtknochenfläche. Als sekundäres Ergebnis dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob sich diese Diskrepanzen auch auf die Trabekelarchitektur mit verändertem spongiösem Trabekeldurchmesser auswirken könnten. Es wurde mittels BoneJ-Analyse die Trabekeldicke bestimmt. Die Untersuchung basiert auf den Schnitten der Von Kossa / Van Gieson-Färbung (Abb. 8).



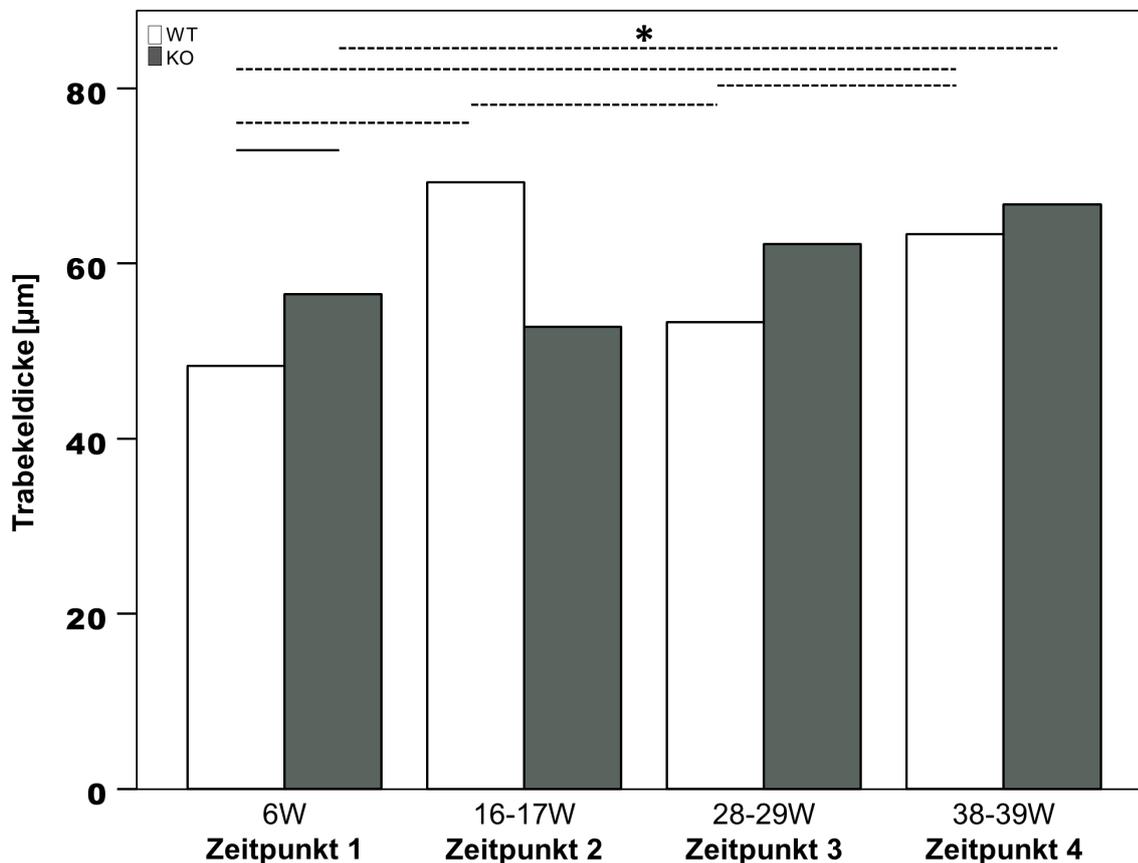
**Abbildung 15: Die Trabekeldicke lag bei WT und KO auf annähernd gleichem Niveau.**

Mithilfe der auf der Von Kossa / Van Gieson-Färbung basierenden histomorphometrischen BoneJ-Analyse zeigten sich beim explorativen Vergleich der mittleren Trabekeldicke zwischen den Gruppen keine wesentlichen Unterschiede. Bei WT belief sich der Median auf 61,26 µm, bei KO auf 62,28 µm.

## Ergebnisse

Bei Betrachtung aller Versuchstiere unterschied sich die mittlere Trabekeldicke von WT und KO nur marginal. Bei WT ließ sich ein Median von 61,26  $\mu\text{m}$  ermitteln, bei KO lag dieser bei 62,28  $\mu\text{m}$  (Abb. 15).

Unterschiede wurden erst durch Einteilung in die Zeitpunkte eins bis vier erkennbar (Abb. 16).



**Abbildung 16: Abgesehen von Zeitpunkt 2 ließ sich bei KO gegenüber WT eine erhöhte Trabekeldicke feststellen.**

Mithilfe der auf der Von Kossa / Van Gieson-Färbung basierenden histomorphometrischen BoneJ-Analyse zeigte sich beim explorativen Vergleich eine erhöhte Trabekeldicke bei KO zu drei von vier Zeitpunkten. Lediglich beim zweiten Zeitpunkt war diese Tendenz nicht festzustellen, sondern gegensätzlich. Mit  $p < 0,05$  konnten im Alter von 6 Wochen diese Ergebnisse unterstrichen werden. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Mit Ausnahme des Zeitpunkts 2 wurde zu allen Zeitpunkten bei KO gegenüber der gleichaltrigen WT eine erhöhte mediane Trabekeldicke gemessen. In der jüngsten Vergleichsgruppe liegt mit  $p = 0,008$  hierfür ein Hinweis vor (Abb. 16). Der größte mediane Trabekeldurchmesser konnte bei KO des ältesten Zeitpunkts 4 im Alter von 39 Wochen bestimmt werden und lag 3,38  $\mu\text{m}$  über dem Wert gleichaltriger WT (Abb. 16). Bei KO war die mediane Trabekeldicke zum Zeitpunkt 1 bei 56,51  $\mu\text{m}$ . Zum Zeitpunkt 2 lag dieser Wert bei 52,78  $\mu\text{m}$  und stieg dann um 9,43  $\mu\text{m}$  zum Zeitpunkt 3 sowie um weitere 4,52  $\mu\text{m}$  bis zum Zeitpunkt 4 mit 66,73  $\mu\text{m}$  an.

Zum Zeitpunkt 1 konnte bei WT ein Median von 48,32  $\mu\text{m}$ , zum Zeitpunkt 3 ein Median von 53,27  $\mu\text{m}$  und zum Zeitpunkt 4 ein Median von 63,35  $\mu\text{m}$  bestimmt werden.

## Ergebnisse

Der maximale Trabekeldurchmesser konnte bei WT zum Zeitpunkt 2 mit einem Median von 69,28  $\mu\text{m}$  gemessen werden und lag deutlich über der medianen Trabekeldicke von Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 3 ( $p = 0,001$ ) (Abb. 16). Mit  $p = 0,000033$  (Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 1) sowie mit  $p = 0,001$  (Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 3) konnte man Hinweise für diesen Trend finden.

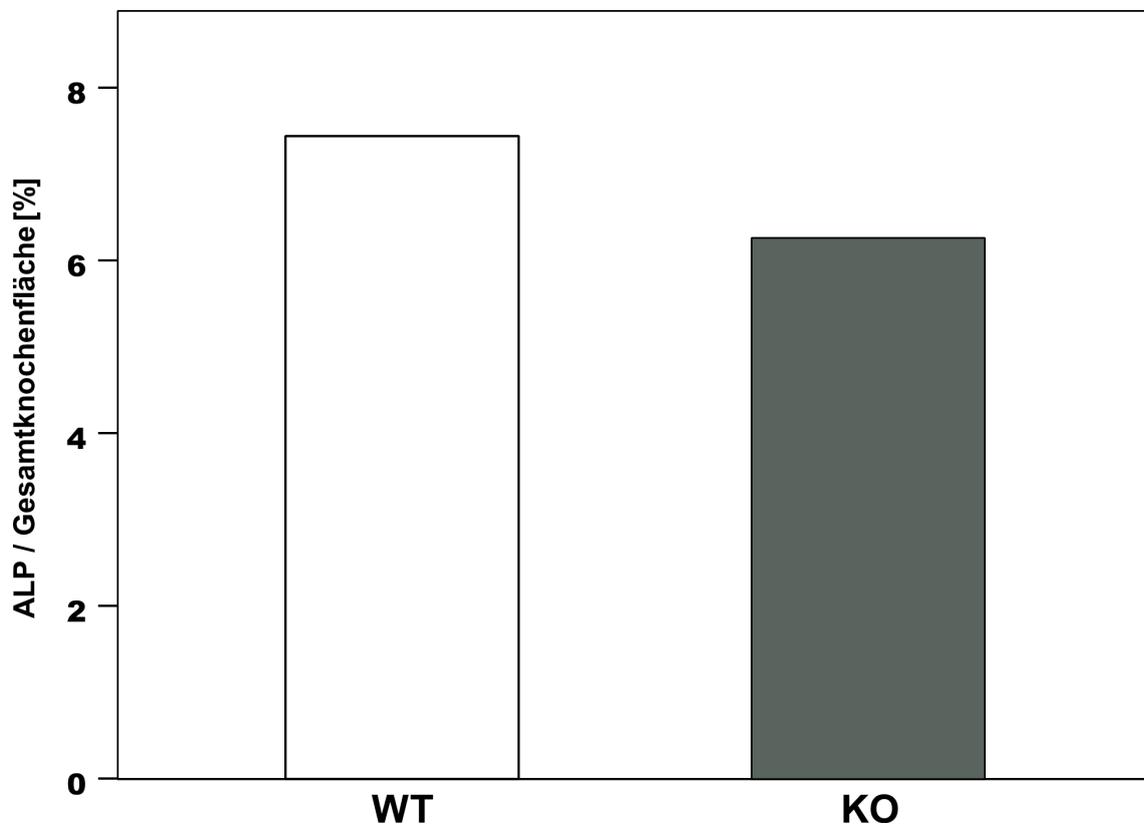
Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 22 und Tab. 23) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

Es stellte sich die Frage, wie die Diskrepanzen zwischen WT und KO bei BMD, mineralisierter Knochenmatrix und Trabekeldicke vermittelt wurden.

Daher wurden die Knochenzellen histomorphometrisch betrachtet, um Unterschiede explorativ darstellen zu können.

### 3.4 Stetiger Anstieg der ALP-Aktivität mit dem Alter bei KO

Durch Enzymhistochemie wurden ALP-positive Zellen bläulich sichtbar gemacht, um histomorphometrisch auf das Färbeverhalten in der ROI rückschließen zu können. Die ROI ist definiert als der trabekuläre Knochen des proximalen und distalen sowie epi- und metaphysären linken Femurs. Die ALP-positive Fläche wurde schließlich auf die Gesamtknochenfläche desselben Schnitts normalisiert.



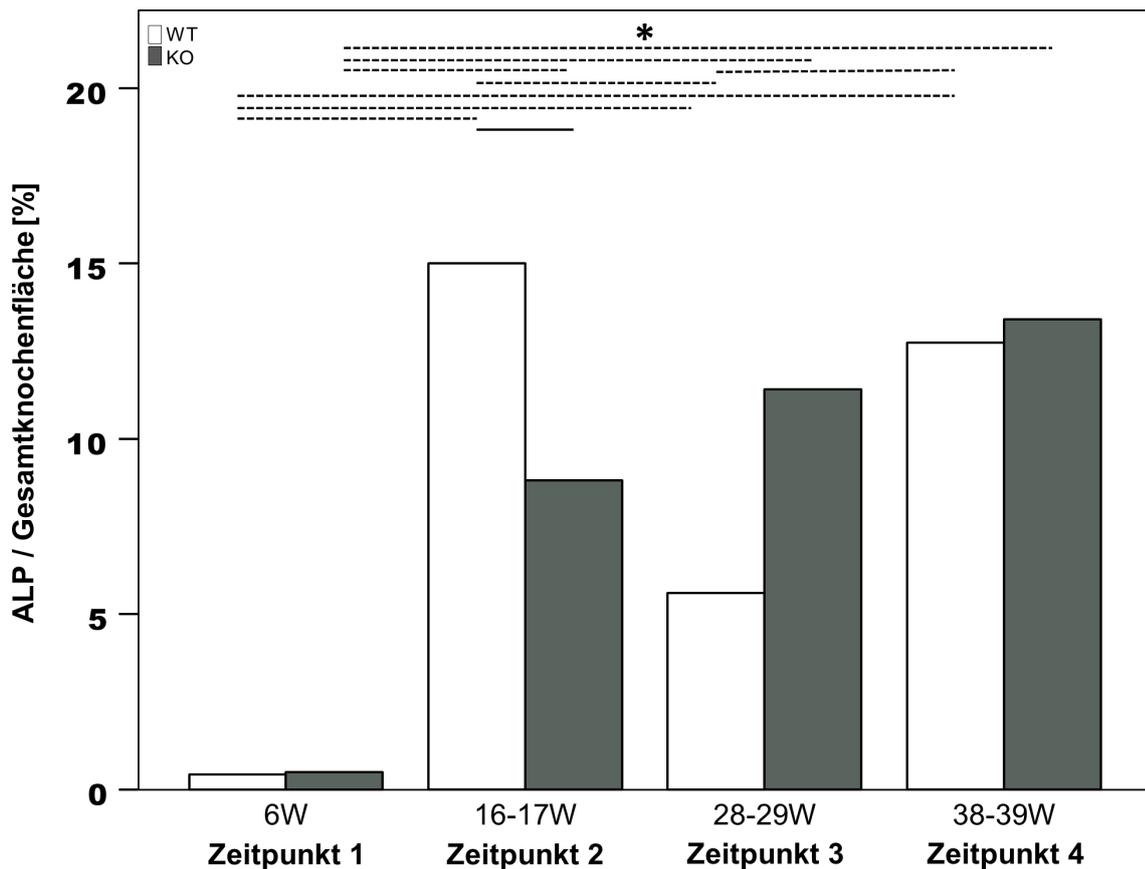
**Abbildung 17: Die relative ALP-positive Fläche war bei KO gegenüber WT niedriger.**

Mithilfe der ALP-Färbung wurde histomorphometrisch die ALP-positive Fläche dargestellt. Beim explorativen Vergleich konnten zwischen den Gruppen Unterschiede festgestellt werden, jedoch ohne statistische Hinweise. Bei WT belief sich der Median auf 7,44 %, bei KO auf 6,26 %.

## Ergebnisse

Bei der explorativen Betrachtung der ALP-positiven Fläche von WT und KO ergab die Histomorphometrie als sekundäres Ergebnis der vorliegenden Studie einen bei KO um 1,18 % reduzierten Wert. Während die Gesamtheit der WT im Median auf 7,44 % ALP-positiver Knochenfläche kam, ließ sich bei KO 6,26 % ALP-positiver Knochenfläche ermitteln (Abb. 17).

Um Einsicht in die Entwicklung der ALP-positiven Fläche zu erhalten, wurde die histochemische Aktivität nach Zeitpunkten betrachtet.



**Abbildung 18: Mit zunehmendem Alter stetiger Anstieg der ALP-positiven Knochenfläche bei KO.** Beim explorativen Vergleich des relativen Anteils ALP-positiver Fläche an der Gesamtknochenfläche konnte bei KO ein sich fortsetzender Anstieg von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 4 ermittelt werden. Bei WT zeigte sich die höchste Ausprägung des Medians zum Zeitpunkt 2 (15 %) und war demgegenüber bei den älteren Zeitpunkten 3 und 4 reduziert. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Die ALP-positiv Knochenfläche erreichte zum Zeitpunkt 1 bei WT einen Median von 0,42 % und bei KO von 0,5 %. Diese Werte stellten innerhalb WT und KO die niedrigsten Ausprägungen aller Untersuchungsobjekte dar. Die maximale mediane ALP-positiv Knochenfläche konnte bei WT des Zeitpunkts 2 mit 15 % festgestellt werden und lag hierbei über der gleichaltrigen KO-Gruppe (8,82 %) (Abb. 18). Ein Indiz für diesen Trend konnte mit  $p = 0,023$  gefunden werden. Bei den Zeitpunkten 3 und 4 lag KO im Vergleich über WT (Abb. 18). Zum Zeitpunkt 3 ließ sich für WT ein Median von 5,6 % ermitteln, der korrespondierende Median bei KO lag bei einem mehr als doppelt so hohen Wert mit

## Ergebnisse

11,41 %. Beim letzten Zeitpunkt 4 ergab die Histomorphometrie bei WT eine ALP-positive Knochenfläche von 12,74 %, KO lag im Median 0,66 % über letzteren und ließ sich mit 13,4 % ermitteln. Statistische Hinweise ergaben sich bei beiden Zeitpunkten nicht.

Die Entwicklung der ALP-Aktivität innerhalb der Zeitpunkte zeigte den Trend, dass bei beiden Vergleichsgruppen die jüngsten Ratten mit statistischen Anhaltspunkten unter allen älteren Zeitpunkten lagen [WT: Zeitpunkt 1:  $p = 0,000004$  (zu Zeitpunkt 2);  $p = 0,036$  (zu Zeitpunkt 3);  $p = 0,00001$  (zu Zeitpunkt 4); KO: Zeitpunkt 1:  $p = 0,00004$  (zu Zeitpunkt 2);  $p = 0,001$  (zu Zeitpunkt 3);  $p = 0,00004$  (zu Zeitpunkt 4)]. Weiterhin resultierte aus der histomorphometrischen Analyse der auf die Gesamtknochenfläche normalisierten ALP-positiven Region ein kontinuierlicher Anstieg der ALP-positiven Fläche innerhalb von KO. Diese Entwicklung konnte bei WT nicht gezeigt werden (Abb. 18).

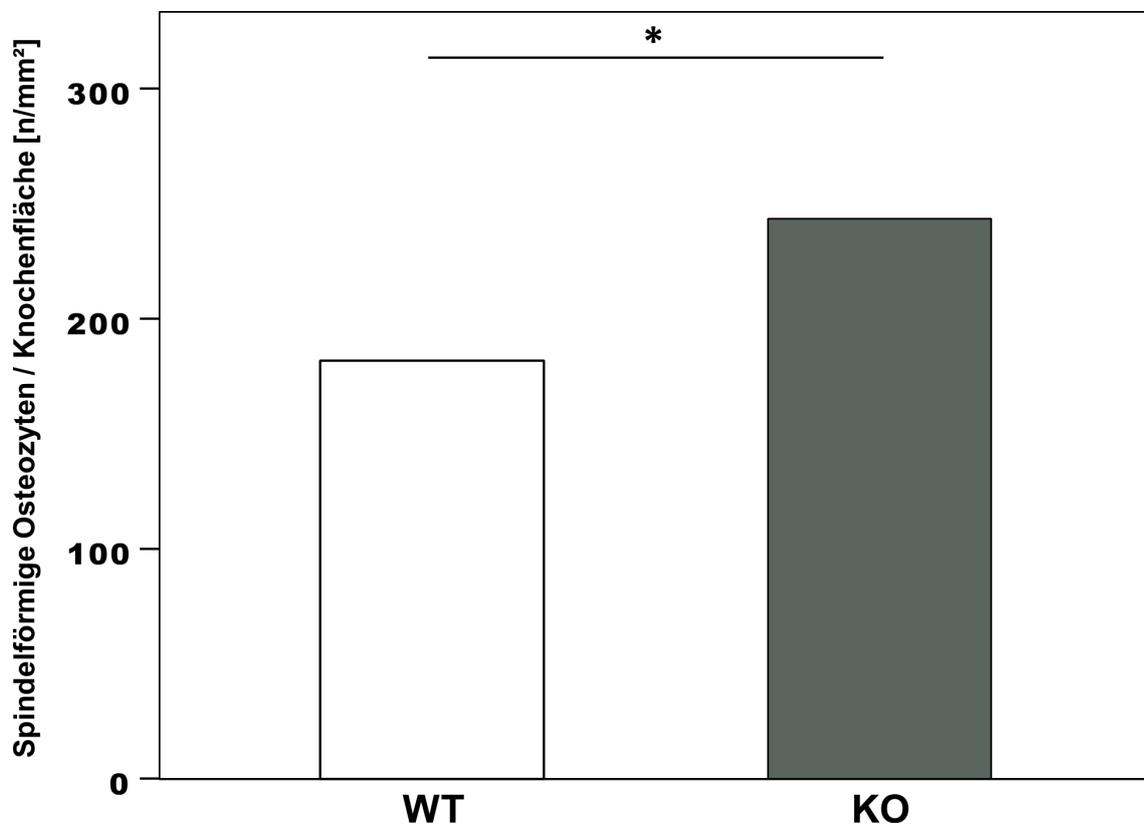
Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 24 und Tab. 25) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

### 3.5 KO übersteigt WT in der Osteozyten-Quantität

Um explorativ zu betrachten, ob der stetige Anstieg ALP-positiver Fläche bei KO auch zu Differenzen bei den Osteozyten führt, wurde die Morphologie-darstellende Silbernitrat-Färbung verwendet (Abb. 9). Bei der Analyse wurde die Osteozyten-Anzahl pro Foto auf die Knochenfläche desselben Fotos normalisiert.

Im ersten Schritt wurde die Gesamtheit aller spindelförmigen Osteozyten betrachtet.

Die Ergebnisse zeigten einen erhöhten Median für KO gegenüber WT bei der Anzahl spindelförmiger Osteozyten pro Knochenfläche ( $Oz_{sp./mm^2}$ ). Der Zentralwert lag bei WT bei 187,61  $Oz_{sp./mm^2}$  und bei KO bei 253,85  $Oz_{sp./mm^2}$  (Abb. 19). Der kleine p-Wert ( $p = 0,000000000003$ ) gibt einen Hinweis auf diesen Trend.

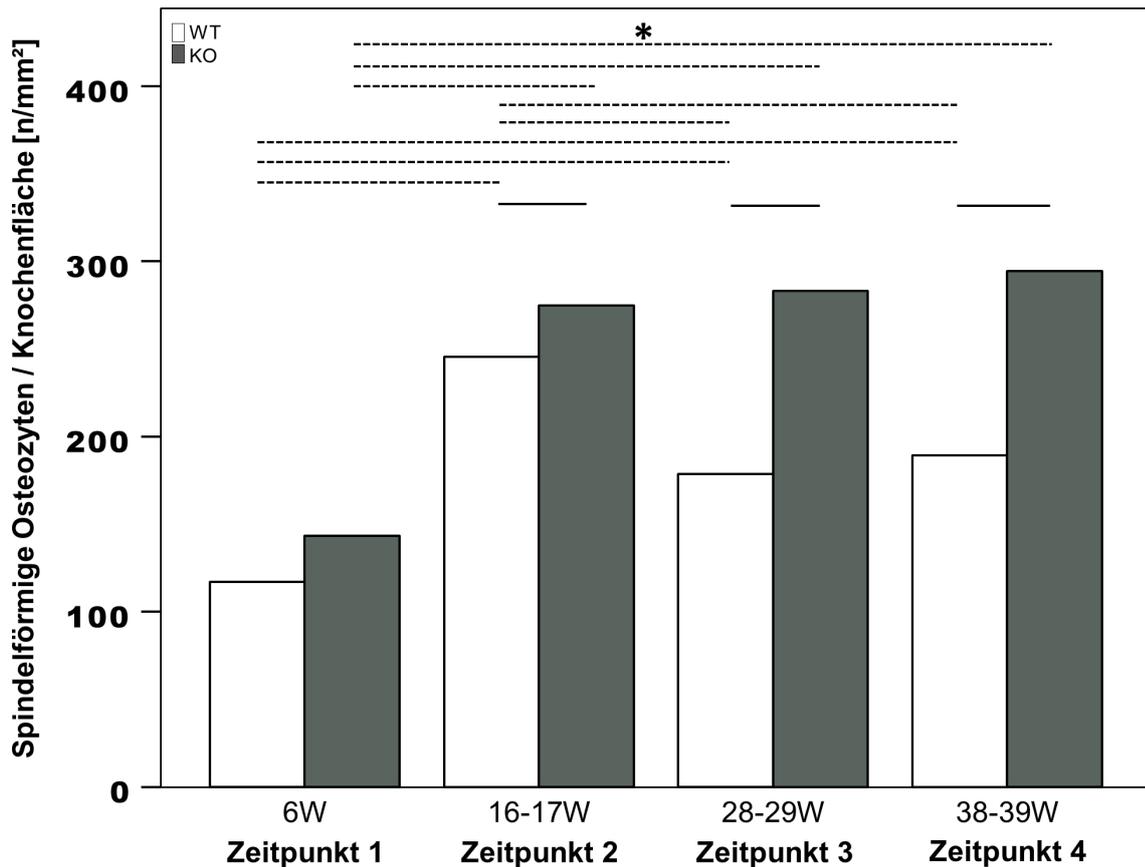


**Abbildung 19: Spindelförmige Osteozyten waren bei KO vermehrt vorzufinden.**

Es konnte bei KO ein Median von 253,85  $Oz_{sp./mm^2}$  ermittelt werden, der mit statistischen Hinweisen ( $p = 0,000000000003$ ) über dem Median von WT (187,61  $Oz_{sp./mm^2}$ ) lag. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Diese Tendenz setzte sich auch nach Altersgruppierung fort. Zu jedem der vier Zeitpunkte lag der Median spindelförmiger Osteozyten bei KO über WT (Abb. 20).

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Spindelförmige Osteozyten ließen sich zu jedem Zeitpunkt vermehrt bei KO bestimmen.**

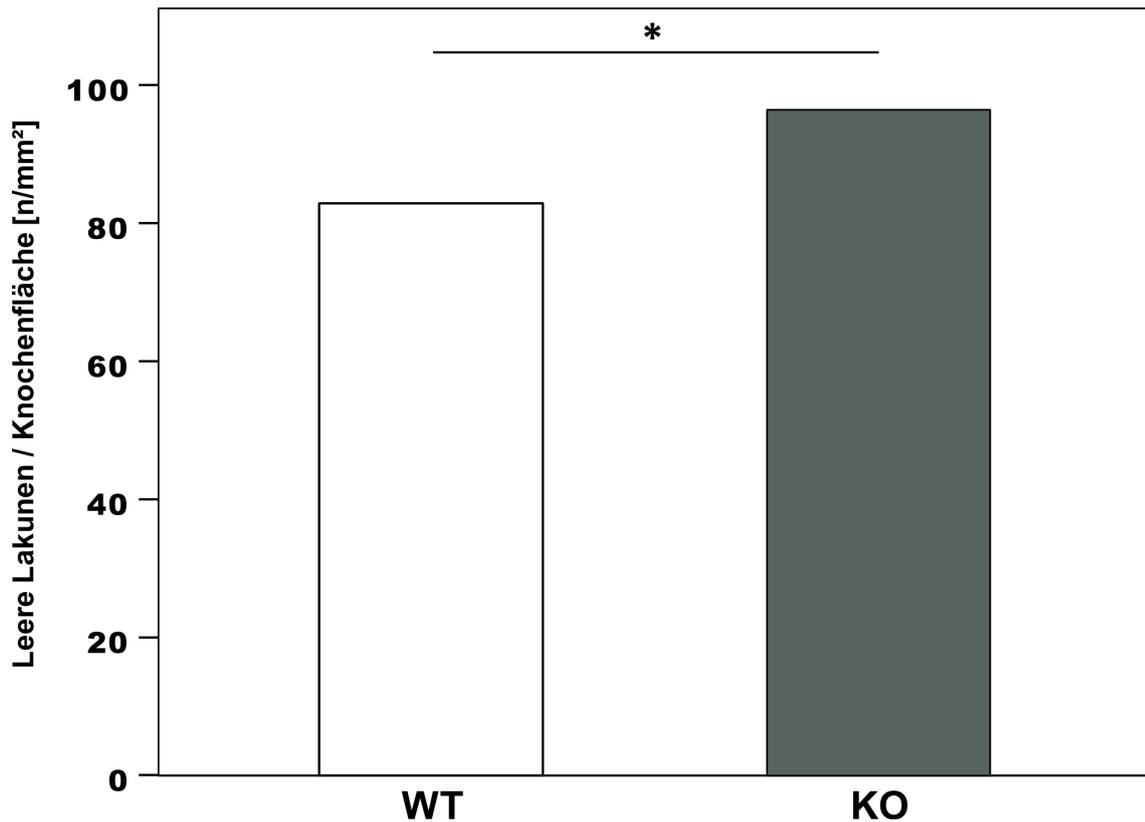
Der Median spindelförmiger Osteozyten stieg bei KO von Zeitpunkt 1 (143,15  $Oz_{sp.}/mm^2$ ) zu Zeitpunkt 4 (294,59  $Oz_{sp.}/mm^2$ ) stetig an und lag bei jeder Altersgruppe über WT. Hingegen erreichte WT die höchste Ausprägung zum Zeitpunkt 2 mit 245,42  $Oz_{sp.}/mm^2$ . (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Es ließen sich hierfür ab einem Vergleichsalter von 16–17 Wochen statistische Hinweise finden (Zeitpunkt 2 KO vs. WT  $p = 0,01$ ; Zeitpunkt 3 KO vs. WT  $p = 0,00000000000004$ ; Zeitpunkt 4 KO vs. WT  $p = 0,000006$ ). Während bei WT zum Zeitpunkt 2 die höchste Ausprägung spindelförmiger Osteozyten bestimmt wurde (245,42  $Oz_{sp.}/mm^2$ ) und der Median zum Zeitpunkt 4 bei 189,4  $Oz_{sp.}/mm^2$  lag, ließ sich bei KO von Zeitpunkt 1 (143,15  $Oz_{sp.}/mm^2$ ) bis zum Zeitpunkt 4 (294,59  $Oz_{sp.}/mm^2$ ) ein kontinuierlicher Anstieg spindelförmiger Osteozyten messen (Abb. 20).

Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 26 und Tab. 27) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

Daraufhin wurde die Summe leerer Lakunen pro Knochenfläche ( $LL/mm^2$ ) bestimmt. Insgesamt wurde bei KO gegenüber WT eine erhöhte Anzahl leerer Lakunen gezählt (Abb. 21). Bei WT lag der Median bei 84,63  $LL/mm^2$  und bei KO bei 101,7  $LL/mm^2$ . Mit  $p = 0,000006$  konnte hierfür ein statistischer Hinweis gefunden werden.

## Ergebnisse



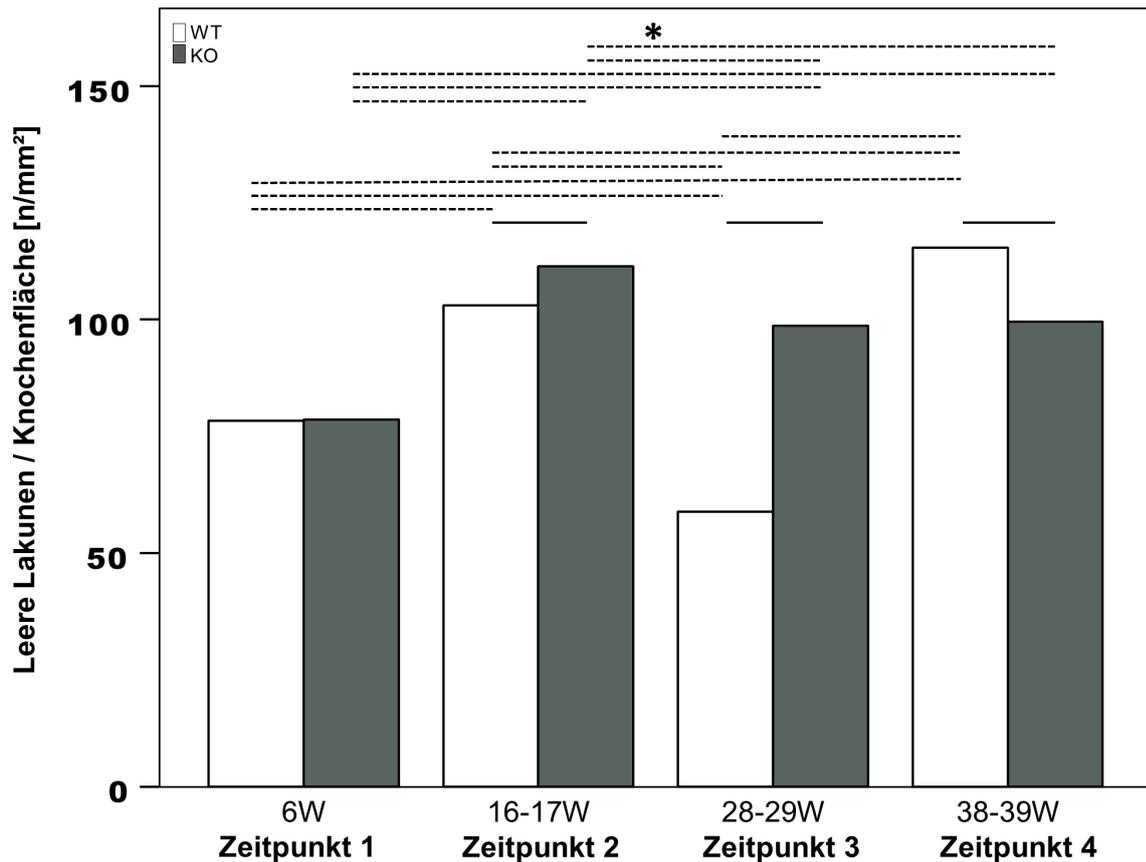
**Abbildung 21: Die Summe leerer Lakunen war bei KO erhöht.**

Es konnte bei KO ein Median von 101,7 LL/mm<sup>2</sup> ermittelt werden, der mit statistischen Hinweisen ( $p = 0,000006$ ) über dem Median von WT (84,63 LL/mm<sup>2</sup>) lag. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Nach Einteilung in Zeitpunkte zeigte sich im jüngsten Vergleichsalter mit 6 Wochen eine annähernd gleiche mediane Ausprägung leerer Lakunen pro Knochenfläche zwischen WT (78,35 LL/mm<sup>2</sup>) und KO (78,62 LL/mm<sup>2</sup>) (Abb. 22).

Für die Zeitpunkte 2 und 3 konnten bei KO verglichen mit WT mehr leere Lakunen pro Knochenfläche gezählt werden (Abb. 22). Hinweise für diesen Trend konnten durch die kleinen p-Werte (Zeitpunkt 2 KO vs. WT  $p = 0,003$ ; Zeitpunkt 3 KO vs. WT  $p = 0,000000000000006$ ) gefunden werden. Mit  $p = 0,014$  zum Zeitpunkt 4 drehte sich diese Tendenz mit vermehrten leeren Lakunen bei WT gegenüber KO (Abb. 22). Mithilfe der Histomorphometrie konnte gezeigt werden, dass die Anzahl leerer Lakunen pro Knochenfläche bei WT von Zeitpunkt 2 (103,02 LL/mm<sup>2</sup>) zu Zeitpunkt 4 (115,41 LL/mm<sup>2</sup>) zunahm, während sich bei KO eine gegenläufige Tendenz mit von Zeitpunkt 2 (111,44 LL/mm<sup>2</sup>) zu Zeitpunkt 4 (99,59 LL/mm<sup>2</sup>) abfallender Anzahl leerer Lakunen pro Knochenfläche ergab.

## Ergebnisse



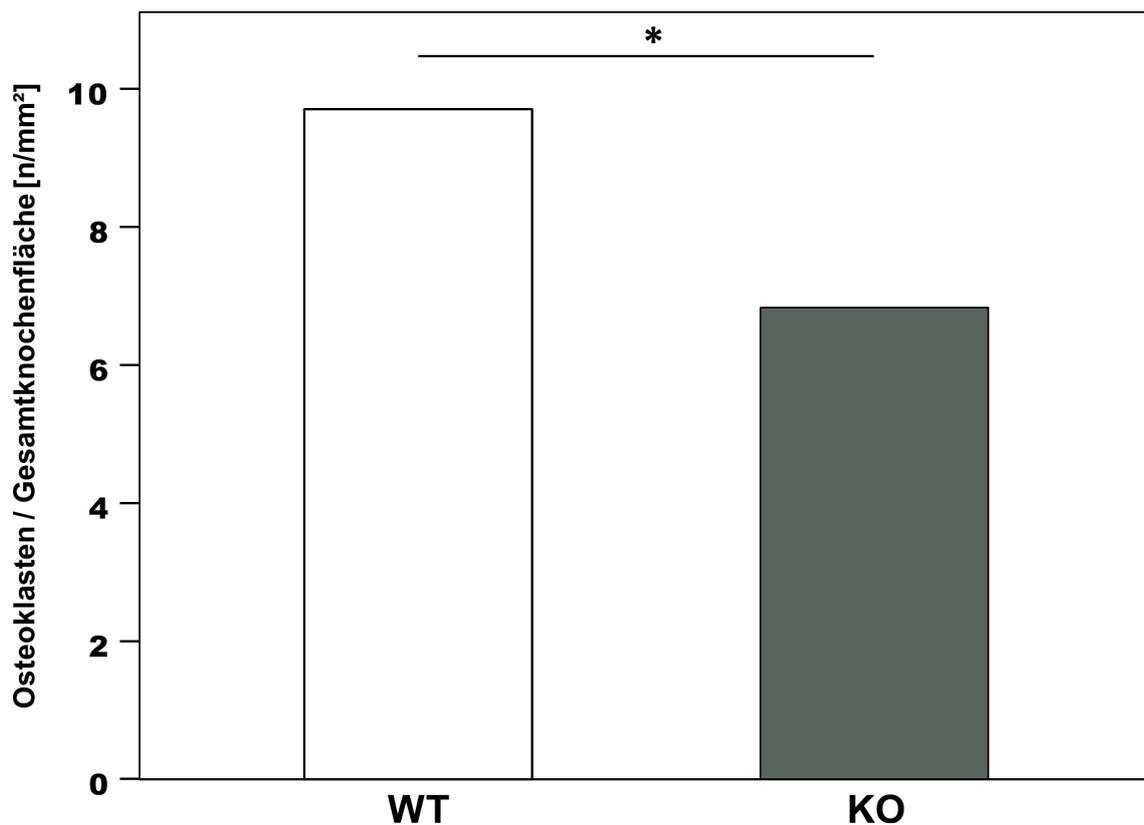
**Abbildung 22: Bei WT stieg die Anzahl leerer Lakunen von Zeitpunkt 2 zum Zeitpunkt 4 an, bei KO fiel sie hingegen ab.**

Die Summe leerer Lakunen stieg bei WT von Zeitpunkt 1 (78,35 LL/mm<sup>2</sup>) zu Zeitpunkt 4. Die meisten leeren Lakunen wurden bei WT im ältesten Zeitpunkt gezählt (115,41 LL/mm<sup>2</sup>). Hingegen wurde bei KO festgestellt, dass der höchste Median zum Zeitpunkt 2 mit 111,44 LL/mm<sup>2</sup> lag. Zum Zeitpunkt 4 lag der Median von WT (115,41 LL/mm<sup>2</sup>) deutlich über KO (99,59 LL/mm<sup>2</sup>). (\* = p < 0,05 M-W-U-Test).

Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 28 und Tab. 29) siehe Anhang (ab Kap. 11.7). Zur Vollständigkeit wurden auch runde Osteozyten bestimmt und auch die Gesamtsumme aller Osteozyten analysiert. Die Ergebnisse hierzu befinden sich ebenfalls im Anhang ab Kap. 11.7 (Tab. 30–33).

### 3.6 Anzahl und Aktivität der Osteoklasten sind bei KO erniedrigt

Um herauszufinden, ob ein Knockout der Tph2 sich auf die knochenresorbierenden Zellen auswirken könnte, wurde enzymhistochemisch die TRAP gefärbt (Abb. 10), semi-automatisch die Anzahl der Osteoklasten gezählt sowie die Länge der *Ruffled Border* ausgemessen. Die Daten dieser sekundären Ergebnisse wurden explorativ analysiert. Die ROI ist definiert als die epi- und metaphysären Knochenenden des linken Femurs. Die Osteoklasten-Anzahl als auch die Länge der *Ruffled Border* wurden auf die Gesamtknochenfläche desselben Schnitts normalisiert.

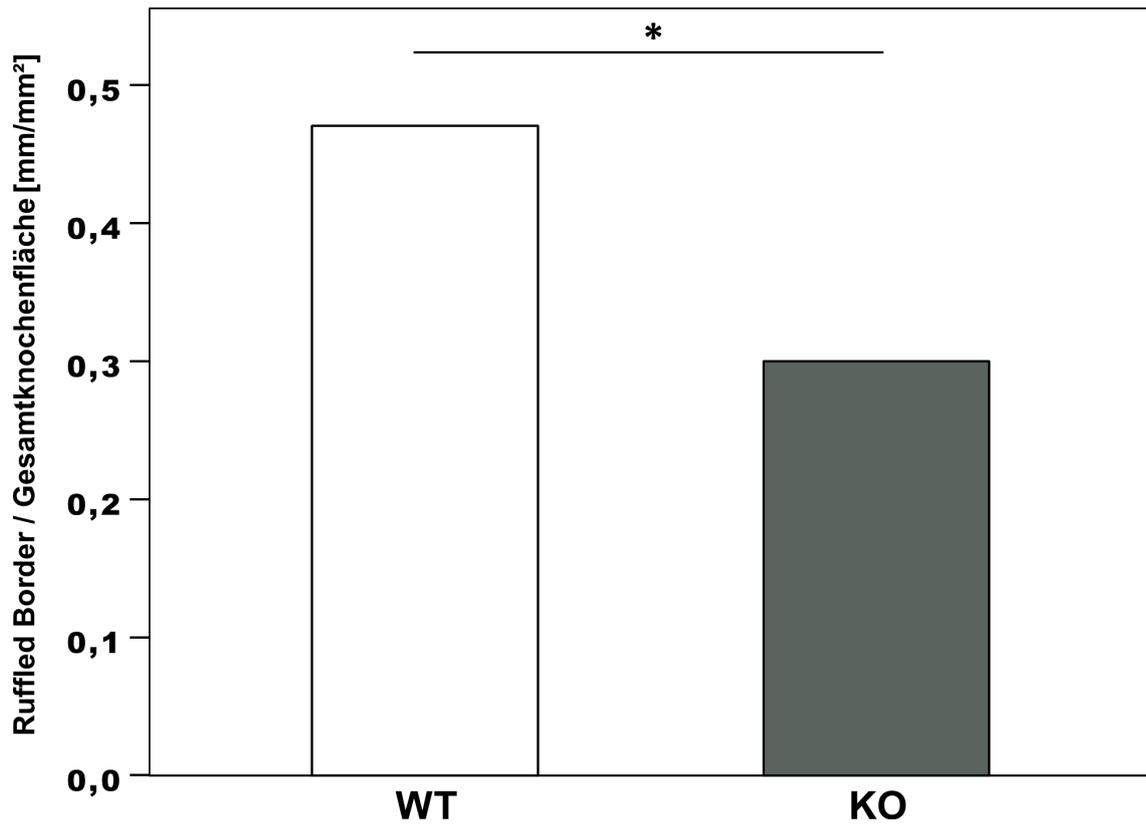


**Abbildung 23: Die Osteoklasten-Anzahl war bei KO erniedrigt.**

Mit der TRAP-Enzymhistochemie konnte bestimmt werden, dass die Osteoklasten-Anzahl pro Gesamtknochenfläche bei KO vs. WT um 2,87 Ok/mm<sup>2</sup> erniedrigt war. Diese Tendenz wurde durch das kleine  $p = 0,002$  unterstrichen. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Durch die Histomorphometrie der TRAP-Färbung konnten Hinweise generiert werden, dass KO gegenüber WT sowohl eine reduzierte Osteoklasten-Anzahl pro Gesamtknochenfläche (Ok/mm<sup>2</sup>) (Abb. 23) als auch eine reduzierte Länge der *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche (mm/mm<sup>2</sup>) (Abb. 24) aufweist. Während sich bei WT ein Median von 9,7 Ok/mm<sup>2</sup> ermitteln ließ, ergab die Zell-Auszählung bei KO im Median 6,83 Ok/mm<sup>2</sup>. Die *Ruffled Border* konnte bei WT im Median auf 0,47 mm/mm<sup>2</sup> ausgemessen werden, während sich bei KO ein Median von 0,3 mm/mm<sup>2</sup> ergab. Diese Hinweise wurden durch die jeweils niedrigen p-Werte mit  $p = 0,002$  gestützt.

## Ergebnisse

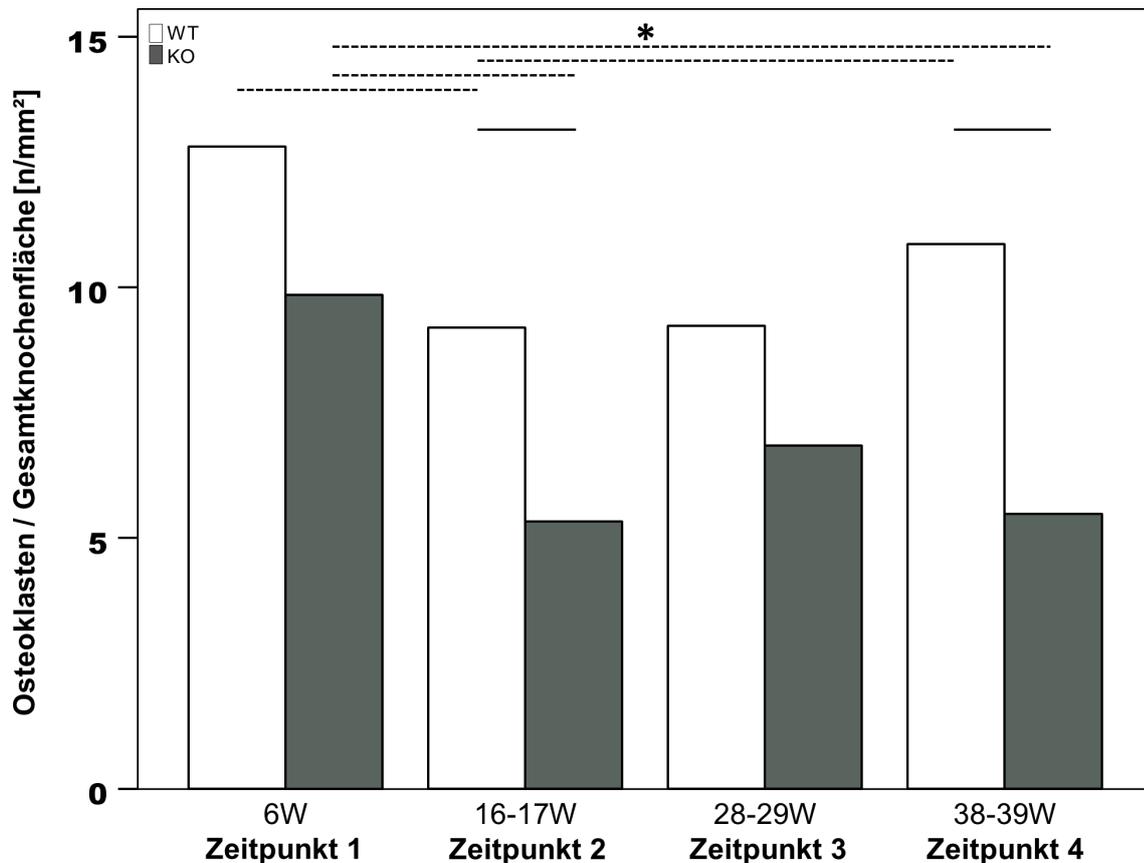


**Abbildung 24: Die Länge der *Ruffled Border* war bei KO reduziert.**

Die Auswertung der TRAP-Enzymhistochemie machte ersichtlich, dass die summierte *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche bei KO vs. WT um 0,17 mm/mm<sup>2</sup> erniedrigt war. Diese Tendenz wurde durch das kleine  $p = 0,002$  unterstrichen. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

## Ergebnisse

Aus der Analyse der TRAP-Färbung ging hervor, dass KO gemessen an WT zu allen vier Zeitpunkten eine erniedrigte normalisierte Osteoklasten-Anzahl aufwies (Abb. 25).



**Abbildung 25: Der Anstieg der Osteoklasten-Anzahl bei WT ab Zeitpunkt 2 blieb bei KO aus.**

Die TRAP-Enzymhistochemie führte zu dem Ergebnis, dass die Osteoklasten-Anzahl pro Gesamtknochenfläche bei KO gegenüber WT erniedrigt war. Weiterhin zeigte sich bei WT eine deutliche Zunahme der Osteoklasten-Anzahl von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4 mit  $p = 0,011$ , wohingegen die mediane Osteoklasten-Anzahl bei KO nicht wesentlich zulegte. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

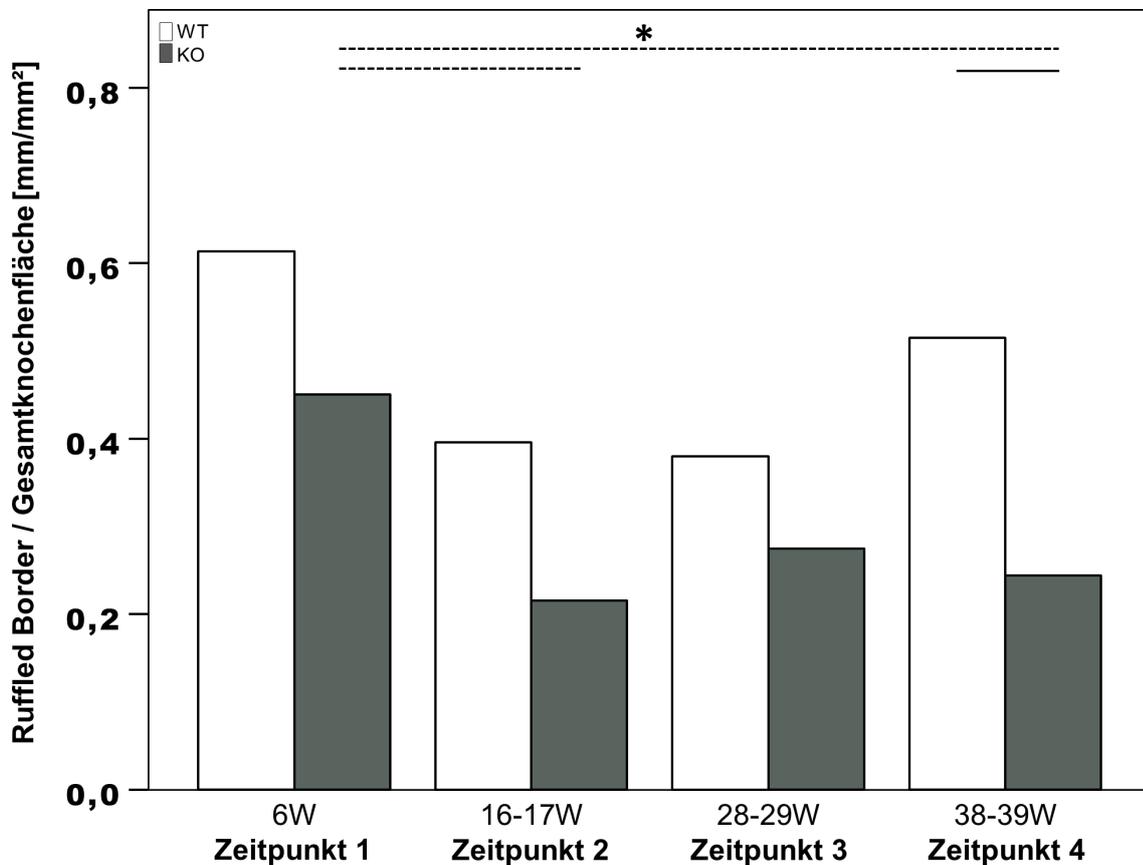
Dabei bezifferte sich zum Zeitpunkt 2 bei WT die mediane Osteoklasten-Anzahl auf  $9,2 \text{ Ok/mm}^2$  und bei KO auf  $5,32 \text{ Ok/mm}^2$ . Für diesen Trend war mit  $p = 0,012$  ein Hinweis gegeben. Auch zum ältesten Zeitpunkt 4 war die Osteoklasten-Anzahl bei KO ( $5,49 \text{ Ok/mm}^2$ ) im Vergleich zu den gleichaltrigen WT ( $10,86 \text{ Ok/mm}^2$ ) erniedrigt (Abb. 25). Für diese Tendenz zeigten sich mit  $p = 0,008$  statistische Hinweise.

Während sich sowohl bei WT als auch bei KO statistische Hinweise für eine Reduktion der Osteoklasten-Anzahl von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 finden ließen (WT:  $p = 0,04$ ; KO:  $p = 0,001$ ), zeigte die Histomorphometrie zusätzlich statistische Hinweise für eine Abnahme der Osteoklasten-Anzahl von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 4 ( $p = 0,00025$ ) bei KO eine (Abb. 25).

Der Anstieg der Osteoklasten-Anzahl von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4 belief sich bei WT mit  $p = 0,011$  auf  $1,66 \text{ Ok/mm}^2$ . Bei KO fiel dieser geringer aus mit einem Zuwachs von  $0,17 \text{ Ok/mm}^2$  (Abb. 25).

## Ergebnisse

Die Längenmessung der summierten *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche ergab ein ähnliches Bild, mit kürzerer *Ruffled Border* bei KO verglichen mit WT zu allen vier Zeitpunkten (Abb. 26).



**Abbildung 26: Deutliche Längenzunahme der *Ruffled Border* bei WT von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4, jedoch nur marginaler Anstieg bei KO.**

Durch die TRAP-Enzymhistochemie wurde ersichtlich, dass die summierte Länge der *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche bei KO gegenüber WT zu allen Zeitpunkten erniedrigt war. Weiterhin zeigte sich eine Längenzunahme der *Ruffled Border* von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4 bei WT, wohingegen die Mediane bei KO zu denselben Zeitpunkten auf einem Niveau stagnierten. (\* =  $p < 0,05$  M-W-U-Test).

Weiterhin war zum Zeitpunkt 4 die mediane *Ruffled Border* bei WT ( $0,51 \text{ mm/mm}^2$ ) im Vergleich zu KO ( $0,24 \text{ mm/mm}^2$ ) um  $0,27 \text{ mm/mm}^2$  länger und folglich mehr als doppelt so lang (Abb. 26). Ein Anhaltspunkt für diesen Trend konnte mit  $p = 0,008$  gefunden werden.

Die Länge der *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche ließ sowohl bei WT als auch bei KO eine Reduktion von Zeitpunkt 1 zu allen älteren Zeitpunkten 2–4 erkennen (Abb. 27). Für diesen Trend konnten allerdings nur statistische Hinweise bei KO gefunden werden: Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2:  $p = 0,005$ ; Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 4:  $p = 0,002$ . Während die Länge der *Ruffled Border* pro Gesamtknochenfläche bei WT von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4 um  $0,11 \text{ mm/mm}^2$  zunahm, verzeichnete KO nur einen geringen Längenzuwachs von  $0,02 \text{ mm/mm}^2$ .

Für detaillierte deskriptive Statistik (Tab. 34–37) siehe Anhang (ab Kap. 11.7).

## 4 Diskussion

Die Prävalenz von Osteoporose beträgt laut EPOS-Studie bei 50–60-jährigen postmenopausalen Frauen 15 %, die bis zum Alter von 70 Jahren auf 45 % ansteige (Kurth *et al.*, 2017, S. 4; Scheidt-Nave *et al.*). Bei über 70 Jahre alten Männern stellte dieselbe Studie eine Krankheitshäufigkeit von 17 % fest. Da Osteoporose im Zusammenhang mit dem demographischen Wandel zunimmt (Plass *et al.*, 2014), ist eine erfolgreiche Osteoporose-Therapie und Fraktur-Prophylaxe von großer gesundheitspolitischer und sozioökonomischer Relevanz.

Veränderte zentrale 5-HT-Spiegel werden ätiopathogenetisch bei der Depression diskutiert (Lesch *et al.*, 2012). Bei einigen so neuropsychiatrisch erkrankten Patienten konnten Tph2-SNPs beschrieben werden (Gutknecht *et al.*, 2009; Zill *et al.*, 2004a). Gleichzeitig konnten Meta-Analysen einen statistischen Zusammenhang der Diagnose und Therapie der Depression mit reduzierter BMD als auch mit erhöhtem Frakturrisiko beschreiben (Wu *et al.*, 2009).

Mit den radiologischen und histologischen Ergebnissen dieser Studie konnte erstmalig am Rattenmodell gezeigt werden, dass sich durch gentechnisches Ausschalten der neuronal exprimierten Tph2 ein veränderter Knochenstoffwechsel beschreiben lässt.

Dieser Knockout führt zu einem im ZNS herrschenden 5-HT-Mangel, während somatisch-periphere 5-HT-Konzentrationen weitestgehend unverändert bleiben (Mosienko *et al.*, 2015; Walther *et al.*, 2003a).

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen radiologisch signifikant erhöhte BMD in der DXA-Methode und histomorphometrisch ebenfalls signifikant vermehrte mineralisierte Knochenmatrix bei KO auf, verglichen mit WT.

Da die Prävalenz der Osteoporose mit zunehmendem Alter ansteigt (Kurth *et al.*, 2017, S. 4), wurden in der hier vorliegenden Studie mehrere Altersgruppen gebildet, um so Ausprägungen zu verschiedenen Zeitpunkten zu betrachten. Die Alterseinteilung in vier Zeitpunkte bei histologischer Betrachtung nimmt Rücksicht auf die Geschlechtsreife der Versuchstiere. Zeitpunkt 1 spiegelt die unreife prä-pubertäre Lebensphase und die Zeitpunkte 2–4 die geschlechtsreifen und adulten Abschnitte wider (Sengupta, 2013; Suckow *et al.*, 2006). Zeitpunktabhängig zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation erhöhte Trabekeldicke, verstärkte ALP-Aktivität, gesteigerte Osteozyten-Quantität sowie erniedrigte TRAP-Aktivität bei KO verglichen mit WT.

#### 4.1 KO zeigt erhöhte BMD

Um zu Beginn der Studie einen Überblick über die Knochenbeschaffenheit der Versuchstiere zu erhalten, wurde mittels DXA die BMD untersucht. Sie beschreibt den Mineralgehalt pro  $\text{cm}^2$  Knochenfläche. Die DXA stellt ein weitestgehend Prüfer-unabhängiges Verfahren dar und wird als einzige röntgenologische Untersuchung in der Basisdiagnostik der Osteoporose laut S3-Leitlinie empfohlen (Kurth *et al.*, 2017, S. 84). Eine Meta-Analyse konnte am Menschen einen Zusammenhang zwischen einer Abnahme der BMD und einer erhöhten Frakturgefahr aufzeigen (Marshall *et al.*, 1996). Das in der vorliegenden Dissertation untersuchte Rattenmodell zeigte am linken Femur eine signifikant höhere BMD bei KO im Vergleich zu WT (Abb. 11). Auch altersgruppiert ließ sich zu verschiedenen Zeitpunkten explorativ eine mit statistischen Hinweisen höhere BMD bei KO gegenüber WT bestimmen (Abb. 12).

Diese Studie kann der bisher publizierten Literatur dahingehend zustimmen, dass die neuronal exprimierte Tph2 einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel zu haben scheint (Brommage *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2009). Brommage *et al.* konnten an der Wirbelsäule eines männlichen Tph2-Mausmodells eine um 11 % und signifikant höhere BMD bei KO gegenüber WT feststellen (Brommage *et al.*, 2015). Die DXA-Analyse des Femurs ergab bei diesen Autoren jedoch keinen Unterschied. Brommages Erkenntnisse an der Wirbelsäule konnten folglich in der hier vorliegenden Dissertation am Femur nachvollzogen werden.

Da diese Pilotstudie erstmalig die Knochenbeschaffenheit am gentechnisch modifizierten Tph2-Rattenmodell untersucht, stellt sich die Frage, ob die vorliegenden Ergebnisse mit in der Literatur beschriebenen Kontrollgruppen-Werten übereinstimmen. Die von Koller *et al.* an 26 Wochen alten dunklen Agouti-Ratten bestimmte femorale BMD ( $0,23 \text{ g/cm}^2$ ) liegt zwischen den Medianen von WT ( $0,2 \text{ g/cm}^2$ ) und KO ( $0,25 \text{ g/cm}^2$ ) der hier vorliegenden Studie (Abb. 11), sodass relevante Messfehler nicht begangen wurden oder immerhin nicht ausschlaggebend zu sein scheinen (Koller *et al.*, 2008). Für an Sprague-Dawley-Ratten gemessene femorale BMD ergibt sich ein ähnliches Bild (Bagi *et al.*, 1996).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei der Agouti-Ratte ein Knockout der Tph2 zu einer gegenüber WT verstärkten Knochendichte führen könnte, mit messbarer BMD-Erhöhung in der geschlechtsreifen Lebensphase der Ratte. Die Genmodifikation scheint sich sowohl zwischen Mäusen und Ratten nicht nur in unterschiedlicher Intensität an der gleichen Knochenregion zu zeigen, sondern darüber hinaus noch an verschiedenen Stellen des Skeletts.

## 4.2 Das VNS als Vermittler zwischen Tph2 und dem Knochenstoffwechsel

Die radiologisch gemessene erhöhte BMD bei KO ließ sich auch im histologischen Schnitt nachvollziehen. Durch die Von Kossa / Van Gieson-Färbung konnte eine bei KO gegenüber WT signifikant vermehrte mineralisierte Knochenmatrix bestimmt werden (Abb. 13). Auch explorativ zu allen vier Zeitpunkten war die mineralisierte Knochenmatrix bei KO erhöht (Abb. 14). Hierbei handelt es sich um die erstmalige histologische Beschreibung der Knochenmatrix an einem Tph2-Rattenmodell. Die mineralisierte Knochenmatrix wird von Osteoblasten gebildet und von Osteoklasten abgebaut. Physiologische Reize wie beispielsweise mechanische Be- oder Entlastung wirken auf die Knochenhomöostase ein und führen entweder zu verstärktem Auf- oder Abbau (Kular *et al.*, 2012). Yadav *et al.* zeigten in einem Experiment am Tph2-Mausmodell eine durch KO resultierende Reduktion der Knochenmasse, verglichen mit WT (Yadav *et al.*, 2009). Ihre Erkenntnisse unterscheiden sich von den Resultaten der hier vorliegenden Dissertation. Sie schlagen vor, dass die Knochenreduktion durch Tph2-exprimierende 5-HT-Neurone des Hirnstamms vermittelt seien, die zum ventromedialen Hypothalamus zögen und dort über 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren zu einer Senkung sympathischer Aktivität führten (Yadav *et al.*, 2009). Diese Annahme wurde von der Arbeitsgruppe dadurch begründet, dass bei ihren KO unter anderem erhöhte Adrenalinpiegel gemessen wurden und die knochenzellulären Veränderungen dem Phänotyp Adrβ2(-/-) negativer Mäusen entsprächen (Yadav *et al.*, 2009). Letzteren fehle der β2-Adrenorezeptor (Elefteriou *et al.*, 2005), der als einziger adrenerger Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoblasten exprimiert werde (Takeda *et al.*, 2002). Der Sympathikus sei für eine erhöhte Osteoklastenfläche mit verstärkter Knochenresorption verantwortlich, indem er über den β2-Adrenorezeptor zu verstärkter Phosphorylierung des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4 (ATF-4) und infolgedessen zur gesteigerten Bildung von RANKL führe (Elefteriou *et al.*, 2005). RANKL binde über Zell-Zell-Kommunikation an RANK und führe zu gesteigerter Osteoklasten-Aktivität (Hsu *et al.*, 1999).

Auf die knochenformierende Zellreihe soll der Sympathikus hemmend wirken, indem er über Beeinflussung der Gen-Expression in Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen zu einer Suppression des G1-Cyclins im Zellzyklus führe (Fu *et al.*, 2005).

Die an Yadavs Tph2-Mausmodell beschriebene Veränderung der Knochenmatrix bei KO gegenüber WT ginge einher mit erhöhtem Energieverbrauch und erniedrigter Nahrungsaufnahme (Yadav *et al.*, 2009). Im Sinne eines peripher-somatisch negativen Feedbackmechanismus sei Leptin fähig, die 5-HT-Sekretion in Tph2-exprimierenden Hirnstamm-Neuronen zu hemmen und daher indirekt den Knochenzuwachs zu reduzieren. Es sei daher durch Leptin ein Hormon gefunden worden, das autonome

Körperfunktionen wie Energieverbrauch und Nahrungsaufnahme mit dem Knochenstoffwechsel zu koppeln vermag (Yadav *et al.*, 2009).

Fest steht, dass es sich bei dem proklamierten Stoffwechselweg um einen fundierten und schlüssigen Vorschlag handelt. Der Zusammenhang mit dem sympathischen Nervensystem ist jedoch keinesfalls kausal gesichert.

Es sei kritisch angemerkt, dass die publizierten Erkenntnisse, die die oben beschriebene Theorie stützen, ihren Ursprung alle von einer einzigen Arbeitsgruppe um Dr. Karsenty und Kollegen haben und darüber hinaus bisher keine von dieser Gruppe unabhängigen Forscher die Ergebnisse reproduzieren beziehungsweise bestätigen konnten (Mosienko *et al.*, 2015). Allein schon die künstlichen Umweltbedingungen bei unterschiedlichen Stichprobengrößen könnten den ausschlaggebenden Unterschied darstellen, bedingt durch die zwar hohe interne, aber geringe externe Validität von Tierversuchen im Labor (Trimmel, 2009, S. 56). So überprüften Lam *et al.* Yadavs Hypothesen und kamen zu dem gegensätzlichen Ergebnis, dass Leptin eben nicht direkt 5-HT-Neurone des Hirnstamms beeinflusse. Auch eine Leptin-abhängige Modulation der Tph2-Expression in den dorsalen Raphe-Komplexen konnten sie nicht nachvollziehen (Lam *et al.*, 2011). Während Brommage *et al.* an einem adulten (18–83 Wochen alten) Tph2-Mausmodell eine erhöhte BMD bei KO feststellen konnten (Brommage *et al.*, 2015), fokussierten sich Yadav *et al.* auf deutlich jüngere Mäuse (4–12 Wochen alt) (Yadav *et al.*, 2009). Diese Diskrepanz zwischen Jung und Alt spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Dissertation wider. Eingeteilt in die vier Zeitpunkte zeigte sich ein besonders deutlicher Unterschied in der mineralisierten Knochenmatrix zwischen KO und WT in der ältesten Vergleichsgruppe zum Zeitpunkt 4 (Abb. 14).

Yadavs vorgeschlagenem Stoffwechselweg widersprechend wurde von anderen Forschergruppen beschrieben, dass sowohl Tph2-Mausmodelle als auch Tph2-Rattenmodelle physiologische Auffälligkeiten zeigen, die mit erhöhtem Sympathikotonus unwahrscheinlich gleichzeitig auftreten, wenngleich diese Fragestellung in den Originalarbeiten explizit nicht beantwortet wurde (Alenina *et al.*, 2009; Magnusson und Cummings, 2017). So konnten Alenina *et al.* an einem 12–24 Wochen alten, männlichen Tph2-Mausmodell bei KO gegenüber WT einen reduzierten Blutdruck mit erniedrigter nächtlicher Herzfrequenz, eine reduzierte Atemtätigkeit sowie eine erhöhte Tagesschläfrigkeit feststellen (Alenina *et al.*, 2009). Bradykardien und reduzierter mittlerer Blutdruck konnten auch an einem Tph2-Rattenmodell bei KO gegenüber WT beschrieben werden (Magnusson und Cummings, 2017). Die Blutdruckreduktion war dabei in ruhigen Schlafstadien zu beobachten. Der kardiale Vagotonus war bei den untersuchten Jungratten bei KO höher und der vaskuläre Sympathikotonus war bei KO niedriger, verglichen mit WT (Magnusson und Cummings, 2017). Dies kann man als

Hinweis werten, dass das Ausschalten der Tph2 mindestens am Rattenmodell zur Steigerung parasymphathischer Aktivität, gegebenenfalls auch zu reduzierter Sympathikus-Aktivität führen könnte (Bear *et al.*, 2018, S. 570).

Der Parasympathikus wirkt, im Gegensatz zum Sympathikus, auf den Knochenstoffwechsel anabol (Bajayo *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass zentrale parasymphathische Fasern die Knochenzellen über verschiedene Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) innervieren, mit üppiger Expression des  $\alpha_2$ -nikotinischen AChR auf Osteoklasten (Bajayo *et al.*, 2012). Und tatsächlich konnten durch Bajayo *et al.* solche Fasern retrograd zum Rückenmark vom distal-metaphysären Femur in Mäusen dargestellt werden (Bajayo *et al.*, 2012). Die zentrale Kommunikation mit dem Parasympathikus soll dabei über Interleukin 1 (IL-1) vermittelt werden (Bajayo *et al.*, 2012). Mäuse mit gentechnischer Überexpression des humanen IL-1-Rezeptor-Antagonisten im ZNS zeigen niedrigen Knochenstatus mit reduzierter mineralisierter Knochenmatrix (Bajayo *et al.*, 2005). Dieser Reduktion des Knochenzustands konnte auch nicht mit Pyridostigmin begegnet werden, woraus die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass die knochenanabole Wirkung des zentralen IL-1 über den Parasympathikus vermittelt werde (Bajayo *et al.*, 2012).

Auch wenn ein Zusammenhang von Tph2 mit der IL-1-Parasympathikus-Achse noch nicht untersucht wurde, lässt sich schlussfolgernd die Hypothese aufstellen, dass die in dieser Dissertation erhöhte mineralisierte Knochenmatrix bei KO gegenüber WT über einen bei KO erniedrigten sympathischen Einfluss und / oder erhöhten Parasympathikotonus verursacht sein könnte, der sich möglicherweise besonders im höheren Alter zeigt.

Diese Altersabhängigkeit ließ sich bei Betrachtung der Trabekeldicke vermuten. Die Ergebnisse dieser Dissertation konnten explorativ zeigen, dass sich der trabekuläre Durchmesser im metaphysären Femur über alle Altersstufen hinweg zwischen WT und KO nicht oder nur sehr minimal unterscheidet (Abb. 15).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte von WT decken sich mit den Erkenntnissen aus der Literatur: Der Durchmesser der Trabekel liegt bei der Ratte unter 80  $\mu\text{m}$  (Jerome *et al.*, 2017, S. 78).

Erst nach Alterseinteilung in die vier Zeitpunkte wurden Unterschiede sichtbar (Abb. 16). Laborratten erreichen ungefähr im Alter von 6–10 Wochen die Geschlechtsreife (Sengupta, 2013; Suckow *et al.*, 2006), was genau zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 in der vorliegenden Studie liegt. Dieser Aspekt scheint relevant zu sein, da die Ergebnisse dieser Dissertation darauf hindeuten, dass WT mit bzw. kurz nach Erreichen der Fähigkeit zur Reproduktion das Maximum des femoralen Spongiosadurchmessers zeigt, was bei KO jedoch nicht festzustellen war (Abb. 16). Im Gegensatz zu WT lässt sich

jedoch bei KO ein moderater, aber dennoch stetiger Zuwachs der trabekulären Dicke vermuten (Abb. 16). Frauen erreichen die maximale Knochenmasse am Femurhals ebenfalls mit bzw. kurz nach der Geschlechtsreife im Alter von durchschnittlich 17,2 Jahren (Matkovic *et al.*, 1994). Dieser vielleicht altersabhängige Einfluss der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel kann auch durch die Literatur vermutet werden. An der Tibia eines 12 Wochen alten Tph2-Mausmodells konnte eine signifikant erniedrigte Trabekeldicke bei KO gegenüber WT beschrieben werden (Yadav *et al.*, 2009), wie sie auch in der hier vorliegenden Studie zum Zeitpunkt 2 am linken Femur nachzuvollziehen war (Abb. 16).

Wie Ratten können auch Labormäuse ab etwa der 10. Woche als geschlechtsreif angesehen werden (Dutta und Sengupta, 2016). Brommage *et al.* konnten mithilfe ihrer radiologischen CT-Analysen an ihrem deutlich älteren Tph2-Mausmodell bei KO gegenüber WT jedoch keinen Unterschied der Trabekeldicke im distalen Femur feststellen (Brommage *et al.*, 2015), was auf den ersten Blick der vorgeschlagenen Hypothese „Altersabhängigkeit“ widerspricht. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass in der hier vorliegenden Dissertation neben dem distalen Femur auch zusätzlich die proximale Region betrachtet wurde. Osteoporotische Veränderungen und die resultierenden pathologischen Frakturen äußern sich an der unteren Extremität mit überwiegender Mehrheit als proximale Oberschenkelbrüche, wie aus einer systematischen Literaturübersicht hervorgeht (Warriner *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann die Hypothese für Agouti-Ratten aufgestellt werden, dass bei KO am Tph2-Modell eine Veränderung der metaphysären Spongiosatrabekel resultieren könnte, die zu einer möglicherweise auch im geschlechtsreifen Alter noch stetigen Zunahme des Trabekeldurchmessers führt.

### **4.3 Die Knochenzellen**

Eine Dickenzunahme der Knochen trabekel resultiert aus einer Verschiebung des homöostatischen Knochenumbaus in Richtung Knochenaufbau (Zhu *et al.*, 2018). Dabei kann sowohl die Knochenbildung der osteoblastären Zellreihe erhöht und / oder der Knochenabbau durch die Osteoklasten reduziert sein (Kular *et al.*, 2012). Solche Veränderungen der Knochenhomöostase konnten in der vorliegenden Dissertation nachvollzogen und erstmalig eine veränderte ossäre Histologie durch KO der Tph2 an einem Rattenmodell beschrieben werden.

### Osteoblasten

Die Arbeitsgruppe um Karsenty und Kollegen konnte eine deutlich reduzierte Anzahl an Osteoblasten an einem 3 Monate alten Tph2-Mausmodell bei KO bestimmen, verglichen mit der Kontrollgruppe (Yadav *et al.*, 2009). Sie beschrieb hierbei eine Reduktion der normalisierten Osteoblastenzahl um 65 %. Zum korrespondierenden Zeitpunkt 2 mit 16–17 Wochen konnten diese Unterschiede auch in der hier vorliegenden Dissertation nachvollzogen werden. ALP war zum Zeitpunkt 2 bei KO im Vergleich zu WT um 41,2 % reduziert (Abb. 18).

Wie auch schon bei Betrachtung der Trabekeldicke lässt sich auch an den Knochenzellen ein Zusammenhang mit dem Rattenalter bzw. der Geschlechtsreife vermuten. Generell konnte zwischen WT und KO kein statistischer Hinweis für einen Unterschied in der ALP-positiven Fläche gefunden werden (Abb. 17). Während sich der Höchstwert der ALP-positiven Fläche bei WT zum Zeitpunkt 2 zeigte, ließ sich hingegen bei KO ein stetiger Anstieg von Zeitpunkt zu Zeitpunkt festhalten (Abb. 18). WT der Zeitpunkte 2–4 zeigten darüber hinaus eine ähnliche prozentuale ALP-positive Fläche wie die Sham-operierte Kontrollgruppe einer an Ratten durchgeführten Osteoporose-Studie (El Khassawna *et al.*, 2015), wenngleich eine Sham-Operation als möglicher Einflussfaktor auf veränderte ALP-Positivität respektive Osteoblasten-Aktivität berücksichtigt werden muss.

Diese Veränderungen könnten wieder mit einer Adaptation des VNS einhergegangen sein. Shi *et al.* zeigten an einem 6–24 Wochen alten Mausmodell, denen der muskarinerge  $M_3$ -Acetylcholinrezeptor ( $M_3$ AChR) durch Doppel-Knockout fehlt [ $M_3$ AChR(-/-)], eine gegenüber der  $M_3$ AChR-Kontrollgruppe reduzierte Osteoblasten-Anzahl (Shi *et al.*, 2010). Interessanterweise führte ein Ausschalten dieses Rezeptors selektiv auf den Osteoblasten zu keinen veränderten Knochenparametern, wohingegen ein selektives Ausschalten des  $M_3$ AChR in den Neuronen zu dem gleichen osteopenen Phänotyp führte wie ein unselektiver  $M_3$ AChR-Knockout aller Zellen (Shi *et al.*, 2010). Die Expression von  $M_3$ AChR konnte durch Shi *et al.* neben einigen anderen Hirnregionen auch auf Neuronen der dorsalen Raphe-Kernen des Hirnstamms gezeigt werden (Shi *et al.*, 2010), bei denen eine Tph2-Expression gemessen werden konnte (Gutknecht *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2009). Die zentrale parasymphatische Innervation über  $M_3$ AChR führe zu einer Hemmung der sympathischen Inhibition des Knochenstoffwechsels (Shi *et al.*, 2010).

Zwar war sowohl die Tph2-Expression als auch die Konzentration von 5-HT in dem von Shi *et al.* studierten Mausmodell bei  $M_3$ AChR(-/-) zu  $M_3$ AChR-Wildtyp ähnlich, doch wurden dabei keine Angaben zum Mausalter gemacht (Shi *et al.*, 2010). Ein Zusammenhang zwischen dem Tieralter und einer veränderten Tph2-Expression

könnte bestehen. Durch die Ergebnisse dieser Dissertation lässt sich folglich die Hypothese aufstellen, dass ein Knockout der Tph2 zu einem stetigen Anstieg der ALP-Aktivität respektive der Osteoblasten-Aktivität führen könnte. Ungleich zu WT, könnte sich bei KO die stärkere Ausprägung nicht kurz nach der Geschlechtsreife, sondern erst im späten Erwachsenenalter zeigen.

### **Osteozyten**

Osteoblasten entwickeln sich im Rahmen der Mineralisation zu in die mineralisierte Matrix eingelagerten Osteozyten (Abb. 2) (Kular *et al.*, 2012). Als zentrale Koordinatoren beeinflussen letztere durch endo- und parakrine Sekretion den Knochenumbau wesentlich (Rupp *et al.*, 2018). In dieser Studie konnte zum ersten Mal die Osteozyten-Morphologie und -Dichte am Tph2-Rattenmodell beschrieben werden. Zarrinkalam *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen Osteozyten-Dichte und trabekulärer Knochenmasse beschreiben, bei dem die Anzahl lebender Osteozyten negativ und die Anzahl leerer Lakunen positiv mit der erodierten Knochenfläche korrelierte (Zarrinkalam *et al.*, 2012). Letztere können als Indikatoren osteozytärer Apoptose angesehen werden (El Khassawna *et al.*, 2015). Spindelförmige Osteozyten wurden entsprechend in der hier vorliegenden Studie als lebend betrachtet. In dieser Dissertation fanden sich bei KO gegenüber WT statistische Hinweise für eine erhöhte Anzahl spindelförmiger Osteozyten (Abb. 19), aber auch für eine Erhöhung leerer Lakunen (Abb. 21). Während sich bei WT zum Zeitpunkt 2 das Dichtemaximum lebender Osteozyten pro Knochenfläche bestimmen ließ und die Quantität bei älteren WT demgegenüber deutlich erniedrigt war, zeigte sich bei KO mit statistischen Indizien eine stetige Zunahme der spindelförmigen Osteozyten (Abb. 20). Die Anzahl spindelförmiger Osteozyten bezogen auf die Knochenfläche von WT stimmt mit den Werten von Zarrinkalam *et al.* überein, wenngleich es sich bei letzterem um ein Schafmodell handelte (Zarrinkalam *et al.*, 2012). In einer Osteoporose-Studie an einem 5 Monate alten Rattenmodell wurde bei der unbehandelten basalen Kontrollgruppe eine dreifach so hohe Osteozytendichte gezählt wie bei WT in dieser Dissertation (Fonseca *et al.*, 2011). Grund hierfür könnten sowohl die unterschiedlichen ROIs (Femur-Diaphyse bei Fonseca *et al.* vs. Femur-Metaphysen in dieser Dissertation) als auch unterschiedliche Färbungen sein. Die Silbernitrat-Färbung stellt neben den Osteozyten-Somata auch ihre Kanalikuli schwärzlich dar (El Khassawna *et al.*, 2015), welche in der von Fonseca *et al.* verwendeten Hämatoxylin-Eosin-Färbung ausbleibt. Sichtbare Kanalikuli waren ein Einschlusskriterium in der Studie dieser Dissertation.

Die bei KO erhöhte Dichte lebender Osteozyten könnte ein weiterer Anhaltspunkt dafür sein, dass KO gegenüber WT mit steigendem Alter nach der Geschlechtsreife zu

erhöhter mineralisierter Knochenmatrix tendiere. Osteozyten könnten über sekretierte Signalmoleküle die Beeinflussung des Knochenumbaus vermittelt haben (Fonseca *et al.*, 2014). Die Literatur diskutiert dieses Thema durchaus kontrovers (Dallas *et al.*, 2013). Es legen jedoch einige Publikationen nahe, dass Proteine wie das Dentin-Matrixprotein 1 (DMP1) die femorale BMD zu erhöhen vermögen, zumindest temporär (Bhatia *et al.*, 2012). Dies wurde durch ein DMP1-überexprimierendes Mausmodell nahegelegt (Bhatia *et al.*, 2012). DMP1-Knockout-Mäuse zeigten mangelhafte Osteozyten-Entwicklung mit hypomineralisiertem Knochen (Feng *et al.*, 2006). Weiterhin geht eine Vermeidung osteozytärer Apoptose mit biomechanischer Stabilität einher (Fonseca *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse sind von möglicher kritischer Relevanz für das in dieser Dissertation untersuchte Rattenmodell. Einerseits konnte eine generell erhöhte Anzahl leerer Lakunen bei KO gegenüber WT bestimmt werden (Abb. 21). Andererseits zeigte WT, wie schon in der Literatur beschrieben (Mullender *et al.*, 1996; Vashishth *et al.*, 2000), mit zunehmendem Alter einen Anstieg leerer Lakunen. Dieser Anstieg blieb bei KO im Gegensatz dazu aus (Abb. 22). Im ältesten Vergleichsalter zum Zeitpunkt 4 war daher die Anzahl leerer Lakunen bei KO gegenüber WT erniedrigt. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Ausschalten der Tph2 zwar mit vermehrter mineralisierter Knochenmatrix und erhöhter Trabekeldicke einhergeht, sich dies aber negativ auf die Biomechanik mit reduzierter Knochenstabilität auswirkt. Es könnte beispielhaft zu Osteosklerose-ähnlichen Zuständen führen, bei denen sich trotz erhöhter BMD eine reduzierte Knochenstabilität zeigt (Tuukkanen *et al.*, 2000).

An einem Tph2-Rattenmodell konnte bei KO eine signifikant erhöhte neuronale mRNA-Expression des Wachstumsfaktors „*Brain-derived neurotrophic Factor*“ (BDNF) gegenüber WT gemessen werden (Brivio *et al.*, 2018). Die BDNF-Konzentration peripher wurde dabei allerdings nicht bestimmt. Es kann folglich die Hypothese gebildet werden, dass die neuronale BDNF-Überexpression sich möglicherweise auch auf den peripheren BDNF-Haushalt auswirken könnte. Ein Übertritt dieses Neurotransmitters über die BHS sei möglich (Pan *et al.*, 1998). Es konnte nämlich gezeigt werden, dass zumindest lokal produziertes BDNF zu sklerotischen Knochenveränderungen führe, indem BDNF die Ausdifferenzierung der knochenformierenden Zelllinie fördere (Ida-Yonemochi *et al.*, 2017). Auch ein möglicher Zusammenhang mit dem VNS wie auch dem neuronalen 5-HT-System wurde bereits beschrieben (Chang *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2018). Einschränkend wirkt auf diese Hypothese ein starker Verdünnungseffekt bei Übertritt von BDNF in den Blutkreislauf. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Knockout der neuronalen Tph2 am Rattenmodell zu vermehrter osteozytärer Zelldichte gegenüber WT führen könnte. Die Diskrepanzen in der Ausprägung leerer Lakunen wirken sich aber auch möglicherweise negativ auf die Knochenstabilität aus.

### Osteoklasten

Als zentrale Koordinatoren des Knochenbaus fördern lebende Osteozyten nicht nur die Knochenbildung, sondern vermögen es weiterhin durch Sekretion von TGF- $\beta$  zumindest *in vitro* die osteoklastäre Knochenresorption zu hemmen (Heino *et al.*, 2002). Die im Erwachsenenalter bei WT abnehmende, bei KO jedoch zunehmende Osteozytendichte (Abb. 20) könnte folglich auch die Ergebnisse in der Untersuchung der Osteoklasten bedingt haben. In dieser Studie zeigte sich entsprechend bei KO gegenüber WT eine verminderte Osteoklasten-Anzahl (Abb. 23) und -Aktivität (Abb.24), unterstrichen durch die kleinen p-Werte mit  $p = 0,002$ . In dieser Dissertation legt WT nach Erreichen der Geschlechtsreife eine ansteigende osteoklastäre Anzahl und Aktivität nahe (Abb. 25 und Abb. 26). Zunächst kann aus diesen Befunden die Literaturmeinung gestützt werden, dass die Anzahl und Aktivität TRAP-positiver Osteoklasten mit dem Alter korreliere (Chung *et al.*, 2014; El Khassawna *et al.*, 2015). Weiterhin zeigte sich bei KO dieser Trend nicht, sondern eher eine Stagnation. Die Unterschiede in der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität waren folglich zum Zeitpunkt 4 zwischen WT und KO besonders deutlich zu erkennen (Abb. 25 und 26). Zu diesen Erkenntnissen passt auch die schon in Kap. 4.2 diskutierte Hypothese: Ein Zusammenhang zwischen den knochenzellulären Differenzen bei KO gegenüber WT könnte über eine eventuell erniedrigte sympathische und / oder erhöhte parasympathische Aktivität bestehen, die sich erst allmählich nach der Geschlechtsreife zeigt.

Nach Bajayo *et al.* fördere der Parasympathikus vor allem die Apoptose der Osteoklasten (Bajayo *et al.*, 2012). Es würde daher eine niedrigere Anzahl und Aktivität der Osteoklasten bei KO gegenüber WT resultieren. Dies legt diese Dissertation nahe. Yadav *et al.* sind die bis dato einzige Forschergruppe in der internationalen Literatur, die einen Zusammenhang der neuronalen Tph2 und den Osteoklasten untersuchten. Sie zeigten an ihrem 4–12 Wochen alten – und deshalb nicht zwingend geschlechtsreifen – Tph2-Mausmodell eine bei KO gegenüber WT signifikant erhöhte Osteoklasten-Anzahl. Die Arbeitsgruppe führt dies auf eine bei KO gesteigerte sympathische Aktivität zurück (Yadav *et al.*, 2009).

Im korrespondierenden Alter mit 6 Wochen ergab sich am Rattenmodell der hier vorliegenden Pilotstudie folgendes Bild: Zwar lag zum Zeitpunkt 1 der Median von KO unter WT, die Spannweite aller Messwerte der Osteoklasten-Anzahl war zwischen KO und WT jedoch nahezu identisch (Tab. 36, im Anhang, Kap. 11.7.6).

Schlussfolgernd lässt sich durch die Dissertation ein weiterer Hinweis ermitteln, dass sich der Einfluss der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel abhängig vom Rattenalter zeigen könnte. Die signifikant gesteigerte BMD und mineralisierte Knochenmatrix bei KO

## Diskussion

gegenüber WT könnte sich entsprechend durch eine reduzierte Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität bei KO gegenüber WT ausgeprägt haben, vermittelt über ein eventuell beeinflusstes VNS.

#### 4.4 Limitationen

Die hier vorliegende Studie greift einige diskutierte Erkenntnisse und Hypothesen der zunehmend beforschten neuroskelettalen Biologie auf. Gerade weil es sich in der vorliegenden Dissertation um eine erste Pilotstudie an einem Tph2-Rattenmodell handelt, wirken einige Faktoren einschränkend auf die Interpretation der Ergebnisse. Zuallererst müssen Geschlechts- und Altersunterschiede berücksichtigt werden. Dienten bei der histologischen Untersuchung der Femora zu den Zeitpunkten 2–4 ausschließlich weibliche Agouti-Ratten, so waren jedoch zum Zeitpunkt 1 sowohl männliche als auch weibliche Nager vertreten. Die Geschlechter waren dabei jedoch zwischen WT und KO gleichmäßig verteilt. Darüber hinaus wirkt einschränkend auf die Interpretation der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, dass sich die Alterszusammensetzung in den definierten Zeitpunkten geringfügig unterschieden hat. Dadurch, dass ab dem Zeitpunkt 2 die Gruppe der KO eine Woche älter war als WT, könnten altersbedingte Effekte möglicherweise die Ergebnisse systematisch beeinflusst haben.

Diesen Limitationen muss entgegengestellt werden, dass jedoch gerade durch die Umsetzung der Pilotstudie eine Maxime der tierexperimentellen Forschung Gewichtung fand. Das Experiment dieser Dissertation fußt auf dem Grundsatz der wissenschaftlichen Arbeit des 3-R-Prinzips: *Replacement*, *Reduction* und *Refinement* (Russell und Burch, 1959). Die Studie dieser Dissertation wurde durch eine Kooperation mit dem MDC ermöglicht, welches die Ratten für Verhaltensstudien generiert und gezüchtet hat. Es wurden diejenigen Ratten in die vorliegende Knochenstudie inkludiert, die aufgrund der Zuchtbeendigung ohnehin euthanasiert wurden. So konnten erfolgreich Leid und mit Tierversuchen verbundene Euthanasien reduziert werden.

Von zentraler Wichtigkeit für die Auswertung und Reproduzierbarkeit der DXA am Kleintiermodell ist die gleichbleibende Tierpositionierung und Auswertung mittels Software (Grier *et al.*, 1996). Hierbei ist vor allem die saubere Definition der ROI von Relevanz. Kleine Ungenauigkeiten in den ROIs beeinflussen die BMD-Messung, da DXA-Geräte primär zur Untersuchung des Menschen ausgelegt sind. Zur Erhöhung der Reliabilität wurden deshalb in dieser Studie sowohl die Röntgen-Aufnahmen als auch die Auswertung von einer einzigen Person durchgeführt. Einschränkend muss jedoch genannt werden, dass der Untersucher nicht „verblindet“ werden konnte und unterbewusste Störvariablen, beispielsweise im Sinne eines Rosenthal-Effekts, nicht ausgeschlossen werden können.

Darüber hinaus ist limitierend zu erwähnen, dass das Schneiden der Femora am Gefriermikrotom zu den Zeitpunkten 2 und 3 von mehreren Personen durchgeführt

## Diskussion

wurde. Zwar wurde auf standardisierte Durchführungsbedingungen stets geachtet (gleicher Schnittwinkel sowie gleiche Knochen- und Tischposition, homogene Kryotom-Temperatur, regelmäßiger Klängenwechsel *etc.*), nichtsdestotrotz können sich dadurch Störvariablen auf die histomorphometrische Analyse ausgewirkt haben. Die Färbereigenschaft und folglich auch die histomorphometrische Analyse hängen maßgeblich von der Qualität eines histologischen Schnitts ab. Stark begrenzte Stichprobengröße mit entsprechender Ressourcenknappheit lässt einen präventiven Ausschluss aller histologischen Schnitte mit geringfügig reduzierter Qualität jedoch nicht zu. Durch Betrachtung des Medians als Parameter der zentralen Tendenz wurde die Wirkung von Extremwerten auf die Gesamtaussage abgefedert.

Für die Interpretation der Ergebnisse soll entsprechend auch die niedrige Stichprobengröße in der Studie beachtet werden. Vor allem zum Zeitpunkt 3 war die Tieranzahl mit  $n = 4$  gering. In dieser Pilotstudie wurden deshalb die Ergebnisse der Sekundärparameter explorativ und nicht schließend statistisch analysiert.

Die Auswertung der Hauptzielparameter dieser Dissertation erfolgte objektiv mittels Software, wobei bei Definition der ROIs der Untersucher nicht „verblindet“ werden konnte. Verblindung war auch bei den semi-automatischen Auswertungen der Silbernitrat- und TRAP-Färbungen nicht möglich.

#### 4.5 Fazit und Ausblick

Bezogen auf die zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertation

**„Hat die Tph2, als Schrittmacherenzym der neuronalen 5-HT-Synthese, einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel des Rattenfemurs?“**

kann in übergeordneter Betrachtung der diskutierten Ergebnisse folgendes Fazit gezogen werden:

Durch einen Knockout der Tph2 zeigte sich am linken Femur der Agouti-Ratte sowohl radiologisch als auch histologisch bei KO ein gegenüber WT gesteigerter mineralisierter Knochen. Durch die signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO in den Hauptzielparametern lässt sich die Fragestellung folglich positiv beantworten.

Die sekundären Ergebnisse dieser Studie zeigten den Trend auf, dass sich die Unterschiede in der mineralisierten Knochenmatrix mit zunehmendem Erwachsenenalter und nach der Geschlechtsreife der Ratte auf die Trabekelarchitektur auswirken könnte. Als Mediatorvariablen der bei KO erhöhten mineralisierten Knochenmatrix können die Knochenzellen eine entscheidende Rolle gespielt haben. Es konnten die knochenbildenden Osteoblasten sowie die Osteozyten bei KO gegenüber WT in der adulten Phase vermehrt bestimmt werden. Weiterhin ergab die Histomorphometrie der knochenresorbierenden Osteoklasten bei KO gegenüber WT reduzierte Werte.

Summa summarum konnte durch die vorliegende Dissertation zum ersten Mal am Rattenmodell ein Zusammenhang zwischen der neuronal exprimierten Tph2, respektive des zentralen 5-HT-Haushalts, und dem peripheren Knochenstoffwechsel nahegelegt werden.

Durch die Diskussion der Ergebnisse ergeben sich folgende weitere Fragestellungen, an die sich in der weiterführenden Forschung anknüpfen lässt:

Beeinflusst eine neuronale Tph2-Deletion den Knochenhaushalt der Ratte lokal oder systemisch? Können auch Diskrepanzen an anderen skelettalen Regionen beschrieben werden? Können die Ergebnisse aus dieser Dissertation an Großtiermodellen reproduziert werden?

Als Vermittler des Einflusses der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel wurde das VNS und neuronales IL-1 diskutiert. Beeinflusst dieser mögliche Zusammenhang nicht nur die Knochenzellen, sondern ergibt sich daraus womöglich auch eine Affektion des Immunsystems? Schließlich entstammen Osteoklasten und Makrophagen der gleichen Ursprungszelle.

## Diskussion

Wie hängt der Knochenstoffwechsel mit weiteren Stoffwechselketten zusammen, die über den Hirnstamm koordiniert werden? Zeigen sich Veränderungen beispielsweise im Energiestoffwechsel?

Wie unterscheidet sich die biomechanische Stabilität des Femurs am Tph2-Rattenmodell bei KO im Vergleich zu WT? Ist der Knochen stabiler oder brüchiger? Angenommen das Femur sei biomechanisch stabiler, ließe sich dann einer Gonadektomie-induzierten Osteoporose der Ratte (El Khassawna *et al.*, 2013) durch einen Knockout der Tph2 begegnen?

Durch die Dissertation ergeben sich auch für die klinische Forschung viele offene Fragen. Unterscheidet sich die mittels DXA gemessene BMD bzw. der *T-Score* bei depressiven und / oder autistischen Patienten mit eingeschränkter Tph2-Aktivität von gesunden Probanden? Können bei Patienten mit Osteoporose SNPs der Tph2 festgestellt werden?

In der Literatur wurden an Tph2-Knockout-Tiermodellen Verhaltensmuster beschrieben, die auf eine Depression oder auf eine Autismus-Spektrum-Störung hindeuten (Kane *et al.*, 2012; Mosienko *et al.*, 2012). Depressive (Schweiger *et al.*, 2016; Ju *et al.*, 2013) als auch autistische (Wang *et al.*, 2016; Barnhill *et al.*, 2017; Ekhlaspour *et al.*, 2016) Patienten tendieren zu reduzierter BMD sowie zu niedrigen Calcitriol-Spiegeln. Eine Supplementation von Calcitriol scheint einen positiven Effekt auf den Verlauf einer Depression und einer Autismus-Spektrum-Störung zu haben (Cheng *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2017; Ucuz *et al.*, 2015).

In dieser Dissertation wurde sowohl eine signifikant erhöhte BMD als auch eine signifikant erhöhte mineralisierte Knochenmatrix bei KO gegenüber WT festgestellt. Diese Beobachtungen könnten mit einem beeinflussten Calcitriol- und Kalzium-Haushalt in Verbindung stehen. Zu dieser Hypothese trägt bei, dass eine Calcitriol-Supplementation depressionsähnliche Zustände an einem ovariectomierten Rattenmodell reduzierte (Koshkina *et al.*, 2019). Dabei ließ sich auch eine Induktion von BDNF im Hippocampus feststellen (Koshkina *et al.*, 2019). Ein BDNF-Anstieg zeigte sich auch bei KO in einem Tph2-Rattenmodell von Brivio *et al.* (Brivio *et al.*, 2018). Weiterhin konnten Kaneko *et al.* in einer Zellkultur eine durch Calcitriol bedingte Induktion der Tph2-Genexpression an Ratte und Mensch zeigen (Kaneko *et al.*, 2015).

Im Sinne eines noch unbekanntes Regelkreises könnte ein Knockout der Tph2 reziprok einen veränderten Mineralhaushalt bedingen, beispielsweise durch Beeinflussung der Calcitriol-Wirkung. Diese Theorie ist aber noch nicht belegt. In der Tat wurden an Tph2-Tiermodellen Veränderungen beschrieben, die beim Menschen gehäuft als Symptome einer hypo- und hyperkalzämischen Elektrolytstörung (Cooper und Gittoes, 2008; Minisola *et al.*, 2015) genannt werden. Die Experimentalgruppen zeigten Depressivität

## Diskussion

(Mosienko *et al.*, 2012), Schlafstörungen (Alenina *et al.*, 2009), Änderungen des Herzrhythmus (Magnusson und Cummings, 2017; Alenina *et al.*, 2009) sowie Wachstumsverzögerungen (Alenina *et al.*, 2009).

Es sollte daher in der aufbauenden Forschung bei einem Tph2-Knockout-Tiermodell neben dem Knochen- auch der endokrine Mineralstoffwechsel untersucht werden.

Calcitriol und Kalzium werden zur Osteoprotektion als Nahrungsergänzungsmittel bei Osteoporose empfohlen (Kurth *et al.*, 2017, S. 142–149). Durch eine pharmakologische Beeinflussung der Tph2 könnte in Zukunft der therapeutische Effekt gegebenenfalls optimiert werden. Erfolgversprechend klingt dieser Ansatz vor allem dann, wenn eine psychiatrische Erkrankung wie eine Depression oder eine Autismus-Spektrum-Störung als Komorbidität vorliegen.

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse dieser Dissertation sollen daher als Basis dienen, um zukünftig neue Ansätze für eine spezifische Prophylaxe und Therapie von Osteoporose zu entwickeln.

### 5 Zusammenfassung

Osteoporose tritt vor allem im höheren Alter auf. Veränderungen im Knochenstoffwechsel sind hauptsächlich im Rahmen von System- und Hormonerkrankungen untersucht worden.

Das in der Blutbahn zirkulierende 5-HT wird durch die Tph1 synthetisiert und soll die Osteoblasten-Proliferation hemmen. Hingegen wird das im ZNS als Neurotransmitter wirkende 5-HT durch das Schrittmacherenzym Tph2 gebildet. Sein Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ist nur wenig untersucht.

5-HT kann die BHS nicht übertreten, wodurch sich zwei verschiedene Wirkungskompartimente ergeben: peripheres 5-HT (gebildet durch die Tph1) vs. neuronales 5-HT (gebildet durch Tph2). Letzteres scheint an der Homöostase von Körper und Geist beteiligt zu sein. Veränderungen im neuronalen 5-HT-Haushalt werden mit der Pathogenese von psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Studien zeigen, dass Depressive und Patienten mit einer Autismus-Spektrum-Störung zu reduzierter Knochendichte tendieren. Gleichzeitig sind verminderte Knochenqualität und erhöhte Frakturneigung als Nebenwirkung von SSRI-Therapien bekannt. Der Einfluss des neuronalen 5-HT-Systems auf den Knochenstoffwechsel ist jedoch weitgehend unerforscht. Ferner widersprechen sich bis dato publizierte Ergebnisse mitunter deutlich.

Im Fokus der vorliegenden Pilotstudie steht deshalb die Untersuchung eines potenziellen Einflusses der Tph2 auf den Knochenstoffwechsel. Hierfür wurde ein Agouti-Rattenmodell (WT vs. KO) am linken Femur radiologisch mittels DXA und histomorphometrisch mithilfe von mehreren Färbungen untersucht.

KO zeigte verglichen mit WT radiologisch signifikant erhöhte BMD als auch histologisch signifikant erhöhte mineralisierte Knochenmatrix. Explorativ deutete diese Studie auf einen möglichen Einfluss der Tph2 auf die Knochenzellen hin, u. a. mit vermehrten Osteozyten und erniedrigten Osteoklasten bei KO im Vergleich zu WT.

In dieser Studie konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der neuronalen Tph2 und dem Knochenstoffwechsel am Rattenmodell gezeigt werden. Unterschiede im Trabekeldurchmesser ließen sich erst unter Rücksichtnahme des Rattenalters erkennen. Im Kontext bisheriger Literatur betont diese Studie deshalb vor allem die Relevanz des Zuchtalters und der Geschlechtsreife, die bei Aussagen bezüglich eines Tph2-Einflusses auf den Knochenstoffwechsel berücksichtigt werden müssen. Weiterhin werden in der vorliegenden Dissertation unterschiedliche Mechanismen und Regelkreise zwischen der neuronalen Tph2 und dem peripheren Knochenstoffwechsel diskutiert.

### 6 Summary

Osteoporosis is a disease primarily among the elderly. Alterations in bone metabolism are investigated mainly in the context of systemic and hormonal diseases.

5-HT circulating in the bloodstream gets synthesized by Tph1 and is said to inhibit osteoblast proliferation. In contrast, 5-HT acting as a neurotransmitter is produced by the pacemaker enzyme Tph2. The impact of brain derived 5-HT and its enzyme Tph2 on bone metabolism is examined only a little.

5-HT cannot cross the blood-brain barrier, leading to two different compartments: peripheral 5-HT by Tph1 and central 5-HT by Tph2. The latter appears to be involved in the homeostasis of body and mind. Changes in the neuronal 5-HT system are linked to pathogenesis and pathophysiology of psychiatric disorders. Studies show that depressive patients and patients with autistic spectrum disorders tend to have reduced BMD. Simultaneously, reduced bone quality and increased fracture risk are well-known side effects of SSRI therapies. The impact of brain-derived 5-HT remains mostly unexplored. Besides, results published so far contradict each other considerably.

Therefore, the focus of the present pilot study was to investigate a potential influence of Tph2 on bone metabolism. To do so, an animal model (KO vs. WT) of agouti rats was investigated at the left femur radiologically by DXA and histomorphometrically by stainings.

Compared to WT, KO showed significantly higher BMD and histomorphometrically significantly increased mineralized bone area. Exploratively the present study indicated a possible influence of Tph2 on bone cells. Osteocytes were raised and osteoclasts were reduced at KO compared to WT.

The present study was the first to show a possible connection between the neuronal Tph2 and bone metabolism in a rat model. Differences in the trabecular thickness could be recognized by taking the rats' age into account. In the context of so far published data, the present study punctuates the relevance of breeding age and sexual maturity, which must be considered when making statements regarding a Tph2 impact on bone metabolism. Furthermore, different mechanisms and control loops between the centrally located Tph2 and the peripheral bone metabolism are discussed in the present dissertation.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

(-/-)	Knockout, homozygot
(+/+)	Wildtyp, homozygot
*	p < 0,05 im M-W-U-Test
°C	Grad Celsius
µGy	Mikrogray
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	Serotonin
5-HTP	5-Hydroxy-L-Tryptophan
AAAD	Aromatisierte L-Aminosäure-Decarboxylase
Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
Adrβ2(-/-)	Homozygoter Knockout des β2-Adrenorezeptor
ALP	alkalische Phosphatase
AP	Saure Phosphatase
ATF-4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
BDNF	Brain-derived neurotrophic Factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMD	Bone Mineral Density
BMU	basic multicellular unit
BP	Blutplättchen
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hydroxylapatit
CaCO <sub>3</sub>	Kalzium-Karbonat
CaHPO <sub>4</sub>	Kalzium-Hydrogen-Phosphat
Calcitriol	1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dist.	distal
DMP1	Dentin-Matrixprotein 1
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
ENS	Enterisches Nervensystem
EPOS	Europäische prospektive Osteoporose-Studie
<i>et. al.</i>	<i>et alia</i>
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
EZ	Enterochromaffine Zellen
Fa	Firma
g	Gramm
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
H <sup>+</sup>	Proton
H0	Nullhypothese
H1	Forschungshypothese
IGF	Insulin-ähnliches Wachstumshormon
IL-1	Interleukin 1
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KO	homozygoter Tph2-Knockout: Tph2(-/-)
LL/mm <sup>2</sup>	Anzahl leerer Lakunen / Quadratmillimeter
LNAA	Transporter großer neutraler Aminosäuren

## Abkürzungsverzeichnis

M <sub>3</sub> AChR	.....	muskarinerner Acetylcholinrezeptor 3
MAO	.....	Monoaminoxidase
MCP-1	.....	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
M-CSF	.....	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MDC	.....	.....
		Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft Berlin
min.	.....	mineralisiert
Min.	.....	Minuten
ml	.....	Milliliter
mm	.....	Millimeter
mRNA	.....	messenger Ribonukleinsäure
M-W-U-Test	.....	Mann-Whitney-U-Test
n	.....	Anzahl
NF-κB	.....	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
O <sub>2</sub>	.....	Sauerstoff
Ob	.....	Osteoblast
Ob-V	.....	Osteoblasten-Vorstufen
Ok/mm <sup>2</sup>	.....	Anzahl der Osteoklasten / Quadratmillimeter
OPG	.....	Osteoprotegerin
Oz <sub>sp</sub> /mm <sup>2</sup>	.....	Anzahl spindelförmiger Osteozyten / Quadratmillimeter
p	.....	p-Wert; Signifikanzwert
PFA	.....	Paraformaldehyd
prox.	.....	proximal
PTH	.....	Parathormon
RANK	.....	Rezeptor-Aktivator von NF-κB
RANKL	.....	Rezeptor-Aktivator von NF-κB Ligand
ROI	.....	Interessensregion
SD	.....	Standardabweichung
Sek.	.....	Sekunden
SERT	.....	Serotonin-Transporter
SNP	.....	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSRI	.....	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TGF-β	.....	Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF	.....	Tumornekrosefaktor
Tph	.....	Tryptophan-Hydroxylase
Tph1	.....	Tryptophan-Hydroxylase 1
Tph2	.....	Tryptophan-Hydroxylase 2
TRAP	.....	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Trp	.....	L-Tryptophan
VMAT	.....	Vesikulärer Monoamin-Transporter
VNS	.....	Vegetatives Nervensystem
vs.	.....	versus
WHO	.....	Weltgesundheitsorganisation
Wnt10b	.....	Ligand 10b des Wnt-1-Signalwegs
WT	.....	homozygoter Tph2-Wildtyp: Tph2(+/+)
ZNS	.....	Zentral-Nervensystem
α	.....	Signifikanzniveau
Δ	.....	delta

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Femurs.....	2
Abbildung 2: Skizzierte Entwicklungsschritte knochenformierender Zellen. ....	5
Abbildung 3: Osteoklastäre Knochenresorption.....	6
Abbildung 4: 5-HT-Synthese und -Sekretion.....	13
Abbildung 5: Das 5-HT-System im ZNS. ....	14
Abbildung 6: DXA-Gerät mit Versuchstier in Bauchlage. ....	23
Abbildung 7: Arbeitsschritte der Von Kossa / Van Gieson-Histomorphometrie. ....	28
Abbildung 8: Vorbereitungen zur Analyse der Trabekeldicke.....	29
Abbildung 9: Ein spindelförmiger Osteozyt. ....	30
Abbildung 10: Ein TRAP-positiver Osteoklast.....	32
Abbildung 11: Femorale BMD bei KO signifikant erhöht. ....	35
Abbildung 12: Die BMD war zu beiden Zeitpunkten bei KO gegenüber WT erhöht....	36
Abbildung 13: Der Anteil der mineralisierten Knochenmatrix war bei KO signifikant erhöht.....	37
Abbildung 14: Zu allen Zeitpunkten war der Anteil mineralisierter Knochenfläche bei KO gegenüber WT erhöht.....	38
Abbildung 15: Die Trabekeldicke lag bei WT und KO auf annähernd gleichem Niveau. ....	39
Abbildung 16: Abgesehen von Zeitpunkt 2 ließ sich bei KO gegenüber WT eine erhöhte Trabekeldicke feststellen. ....	40
Abbildung 17: Die relative ALP-positive Fläche war bei KO gegenüber WT niedriger. ....	41
Abbildung 18: Mit zunehmendem Alter stetiger Anstieg der ALP-positiven Knochenfläche bei KO. ....	42
Abbildung 19: Spindelförmige Osteozyten waren bei KO vermehrt vorzufinden.....	44
Abbildung 20: Spindelförmige Osteozyten ließen sich zu jedem Zeitpunkt vermehrt bei KO bestimmen. ....	45
Abbildung 21: Die Summe leerer Lakunen war bei KO erhöht. ....	46
Abbildung 22: Bei WT stieg die Anzahl leerer Lakunen von Zeitpunkt 2 zum Zeitpunkt 4 an, bei KO fiel sie hingegen ab.....	47
Abbildung 23: Die Osteoklasten-Anzahl war bei KO erniedrigt. ....	48
Abbildung 24: Die Länge der <i>Ruffled Border</i> war bei KO reduziert. ....	49
Abbildung 25: Der Anstieg der Osteoklasten-Anzahl bei WT ab Zeitpunkt 2 blieb bei KO aus. ....	50
Abbildung 26: Deutliche Längenzunahme der <i>Ruffled Border</i> bei WT von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 4, jedoch nur marginaler Anstieg bei KO.....	51

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mikroskopische Vergrößerung bei der jeweiligen Färbung.....	26
Tabelle 2: Umrechnungstabelle zur Bestimmung der Fotogröße. ....	26
Tabelle 3: Materialien für die Gewebeeinbettung.....	94
Tabelle 4: Fixationsprotokoll und Einbettungsvorbereitung.....	94
Tabelle 5: Einbettungsprotokoll. ....	94
Tabelle 6: Materialien für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung. ....	95
Tabelle 7: Lösungsvorbereitung für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung.....	95
Tabelle 8: Arbeitsanweisung für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung.....	96
Tabelle 9: Materialien für die Silbernitrat-Färbung. ....	96
Tabelle 10: Lösungsvorbereitung für die Silbernitrat-Färbung.....	97
Tabelle 11: Arbeitsanweisung für die Silbernitrat-Färbung.....	97
Tabelle 12: Materialien für die ALP-Färbung. ....	98
Tabelle 13: Lösungsvorbereitung für die ALP-Färbung.....	98
Tabelle 14: Arbeitsanweisung für die ALP-Färbung.....	99
Tabelle 15: Materialien für die TRAP-Färbung.....	99
Tabelle 16: Lösungsvorbereitung für die TRAP-Färbung.....	100
Tabelle 17: Arbeitsanweisung für die TRAP-Färbung. ....	101
Tabelle 18: Analyse der BMD.....	112
Tabelle 19: Analyse der BMD nach Zeitpunkten.....	112
Tabelle 20: Analyse des prozentualen Anteils mineralisierter Knochenmatrix.....	112
Tabelle 21: Analyse des prozentualen Anteils mineralisierter Knochenmatrix nach Zeitpunkten. ....	112
Tabelle 22: Analyse der Trabekeldicke.....	113
Tabelle 23: Analyse der Trabekeldicken nach Zeitpunkten.....	113
Tabelle 24: Analyse der ALP-positiven Fläche. ....	113
Tabelle 25: Analyse der ALP-positiven Fläche nach Zeitpunkten. ....	113
Tabelle 26: Anzahl spindelförmige Osteozyten.....	114
Tabelle 27: Anzahl spindelförmiger Osteozyten nach Zeitpunkten.....	114
Tabelle 28: Anzahl leerer Lakunen. ....	114
Tabelle 29: Anzahl leerer Lakunen nach Zeitpunkten. ....	114
Tabelle 30: Gesamtanzahl an Osteozyten.....	115
Tabelle 31: Gesamtanzahl an Osteozyten nach Zeitpunkten.....	115
Tabelle 32: Anzahl runder Osteozyten.....	115
Tabelle 33: Anzahl runder Osteozyten nach Zeitpunkten.....	115
Tabelle 34: Osteoklasten-Anzahl.....	116

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 35: Länge der <i>Ruffled Border</i> .....	116
Tabelle 36: Osteoklasten-Anzahl nach Zeitpunkten.....	116
Tabelle 37: Länge der <i>Ruffled Border</i> nach Zeitpunkten.....	116

## 10 Literaturverzeichnis

- Ahlman, H. (1985), „Serotonin and carcinoid tumors“, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 7 Suppl 7, S79-85.
- Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boyé, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K., Hörtnagl, H. und Bader, M. (2009), „Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106. Jg., Nr. 25, S. 10332–10337.
- Alford, A. I., Kozloff, K. M. und Hankenson, K. D. (2015), „Extracellular matrix networks in bone remodeling“, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65. Jg., S. 20–31.
- Anderson, H. C. (2003), „Matrix vesicles and calcification“, *Current rheumatology reports*, 5. Jg., Nr. 3, S. 222–226.
- Bagi, C. M., DeLeon, E., Ammann, P., Rizzoli, R. und Miller, S. C. (1996), „Histology of the proximal femur in rats: Impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness“, *The Anatomical Record*, 245. Jg., Nr. 4, S. 633–644.
- Bajayo, A., Bar, A., Denes, A., Bachar, M., Kram, V., Attar-Namdar, M., Zallone, A., Kovács, K. J., Yirmiya, R. und Bab, I. (2012), „Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109. Jg., Nr. 38, S. 15455–15460.
- Bajayo, A., Goshen, I., Feldman, S., Csernus, V., Iverfeldt, K., Shohami, E., Yirmiya, R. und Bab, I. (2005), „Central IL-1 receptor signaling regulates bone growth and mass“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102. Jg., Nr. 36, S. 12956–12961.
- Barnhill, K., Ramirez, L., Gutierrez, A., Richardson, W., Marti, C. N., Potts, A., Shearer, R., Schutte, C. und Hewitson, L. (2017), „Bone Mineral Density in Boys Diagnosed with Autism Spectrum Disorder: A Case-Control Study“, *Journal of autism and developmental disorders*, 47. Jg., Nr. 11, S. 3608–3619.
- Bartl, R. (2011), *Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie, Thieme Electronic Book Library*, 4., vollst. überarb. u. erw. Aufl., Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. und Engel, A. K. (Hg.) (2018), *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*, 4. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D. und MacDougald, O. A. (2005), „Regulation of osteoblastogenesis and bone mass

- by Wnt10b“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102. Jg., Nr. 9, S. 3324–3329.
- Berger, C., Goltzman, D., Langsetmo, L., Joseph, L., Jackson, S., Kreiger, N., Tenenhouse, A., Davison, K. S., Josse, R. G., Prior, J. C. und Hanley, D. A. (2010), „Peak bone mass from longitudinal data: implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25. Jg., Nr. 9, S. 1948–1957.
- Bhatia, A., Albazzaz, M., Espinoza Orías, A. A., Inoue, N., Miller, L. M., Acerbo, A., George, A. und Sumner, D. R. (2012), „Overexpression of DMP1 accelerates mineralization and alters cortical bone biomechanical properties in vivo“, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 5. Jg., Nr. 1, S. 1–8.
- Bonewald, L. F. (2007), „Osteocytes as dynamic multifunctional cells“, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116. Jg., S. 281–290.
- Bonewald, L. F. und Mundy, G. R. (1990), „Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling“, *Clinical orthopaedics and related research*, Nr. 250, S. 261–276.
- Bonucci, E. (2012), „Bone mineralization“, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17. Jg., S. 100–128.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. und Lacey, D. L. (2003), „Osteoclast differentiation and activation“, *Nature*, 423. Jg., Nr. 6937, S. 337–342.
- Brivio, P., Sbrini, G., Peeva, P., Todiras, M., Bader, M., Alenina, N. und Calabrese, F. (2018), „TPH2 Deficiency Influences Neuroplastic Mechanisms and Alters the Response to an Acute Stress in a Sex Specific Manner“, *Frontiers in molecular neuroscience*, 11. Jg., S. 389.
- Brommage, R., Liu, J., Doree, D., Yu, W., Powell, D. R. und Melissa Yang, Q. (2015), „Adult Tph2 knockout mice without brain serotonin have moderately elevated spine trabecular bone but moderately low cortical bone thickness“, *BoneKEy reports*, 4. Jg., S. 718.
- Bulbring, E. und Crema, A. (1959), „The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa“, *The Journal of physiology*, 146. Jg., Nr. 1, S. 18–28.
- Bull, H. (2002), „Acid phosphatases“, *Molecular Pathology*, 55. Jg., Nr. 2, S. 65–72.
- Burgess, T. L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B. D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W. J., Dunstan, C. R., Hu, S. und Lacey, D. L. (1999), „The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts“, *The Journal of Cell Biology*, 145. Jg., Nr. 3, S. 527–538.

- Burstone, M. S. (1959), „Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts“, *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 7. Jg., Nr. 1, S. 39–41.
- Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V. und Teti, A. (2014), „The Great Beauty of the osteoclast“, *Archives of biochemistry and biophysics*, 558. Jg., S. 70–78.
- Center, J. R., Nguyen, T. V., Schneider, D., Sambrook, P. N. und Eisman, J. A. (1999), „Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study“, *The Lancet*, 353. Jg., Nr. 9156, S. 878–882.
- Chang, C.-C., Chang, H.-A., Chen, T.-Y., Fang, W.-H. und Huang, S.-Y. (2014), „Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism affects sympathetic tone in a gender-specific way“, *Psychoneuroendocrinology*, 47. Jg., S. 17–25.
- Chang, W. H., Lee, I. H., Chi, M. H., Lin, S.-H., Chen, K. C., Chen, P. S., Chiu, N. T., Yao, W. J. und Yang, Y. K. (2018), „Prefrontal cortex modulates the correlations between brain-derived neurotrophic factor level, serotonin, and the autonomic nervous system“, *Scientific reports*, 8. Jg., Nr. 1, S. 2558.
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M. und Xie, C. (2017), „Osteoblast-Osteoclast Interactions“, *Connective tissue research*, 59. Jg., Nr. 2, S. 99–107.
- Cheng, Y.-C., Huang, Y.-C. und Huang, W.-L. (2020), „The effect of vitamin D supplement on negative emotions: A systematic review and meta-analysis“, *Depression and anxiety*, 37. Jg., Nr. 6, S. 549–564.
- Chugani, D. C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J. J., Lee, J. und Chugani, H. T. (1999), „Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children“, *Annals of neurology*, 45. Jg., Nr. 3, S. 287–295.
- Chung, P.-L., Zhou, S., Eslami, B., Shen, L., LeBoff, M. S. und Glowacki, J. (2014), „Effect of age on regulation of human osteoclast differentiation“, *Journal of cellular biochemistry*, 115. Jg., Nr. 8, S. 1412–1419.
- Cizza, G., Primma, S. und Csako, G. (2009), „Depression as a risk factor for osteoporosis“, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20. Jg., Nr. 8, S. 367–373.
- Clarke, B. (2008), „Normal bone anatomy and physiology“, *Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN*, 3 Suppl 3, S131-9.
- Cooper, M. S. und Gittoes, N. J. L. (2008), „Diagnosis and management of hypocalcaemia“, *BMJ (Clinical research ed.)*, 336. Jg., Nr. 7656, S. 1298–1302.
- Cosman, F., Beur, S. J. de, LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S. und Lindsay, R. (2014), „Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis“, *Osteoporosis International*, 25. Jg., Nr. 10, S. 2359–2381.

- Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J.-M., Gershon, M. D., Mallet, J. und Vodjdani, G. (2007), „Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104. Jg., Nr. 1, S. 329–334.
- Côté, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J. und Vodjdani, G. (2004), „Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function“, *Trends in molecular medicine*, 10. Jg., Nr. 5, S. 232–238.
- Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.-A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J. und Vodjdani, G. (2003), „Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100. Jg., Nr. 23, S. 13525–13530.
- Craske, M. G. und Stein, M. B. (2016), „Anxiety“, *The Lancet*, 388. Jg., Nr. 10063, S. 3048–3059.
- Cummings, S. R., San Martin, J., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I. R., Delmas, P., Zoog, H. B., Austin, M., Wang, A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati, C., Siddhanti, S. und Christiansen, C. (2009), „Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis“, *The New England journal of medicine*, 361. Jg., Nr. 8, S. 756–765.
- Dahlström, A. und Fuxe, K. (1964), „Evidence for the Existence of Monoamine containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons.“, *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1-55.
- Dallas, S. L., Prideaux, M. und Bonewald, L. F. (2013), „The osteocyte: an endocrine cell ... and more“, *Endocrine reviews*, 34. Jg., Nr. 5, S. 658–690.
- Delaisse, J.-M. (2014), „The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation“, *BoneKEy reports*, 3. Jg., S. 561.
- 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. und Parfitt, A. M. (2013), „Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 28. Jg., Nr. 1, S. 2–17.
- Drenckhahn, D. (2008), „Skelett- und Muskelsystem. Allgemeine Gelenk- und Knochenlehre“, in Benninghoff, A. und Drenckhahn, D. (Hg.), *Anatomie Band 1:*

- Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Anatomie*, 17., durchges. Aufl., Elsevier, Urban & Fischer, München, S. 254–277.
- Drenckhahn, D. und Kugler, P. (2008), „Allgemeine Gewebelehre. Knochengewebe“, in Benninghoff, A. und Drenckhahn, D. (Hg.), *Anatomie Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Anatomie*, 17., durchges. Aufl., Elsevier, Urban & Fischer, München, S. 93–207.
- Dutta, S. und Sengupta, P. (2016), „Men and mice: Relating their ages“, *Life sciences*, 152. Jg., S. 244–248.
- Ekhlaspour, L., Baskaran, C., Campoverde, K. J., Sokoloff, N. C., Neumeyer, A. M. und Misra, M. (2016), „Bone Density in Adolescents and Young Adults with Autism Spectrum Disorders“, *Journal of autism and developmental disorders*, 46. Jg., Nr. 11, S. 3387–3391.
- El Khassawna, T., Böcker, W., Brodsky, K., Weisweiler, D., Govindarajan, P., Kampschulte, M., Thormann, U., Henss, A., Rohnke, M., Bauer, N., Müller, R., Deutsch, A., Ignatius, A., Dürselen, L., Langheinrich, A., Lips, K. S., Schnettler, R. und Heiss, C. (2015), „Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats“, *Histochemistry and cell biology*, 144. Jg., Nr. 5, S. 491–507.
- El Khassawna, T., Böcker, W., Govindarajan, P., Schliepke, N., Hürter, B., Kampschulte, M., Schlewitz, G., Alt, V., Lips, K. S., Faulenbach, M., Möllmann, H., Zahner, D., Dürselen, L., Ignatius, A., Bauer, N., Wensch, S., Langheinrich, A. C., Schnettler, R. und Heiss, C. (2013), „Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat“, *PloS one*, 8. Jg., Nr. 8, e71665.
- El Khassawna, T., Merboth, F., Malhan, D., Böcker, W., Daghma, D. E. S., Stoetzel, S., Kern, S., Hassan, F., Rosenbaum, D., Langenstein, J., Bauer, N., Schlagenhaut, A., Rösen-Wolff, A., Schulze, F., Rupp, M., Hose, D., Secklinger, A., Ignatius, A., Wilke, H.-J., Lips, K. S. und Heiss, C. (2017), „Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis“, *The American journal of pathology*, 187. Jg., Nr. 8, S. 1686–1699.
- 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. und Karsenty, G. (2005), „Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART“, *Nature*, 434. Jg., Nr. 7032, S. 514–520.
- Erspamer, V. (1954), „Quantitative Estimation of 5-Hydroxytryptamine in Gastro-Intestinal Mucosa, Spleen and Blood of Vertebrates“, in Wolstenholme, G. E. W. und Cameron, M. P. (Hg.), *Ciba Foundation Symposium - Hypertension: Humoral*

- and Neurogenic Factors, Novartis Foundation Symposia*, Bd. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, S. 78–90.
- Erspamer, V. und Asero, B. (1952), „Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine“, *Nature*, 169. Jg., Nr. 4306, S. 800–801.
- Everts, V., Delaissé, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P. und Beertsen, W. (2002), „The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17. Jg., Nr. 1, S. 77–90.
- Fazzalari, N. L., Kuliwaba, J. S., Atkins, G. J., Forwood, M. R. und Findlay, D. M. (2001), „The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16. Jg., Nr. 6, S. 1015–1027.
- Felsenberg, D. (2016a), „Osteoporose“, in Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B. und Dietel, M. (Hg.), *Harrisons Innere Medizin*, 19. Auflage, deutsche Ausgabe, McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Stuttgart, S. 3049–3072.
- Felsenberg, D. (2016b), „Physiologie und Pathophysiologie des Knochen- und Mineralstoffwechsels“, in Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B. und Dietel, M. (Hg.), *Harrisons Innere Medizin*, 19. Auflage, deutsche Ausgabe, McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Stuttgart, S. 3012–3024.
- Feng, J., Shan, L., Du, L., Wang, B., Li, H., Wang, W., Wang, T., Dong, H., Yue, X., Xu, Z., Staal, W. G. und Jia, F. (2017), „Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder“, *Nutritional neuroscience*, 20. Jg., Nr. 5, S. 284–290.
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S. I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M. K., Quarles, L. D., Bonewald, L. F. und White, K. E. (2006), „Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism“, *Nature genetics*, 38. Jg., Nr. 11, S. 1310–1315.
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J. A. und Duarte, J. A. (2014), „Bone quality: the determinants of bone strength and fragility“, *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 44. Jg., Nr. 1, S. 37–53.

- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Esteves, J. L. S., Viriato, N., Vaz, M., Mota, M. P. und Duarte, J. A. (2011), „Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy“, *Calcified tissue international*, 88. Jg., Nr. 6, S. 443–454.
- Freitag, C. M. und Vogeley, K. (2016), *Autismus-Spektrum-Störungen im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter: Teil 1: Diagnostik*, Interdisziplinäre S3-Leitlinie der DGKJP und der DGPPN.
- Fu, L., Patel, M. S., Bradley, A., Wagner, E. F. und Karsenty, G. (2005), „The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation“, *Cell*, 122. Jg., Nr. 5, S. 803–815.
- Garnero, P. und Delmas, P. D. (1997), „Osteoporosis“, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26. Jg., Nr. 4, S. 913–936.
- Geurts, A. M., Cost, G. J., Rémy, S., Cui, X., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Jacob, H. J., Anegon, I. und Buelow, R. (2010), „Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases“, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 597. Jg., S. 211–225.
- Glusa, E. und Pertz, H. H. (2000), „Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors“, *British Journal of Pharmacology*, 130. Jg., Nr. 3, S. 692–698.
- Graves, D. T., Jiang, Y. und Valente, A. J. (1999), „The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts“, *Frontiers in bioscience a journal and virtual library*, 4. Jg., D571-80.
- Grier, S. J., Turner, A. S. und Alvis, M. R. (1996), „The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals“, *Investigative radiology*, 31. Jg., Nr. 1, S. 50–62.
- Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F. und Heymann, D. (2003), „Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis“, *The American journal of pathology*, 163. Jg., Nr. 5, S. 2021–2031.
- Gutknecht, L., Jacob, C., Strobel, A., Kriegebaum, C., Müller, J., Zeng, Y., Markert, C., Escher, A., Wendland, J., Reif, A., Mössner, R., Gross, C., Brocke, B. und Lesch, K.-P. (2007), „Tryptophan hydroxylase-2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation“, *The international journal of neuropsychopharmacology*, 10. Jg., Nr. 3, S. 309–320.
- Gutknecht, L., Kriegebaum, C., Waider, J., Schmitt, A. und Lesch, K.-P. (2009), „Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice“, *European neuropsychopharmacology the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 19. Jg., Nr. 4, S. 266–282.

- Gutknecht, L., Waider, J., Kraft, S., Kriegebaum, C., Holtmann, B., Reif, A., Schmitt, A. und Lesch, K.-P. (2008), „Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice“, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria 1996)*, 115. Jg., Nr. 8, S. 1127–1132.
- Halleen, J. M., Räsänen, S. R., Alatalo, S. L. und Väänänen, H. K. (2003), „Potential function for the ROS-generating activity of TRACP“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18. Jg., Nr. 10, S. 1908–1911.
- Hardebo, J. E., Edvinsson, L., MacKenzie, E. T. und Owman, C. (1979), „Histofluorescence study on monoamine entry into the brain before and after opening of the blood-brain barrier by various mechanisms“, *Acta neuropathologica*, 47. Jg., Nr. 2, S. 145–150.
- Häussler, B., Gothe, H., Göl, D., Glaeske, G., Pientka, L. und Felsenberg, D. (2007), „Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study“, *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 18. Jg., Nr. 1, S. 77–84.
- Hayden, J. M., Mohan, S. und Baylink, D. J. (1995), „The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption“, *Bone*, 17. Jg., Nr. 2, S93-S98.
- Hayman, A. R. (2008), „Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy“, *Autoimmunity*, 41. Jg., Nr. 3, S. 218–223.
- Heino, T. J., Hentunen, T. A. und Väänänen, H. K. (2002), „Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen“, *Journal of cellular biochemistry*, 85. Jg., Nr. 1, S. 185–197.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B. und Kanis, J. A. (2013), „Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)“, *Archives of osteoporosis*, 8. Jg., S. 136.
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B. und Boyle, W. J. (1999), „Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96. Jg., Nr. 7, S. 3540–3545.

- Huggenberger, S., Moser, N., Schröder, H., Cozzi, B., Granato, A. und Merighi, A. (2019), *Neuroanatomie des Menschen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ida-Yonemochi, H., Yamada, Y., Yoshikawa, H. und Seo, K. (2017), „Locally Produced BDNF Promotes Sclerotic Change in Alveolar Bone after Nerve Injury“, *PloS one*, 12. Jg., Nr. 1, e0169201.
- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M. und Hirokawa, K. (2001), „Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus“, *Endocrinology*, 142. Jg., Nr. 4, S. 1419–1426.
- Jerome, C., Hoch, B. und Carlson, C. (2017), „Skeletal System“, in Treuting, P., Dintzis, S. und Montine, K. (Hg.), *Comparative Anatomy and Histology: A mouse, rat, and human atlas*, Second Edition, 2. Aufl., Elsevier Academic Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, S. 67–88.
- Jonnakuty, C. und Gragnoli, C. (2008), „What do we know about serotonin?“, *Journal of cellular physiology*, 217. Jg., Nr. 2, S. 301–306.
- Ju, S.-Y., Lee, Y.-J. und Jeong, S.-N. (2013), „Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of depression: a systematic review and meta-analysis“, *The journal of nutrition, health & aging*, 17. Jg., Nr. 5, S. 447–455.
- Kane, M. J., Angoa-Peréz, M., Briggs, D. I., Sykes, C. E., Francescutti, D. M., Rosenberg, D. R. und Kuhn, D. M. (2012), „Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism“, *PloS one*, 7. Jg., Nr. 11, e48975.
- Kaneko, I., Sabir, M. S., Dussik, C. M., Whitfield, G. K., Karrys, A., Hsieh, J.-C., Haussler, M. R., Meyer, M. B., Pike, J. W. und Jurutka, P. W. (2015), „1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D“, *The FASEB Journal*, 29. Jg., Nr. 9, S. 4023–4035.
- Kanis, J. A. (2007), *Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level: Report of a WHO Scientific Group*.
- Kaplan, K., Echert, A. E., Massat, B., Puissant, M. M., Palygin, O., Geurts, A. M. und Hodges, M. R. (2016), „Chronic central serotonin depletion attenuates ventilation and body temperature in young but not adult Tph2 knockout rats“, *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. 1985)*, 120. Jg., Nr. 9, S. 1070–1081.
- Katsimbri, P. (2017), „The biology of normal bone remodelling“, *European journal of cancer care*, 26. Jg., Nr. 6.

- Kaumann, A. J. und Levy, F. O. (2006), „5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system“, *Pharmacology & therapeutics*, 111. Jg., Nr. 3, S. 674–706.
- Kawamoto, T. und Kawamoto, K. (2014), „Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method (2012)“, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1130. Jg., S. 149–164.
- Kearns, A. E., Khosla, S. und Kostenuik, P. J. (2008), „Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease“, *Endocrine reviews*, 29. Jg., Nr. 2, S. 155–192.
- Khosla, S., Westendorf, J. J. und Oursler, M. J. (2008), „Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures“, *The Journal of clinical investigation*, 118. Jg., Nr. 2, S. 421–428.
- Klauber, J., Günster, C., Gerste, B., Robra, B.-P. und Schmacke, N. (Hg.) (2013), *Versorgungs-Report 2013: Schwerpunkt: Depression - Mit Online-Zugang zum Internet-Portal: www.versorgungs-report-online.de*, 1. Aufl., Schattauer, Stuttgart.
- Koller, D. L., Liu, L., Alam, I., Sun, Q., Econs, M. J., Foroud, T. und Turner, C. H. (2008), „Linkage screen for BMD phenotypes in male and female COP and DA rat strains“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 23. Jg., Nr. 9, S. 1382–1388.
- Koshkina, A., Dudnichenko, T., Baranenko, D., Fedotova, J. und Drago, F. (2019), „Effects of Vitamin D3 in Long-Term Ovariectomized Rats Subjected to Chronic Unpredictable Mild Stress: BDNF, NT-3, and NT-4 Implications“, *Nutrients*, 11. Jg., Nr. 8.
- Kriegebaum, C. (2009), „Spatio-temporal Expression Patterns of the Serotonin Synthesis Enzymes TPH1 and TPH2 and Effects of Acute Stress“, Dissertation, Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, 2009.
- Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K.-P. und Reif, A. (2010a), „Serotonin Kompakt - Teil 1. Neurobiologische und entwicklungs-genetische Grundlagen“, *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, 78. Jg., Nr. 6, S. 319–331.
- Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K.-P. und Reif, A. (2010b), „Serotonin Kompakt - Teil 2. Verhaltensgenetik und Psychopathologie“, *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, 78. Jg., Nr. 6, S. 332–342.
- Kroeze, W. und Roth, B. (1998), „The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis“, *Biological Psychiatry*, 44. Jg., Nr. 11, S. 1128–1142.

- Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M. und Xu, J. (2012), „An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level“, *Clinical biochemistry*, 45. Jg., Nr. 12, S. 863–873.
- Kurth, A., Pfeifer, M., Kallenbach, M. und Abou Elnaga, J. (2017), *S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose: bei postmenopausalen Frauen und bei Männern*, Leitlinie, AWMF online.
- Lacey, D. L., Erdmann, J. M., Shima, M., Kling, S., Matayoshi, A., Ohara, J. und Perkins, S. L. (1994), „Interleukin 4 enhances osteoblast macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin 6, production“, *Calcified tissue international*, 55. Jg., Nr. 1, S. 21–28.
- Lam, D. D., Leininger, G. M., Louis, G. W., Garfield, A. S., Marston, O. J., Leshan, R. L., Scheller, E. L., Christensen, L., Donato, J., Xia, J., Evans, M. L., Elias, C., Dalley, J. W., Burdakov, D. I., Myers, M. G. und Heisler, L. K. (2011), „Leptin does not directly affect CNS serotonin neurons to influence appetite“, *Cell metabolism*, 13. Jg., Nr. 5, S. 584–591.
- Lang, G. (2013), *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, 2.*, überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer, Vienna.
- Lesch, K.-P., Araragi, N., Waider, J., van den Hove, D. und Gutknecht, L. (2012), „Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour“, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367. Jg., Nr. 1601, S. 2426–2443.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D. J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M. und Clavien, P.-A. (2006), „Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration“, *Science (New York, N.Y.)*, 312. Jg., Nr. 5770, S. 104–107.
- Li, J., Sarosi, I., Cattley, R. C., Pretorius, J., Asuncion, F., Grisanti, M., Morony, S., Adamu, S., Geng, Z., Qiu, W., Kostenuik, P., Lacey, D. L., Simonet, W. S., Bolon, B., Qian, X., Shalhoub, V., Ominsky, M. S., Zhu Ke, H., Li, X. und Richards, W. G. (2006), „Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia“, *Bone*, 39. Jg., Nr. 4, S. 754–766.
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S. E. und Wu, D. (2005), „Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling“, *The Journal of biological chemistry*, 280. Jg., Nr. 20, S. 19883–19887.
- Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y.-Y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Kim, D. O., Côté, F., Mallet, J. und Gershon, M. D. (2011), „Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of

- enteric dopaminergic neurons“, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 31. Jg., Nr. 24, S. 8998–9009.
- Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (2019), *Taschenlehrbuch Histologie*, 6., vollständig überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Magnusson, J. L. und Cummings, K. J. (2017), „Central serotonin and the control of arterial blood pressure and heart rate in infant rats: influence of sleep state and sex“, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314. Jg., Nr. 2, R313-21.
- Malhan, D., Muelke, M., Rosch, S., Schaefer, A. B., Merboth, F., Weisweiler, D., Heiss, C., Arganda-Carreras, I. und El Khassawna, T. (2018), „An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry“, *Frontiers in endocrinology*, 9. Jg., S. 666.
- Marshall, D., Johnell, O. und Wedel, H. (1996), „Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures“, *BMJ (Clinical research ed.)*, 312. Jg., Nr. 7041, S. 1254–1259.
- Martin, T. J. und Sims, N. A. (2005), „Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption“, *Trends in molecular medicine*, 11. Jg., Nr. 2, S. 76–81.
- Matkovic, V., Jelic, T., Wardlaw, G. M., Ilich, J. Z., Goel, P. K., Wright, J. K., Andon, M. B., Smith, K. T. und Heaney, R. P. (1994), „Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model“, *The Journal of clinical investigation*, 93. Jg., Nr. 2, S. 799–808.
- Matsuo, K. und Irie, N. (2008), „Osteoclast-osteoblast communication“, *Archives of biochemistry and biophysics*, 473. Jg., Nr. 2, S. 201–209.
- Matthes, S., Mosienko, V., Bashammakh, S., Alenina, N. und Bader, M. (2010), „Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders“, *Pharmacology*, 85. Jg., Nr. 2, S. 95–109.
- Meltzer, H. Y. (1990), „Role of serotonin in depression“, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600. Jg., 486-99; discussion 499-500.
- Mennerich, D. (2000), „Regulation der Entwicklung und Regeneration von Skelettmuskelzellen durch die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Myf-6“, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2000.
- Meyer, S. F. de, Vanhoorelbeke, K., Broos, K., Salles, I. I. und Deckmyn, H. (2008), „Antiplatelet drugs“, *British journal of haematology*, 142. Jg., Nr. 4, S. 515–528.
- Mikuni-Takagaki, Y., Kakai, Y., Satoyoshi, M., Kawano, E., Suzuki, Y., Kawase, T. und Saito, S. (1995), „Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells

- in culture“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10. Jg., Nr. 2, S. 231–242.
- Minisola, S., Pepe, J., Piemonte, S. und Cipriani, C. (2015), „The diagnosis and management of hypercalcaemia“, *BMJ (Clinical research ed.)*, 350. Jg., h2723.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L. und Gwaltney-Brant, S. M. (2008), „Serotonin: a review“, *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31. Jg., Nr. 3, S. 187–199.
- Mosienko, V., Beis, D., Pasqualetti, M., Waider, J., Matthes, S., Qadri, F., Bader, M. und Alenina, N. (2015), „Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis“, *Behavioural brain research*, 277. Jg., S. 78–88.
- Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M. und Alenina, N. (2012), „Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin“, *Translational psychiatry*, 2. Jg., e122.
- Mulisch, M. und Welsch, U. (Hg.) (2010), *Mikroskopische Technik*, 18. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- Mullender, M. G., van der Meer, D. D., Huiskes, R. und Lips, P. (1996), „Osteocyte density changes in aging and osteoporosis“, *Bone*, 18. Jg., Nr. 2, S. 109–113.
- Neal, K. B., Parry, L. J. und Bornstein, J. C. (2009), „Strain-specific genetics, anatomy and function of enteric neural serotonergic pathways in inbred mice“, *The Journal of physiology*, 587. Jg., Nr. 3, S. 567–586.
- Oreffo, R. O., Mundy, G. R., Seyedin, S. M. und Bonewald, L. F. (1989), „Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts“, *Biochemical and biophysical research communications*, 158. Jg., Nr. 3, S. 817–823.
- Pan, W., Banks, W. A., Fasold, M. B., Bluth, J. und Kastin, A. J. (1998), „Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood–brain barrier“, *Neuropharmacology*, 37. Jg., Nr. 12, S. 1553–1561.
- Pasco, J. A., Seeman, E., Henry, M. J., Merriman, E. N., Nicholson, G. C. und Kotowicz, M. A. (2006), „The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis“, *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 17. Jg., Nr. 9, S. 1404–1409.
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.-P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevsek, M., Fink, H., Rupnik, M. und Walther, D. J. (2009), „Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation“, *PLoS biology*, 7. Jg., Nr. 10, e1000229.

- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J. J., Khosla, S. und Oursler, M. J. (2008), „Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105. Jg., Nr. 52, S. 20764–20769.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., Giorgio, R. de, Brecha, N. und Edwards, R. H. (1995), „Differential expression of two vesicular monoamine transporters“, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, 15. Jg., Nr. 9, S. 6179–6188.
- Plass, D., Vos, T., Hornberg, C., Scheidt-Nave, C., Zeeb, H. und Krämer, A. (2014), „Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study“, *Deutsches Arzteblatt international*, 111. Jg., Nr. 38, S. 629–638.
- Raggatt, L. J. und Partridge, N. C. (2010), „Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling“, *The Journal of biological chemistry*, 285. Jg., Nr. 33, S. 25103–25108.
- Rapport, M. M., Green, A. A. und Page, I. H. (1948), „Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization“, *The Journal of biological chemistry*, 176. Jg., Nr. 3, S. 1243–1251.
- Richards, J. B., Papaioannou, A., Adachi, J. D., Joseph, L., Whitson, H. E., Prior, J. C. und Goltzman, D. (2007), „Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture“, *Archives of internal medicine*, 167. Jg., Nr. 2, S. 188–194.
- Rizzoli, R., Cooper, C., Reginster, J.-Y., Abrahamsen, B., Adachi, J. D., Brandi, M. L., Bruyère, O., Compston, J., Ducy, P., Ferrari, S., Harvey, N. C., Kanis, J. A., Karsenty, G., Laslop, A., Rabenda, V. und Vestergaard, P. (2012), „Antidepressant medications and osteoporosis“, *Bone*, 51. Jg., Nr. 3, S. 606–613.
- Rupp, M., Merboth, F., Daghma, D. E., Biehl, C., El Khassawna, T. und Heiß, C. (2018), „Osteozyten“, *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*.
- Russell, W. M. S. und Burch, R. L. (1959), *The principles of humane experimental technique*, Methuen, London.
- Savelieva, K. V., Zhao, S., Pogorelov, V. M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E. und Lanthorn, T. H. (2008), „Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants“, *PloS one*, 3. Jg., Nr. 10, e3301.
- Scheidt-Nave, C., Banzer, D. und Abendroth, K., *Multizentrische Studie zu Verteilung, Determination und prädiktivem Wert der Knochendichte in der deutschen Bevölkerung: Schlussbericht ; [Abschlußdatum des Vorhabens 30.9.1996, Univ. Medizinische Klinik und Poliklinik Abt. Endokrinologie und Stoffwechsel, Heidelberg*.
- Schneider, F. und Härter, M. (2015), *Unipolare Depression: Langfassung*, 2. Auflage.

- Schweiger, J. U., Schweiger, U., Hüppe, M., Kahl, K. G., Greggensen, W. und Fassbinder, E. (2016), „Bone density and depressive disorder: a meta-analysis“, *Brain and behavior*, 6. Jg., Nr. 8, e00489.
- Sengupta, P. (2013), „The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's“, *International Journal of Preventive Medicine*, 4. Jg., Nr. 6, S. 624–630.
- Shi, Y., Oury, F., Yadav, V. K., Wess, J., Liu, X. S., Guo, X. E., Murshed, M. und Karsenty, G. (2010), „Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity“, *Cell metabolism*, 11. Jg., Nr. 3, S. 231–238.
- Siggelkow, H. (2016), „Erkrankungen der Nebenschilddrüse und Kalziumhomöostase“, in Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B. und Dietel, M. (Hg.), *Harrisons Innere Medizin*, 19. Auflage, deutsche Ausgabe, McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Stuttgart, S. 3025–3048.
- Sims, N. A. und Martin, T. J. (2014), „Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit“, *BoneKEY reports*, 3. Jg., S. 481.
- Sims, N. A. und Martin, T. J. (2015), „Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface?“, *Frontiers in endocrinology*, 6. Jg., S. 41.
- Singh, N. und Ecker, G. F. (2018), „Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1“, *International journal of molecular sciences*, 19. Jg., Nr. 5.
- Soysa, N. S. und Alles, N. (2016), „Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview“, *Biochemical and biophysical research communications*, 476. Jg., Nr. 3, S. 115–120.
- Stenbeck, G. (2002), „Formation and function of the ruffled border in osteoclasts“, *Seminars in cell & developmental biology*, 13. Jg., Nr. 4, S. 285–292.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S. H. und Franklin, C. L. (2006), *The laboratory rat, American College of Laboratory Animal Medicine series*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Boston.
- Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K. L., Armstrong, D., Ducy, P. und Karsenty, G. (2002), „Leptin Regulates Bone Formation via the Sympathetic Nervous System“, *Cell*, 111. Jg., Nr. 3, S. 305–317.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. und Ikeda, K. (2007), „Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction“, *Cell metabolism*, 5. Jg., Nr. 6, S. 464–475.

## Literaturverzeichnis

- Torres, G. E., Gainetdinov, R. R. und Caron, M. G. (2003), „Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function“, *Nature reviews Neuroscience*, 4. Jg., Nr. 1, S. 13–25.
- Tran Van, P., Vignery, A. und Baron, R. (1982), „An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat“, *Cell and tissue research*, 225. Jg., Nr. 2, S. 283–292.
- Trimmel, M. (2009), *Wissenschaftliches Arbeiten in Psychologie und Medizin, UTB Schlüsselkompetenzen Psychologie, Medizin*, Bd. 3079, 1. Aufl., UTB GmbH, Stuttgart.
- Tseng, P.-T., Chen, Y.-W., Yeh, P.-Y., Tu, K.-Y., Cheng, Y.-S. und Wu, C.-K. (2015), „Bone Mineral Density in Schizophrenia: An Update of Current Meta-Analysis and Literature Review Under Guideline of PRISMA“, *Medicine*, 94. Jg., Nr. 47, e1967.
- Tuukkanen, J., Koivukangas, A., Jämsä, T., Sundquist, K., Mackay, C. A. und Marks, S. C. (2000), „Mineral density and bone strength are dissociated in long bones of rat osteopetrotic mutations“, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15. Jg., Nr. 10, S. 1905–1911.
- Tyce, G. M. (1990), „Origin and metabolism of serotonin“, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 16 Suppl 3, S1-7.
- Ucuz, İ. İ., Dursun, O. B., Esin, İ. S., Özgeriş, F. B., Kurt, N., Kiziltunç, A. und Orbak, Z. (2015), „The relationship between Vitamin D, autistic spectrum disorders, and cognitive development: do glial cell line-derived neurotrophic factor and nerve growth factor play a role in this relationship?“, *International Journal of Developmental Disabilities*, 61. Jg., Nr. 4, S. 222–230.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Higashio, K. und Suda, T. (2000), „Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function“, *Endocrinology*, 141. Jg., Nr. 9, S. 3478–3484.
- Vashishth, D., Verborgt, O., Divine, G., Schaffler, M. B. und Fyhrie, D. P. (2000), „Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age“, *Bone*, 26. Jg., Nr. 4, S. 375–380.
- Veale, D. und Roberts, A. (2014), „Obsessive-compulsive disorder“, *BMJ (Clinical research ed.)*, 348. Jg., g2183.
- Walther, D. J. und Bader, M. (2003), „A unique central tryptophan hydroxylase isoform“, *Biochemical Pharmacology*, 66. Jg., Nr. 9, S. 1673–1680.

- Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. und Bader, M. (2003a), „Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform“, *Science (New York, N.Y.)*, 299. Jg., Nr. 5603, S. 76.
- Walther, D. J., Peter, J.-U., Winter, S., Höltje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinckel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C. S., Ahnert-Hilger, G. und Bader, M. (2003b), „Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet  $\alpha$ -Granule Release“, *Cell*, 115. Jg., Nr. 7, S. 851–862.
- Wang, T., Shan, L., Du, L., Feng, J., Xu, Z., Staal, W. G. und Jia, F. (2016), „Serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis“, *European child & adolescent psychiatry*, 25. Jg., Nr. 4, S. 341–350.
- Warriner, A. H., Patkar, N. M., Curtis, J. R., Delzell, E., Gary, L., Kilgore, M. und Saag, K. (2011), „Which fractures are most attributable to osteoporosis?“, *Journal of clinical epidemiology*, 64. Jg., Nr. 1, S. 46–53.
- Weaver, C. M., Gordon, C. M., Janz, K. F., Kalkwarf, H. J., Lappe, J. M., Lewis, R., O’Karma, M., Wallace, T. C. und Zemel, B. S. (2016), „The National Osteoporosis Foundation’s position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations“, *Osteoporosis International*, 27. Jg., Nr. 4, S. 1281–1386.
- Welsch, U. und Kummer, W. (Hg.) (2018), *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie das Lehrbuch*, Das Lehrbuch, 5. Auflage, Elsevier, München.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W. und Stanley, E. R. (1990), „Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87. Jg., Nr. 12, S. 4828–4832.
- Woo, K. M., Kim, H.-M. und Ko, J. S. (2002), „Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-XL“, *Experimental & Molecular Medicine*, 34. Jg., Nr. 5, S. 340–346.
- Wu, Q., Magnus, J. H., Liu, J., Bencaz, A. F. und Hentz, J. G. (2009), „Depression and low bone mineral density: a meta-analysis of epidemiologic studies“, *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20. Jg., Nr. 8, S. 1309–1320.
- Wysolmerski, J. J. (2012), „Osteocytic osteolysis: time for a second look?“, *BoneKEY reports*, 1. Jg., S. 229.

- Yadav, V. K., Balaji, S., Suresh, P. S., Liu, X. S., Lu, X., Li, Z., Guo, X. E., Mann, J. J., Balapure, A. K., Gershon, M. D., Medhamurthy, R., Vidal, M., Karsenty, G. und Ducey, P. (2010), „Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis“, *Nature medicine*, 16. Jg., Nr. 3, S. 308–312.
- Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., Klemenhagen, K. C., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Guo, X. E., Tecott, L. H., Mann, J. J., Hen, R., Horvath, T. L. und Karsenty, G. (2009), „A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure“, *Cell*, 138. Jg., Nr. 5, S. 976–989.
- Yadav, V. K., Ryu, J.-H., Suda, N., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Schütz, G., Glorieux, F. H., Chiang, C. Y., Zajac, J. D., Insogna, K. L., Mann, J. J., Hen, R., Ducey, P. und Karsenty, G. (2008), „Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum“, *Cell*, 135. Jg., Nr. 5, S. 825–837.
- Yang, S. Y., Yoo, H. J., Cho, I. H., Park, M. und Kim, S. A. (2012), „Association with tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms and autism spectrum disorders in Korean families“, *Neuroscience research*, 73. Jg., Nr. 4, S. 333–336.
- Yoon, K., Thiede, M. A. und Rodan, G. A. (1988), „Alkaline phosphatase as a reporter enzyme“, *Gene*, 66. Jg., Nr. 1, S. 11–17.
- Zarrinkalam, M. R., Mulaibrahimovic, A., Atkins, G. J. und Moore, R. J. (2012), „Changes in osteocyte density correspond with changes in osteoblast and osteoclast activity in an osteoporotic sheep model“, *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 23. Jg., Nr. 4, S. 1329–1336.
- Zhang, X., Gainetdinov, R. R., Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T. D., Burch, L. H., Williams, R. B., Schwartz, D. A., Krishnan, K. R. R. und Caron, M. G. (2005), „Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression“, *Neuron*, 45. Jg., Nr. 1, S. 11–16.
- Zhu, S., Yao, F., Qiu, H., Zhang, G., Xu, H. und Xu, J. (2018), „Coupling factors and exosomal packaging microRNAs involved in the regulation of bone remodelling“, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93. Jg., Nr. 1, S. 469–480.
- Zill, P., Baghai, T. C., Zwanzger, P., Schüle, C., Eser, D., Rupprecht, R., Möller, H.-J., Bondy, B. und Ackenheil, M. (2004a), „SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression“, *Molecular psychiatry*, 9. Jg., Nr. 11, S. 1030–1036.

## Literaturverzeichnis

Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.-J., Bondy, B. und Ackenheil, M. (2004b), „Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims“, *Biological Psychiatry*, 56. Jg., Nr. 8, S. 581–586.

## 11 Anhang

### 11.1 Fixations- und Einbettungsprotokoll

Tabelle 3: Materialien für die Gewebeeinbettung.

Reagenz	Hersteller
Einbettungsmedium	SCEM-L1 embedding medium, Fa. SECTION-LAB Co Ltd., Japan
Aceton	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	4 % W/V Paraformaldehyd-Pulver in DEPC-behandeltem Wasser bei pH 9,1
Sucrose	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Fixationsprotokoll und Einbettungsvorbereitung.

Schritt	Lösung	Zeit (h)	Temperatur
1.	4 % PFA	2	4 °C
2.	10 % Sucrose	24	4 °C
3.	20 % Sucrose	24	4 °C
4.	30 % Sucrose	24	4 °C

Tabelle 5: Einbettungsprotokoll.

Schritt	Anweisung
1.	Auffüllen eines kältestabilen Behälters mit ca. 500 g Trockeneis.
2.	Aceton und n-Hexan im 50 : 50 Mischungsverhältnis hinzugeben, sodass es das Trockeneis 2 - 3 cm bedeckt.
3.	Das Femur trocken tupfen und in eine Edelstahl-Gussform legen.
4.	Das Femur vollständig mit Einbettmedium in der Gussform bedecken.
5.	Die Gussform sodann in die Gefrierflüssigkeit hängen. Darauf achten, dass das Aceton/Hexan-Gemisch nicht mit dem Einbettmedium in Berührung kommt.
6.	Auf die komplette Verfestigung des Einbettmediums warten.
7.	Einbettmedium vorsichtig aus der Gussform herauslösen und mit Frischhaltefolie eng umwickeln.
8.	Bei -20 °C bis zum Schneidvorgang am Kryostat lagern.

## 11.2 Färbeprotokoll Von Kossa-/ Van Gieson-Färbung

Tabelle 6: Materialien für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung.

Reagenz	Hersteller
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Holding GmbH, Bielefeld, Deutschland
Xylol	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Natriumcarbonat	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
37 % Formaldehydlösung	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methylgrün	Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung A	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung B	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Picro-Fuchsin Van Gieson	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Vitroclud®	Fa. R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
1x PBS	DPBS (10x), Fa. Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, in 1:10 Verdünnung (Aqua dest)

Tabelle 7: Lösungsvorbereitung für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung.

Reagenz	Anweisung
3 % Silbernitrat	3 g Silbernitrat in 100 ml Aqua bidest.
10 % Natriumkarbonat-Formaldehyd	10 g Natriumkarbonat 25 ml 37 % Formaldehyd auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen
5 % Natriumthiosulfat	5 g auf 100 ml Aqua dest.
0,8 % Methylgrün	1 g auf 100 ml Aqua dest + 25 ml abst. Ethanol
Hämatoxylin nach Weigert	1 Teil A + 1 Teil B im gleichen Verhältnis mischen

## Anhang

**Tabelle 8: Arbeitsanweisung für die Von Kossa-/Van Gieson-Färbung.**

Arbeitsschritt	Wiederholung	Zeit
Proben auftauen	1x	60 Min.
1x PBS	1x	20 Min.
Aqua bidest.	1x	2 Min.
3 % Silbernitrat	1x	3 - 5 Min.
Aqua bidest.	3x	2 Min.
Silbernitrat-Reduzierung in 10 % Natriumkarbonat-Formaldehyd	1x	1 - 2 Min.
Spülen (unter fließendem Leitungswasser)	1x	8 Min.
Fixieren in 5 % Natriumthiosulfat	1x	5 Min.
Stoppen der Reaktion: Aqua dest.	2x	2 Min.
Gegenfärbung mit Methylgrün	1x	8 Min.
Spülen (unter fließendem Leitungswasser)	1x	8 Min.
Spülen (unter fließendem Aqua dest.)	3x	2 Min.
Färben mit Weigerts Eisenhämatoxylin	1x	6 Min.
Spülen (unter fließendem Leitungswasser)	1x	8 Min.
Van Gieson-Färbung	1x	5 Min.
96 % Ethanol	3x	kurz in Küvette eintauchen
100 % Ethanol	1x	30 Sek.
Xylol	2x	5 Min. pro Küvette
Eindecken mit Vitroclud®		

Sofern keine gesonderte Temperaturangabe in °C vorhanden ist, gilt Raumtemperatur.

### 11.3 Färbeprotokoll Silbernitrat-Färbung

**Tabelle 9: Materialien für die Silbernitrat-Färbung.**

Reagenz	Hersteller
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Holding GmbH, Bielefeld, Deutschland
Xylol	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Gelatine aus der Rinderhaut	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Ameisensäure 98-100 %	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Anhang

Titriplex III p. a. (EDTA)	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (25 % HCL)	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vitroclud®	Fa. R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Natronlauge	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	DPBS (10x), Fa. Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, in 1:10 Verdünnung (Aqua dest)
Pap Pen	Fa. Kisker Biotech GmbH % Co. KG, Steinfurt, Deutschland

**Tabelle 10: Lösungsvorbereitung für die Silbernitrat-Färbung.**

Reagenz	Anweisung
Tris / EDTA-Lösung	3,4 % Tris (34 g) + 10 % EDTA (50 g) in 500 ml Aqua dest. auflösen, pH auf 7,0 - 7,4 mit NaOH 10 N titrieren
Lösung A	24,75 ml Aqua bidest. + 250 µl Ameisensäure + 0,5 g Gelatine Gelatine in Aqua bidest. im Falcon-Röhrchen bei 37 °C unter ständiger Bewegung für 30 Min. lösen, dann Ameisensäure hinzugeben. Im Kühlschrank lagern, vor Verwendung auf 37 °C aufwärmen.
Lösung B	50 % Silbernitrat = 10 g Silbernitrat + 20 ml Aqua bidest
Lösungsmischung (A + B)	A + B im Verhältnis 1 : 2 mischen

**Tabelle 11: Arbeitsanweisung für die Silbernitrat-Färbung.**

Arbeitsschritt	Wiederholung	Zeit
Proben auftauen	1x	60 Min.
1x PBS	1x	20 Min.
Entmineralisieren: Tris / EDTA	1x	24 h.
Aqua bidest.	2x	5 Min.
3 % Silbernitrat	1x	3 - 5 Min.
Aqua bidest.	3x	2 Min.
Einkreisen mit Pap Pen		
Lösungsmischung (A+B) auf Schnitte (Dunkelkammer)	1x	38 Min.
Aqua dest.	1x	5 Min.
5 % Natriumthiosulfat (in Aqua bidest.)	1x	10 Min.
Aqua dest.	1x	5 Min.
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe 70 %, 96 %, 100 % Ethanol	1x	5 Min. pro aufsteigender Küvette
Xylol	2x	5 Min. pro Küvette
Eindecken mit Vitroclud®		

Sofern keine gesonderte Temperaturangabe in °C vorhanden ist, gilt Raumtemperatur.

## 11.4 Färbeprotokoll ALP-Färbung

Tabelle 12: Materialien für die ALP-Färbung.

Reagenz	Hersteller
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Holding GmbH, Bielefeld, Deutschland
Xylol	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenfilter: 32 mm mit 0,2 µm Membran	Fa. Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Phosphatase-Substrat BCIP/NBT	SeraCare Life Science Inc., 37 Birch Street, Milford, MA USA
Tris	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pap Pen	Fa. Kisker Biotech GmbH % Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	DPBS (10x), Fa. Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, in 1 : 10 Verdünnung (Aqua dest)
Vitroclud®	Fa. R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

Tabelle 13: Lösungsvorbereitung für die ALP-Färbung.

Reagenz	Anweisung
0,1 M Tris-Puffer pH 9,4	Stammlösung (1 M): 121,1 g Tris auf 1 l Aqua dest.: Mit 25%iger HCL auf pH 9,4 einstellen Gebrauchslösung (0,1 M): 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest.
20 % Essigsäure:	2 ml Eisessig + 8 ml Aqua dest.
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Vor Gebrauch aufschütteln

## Anhang

**Tabelle 14: Arbeitsanweisung für die ALP-Färbung.**

Arbeitsschritt	Wiederholung	Zeit
Proben auftauen	1x	60 Min.
1x PBS	1x	20 Min.
Spülen mit Aqua dest.	3x	5 Min.
Spülen mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4)	1x	10 Min.
Schnitte einkreisen (Pap Pen)		
Negativkontrolle: 20 % Essigsäure	1x	30 Min.
Färben: BCIP/NBT Phosphatase-Substrat mit Spritze durch Spritzenfilter	1x	75 Min. bei 37 °C in feuchter Dunkelkammer
Spülen mit Aqua dest.	3x	5 Min.
Gegenfärben: Kernechtrot-Aluminiumsulfat	1x	15 Min., Lösung vorher aufschütteln
Spülen mit Aqua dest.	3x	5 Min.
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe 70 %, 96 %, 100 % Ethanol	1x	5 Min. pro aufsteigender Küvette
Xylol	2x	5 Min. pro Küvette
Eindecken mit Vitroclud®		

Sofern keine gesonderte Temperaturangabe in °C vorhanden ist, gilt Raumtemperatur.

### 11.5 Färbeprotokoll TRAP-Färbung

**Tabelle 15: Materialien für die TRAP-Färbung.**

Reagenz	Hersteller
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Holding GmbH, Bielefeld, Deutschland
Xylol	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat p.a	Fa. Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Naphthol-AS-TR-Phosphat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
N-N-Dimethylformamid	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Echtrotsalz	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH., 89555 Steinheim
Shandon Instant Hämatoxylin	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kaisers Glyceringelatine	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, 32 %	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Plastikspatel, Rührspatel	Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

## Anhang

Eppendorf-Tube, 2 ml	Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen 50 ml	Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapiere HK83,1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	DPBS (10x), Fa. Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, in 1:10 Verdünnung (Aqua dest)
Pap Pen	Fa. Kisker Biotech GmbH % Co. KG, Steinfurt, Deutschland

**Tabelle 16: Lösungsvorbereitung für die TRAP-Färbung.**

Reagenz	Anweisung
0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,2	Stammlösung (1M): 82,03 g/l Natriumacetat in Aqua dest. lösen; pH mit 25 % HCL auf 5,2 einstellen 25 ml Gebrauchslösung (0,1 M): Puffer 1 + 9 in Aqua dest. 25 ml in einem 50 ml Falcon-Röhrchen herstellen
Färbelösung 1	35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat in 125 µl N-N-Dimethylformamid lösen (Eppendorf-Tube)
Färbelösung 2	1) 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat in 1 ml der 0,1 M Na-Acetat-Gebrauchslösung mischen (Eppendorf-Tube) 2) 35 mg Echtrotsalz in 1 ml der 0,1 M Na-Acetatgebrauchslösung mischen (Eppendorf-Tube) 3) Beide Ansätze in die restliche 0,1 M Na-Acetatgebrauchslösung geben
TRAP-Färbelösung	Färbelösung 1 zu Färbelösung 2 geben
Shandon Instant Hämatoxylin	Stammlösung: A und B in 1 l Aqua bidest. Mischen Gebrauchslösung: Stammlösung + Aqua bidest. (Verhältnis 1 : 3)

## Anhang

**Tabelle 17: Arbeitsanweisung für die TRAP-Färbung.**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Wiederholung</b>	<b>Zeit</b>
Proben auftauen	1x	60 Min.
1x PBS	1x	20 Min.
100 % Ethanol	1x	5 Min.
96 % Ethanol	1x	5 Min.
70 % Ethanol	1x	5 Min.
Spülen mit Aqua dest.	2x	5 Min.
Spülen mit 0,1 M Na-Acetatpuffer	1x	10 Min.
Schnitte einkreisen (Pap Pen)		
Negativkontrolle: Nur Färbelösung 2	1x	30 Min. bei 37 °C in feuchter Dunkelkammer
Färben: TRAP-Färbelösung	1x	30 Min. bei 37 °C in feuchter Dunkelkammer
Objektträger von TRAP-Färbelösung abklopfen		
Spülen mit Aqua dest.	3x	5 Min.
Gegenfärben: Shandon Hämatoxylin	1x	4 Min.
Schnitte kurz in Aqua dest. eintauchen		
Bläuen in Leitungswasser	1x	10 Min.
Spülen in Aqua dest.	1x	5 Min.
Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine		

Sofern keine gesonderte Temperaturangabe in °C vorhanden ist, gilt Raumtemperatur.

## 11.6 ImageJ Makros

### 11.6.1 ROI-Auswertung

```
// author: Matthias Muelke; Institut für Experimentelle Unfallchirurgie Gießen
```

```
dir1=getDirectory("Input");
dir2=getDirectory("Working directory");

Dialog.create("settings");
Dialog.addCheckbox("Trabecular Thickness", true);
Dialog.addCheckbox("Trabecular Separation", true);
Dialog.addCheckbox("Trabecular Area", true);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addCheckbox("Osteoid Thickness", true);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addCheckbox("weka_stats", true);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addNumber("scale [pixels/μm] (microscope)", 1.55);
Dialog.show();
mode_Th = Dialog.getCheckbox();
mode_Sep = Dialog.getCheckbox();;
mode_Area = Dialog.getCheckbox();;
mode_Osteoid = Dialog.getCheckbox();;
mode_stats = Dialog.getCheckbox();;
scale = Dialog.getNumber();;

if (mode_Th==1 || mode_Sep==1 || mode_Area==1) {
Dialog.create("Trabecular measurement");
Dialog.addNumber("downsizing", 0.25);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addNumber("Threshold_min", 2);
Dialog.addNumber("Threshold_max", 3);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addCheckbox("draw ROI?", true);
Dialog.show();
downsizing_Tb = Dialog.getNumber();
min_Tb = Dialog.getNumber();;
max_Tb = Dialog.getNumber();;
roi_Tb= Dialog.getCheckbox();;
}else{
    roi_Tb = 0;
}

if (mode_Osteoid==1) {
Dialog.create("Osteoid measurement");
Dialog.addNumber("downsizing", 1);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addNumber("Threshold_min", 2);
Dialog.addNumber("Threshold_max", 2);
Dialog.addMessage("");
Dialog.addCheckbox("draw ROI?", true);
Dialog.show();
downsizing_O = Dialog.getNumber();
min_O = Dialog.getNumber();;
max_O = Dialog.getNumber();;
roi_O= Dialog.getCheckbox();;

if (roi_O==0) {
Dialog.create("Osteoid measurement");
Dialog.addCheckbox("measurement with no ROI?", true);
Dialog.show();
roi_O_no= Dialog.getCheckbox();
}else{
    roi_O_no = 0;
}
}else{
    roi_O = 0;
}

if (roi_Tb==1 && roi_O==1) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Trabecular and Osteoid measurement use same ROI?", true);
Dialog.show();
roi_Tb_O = Dialog.getCheckbox();
}else{
    roi_Tb_O = 0;
}
}
```

## Anhang

```
if (mode_stats==1) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to draw a ROI for Weka_stats?", true);
Dialog.show();
roi_stats = Dialog.getCheckbox();

if (roi_stats==1 && roi_Tb_O==1) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to use the ROI of Trabecular and Osteoid measurement for Weka_stats?", true);
Dialog.show();
roi_stats_Tb_O = Dialog.getCheckbox();

if (roi_stats_Tb_O==0) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to use the ROI of Trabecular measurement for Weka_stats?", true);
Dialog.show();
roi_stats_Tb = Dialog.getCheckbox();

if (roi_stats_Tb==0) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to use the ROI of Osteoid measurement for Weka_stats?", true);
Dialog.show();
roi_stats_O = Dialog.getCheckbox();
}else{
roi_stats_O=0;
}
}else{
roi_stats_Tb=0;
roi_stats_O=0;
}
}else{
roi_stats_Tb_O=0;
roi_stats_Tb=0;
roi_stats_O=0;
}

if (roi_stats==1 && roi_Tb==1 && roi_O==0) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to use the ROI of Trabecular measurement?", true);
Dialog.show();
roi_stats_Tb = Dialog.getCheckbox();
}else{
roi_stats_Tb=0;
}

if (roi_stats==1 && roi_Tb==0 && roi_O==1) {
Dialog.create("ROI");
Dialog.addCheckbox("Do you want to use the ROI of Osteoid measurement?", true);
Dialog.show();
roi_stats_O = Dialog.getCheckbox();
}else{
roi_stats_O=0;
}

}else{
roi_stats_Tb_O=0;
roi_stats_Tb=0;
roi_stats_O=0;
roi_stats=0;
}

if(File.exists(dir2+"Thickness")) {
print("folder already exists");
}else{
myDir3=dir2+"Thickness"+File.separator;
File.makeDirectory(myDir3);
print("new folder created");
}

dir3=dir2+"Thickness\\";

if(File.exists(dir2+"Separation")) {
print("folder already exists");
}else{
myDir4=dir2+"Separation"+File.separator;
File.makeDirectory(myDir4);
print("new folder created");
}
dir4=dir2+"Separation\\";
```

## Anhang

```
if(File.exists(dir2+"Osteoid")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir5=dir2+"Osteoid"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir5);
    print("new folder created");
}

dir5=dir2+"Osteoid\\";

setBatchMode(false);

if (roi_Tb_O==1) {
if(File.exists(dir2+"roi_Tb_O")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir6=dir2+"roi_Tb_O"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir6);
    print("new folder created");
}
dir6=dir2+"roi_Tb_O\\";

list = getFileList(dir1);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file1=dir1+list[j];

open(file1);
waitForUser("draw ROI");
saveAs("Tiff", dir6+list[j]+".tif");
close();
}
}else{

if(File.exists(dir2+"roi_Tb")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir6=dir2+"roi_Tb"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir6);
    print("new folder created");
}
dir6=dir2+"roi_Tb\\";
if (roi_Tb==1) {
list = getFileList(dir1);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file1=dir1+list[j];

open(file1);
waitForUser("draw ROI for trabecular measurement");
saveAs("Tiff", dir6+list[j]+".tif");
close();
}
}
if (roi_O==1) {
if(File.exists(dir2+"roi_O")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir7=dir2+"roi_O"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir7);
    print("new folder created");
}
dir7=dir2+"roi_O\\";
list = getFileList(dir1);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file1=dir1+list[j];

open(file1);
waitForUser("draw ROI for Osteoid measurement");
saveAs("Tiff", dir7+list[j]+".tif");
close();
}
}
}

if (roi_stats==1 && roi_stats_Tb_O==0 && roi_stats_Tb==0 && roi_stats_O==0) {

if(File.exists(dir2+"ROI_stats")) {
    print("folder already exists");
}else{
    myDir9=dir2+"ROI_stats"+File.separator;
    File.makeDirectory(myDir9);
    print("new folder created");
}
}
```

## Anhang

```
dir9=dir2+"ROI_stats\\";

list = getFileList(dir1);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file1=dir1+list[j];

open(file1);
waitForUser("draw ROI for Weka stats");
saveAs("Tiff", dir9+list[j]+".tif");
close();
}
}

if (mode_Th==1 || mode_Sep==1 || mode_Area==1) {

setBatchMode(false);
if (roi_Tb==0) {
list = getFileList(dir1);
for (j=0; j<list.length; j++) {
open(dir1+list[j]);
saveAs("Tiff", dir6+list[j]);
close();
}
}

if (mode_Th==1) {
list = getFileList(dir6);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file2=dir6+list[j];

open(file2);
run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
setThreshold( min_Tb, max_Tb);
run("Convert to Mask");
roiManager("Select", 0);
run("Colors...", "foreground=green background=black selection=yellow");
setOption("BlackBackground", true);
run("Clear Outside");

run("Make Binary");

run("Scale...", "x=downsizing_Tb y=downsizing_Tb interpolation=Bilinear average create");
run("Make Binary");
run("Thickness", "thickness graphic");

saveAs("Tiff", dir3+list[j]+".1.tif");
close();
close();
close();
roiManager("Delete");
setResult("measurement", j, "Thickness");

}

while (nImages>0) {
selectImage(nImages);
close();
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir2+"Results_Thickness_"+TimeString+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
```

## Anhang

```
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");

}

if (mode_Sep==1) {
list = getFileList(dir6);
for (j=0; j<list.length; j++) {
file2=dir6+list[j];

open(file2);
run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
setThreshold( min_Tb, max_Tb);
run("Convert to Mask");
roiManager("Select", 0);
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");

run("Colors...", "foreground=green background=white selection=yellow");
setBackground(255, 255, 255);
run("Clear Outside");

run("Make Binary");

run("Scale...", "x=downsizing_Tb y=downsizing_Tb interpolation=Bilinear average create");
run("Make Binary");
run("Invert");
run("Thickness", "spacing graphic");

saveAs("Tiff", dir4+list[j]+"2.tif");
close();
close();
close();
setResult("measurement ", j, "Separation");
roiManager("Delete");
}

while (nImages>0) {
selectImage(nImages);
close();
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir2+"Results_Separation_"+TimeString+".xls");

selectWindow("Results");
run("Close");

selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
}

if (mode_Area==1) {

list = getFileList(dir6);
setBatchMode( true );
run("Set Measurements...", "area area_fraction redirect=None decimal=3");
for (j=0; j<list.length; j++) {
open(dir6+list[j]);

run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
run("ROI Manager...");
```

## Anhang

```
roiManager("Add");
setThreshold( min_Tb, max_Tb);
run("Convert to Mask");
roiManager("Select", 0);
run("Colors...", "foreground=green background=black selection=yellow");
setOption("BlackBackground", true);
run("Clear Outside");

l=3*;

run("Measure");
run("Clear Outside");
run("Make Binary");
run("Invert");

// id values of each class in the classified image
classLabels = newArray( 0, 1 );

run("Set Measurements...", "area area_fraction redirect=None decimal=3");

for( i=0; i<classLabels.length; i ++ )
{
  minTh = classLabels[ i ];
  maxTh = classLabels[ i ];
  if( i < classLabels.length - 1 )
    maxTh = classLabels[ i+1 ] -1;
  else // last value is assumed to be 255
  {
    minTh = classLabels[ i-1 ] +1;
    maxTh = classLabels[ i ];
  }
  selectWindow(list[j]);
  run("Duplicate...", "title=[to-be-thresholded]"); selectWindow("to-be-thresholded");
  setThreshold( minTh, maxTh );
  run("Convert to Mask");
  run("Measure");
  close();
}
close();
new=getResult("Area",l);
new2=getResult("Area",l+1);
new3=getResult("%Area",l+1);
setResult("Tb.Ar/T.Ar", l, new3/(new/new2));
setResult("name", l, list[j]);
roiManager("Delete");
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_ ";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_ ";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir2+"Results_Area_"+TimeString+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
}
}

if (mode_Osteoid==1) {
setBatchMode(false);
if (roi_O==1) {
if (roi_Tb_O==1) {
list = getFileList(dir6);
}else{
list = getFileList(dir7);
}
}else{
list = getFileList(dir1);
}
}
for (j=0; j<list.length; j++) {
if (roi_O==1) {
if (roi_Tb_O==1) {
file4=dir6+list[j];
```

## Anhang

```
open(file4);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}else{
file4=dir7+list[j];
open(file4);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}
}else{
if (roi_O_no==0){
file4=dir1+list[j];
open(file4);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}else{
file4=dir1+list[j];
open(file4);
}
}

run("Set Scale...", "distance=scale known=1 pixel=1 unit=µm");
setThreshold( min_O, max_O);
run("Convert to Mask");
run("Scale...", "x=downsizing_O y=downsizing_O interpolation=Bilinear average create");

run("Make Binary");
run("Thickness", "thickness graphic");

saveAs("Tiff", dir5+list[j]+"O_Th.tif");
close();
close();
setResult("measurement", j, "Osteoid_Thickness");
}

while (nImages>0) {
selectImage(nImages);
close();
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir2+"Results_Osteoid_Thickness_"+TimeString+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
}

if (mode_stats==1) {
setBatchMode( true );

if (roi_stats==0) {
list = getFileList(dir1);
}else{
if (roi_stats_Tb_O==1 || roi_stats_Tb==1) {
list = getFileList(dir6);
}
if (roi_stats_O==1) {
list = getFileList(dir7);
}
if (roi_stats_Tb_O==0 && roi_stats_Tb==0 && roi_stats_O==0) {
list = getFileList(dir9);
}
}
for (j=0; j<list.length; j++) {

if (roi_stats==0) {
open(dir1+list[j]);
```

## Anhang

```
}else{
if (roi_stats_Tb_O==1 || roi_stats_Tb==1) {
open(dir6+list[j]);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}
if (roi_stats_O==1) {
open(dir7+list[j]);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}
if (roi_stats_Tb_O==0 && roi_stats_Tb==0 && roi_stats_O==0) {
open(dir9+list[j]);
run("Clear Outside");
setOption("BlackBackground", true);
}
}

// id values of each class in the classified image
classLabels = newArray( 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 );

run("Set Measurements...", "area_fraction redirect=None decimal=3");

for( i=0; i<classLabels.length; i ++ )
{
minTh = classLabels[ i ];
maxTh = classLabels[ i ];
if( i < classLabels.length - 1 )
maxTh = classLabels[ i+1 ] -1;
else // last value is assumed to be 255
{
minTh = classLabels[ i-1 ] +1;
maxTh = classLabels[ i ];
}
selectWindow(list[j]);
run("Duplicate...", "title=[to-be-thresholded]"); selectWindow("to-be-thresholded");
setThreshold( minTh, maxTh );
run("Convert to Mask");
run("Measure");
close();
}
close();
k=10";
setResult("name", k, list[j]);
}
while (nImages>0) {
selectImage(nImages);
close();
}

MonthNames = newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
TimeString =DayNames[dayOfWeek]+"_";
if (dayOfMonth<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+dayOfMonth+"-"+MonthNames[month]+"-"+year+"_";
if (hour<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+hour+"-";
if (minute<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+minute+"-";
if (second<10) {TimeString = TimeString+"0";}
TimeString = TimeString+second;

saveAs("Results", dir2+"Results_weka_stats_"+TimeString+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
}
}
```

## 11.6.2 Binärbild mit Schwellenwert-Auswahl zur Trabekeldickenbestimmung

### Schwellenwert: 00

```
//Hier Skalierung nach Fotoaufnahme eintragen  
scale=0.77
```

```
dir1=getDirectory("Input");  
dir2=getDirectory("Output");
```

```
list = getFileList(dir1);  
for (j=0; j<list.length; j++) {  
file1=dir1+list[j];
```

```
open(file1);  
run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
```

```
setAutoThreshold("Default");  
run("Threshold...");  
setThreshold(0, 0);  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask");  
run("RGB Color");
```

```
saveAs("Tiff", dir2+list[j]);  
close();  
}  
while (nImages>0) {  
selectImage(nImages);  
close();  
}
```

### Schwellenwert: 33

```
//Hier Skalierung nach Fotoaufnahme eintragen  
scale=0.77
```

```
dir1=getDirectory("Input");  
dir2=getDirectory("Output");
```

```
list = getFileList(dir1);  
for (j=0; j<list.length; j++) {  
file1=dir1+list[j];
```

```
open(file1);  
run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
```

```
setAutoThreshold("Default");  
run("Threshold...");  
setThreshold(3, 3);  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask");  
run("Create Selection");  
run("RGB Color");  
setBackground(255, 255, 255);  
run("Clear Outside");
```

```
saveAs("Tiff", dir2+list[j]);  
close();  
}  
while (nImages>0) {  
selectImage(nImages);  
close();  
}
```

## 11.6.3 Binärbild zur Bestimmung der Knochenfläche bei der TRAP-Färbung

```
//Hier Skalierung nach Fotoaufnahme eintragen  
scale=0.77
```

```
dir1=getDirectory("Input");  
dir2=getDirectory("Output");
```

```
list = getFileList(dir1);  
for (j=0; j<list.length; j++) {  
file1=dir1+list[j];
```

```
open(file1);  
run("Set Scale...", "distance=scale known=1 unit=µm");
```

```
run("Enhance Contrast...", "saturated=5 equalize");
```

## Anhang

```
run("Color Threshold...");
// Color Thresholder 2.0.0-rc-65/1.52b
// Autogenerated macro, single images only!
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=0;
filter[1]="pass";
min[2]=149;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i], max[i]);
  run("Convert to Mask");
  if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----

saveAs("Tiff", dir2+list[j]);
close();
}
while (nImages>0) {
  selectImage(nImages);
  close();
}
```

## 11.7 Ergebnistabellen

### 11.7.1 Bestimmung der BMD mittels DXA

**Tabelle 18: Analyse der BMD.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	15	0,17	0,24	0,2	0,2	± 0,02
KO	20	0,21	0,33	0,25	0,25	± 0,03

Angegeben in g/cm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 19: Analyse der BMD nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	33-34	8	0,17	0,22	0,18	0,19	± 0,02
	KO	33-34	9	0,21	0,28	0,23	0,23	± 0,02
2	WT	40-42	7	0,19	0,24	0,21	0,21	± 0,02
	KO	40-42	11	0,24	0,33	0,26	0,27	± 0,03

Angegeben in g/cm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

### 11.7.2 Analyse der mineralisierten Knochenmatrix

**Tabelle 20: Analyse des prozentualen Anteils mineralisierter Knochenmatrix.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	36	66,48	98,07	88,36	86,44	± 7,89
KO	29	70,24	99,25	93,32	92,29	± 6,26

Angegeben in %. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 21: Analyse des prozentualen Anteils mineralisierter Knochenmatrix nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	13	69,58	93	84,25	83,39	± 7,79
	KO	6	12	70,24	95,98	91,28	89,52	± 6,53
2	WT	16	10	66,48	97,63	89,16	86,64	± 9,77
	KO	17	6	80,08	99,05	94,82	92,65	± 7,13
3	WT	28	5	76,06	98,07	88,03	87,95	± 8,35
	KO	29	4	86,26	99,25	91,37	92,06	± 6,15
4	WT	38	8	85,11	94,74	90,59	90,22	± 3,06
	KO	39	7	94,25	98,94	97,42	96,86	± 1,9

Angegeben in %. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

### 11.7.3 Quantifizierung der Trabekeldicke

**Tabelle 22: Analyse der Trabekeldicke.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	36	36,37	94,46	61,26	61,05	± 14,16
KO	29	29,69	102,04	62,28	63,29	± 16,28

Angegeben in g/cm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 23: Analyse der Trabekeldicken nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	13	36,67	67,6	48,32	50,83	± 9,1
	KO	6	12	48,75	76,72	56,51	61,31	± 9,33
2	WT	16	10	63,42	94,46	69,28	73,99	± 11,91
	KO	17	6	29,69	82,26	52,78	54,1	± 23,75
3	WT	28	5	44,03	56,98	53,27	51,58	± 5,73
	KO	29	4	50,4	65,92	62,21	60,19	± 7,2
4	WT	38	8	57,06	90,52	63,35	67,43	± 10,77
	KO	39	7	59,65	102,04	66,73	76,36	± 16,83

Angegeben in g/cm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

### 11.7.4 Untersuchung der Osteoblasten-Aktivität

**Tabelle 24: Analyse der ALP-positiven Fläche.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	36	0,01	22,78	7,44	8,12	± 7,65
KO	30	0,2	17,68	6,26	6,53	± 6,17

Angegeben in %. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 25: Analyse der ALP-positiven Fläche nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	13	0,03	1,48	0,42	0,5	± 0,39
	KO	6	12	0,2	0,88	0,5	0,52	± 0,25
2	WT	16	9	7,48	22,78	15	14,8	± 4,48
	KO	17	7	1,37	13,98	8,82	8,42	± 4,09
3	WT	28	6	0,01	19,4	5,6	6,84	± 7,14
	KO	29	4	2,41	17,68	11,41	10,73	± 6,54
4	WT	38	8	7,4	22,28	12,74	13,97	± 5,23
	KO	39	7	6,5	16,83	13,4	12,53	± 3,93

Angegeben in %. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

### 11.7.5 Vergleich der Osteozyten-Quantität

**Tabelle 26: Anzahl spindelförmige Osteozyten.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Fotos	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	27	936	0	963,87	187,61	210,62	± 137,17
KO	29	1155	0	862,36	253,85	263,88	± 151,16

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 27: Anzahl spindelförmiger Osteozyten nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Fotos (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	8	252	0	626,27	117,03	140,97	± 110,86
	KO	6	11	389	0	669,37	143,15	166,19	± 134,85
2	WT	16	8	273	0	813,9	245,42	257,46	± 143,36
	KO	17	7	282	10,66	862,36	274,88	295,03	± 168,01
3	WT	28	5	239	0	963,87	178,61	204,66	± 132,43
	KO	29	4	190	11,01	804,82	283,16	296	± 145,83
4	WT	38	6	172	19,96	659,58	189,4	220,87	± 139,44
	KO	39	7	294	0	680,54	294,59	296,33	± 128,51

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 28: Anzahl leerer Lakunen.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Fotos	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	27	936	0	578,21	84,63	94,12	± 61
KO	29	1155	0	447,24	101,7	108,85	± 64,34

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 29: Anzahl leerer Lakunen nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Fotos (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	8	252	0	299,52	78,35	83,5	± 56,26
	KO	6	11	389	0	386,36	78,62	87,45	± 65,36
2	WT	16	8	273	0	327,15	103,02	102,89	± 55,75
	KO	17	7	282	0	447,24	111,44	124,32	± 77,92
3	WT	28	5	239	0	191,24	58,9	64,22	± 39
	KO	29	4	190	0	404,24	98,66	106,09	± 63,14
4	WT	38	6	172	0	578,21	115,41	126,16	± 80,73
	KO	39	7	294	0	320,39	99,59	105,74	± 48,93

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

## Anhang

**Tabelle 30: Gesamtanzahl an Osteozyten.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Fotos	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	27	936	7,09	1393,28	360,54	401,14	± 235,54
KO	29	1155	10,78	1590	471,68	480,6	± 255,3

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 31: Gesamtanzahl an Osteozyten nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Fotos (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	8	252	4,63	1170,85	255,04	273,28	±189,66
	KO	6	11	389	4,66	1159,08	268,12	303,16	±231,87
2	WT	16	8	273	8,52	1380,09	464,55	481,44	±242,58
	KO	17	7	282	10,66	1409,9	499,36	531,77	±274,11
3	WT	28	5	239	10,27	1361,66	326,05	361,91	±204,67
	KO	29	4	190	22,02	1590	505,44	526,66	±256,72
4	WT	38	6	172	24,29	1393,28	408,83	465,74	±262,99
	KO	39	7	294	6,68	1207	549,96	551,09	±213,72

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 32: Anzahl runder Osteozyten.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Fotos	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	27	936	4,23	374,28	83,2	96,39	± 65,13
KO	29	1155	4,37	458,13	97,12	107,88	± 71,3

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 33: Anzahl runder Osteozyten nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Fotos (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	8	252	0	245,06	44,92	48,8	± 37,46
	KO	6	11	389	0	232,44	40,18	49,53	± 45,1
2	WT	16	8	273	0	341,61	116,35	121,09	± 68,91
	KO	17	7	282	0	358,06	99,29	112,42	± 67,24
3	WT	28	5	239	0	253,09	85,54	93,02	± 52,14
	KO	29	4	190	0	458,13	117,64	124,57	± 71,57
4	WT	38	6	172	0	374,28	100,71	118,71	± 75,14
	KO	39	7	294	0	346,02	142,43	149,02	± 67,42

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

### 11.7.6 Analyse der Osteoklasten-Anzahl und -Aktivität

**Tabelle 34: Osteoklasten-Anzahl.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	32	4,32	18,2	9,7	10,44	± 3,34
KO	27	2,78	17,31	6,83	7,56	± 3,32

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 35: Länge der *Ruffled Border*.**

Gruppe	Gruppen- größe (n)	Minimal- wert	Maximal- wert	Median	Mittelwert	SD
WT	32	0,19	1,25	0,47	0,49	± 0,23
KO	27	0,09	0,73	0,3	0,33	± 0,16

Angegeben in mm/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 36: Osteoklasten-Anzahl nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	9	6,94	16,92	12,81	12,18	± 3,67
	KO	6	10	6,83	17,31	9,85	10,59	± 2,86
2	WT	16	9	4,32	9,88	9,2	8,32	± 1,81
	KO	17	7	3,95	8,98	5,32	5,6	± 1,85
3	WT	28	6	8,02	18,2	9,23	10,51	± 3,83
	KO	29	4	2,78	10,87	6,84	6,83	± 3,4
4	WT	38	8	4,5	14,7	10,86	10,81	± 3,15
	KO	39	6	3,86	6,53	5,49	5,31	± 1,14

Angegeben in n/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

**Tabelle 37: Länge der *Ruffled Border* nach Zeitpunkten.**

Zeit- punkt	Gruppe	Alter (Wochen)	Gruppen- größe (n)	Minimal- Wert	Maximal- Wert	Median	Mittel- wert	SD
1	WT	6	9	0,27	1,25	0,61	0,59	± 0,29
	KO	6	10	0,28	0,73	0,45	0,46	± 0,13
2	WT	16	9	0,19	0,52	0,4	0,42	± 0,1
	KO	17	7	0,16	0,5	0,22	0,25	± 0,11
3	WT	28	6	0,26	1,14	0,38	0,49	± 0,33
	KO	29	4	0,09	0,56	0,27	,3	± 0,2
4	WT	38	8	0,21	0,64	0,51	0,48	± 0,15
	KO	39	6	0,15	0,32	0,24	0,24	± 0,07

Angegeben in mm/mm<sup>2</sup>. Zum Vergleich mit internationaler Literatur ist der Mittelwert hinzugefügt.

## 12 Publikationsverzeichnis und Förderungen

- **Sogl Y.**, Malhan D., Stoetzel S., Peters D., Peeva P., Bader M., Alenina N., Kern S., Heiß C., El Khassawna T., (2019), „Tph2: Mein Kopf reguliert meine Knochen!“, Posterpräsentation auf dem dritten Science Day des Fachbereich Medizin der JLU Gießen.
- Die Promotion im Rahmen dieser Dissertation wurde durch das JLU TRAINEE-Stipendium gefördert.

### 13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## 14 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna**, der mir das interessante Promotionsthema anvertraut hat. Vom ersten Tag an konnte ich seine Leidenschaft für die Knochenphysiologie spüren. Er war es, der mir ersichtlich machte, dass sich Durchhaltekraft und Frustrationstoleranz letztlich durch Erreichen seiner Wünsche und Ziele immer auszahlen.

Nächster Dank gilt **Deeksha Malhan, PhD**. Als erste Ansprechpartnerin für Laborarbeiten stand sie mir Tag und Nacht zur Seite und hatte auf meine vielen Fragen stets die passenden Antworten. Den gemeinsamen Silbernitrat-Färbe-Sonntag werde ich nicht vergessen.

Natürlich gelten meine Anerkennung sowie meine Dankbarkeit **Annette Stengel** und dem gesamten Team der experimentellen Unfallchirurgie am UKGM Gießen, namentlich **Dr. rer. nat. Sabine Stoetzel, Olga Dakischew, Ida Oberst** und **Prof. Dr. rer. nat. Kathrin Lips**. Nicht zuletzt möchte ich **Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Christian Heiß** für die Bereitstellung des Labors und des gesamten Inventars danken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch **Prof. Dr. rer. nat. Michael Bader** und dem **MDC** für die Verantwortung des Tierversuchs und die Bereitstellung der Gewebeproben meinen Dank aussprechen.

Danke sagen möchte ich auch Herrn **Helge Hudel** vom Institut für medizinische Informatik. Seine statistische Expertise, insbesondere aber auch seine motivierende Art war mir bei Erhebung und Interpretation der Ergebnisse eine große Hilfe.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei **meiner Familie** bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen. **Meine Eltern, mein Bruder und auch meine Lebensgefährtin** hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich und haben mir immer den Rücken gestärkt.

**Danke.**