

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Skelettreifung auf die Knochenmasse und adaptive
Knochenantwort bei mechanischer Belastung in *Sost* KO/
Sclerostin-defizienten Mäusen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David Pflanz
aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 07.12.2018

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 25.08.2017 in Scientific Reports unter dem Titel „Sost deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression“ (DOI: 10.1038/s41598-017-09653-9) veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Abstracts	5
1.1	Deutsch	5
1.2	Englisch	6
2	Einleitung und Fragestellung	8
2.1	Knochenstrukturveränderungen am Beispiel der Osteoporose	8
2.2	Grundlagen der Knochenbiologie	9
2.2.1	Knochentypen und -kompartimente	9
2.2.2	Grundlagen des ossären Ana- und Katabolismus und Wolffsches Gesetz . .	10
2.3	Sclerostin und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	12
2.4	Sclerostin und mechanische Belastung	14
2.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
3	Methodik	16
3.1	Mauszucht und Genotypisierung	16
3.2	In vivo Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung in der Maustibia	16
3.3	Mechanische Belastung der Maustibia in vivo	18
3.4	Longitudinale in vivo microCT der kortikalen Tibiadiaphyse und der sekundären Spongiosa der Tibiametaphyse	20
3.5	MicroCT Analyse der statischen Knochenparameter der Kortikalis und der sekundären Spongiosa	21
3.6	Dynamische Histomorphometrie	23
3.7	Statistische Analysen	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Dehnungs-Belastungs-Relationen am tibialen Mittelschaft	27
4.2	Einfluss der skeletalen Reifung auf die ossäre Morphologie und Formation in Abwesenheit zusätzlicher mechanischer Stimuli	29
4.2.1	Kortikales Kompartiment	29
4.2.2	Trabekuläres Kompartiment	31
4.3	Einfluss des Genotyps auf die Knochenmasse und deren Dynamik während der skeletalen Reifung in Abwesenheit zusätzlicher mechanischer Stimuli	33
4.3.1	Kortikales Kompartiment	33
4.3.2	Trabekuläres Kompartiment	34

4.4	Einfluss des Genotyps auf die adaptive Knochenantwort bei mechanischer Belastung	34
4.4.1	Kortikales Kompartiment	35
4.4.2	Trabekuläres Kompartiment	37
4.5	Einfluss des Alters auf die adaptive Knochenantwort bei mechanischer Belastung .	39
4.5.1	Kortikales Kompartiment	40
4.5.2	Trabekuläres Kompartiment	40
5	Diskussion	42
5.1	Zusammenfassung	42
5.2	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschung	43
5.3	Limitationen	46
5.4	Fazit und Ausblick	49
	Literaturverzeichnis	50
	Abkürzungsverzeichnis	59
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	61
	Eidesstattliche Versicherung	62
	Lebenslauf	63
	Publikationsliste	65
	Danksagung	67

1 Abstracts

1.1 Deutsch

Einleitung

Die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung zu verstehen ist ein wichtiger Schritt um ossäre Erkrankungen wie z.B. Osteoporose therapieren zu können. Kürzlich wurde mit dem Hormon Sclerostin, dem Produkt des *Sost* Gens, ein wichtiger Inhibitor des knochenanabolen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs identifiziert. Daher wurde angenommen, dass die Herabregulation von Sclerostin ein notwendiger Schritt für die Mechanosensibilität des Knochens ist. Es konnte jedoch in weiblichen, jungen, langzeit-Sclerostin-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die adaptive Knochenantwort auch über Sclerostin-unabhängige Signalwege auftritt. Es existieren jedoch unterschiedliche Ergebnisse wie Sclerostin-Defizienz die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung verändert. Weiterhin ist bekannt, dass die Mechanosensibilität in Wildtyp-Mäusen mit zunehmendem Skelettalter abnimmt. Insgesamt gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse hinsichtlich des Effektes der skeletalen Reifung mit zunehmendem Alter auf die Knochenmorphologie und Mechanosensibilität in langzeit-Sclerostin-defizienten Individuen. Diese Erkenntnisse sind jedoch notwendig, da sich Sclerostin-Antikörper aktuell in der klinischen Testphase als Behandlungsoption gegen Osteoporose befinden. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt des Alters auf die Knochenmorphologie und Mechanosensibilität im kortikalen und trabekulären Kompartiment in weiblichen, jungen und adulten *Sost* KO und Wildtyp-Mäusen untersucht.

Methodik

10 und 26 Wochen alte, weibliche *Sost* KO und Wildtyp-Wurfgeschwister wurden zwei Wochen lang einer dehnungskalibrierten, axial-kompressiven Belastung der linken Tibia ausgesetzt (+900 μ e am tibialen Mittelschaft, durch Dehnungs-Kalibrierungs-Experimente bestimmt). Die rechte Tibia wurde als interne Kontrolle genutzt. Die statischen und dynamischen Knochenparameter der Spongiosa und Kortikalis wurden mittels microCT an Tag 0, 5, 10 und 15 sowie dynamischer Histomorphometrie (zwischen Tag 3 und 12) untersucht.

Ergebnisse

Sost KO/ Sclerostin-defiziente Mäuse haben eine größere kortikale und trabekuläre Knochenmasse und höhere Knochenmassenzuwächse während der skeletalen Reifung als Wildtyp-Wurfgeschwis-

ter. *Sost* KO Mäuse beider Altersgruppen hatten eine erhöhte adaptive Knochenantwort im kortikalen Kompartiment. Im trabekulären Kompartiment war dies nur in jungen Mäusen der Fall. Die skeletale Reifung reduzierte die Mechanosensibilität in beiden Genotypen und Kompartimenten. Dies ließ sich im Speziellen in den *Sost* KO Mäusen nachweisen, da die Kontrolltiere insgesamt nur eine schwache Reaktion auf die mechanische Belastung zeigten.

Diskussion

Diese Arbeit bestätigt, dass für die adaptive anabole Reaktion des Knochens auf mechanische Belastung die Herabregulation von Sclerostin in jungen Mäusen nicht zwingend notwendig ist. Neu ist die Erkenntnis, dass dies auch für adulte Tiere gilt. Weiterhin nimmt diese, gegenüber den gleichaltrigen Wildtypen sogar erhöhte, Mechanosensibilität mit dem Alter ab. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Behandlungsoptionen welche eine (Langzeit-)Sclerostin-Suppression und zusätzliche körperliche Übungen beinhalten, altersabhängige Veränderungen der Mechanosensibilität des Knochens berücksichtigen sollten.

1.2 Englisch

Introduction

Understanding bone's mechanoresponsiveness is a crucial step for the treatment of bone disorders like osteoporosis. Recently Sclerostin, a product of the *Sost* gene, has been identified as an important inhibitor of the bone mass stimulating Wnt/ β -Catenin-pathway. Therefore Sclerostin-downregulation was thought to be a mandatory step in bone's mechanoresponsiveness, but it has been shown in female, young mice that mechanoresponsiveness can also occur via Sclerostin-independent pathways in long-term Sclerostin-deficient individuals. However, there are differing results how the bone's adaptive response to mechanical loading is being altered under Sclerostin-deficiency. It is also a known fact, that in wildtype mice the mechanoresponsiveness is reduced with skeletal maturation. However, there is little knowledge about the effects of skeletal maturation on the bone's morphology and mechanoresponsiveness in long-term Sclerostin-deficient individuals. But this is important knowledge, as there are currently Sclerostin-antibodies in clinical testing as treatment options against osteoporosis. Therefore this study determines the influence of age on the bone's morphology and mechanoresponsiveness in the trabecular and cortical bone compartment of young and skeletal mature female wildtype and *Sost* KO mice.

Methods

10 and 26 week old female *Sost* KO and breeding littermate mice were subjected to two weeks of strain matched in vivo axial-compressive loading of the left tibia (+900 $\mu\epsilon$ at the tibial midshaft, determined by strain gauging). The right tibia served as internal control. Static and dynamic trabe-

cular and cortical bone parameters were assessed with microCT at day 0, 5, 10 and 15 and dynamic histomorphometry (between day 3 and 12).

Results

Sost KO/ Sclerostin-deficient mice have a higher cortical and trabecular bone mass and higher bone mass gains during skeletal maturation than littermate mice. *Sost* KO mice of both ages had a higher adaptive response to loading in the cortical compartment. For the trabecular compartment, this was only true for young individuals. Skeletal maturation reduced the mechanoresponsiveness in both genotypes and in both compartments. This was especially detectable in *Sost* KO mice, as littermate mice overall showed only a small reaction to loading.

Discussion

This study confirms that Sclerostin-downregulation is not mandatory for the bone's adaptive response in young mice and shows, that this is also true for skeletal mature mice. Furthermore this mechanoresponsiveness is enhanced in *Sost* KO mice and reduced with age. These findings suggest that treatment strategies which include (long-term) Sclerostin-inhibition and additional exercise should consider changes in the bone's mechanoresponsiveness that occur at skeletal maturation.

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Knochenstrukturveränderungen am Beispiel der Osteoporose

Osteoporose ist eine weit verbreitete systemische Skeletterkrankung, die durch eine Abnahme der Knochendichte und -stabilität und ein dadurch erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert ist. Der Hauptmechanismus der Erkrankung besteht in einer Negativbilanz des Knochenstoffwechsels. Meist ist das trabekuläre Kompartiment zuerst und die Kortikalis erst später betroffen. Das höchste Frakturrisiko haben daher auch mechanisch stark beanspruchte Skelettanteile mit einem hohen prozentualen Anteil an Trabekeln: die (insbesondere unteren) Wirbelkörper und der proximale Femur (1, 2).

Unterschieden wird zwischen der primären und sekundären Osteoporose. Die primäre oder idiopathische Osteoporose ist häufig und entsteht ohne bekannte, auslösende Grundkrankheit oder Ursache. Sie wird weiter unterteilt in die idiopathische, juvenile Osteoporose (sehr selten), postmenopausale Osteoporose (Typ I) und die senile Osteoporose (Typ II) (1, 3).

Die mit der Menopause assoziierte Osteoporose Typ I betrifft einen Großteil aller Frauen und wird u.a. mit der sinkenden Östrogenmenge assoziiert. Die genauen biochemischen Hintergründe sind dabei immer noch unverstanden. Es sind mehrere Wirkungen von Östrogen u.a. auf

- a) das RANK-RANKL-OPG-System und damit die Osteoklastenaktivität,
- b) Sclerostin und folglich auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und
- c) die Produktion von Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β

beschrieben (3).

Die senile Osteoporose gilt als überwiegend altersassoziiertes, vermehrter Knochenabbau. Diese Form betrifft Männer und Frauen. Mischformen zwischen seniler und postmenopausaler Osteoporose sind bei Frauen jedoch möglich und nur schwer voneinander zu differenzieren (4, 5). Es werden zahlreiche Einflussfaktoren auf die Prävalenz der Osteoporose diskutiert, u.a. die ethnische Herkunft und damit hereditäre Ursachen, Umweltfaktoren wie Bewegung und Ernährung sowie altersassoziierte Veränderungen im Knochenstoffwechsel (4–7). Insgesamt sind die genauen Ursachen der senilen Osteoporose im Detail jedoch noch unverstanden. Die sekundäre Osteoporose ist im Verhältnis zur primären Form selten und durch eine auslösende Ursache charakterisiert, z.B.:

- Medikamentös: Langzeittherapie mit Kortikosteroiden oder Heparin
- Hormonell: Hyperkortisolismus

- Immobilisation (1).

Die osteoporoseassoziierten Frakturen verursachen direkt oder über Folgeerkrankungen indirekt eine hohe Mortalität und Morbidität im betroffenen, überwiegend älteren Patientenkollektiv (4, 5). Außerdem entstehen durch osteoporotische Frakturen jedes Jahr enorme Behandlungskosten für das Gesundheitssystem (exemplarisch für die USA und Europa zusammen in 2010: mehr als 45 Milliarden Dollar) (8, 9). Genaue Daten zur Prävalenz und Inzidenz der idiopathischen Osteoporose sind indes nur schwer zu erheben, da die Knochenstruktur und -dichte nicht routinemäßig untersucht wird und osteoporotische Frakturen mitunter asymptomatisch bleiben (10). Eine Studie von 2010 zeigte, dass in Europa zu diesem Zeitpunkt ca. 22 Millionen Frauen und ca. 5,5 Millionen Männer an Osteoporose litten und dass dadurch ca. 3,5 Millionen Frakturen verursacht wurden (10). Primäre Osteoporose ist bei Frauen sehr viel häufiger als bei Männern gleichen Alters und man geht von einer ansteigenden Prävalenz mit zunehmendem Alter aus (4, 10, 11). Durch die steigende durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung wird mit ebenfalls ansteigenden Kosten zur Behandlung der Osteoporose und ihrer Folgen gerechnet (10–12).

Die sekundäre Osteoporose wird vorwiegend über die Behandlung der auslösenden Ursachen therapiert (13, 14). Gegen die primäre Osteoporose gibt es mehrere Therapieansätze u.a. Bewegungstherapie, Vitamin D- und Kalziumsubstitution, Bisphosphonate, Parathyroid-Hormon und Hormonsubstitution (13, 14). Ein neuerer Therapieansatz ist ein monoklonaler Antikörper namens Denosumab. Dieser bewirkt eine gezielte Hemmung am RANK-Liganden und führte in Studien zu einer signifikanten Erhöhung der Knochenmasse in lumbalen Wirbelkörpern (14, 15). Insgesamt ist die Wirksamkeit bisheriger Therapieverfahren in der klinischen Routine jedoch unzureichend. Aktuell sind daher auch zwei neue, antikörperbasierte Therapieansätze in der Phase III der klinischen Testung: Romosozumab und Blosozumab. Beide Stoffe sind Antikörper gegen Sclerostin, das Genprodukt des *Sost* Genes (siehe hierzu 2.3 und 2.4) (16, 17).

2.2 Grundlagen der Knochenbiologie

2.2.1 Knochentypen und -kompartimente

Als Skelett (auch „Skelet“, aus dem Griechischen „skeletós“ - „ausgetrockneter Körper“/ „Mumie“), werden in der Anatomie jene Körperbestandteile eines Lebewesens bezeichnet, welche dessen Stützstruktur bilden. Prinzipiell unterscheidet man zwei Skelettarten: das, die äußere Hülle eines Organismus bildende, Exoskelett und das sogenannte Endoskelett, welches eine Stützstruktur innerhalb eines Organismus bildet. Das Skelett der Wirbeltiere und damit auch des Menschen ist ein aus einzelnen Knochen bestehendes Endoskelett. Die Knochen können anatomisch z.B. nach ihrer Form in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden:

- Ossa longa, z.B. Humerus,
- Ossa brevia, z.B. Os cuboideum,

- Ossa plana, z.B. Scapula,
- Ossa pneumatica, z.B. Os frontale,
- Ossa sesamoidea, z.B. Patella und
- Ossa irregularia/ accessoria, z.B. Os trigonum (18–20).

Histologisch lassen sich zwei hauptsächliche Knochenkompartimente unterscheiden: Die Substantia compacta (kurz „Kompakta“) besteht aus sehr kompakt liegenden Lamellen und Osteonen direkt unterhalb des Periosts und gibt dem Knochen seine äußere Form (20, 22). Die Kompakta wird auch als Kortikalis bezeichnet. Hinsichtlich der Morphologie kann man in ihr statische Parameter wie z.B. die kortikale Dicke, die ossifizierte Gesamtfläche und die Mineraleichte erfassen (21). Die Substantia spongiosa (kurz „Spongiosa“) dagegen liegt im Inneren, umgeben von der Kortikalis und besteht aus schwammartig dreidimensional vernetzten Knochenbalken, den Trabekeln (20, 22). Die Spongiosa ist aufgrund der Trabekelausrichtung und -struktur maßgeblich mitverantwortlich für die Stabilität des Knochens. In den von den Trabekeln gebildeten Hohlräumen befinden sich die biologischen Nischen für unterschiedliche Zellarten wie z.B. die B-Gedächtniszellen oder die hämatopoetischen Stammzellen (20). Morphologisch werden in der Spongiosa z.B. die Anzahl an Trabekeln pro Volumeneinheit, die Trabekeldicke und das prozentuale trabekuläre Knochenvolumen erfasst (21).

2.2.2 Grundlagen des ossären Ana- und Katabolismus und Wolffsches Gesetz

Das Skelettsystem ist ständigen Auf- und Abbauprozessen unterworfen und keineswegs ein starres Gerüst. Der Großteil der ossären Matrix besteht aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) und anderen organischen Matrixproteinen. Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sind die drei Grundzellarten der Knochen. Osteoblasten sind dabei hauptsächlich für anabole Prozesse und Osteoklasten eher für ossären Katabolismus zuständig. Die Osteozyten sind hinsichtlich des ossären Ana- und Katabolismus neutral und wurden daher in der Vergangenheit häufig als inaktiv bezeichnet. Ihnen wird nun jedoch eine elementare Rolle in der Sensor- und Steuerfunktion hinsichtlich mechanischer Reize und der Regulierung von Wachstumssignalen im Knochen zugeschrieben (22, 23).

Knochenanabolismus (oder auch Osteogenese bzw. Ossifikation) kann auf zwei unterschiedlichen Wegen stattfinden:

1. Desmale oder direkte Ossifikation

Von Osteoblasten, die über die Differenzierung von mesenchymalen Zellen über Vorläuferzellen entstehen, wird sogenanntes Osteoid (Knochengrundsubstanz) aufgebaut welches anschließend mineralisiert. Die sich so aufbauende, mineralisierte Knochensubstanz mauert die Osteoblasten schrittweise ein. Dadurch differenzieren diese zu Osteozyten und ruhen hinsichtlich der Osteogenese. Diese Art der Knochenbildung findet man vorwiegend in den

Ossa plana. Der so gebildete Knochen wird als Geflecht-, Deck-, Bindegewebs- oder Belegknochen bezeichnet (22, 24, 25).

2. Chondrale oder indirekte Ossifikation

Bei dieser Ossifikationsart entwickelt sich zuerst aus dem mesenchymalen Grundgerüst ein knorpeliges Primordalskelett, das dann in einem zweiten Schritt ossifiziert wird. Der so gebildete Knochen wird Ersatzknochen genannt. Diese Art der Ossifikation kann hierbei entweder von innen heraus (enchondrale Ossifikation) oder von außen her (perichondrale Ossifikation) auftreten. Bei der enchondralen Ossifikation differenzieren sich in das Primordalskelett eingeschwemmte, mesenchymale Zellen zu Chondroklasten und Osteoblasten. Diese Zellarten bauen erstens den Knorpel ab (Chondroklasten) und zweitens ossifizierte Matrix auf (Osteoblasten). Dieser Prozess tritt an den Epiphysenfugen und im Knocheninnenraum, dem späteren Knochenmarkraum, auf und dient vorwiegend dem Längenwachstum. Bei der perichondralen Ossifikation werden vom Periost her Osteoblasten ringförmig um das Primordalskelett angesiedelt und bilden dort ossifizierte Matrix (die sog. Knochenmanschette). Diese Art der Ossifikation trägt vorwiegend zum Dickenwachstum des Knochens bei (22, 24–26).

Knochenkatabolismus wird vorwiegend durch Osteoklasten verursacht. Das sind mehrkernige Riesenzellen, die sich aus einkernigen Vorstufen im Knochenmark differenzieren. Knochenresorptiv wirken diese Zellen durch einen aktiven Protonentransport und einen folglich erniedrigten pH-Wert von ca. 4–5 in ihrer Umgebung sowie der Sezernierung von proteolytischen Enzymen. Dadurch wird sowohl die mineralisierte, als auch die kollagene Struktur der Knochensubstanz aufgelöst und anschließend teilweise phagozytiert. Die so entstehenden Defekte in der ossifizierten Matrix werden Howship-Lakunen genannt (22, 25).

Im Zentrum des Zusammenspiels von Ossifikation und Resorption stehen die Osteozyten, weiter differenzierte Osteoblasten, die in der gesamten Knochenmatrix über ihre Zellfortsätze und dortige Gap junctions miteinander in Verbindung stehen und die als Sensorsystem für die Scherkräfte durch mechanische Belastung innerhalb der Knochenmatrix angesehen werden (22–25). Sie bewirken über die Schaffung eines Mikromilieus und über das Sezernieren von endokrinen Botenstoffen eine Differenzierung und Aktivitätsregulierung von Osteoblasten und -klasten. Mögliche Signalwege von Osteozyten sind beispielweise:

- die Expression von RANKL und dessen Bindung an RANK, was eine Voraussetzung für die Aktivität von Osteoklasten ist,
- die Sekretion von Osteoprotegerin, einem Antagonisten von RANKL,
- die Sekretion von Sclerostin, das über die Blockade des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Differenzierung von Osteoblasten und deren Aktivität hemmt (22–25, 27).

Das Zusammenspiel dieser drei Zellarten ermöglicht dem gesunden Knochen sich an veränderte mechanische Belastungen anzupassen und zum Beispiel mit der Bildung neuer, mineralisierter

Matrix zu reagieren oder diese zu resorbieren. Dieser Prozess wurde makroskopisch zuerst von Julius Wolff im späten 19. Jahrhundert beschrieben und wird dem folgend als *Wolffsches Gesetz* bezeichnet (28).

2.3 Sclerostin und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Sclerostin ist das Produkt des *Sost* Genes, welches im Menschen auf Chromosom 17q12–q21 lokalisiert ist, und praktisch ausschließlich von Osteozyten sezerniert wird (29–32). Entdeckt wurde es bei der Erforschung der Sclerosteose und der van Buchem Krankheit, beides Erkrankungen, die mit einem erhöhtem Knochenmassenphänotyp (u.a. des Schädels) einhergehen (33–35). Sclerostin konkurriert als Antagonist mit dem Agonisten Wnt um die Bindung an den LRP5/6 Rezeptor und hemmt damit den kanonischen oder Wnt/ β -Catenin-Signalweg (36).

Der Wnt-Signalweg wurde hauptsächlich von Harold Varmus und Roel Nusse entdeckt und ist nach seinem Liganden „Wnt“ benannt. Dabei setzt sich die Bezeichnung aus den Genbezeichnung „W“ für „Wingless“ und „nt“ für „Int-1“ zusammen. Beide Gene standen im Zusammenhang mit verschiedenen Beobachtungen („Wingless“: flügellose Variante in der Taufliege *Drosophila melanogaster*; „Int-1“: erhöhte Brustkrebsentwicklung in Mäusen, heute „Wnt-1“ genannt). Dieser Signalweg wurde in den letzten Jahren erforscht und aktuell sind 19 Wnt Gene im menschlichen Genom bekannt (37–40).

Außerdem sind derzeit drei unterschiedliche Wnt-Signalwege bekannt:

- a) nicht-kanonischer planarer-Zell-Polaritäten-Signalweg: reguliert das Cytoskelett und damit die dreidimensionale Struktur von Zellen,
- b) nicht-kanonischer Wnt/Kalzium-Signalweg: reguliert die Kalzium-Homöostase innerhalb der Zelle und
- c) kanonischer oder Wnt/ β -Catenin-Signalweg: aktiviert spezifische Zielgene (39–41).

Der kanonische oder Wnt/ β -Catenin-Signalweg besteht aus zahlreichen Proteinen und Einzelschritten. Im ersten Schritt bindet das Wnt-Signalprotein an den membranständigen Rezeptor Frizzled und an das Low-Density Lipoprotein Rezeptor-Related Protein 5 oder 6 (LRP 5/6). Dadurch wird das Protein Dishevelled aktiviert, was nun zur Inhibierung eines Proteinkomplexes (bestehend aus Axin, Adenomatosis polyposis coli (APC), Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Casein Kinase 1 (CK1)) führt. Dieser Proteinkomplex baut normalerweise β -Catenin ab und verhindert so dessen Akkumulation in der Zelle. Ist nun die Degradation von β -Catenin inhibiert, sammelt sich dieses im Zytoplasma an und wird in den Nukleus transportiert. Dort wirkt es als Transkriptions-Co-Aktivator für Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie und bewirkt schließlich die Aktivierung spezifischer Zielgene, welche den Knochenanabolismus begünstigen. Im Knochen führt die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Sclerostin zu einer reduzierten Osteoblastenaktivierung und -differenzierung und folglich zu einer Hemmung des Knochenanabolismus (Abbildung 2.1) (40-43).

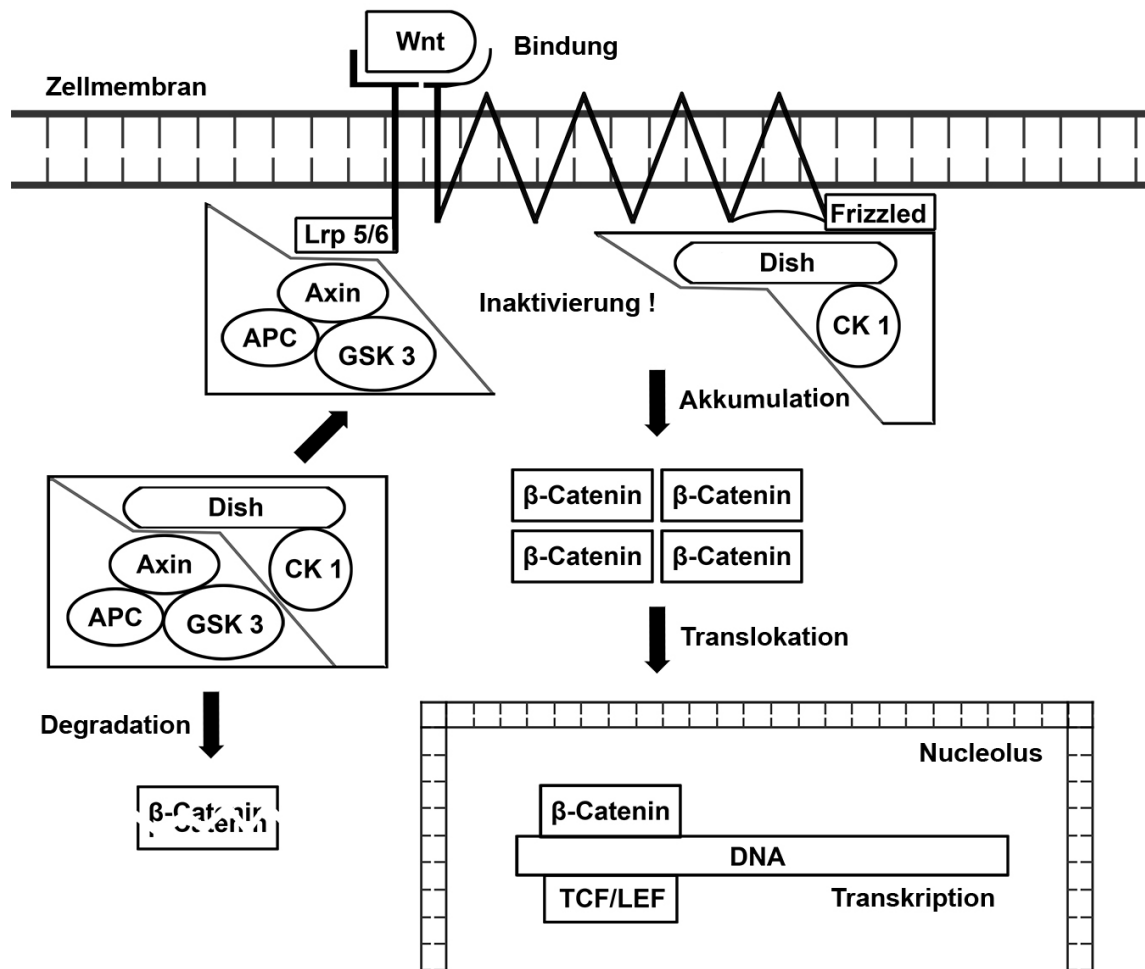


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Durch die Bindung von Wnt an den LRP 5/6-Frizzled-Rezeptorkomplex wird der β -Catenin abbauende Komplex in eine nicht-funktionale Form überführt. Daraufhin akkumuliert β -Catenin innerhalb der Zelle und wirkt nach Translokation in den Nucleolus als Co-Transkriptionsfaktor für spezifische Zielgene.

Während verminderte Sclerostin-Spiegel bzw. ein nicht-funktionales Sclerostinprotein zu einem Phänotyp mit hoher Knochenmasse führen, wird bei erhöhten Sclerostin-Konzentrationen ein Knochenmassenverlust beobachtet (44, 45).

Außerdem kennt man neben der Sclerosteose noch einige weitere Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, die u.a. mit veränderten Knochenmassenphänotypen einhergehen. Bei der Osteoporosis Pseudoglioma kommt es zu einer Mutation des LRP5, so dass die Bindung mit dem Wnt-Protein nicht mehr möglich ist. Folglich bleibt die Osteoblastenstimulation aus und eine schwere, angeborene Osteoporose (neben weiteren Merkmalen) ist die Folge (46). Eine Mutation im G171V-Gen kann zu einem nicht funktionalen Dickkopf-1 Protein (DKK1), einem weiteren Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, führen. Die folglich geschwächte Inhibition im Wnt/ β -Catenin-Signalweg führt zu überschießender Knochenbildung, ähnlich dem Bild der Sclerosteose (45–47).

2.4 Sclerostin und mechanische Belastung

Wie bereits seit Julius Wolff bekannt, führt erhöhte mechanische Beanspruchung in gesunden Knochen zu einem adaptiven anabolen Prozess und Entlastung zu einem adaptiven Knochenabbau (Wolffsches Gesetz) (28). Es ist sowohl in Mensch- als auch in Tierstudien nachgewiesen, dass die adaptive Knochenantwort durch mechanische Belastung im Verlaufe des Alterungsprozesses abnimmt (49–56). Dieser Effekt ist in C57BL/6 Mäusen bereits in adulten Tieren nachweisbar (51, 52). Eine wesentliche Rolle in dieser Signalkaskade von mechanischer Belastung hin zu Knochenanabolismus scheinen dabei der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und dessen Regulation, unter anderem über das von den Osteozyten sezernierte Sclerostin zu spielen (u.a. 22, 23, 48). Wie bereits in 2.3 erwähnt, führt Sclerostin-Defizienz zu einem erhöhten Knochenwachstum. Gleichsam postulierten Tu et al. 2012, dass die Herabregulation der Sclerostinexpression von Osteozyten bei mechanischer Belastung einen notwendigen Schritt in der Signaltransduktion des Knochenanabolismus darstellt (48). Da bereits in verschiedenen Studien ein Anstieg der Sclerostinspiegel auch in gesunden Individuen im Laufe des Alterungsprozesses nachgewiesen wurde, wird dies möglicher Mechanismus für die verringerte Mechanosensibilität im Alter diskutiert (57, 58).

Unter der Annahme, die Herabregulation von Sclerostin sei ein zwingend notwendiger Schritt in der Signaltransduktion von mechanischer Belastung im Knochen, dürfte unter Sclerostin-Defizienz eine mechanische Belastung folglich keinen Effekt haben. Dem widersprechend wurde dagegen von Morse et al. in weiblichen, 10 Wochen alten *Sost* KO und damit Sclerostin-defizienten Mäusen gezeigt, dass durch mechanische Belastung am tibialen Mittelschaft ein Anstieg der statischen und dynamischen kortikalen Knochenparameter bewirkt wird (59). Interessanterweise wiesen die Daten von Morse et al. jedoch deutliche regionenspezifische Unterschiede auf. Während die anabole Reaktion auf mechanische Belastung der Kortikalis in der Metaphyse und am Übergang vom proximalen zum mittleren Tibiadrittel (37% Volume of Interest (VOI)) in den *Sost* KO gegenüber den Kontrolltieren sogar signifikant erhöht war, zeigte der mittlere Anteil der Tibiadiaphyse (50% VOI) eine deutlich schwächere Reaktion (59). Morse et al. nennen als mögliche Ursachen

dafür z.B. innerhalb der Tibia und zwischen den Genotypen veränderte Knochengeometrie und –steifigkeit (59). Letztlich bleibt der Grund für diese regionenspezifischen Ergebnisse jedoch unklar. Bemerkenswert ist außerdem, dass das weder das trabekuläre Kompartiment der *Sost* KO noch der Kontrollmäuse in den Versuchen von Morse et al. einen anabolen Effekt auf mechanische Belastung zeigte (59). Hinsichtlich der periostalen Kortikalis zeigte darüber hinaus eine vor kurzem veröffentlichte Studie von Robling et al., dass die knochenanabole Antwort am Ulnarschaft zwischen *Sost* KO und Kontrolltieren netto vergleichbar groß und unter Sclerostin-Defizienz nicht wesentlich akzentuiert ist (60). Beide Studien untersuchten lediglich junge, Sclerostin-defiziente Mäuse und es ist aktuell noch unklar wie adulte, Sclerostin-defiziente Individuen auf mechanische Belastung reagieren und welchen Effekt damit das zunehmende Knochenalter in diesem Zusammenhang hat.

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist in der Kortikalis und der Spongiosa der Einfluss von dauerhafter Sclerostin-Defizienz auf die adaptive Knochenantwort unter mechanischer Belastung in Abhängigkeit des Alters nicht ausreichend untersucht worden. Die Frage ist demnach, ob mechanische Belastung einen knochenanabolen Effekt in skeletal maturierten Individuen hat und wie sich diese Mechanosensibilität mit zunehmendem Alter verändert.

Wir untersuchten daher die Reaktion der Kortikalis und Spongiosa in Reaktion auf zyklische, axial-kompressive, mechanische Belastung im Tiermodell. Als Versuchstiere wurden weibliche, 10 Wochen alte (jung) und hinsichtlich des Skelettsystems ausgereifte, 26 Wochen alte (adult) *Sost* KO Mäuse und, dem Wildtyp entsprechende, Wurfgeschwister verwendet. Wir führten in vivo microCT Messungen zur Erfassung der Knochenmorphologie und dynamische Histomorphometrie zur Erfassung der Knochenformation durch.

Hypothesen dieser Arbeit

1. Langzeit-Sclerostin-Defizienz führt zu erhöhten trabekulären und kortikalen Knochenmassenzuwächsen während der skeletalen Reifung gegenüber dem Wildtyp.
2. Die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung ist sowohl in jungen, als auch in adulten weiblichen, langzeit-Sclerostin-defizienten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren verändert.
3. Mit zunehmendem Alter nimmt die knochenanabole Antwort auf mechanische Belastung in beiden Genotypen und Kompartimenten ab.

3 Methodik

Alle hier beschriebenen Tierexperimente wurden nach schriftlicher Genehmigung und in Einklang mit geltendem Recht des Landamtes für Gesundheit und Soziales Berlin, speziell dem Antrag G0021/11, welcher am 09.05.2011 genehmigt wurde, durchgeführt. Die Dokumentation wurde nach §9 des Tierschutzgesetzes in Verbindung mit §29 der Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt. Es wurde zu jeder Zeit darauf geachtet die Grundsätze der Charité-Universitätsmedizin Berlin hinsichtlich der „Guten Wissenschaftlichen Praxis“ einzuhalten.

3.1 Mausezucht und Genotypisierung

Um eine möglichst genaue Aussage über die Funktion des *Sost* Gens hinsichtlich der experimentellen Fragestellung zu ermöglichen wurde ein eigenes Mausezuchtprogramm in Zusammenarbeit mit der Versuchstieranstalt der Charité (Campus Benjamin Franklin) ins Leben gerufen. Das Ziel des Zuchtprogrammes war es homozygote *Sost* knockout (KO) und homozygote Wildtyp Wurfgeschwister (=littermate controls, LC) hervorzubringen. Dazu wurde das Spermia von vier männlichen *Sost* ^{-/-} Mäusen gepoolt und in zwei Gruppen aufgeteilt. Anschließend wurde eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion mit den Oocyten von weiblichen C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Nachdem die erste, heterozygote Generation untereinander verpaart wurde, wurden in den darauffolgenden Generationen die homozygoten *Sost* KO und LC Mäuse mit einer Multiplex PCR identifiziert. Zu deren Durchführung wurden Mausschwanzschnitte verwendet. Die ursprünglichen *Sost* ^{-/-} wurden von der Firma Novartis bereitgestellt. Das PCR-Protokoll zur Genotypisierung stammte von Novartis. Die verwendeten Primer waren:

- *Sost*-specific endogen: 5' TCC ACA ACC AgT Cgg AgC TCA Agg 3'
- *Sost*-specific endogen and target: 5' ACT CCA CAC ggT CTg gAA AgT TTg g 3'
- Neo target: 5' ggg Tgg gAT Tag ATA AAT gCC TgC TCT 3' (alle hergestellt von TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland). Mit diesen Primern wurden homozygote LC (*Sost*-specific endogen – *Sost*-specific endogen and target) und *Sost* KO Mäuse (Neo target – *Sost*-specific endogen and target) identifiziert.

3.2 In vivo Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung in der Maustibia

Zur experimentellen Überprüfung des Zusammenhangs zwischen mechanischer, axial-kompressiver Belastung (in Newton, N) und Dehnung (in micro epsilon compression/ microstrain, $\mu\epsilon$) in

der Maustibia wurde eine in diesem Forschungsfeld und der AG bereits etablierte Methode zur Dehnungsmessung genutzt (61, 62). Dazu wurden in einem in vivo Experiment je 7 Mäuse pro Altersgruppe und Genotyp (insgesamt 20 Tiere) verwendet. Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion von 60mg/kg Ketamin und 0.3mg/kg Medetomidin anästhesiert und anschließend mit 0.1ml Buprenorphin (Temgesic) i.p. analgesiert. Im Anschluss wurden die linke und rechte Tibia mit Dehnungsmessstreifen (=DMS) des Typs EA-06-015LA-120 der Firma Micro-Measurements (Vishay Precision Group, USA) versehen. Diese wurden zuvor wie folgt präpariert: unter einem Mikroskop erfolgte der Zuschnitt, nach sorgfältiger Reinigung mittels Alkohol wurden anschließend die Verbindungskabel auf die beiden Kontaktflächen des DMS gelötet und nach Kontrolle von deren Funktionalität wurde der DMS mittels einer mehrlagigen Beschichtung (M-Bond Type 10/ Härtungsmittel, M-coat-D und M-coat-A; Micro-Measurements, Vishay Precision Group, USA) widerstandsfähiger gegen mechanische Beschädigung bei der Applikation und Feuchtigkeit gemacht. Die so präparierten DMS wurden nach Freilegung und Entfettung (CSM-2 Degreaser; Micro-Measurements, Vishay Precision Group, USA) auf der Mitte der antero-medialen Oberfläche des Tibiaschaftes mittels eines Sekundenklebers (SuperGlue; Duro, USA) fixiert. Der Applikationsort an der antero-medialen Tibiaschaftfläche lag am Kreuzungspunkt zweier Orientierungslinien: eine entlang der Tibiaschaftlängsachse und eine entlang der schrägen Tibiaschaftvorderkante (Abbildung 3.1) (61, 62).

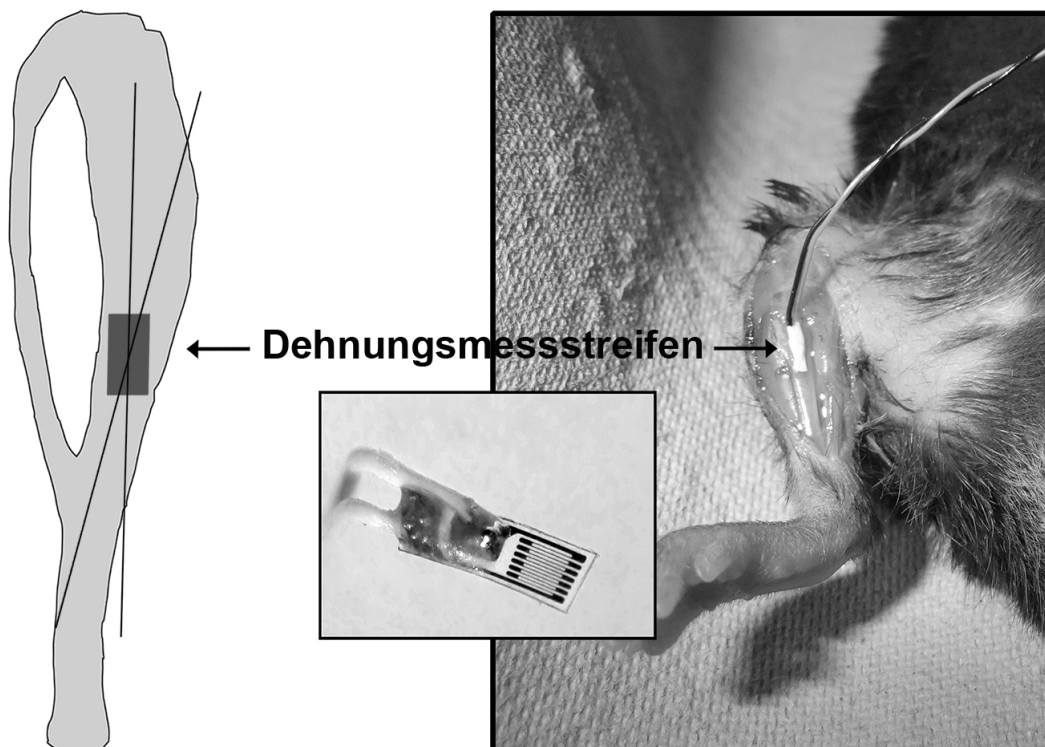


Abbildung 3.1: Position des Dehnungsmessstreifens. Schematische Darstellung der Position des Dehnungsmessstreifens (DMS) an der antero-medialen Tibia und der beiden Orientierungslinien entlang der Schaftlängsachse und entlang des Margo anterior, Photographie des noch unbeschichteten DMS (Mitte) und intraoperatives Bild nach Anbringung des beschichteten DMS in vivo.

Kleinere Blutungen wurden mittels Kompression oder Bipolarpinzette gestillt, größere Blutungen traten bei keiner der Operationen auf. Nach Kontrolle der Funktionsfähigkeit des applizierten DMS und Anschluss desselben an die Aufnahmehardware der In-vivo-Belastungsmaschine (LM1 Testbench; Bose ElectroForce, Framingham, USA) erfolgte anschließend eine Reihe aufeinanderfolgender, unterschiedlicher Belastungen mit Spitzenbelastungen zwischen -2 und -14N in LC und -2 bis -20N in *Sost* KO Mäusen. Die Belastung erfolgte zwischen dem gebeugten Knie und Fuß der jeweiligen Extremität. Zeitgleich wurden die dadurch entstehenden Verformungen am DMS mit Hilfe der Software WinTest (Bose ElektroForce, Framingham, USA) aufgezeichnet (62). Anschließend wurden die ermittelten Zusammenhänge zwischen applizierter Belastung und Dehnung am tibialen Mittelschaft der Mäuse statistisch untersucht. Aufgrund von starken Messvariationen der DMS oder durch vorzeitige Frakturen der Tibiae und folglich fehlerbehafteten Aufzeichnungen mussten einige Messungen aus der statistischen Analyse ausgeschlossen werden. Insgesamt konnten 9 Messungen für die 10 Wochen alten und 14 Messungen für die 26 Wochen alten LC Mäuse, sowie 12 Messungen für die 10 Wochen alten und 8 Messungen für die 26 Wochen alten *Sost* KO Mäuse ausgewertet werden.

3.3 Mechanische Belastung der Maustibia in vivo

Die linke Tibia (=Loaded) von 10 Wochen alten (jungen) und 26 Wochen alten (adulten) *Sost* KO und LC Mäusen (n=7 pro Alter und Genotyp) wurde 2 Wochen lang (5 Tage/ Woche, von Montag bis Freitag) in vivo zyklischen, axial-kompressiven Belastungen ausgesetzt. Die rechte Tibia (=Kontrolle) wurde nicht belastet und diente als interne Kontrolle. Diese Methode wurde bereits in dieser AG etabliert und reduzierte die Zahl der notwendigen Mäuse, da auf eine komplett unbelastete Kontrollgruppe (=Sham-Loaded) verzichtet werden kann (62).

Im Detail setzte sich die Belastung pro Tag wie folgt zusammen: 216 Zyklen, bei 4Hz, mit Spitzenbelastungen am tibialen Mittelschaft, entsprechend der vorherigen Kalibrierungsexperimente, von +900 $\mu\epsilon$. Dabei wurde, wie in anderen Experimenten der AG, eine trianguläre Belastungskurve genutzt, welche aus einer jeweils 0.075s dauernden symmetrischen Be- und Entlastungsphase bei ca. 0.010 ϵ/s in den LC und ca. 0.011 ϵ/s in den *Sost* KO Mäusen bestand (62). Zwischen den einzelnen Belastungskurven wurde jeweils eine 0.1s Ruhephase bei einer Belastung von -1N und alle 4 Zyklen eine 5s Ruhephase mit -1N eingehalten (Abbildung 3.2).

Dieses Belastungskurvenprotokoll wurde von der Arbeitsgruppe bereits verwendet und zeigte in der Vergangenheit suffiziente Wachstumsreize in C57BL/6 Mäusen (62). Hierzu wurden in der Vergangenheit maximale Belastungen von +1200 $\mu\epsilon$ genutzt (im aktuellen Versuch +900 $\mu\epsilon$) (62). Der Grund für die niedrigere Maximalbelastung im vorliegenden Experiment lag in der deutlich hypertrophierten Knochenstruktur der *Sost* KO Mäuse. Die notwendigen Kräfte für das Erreichen von +1200 $\mu\epsilon$ führten in einem initialen Experiment zu deutlichen Kniegelenkschwellungen und unnatürlichen Bewegungsmustern in den jungen Mäusen (siehe hierzu 5.3). Zur Durchführung der Belastungen wurden die Mäuse per inhalationem mit Isofluran betäubt und das linke Bein zwischen

Gewicht und Tibialänge	LC Mäuse				Sost KO Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
Parameter	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)
Tibiallänge (mm)	17.4 ± 0.4	17.2 ± 0.3	18.5 ± 0.3	18.3 ± 0.3	17.7 ± 0.2	17.7 ± 0.3	18.5 ± 0.3	18.4 ± 0.2
Startgewicht Tag 0 (g)	18.4 ± 1	18.4 ± 1	23.9 ± 0.7	23.9 ± 0.7	20.6 ± 1.3	20.6 ± 1.3	26.6 ± 1.5	26.6 ± 1.5
Endgewicht Tag 15 (g)	19 ± 0.8	19 ± 0.8	22.9 ± 0.4	22.9 ± 0.4	21 ± 1.5	21 ± 1.5	25.6 ± 1.5	25.6 ± 1.5

Tabelle 3.4: Tibiallänge, Start- und Endgewicht der Mäuse. Mittels digitalen Messschiebers an Tag 15 nach Entnahme und Dissektion und mittels geeichter Waage zu Beginn und während des Experiments gemessen.

18.4 ± 0.3mm, *Sost* KO jung: 17.7 ± 0.3mm und *Sost* KO adult: 18.5 ± 0.3mm) (Tabelle 3.4) und in 70%igem Alkohol gelagert. Der restliche Mauskorpus wurde für etwaige spätere ex-vivo Analysen bei -80°C tiefgefroren und gelagert.

3.4 Longitudinale in vivo microCT der kortikalen Tibiadiaphyse und der sekundären Spongiosa der Tibiametaphyse

Mittels einer longitudinalen in vivo micro-Computer-Tomographie (=microCT) (vivaCT 40, Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) erfolgte an Tag 0, 5, 10 und 15 die Untersuchung der Kortikalis der mittleren Tibiadiaphyse und der proximalen, sekundären Spongiosa kurz distal der proximalen Epiphysenfuge beider Tibiae. Die Spezifikationen der microCT waren dabei:

- Voxelgröße von 10.5µm
- 55kVp Spannung
- 145µA Stromstärke
- 300ms Integrationszeit
- kein "frame averaging"
- Winkelrotation 180°
- durchschnittliche Messzeit ca. 48 Minuten.

Insgesamt wurden am Tibiamittelschaft 210 und an der proximalen Tibia 416 Schichten erfasst. Die Anästhesie für die Messzeitpunkte erfolgte mit 60mg/kg Ketamin und 0.3mg/kg Medetomidin i.p. Bepanthen-Salbe schützte die Augen der Mäuse gegen Austrocknen. Die bereits betäubten Tiere wurden in einem speziellen Plastik-Mausbett mit Klebestreifen fixiert um Bewegungsartefakte zu verringern (Abbildung 3.3). Nach dem Scan und der, wenn laut Experimentplan nötigen, Belastung wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion von Atipamezolhydrochlorid (5.0mg/ml, „Antisedan“) in 2.5-facher Dosis der Medetomidindosis aus der Narkose geweckt.

Die Rekonstruktion der Scans erfolgte durch die Standardsoftware des Geräteherstellers Scanco mittels gefilterter Rückprojektion. Das CT wurde wöchentlich gegen ein Hydroxy-Apatit-Mineral-Phantom kalibriert und befand sich in einem klimatisierten Raum, um die Untersuchungsbedingungen so stabil wie möglich zu halten. Dieses Verfahren fand bereits in anderen Experimenten der AG Verwendung (51–54, 62).

Aufgrund eines Hardwaredefektes bzw. Rekonstruktionsfehlers in den kortikalen Aufnahmen gingen die Scans von drei 26 Wochen alten *Sost* KO Mäusen an Tag 5 und ein Scan einer 10 Wochen alten LC Maus an Tag 15 verloren. Von den trabekulären Aufnahmen konnte ein Scan einer 26 Wochen alten *Sost* KO Maus an Tag 5 und ein Scan einer 10 Wochen alten LC Maus an Tag 15 nicht vollständig rekonstruiert werden. Sonst konnten die Daten aller 4 Messzeitpunkte jeweils beider Tibiae der Experimentgruppen akquiriert werden.

3.5 MicroCT Analyse der statischen Knochenparameter der Kortikalis und der sekundären Spongiosa

Sämtliche Rekonstruktionen wurden zur Gewährleistung einer möglichst optimalen Vergleichbarkeit vor der eigentlichen Evaluation mittels jeweils 3 manuell festgelegter Punkte (je im proximalen, mittleren und distalen Scanbereich) entlang der axialen Längsachse ausgerichtet. Das Untersuchungsvolumen (=Volume of Interest, VOI) des kortikalen Kompartimentes betrug 5% der Gesamttibiallänge (=total tibia length, TTL) und lag zentriert im mittleren Schaftbereich (Abbildung 3.5). Der proximale VOI Startpunkt lag 20 Schichten distal einer anatomischen Landmarke. Diese Landmarke war die Ebene in der die eher trianguläre, endokortikale Region des Margo anterior am Mittelschaft der Tibia ihre spitzwinklige Form in eine mehr großwinklige Rundung verändert (Abbildung 3.6). Die Konturierung erfolgte semi-automatisch mit anschließender manueller Kontrolle. Es wurden sowohl der gesamte Knochenquerschnitt inklusive Markraum (T.Ar) und nur der ossäre Anteil der Kortikalis exklusive Markraum (Ct.Ar) markiert und untersucht (62).

Die VOI für die sekundäre Spongiosa entsprach dem endokortikalen Markraum entlang 10% der TTL in proximo-distaler Ausrichtung, beginnend 105 μ m (entspricht 10 Schichten bei 10.5 μ m Schichtdicke) distal der proximalen Epiphysenfuge. Aufgrund der deutlich inhomogenen Knochenform in diesem Bereich wurde in diesem VOI etwa jede 5. Schicht manuell markiert und die fehlenden Schichten anschließend iteriert und manuell überprüft.

Der globale Grenzwert zwischen Knochen und restlichem Gewebe betrug 4626 Hounsfield units (=HU) in der kortikalen und 2811HU in der trabekulären VOI. Um diesen Grenzwert zu erhalten wurden die, in einem separaten Schritt erstellten, Histogramme sämtlicher Scans des Mittelschaftes und der proximalen Tibia nach den jeweiligen Gewebepeaks aufgetrennt und der Mittelwert des Peaks für die ossären Anteile gebildet. Dazu wurden zum einen die Daten der weiblichen und zum anderen auch die Daten einer männlichen Vergleichsgruppe genutzt, die Teil eines separaten Experimentes waren. Die mittels der Scanco-Evaluationssoftware untersuchten Parameter für das kortikale VOI waren: das maximale und minimale Flächenträgheitsmoment (=principal area moments

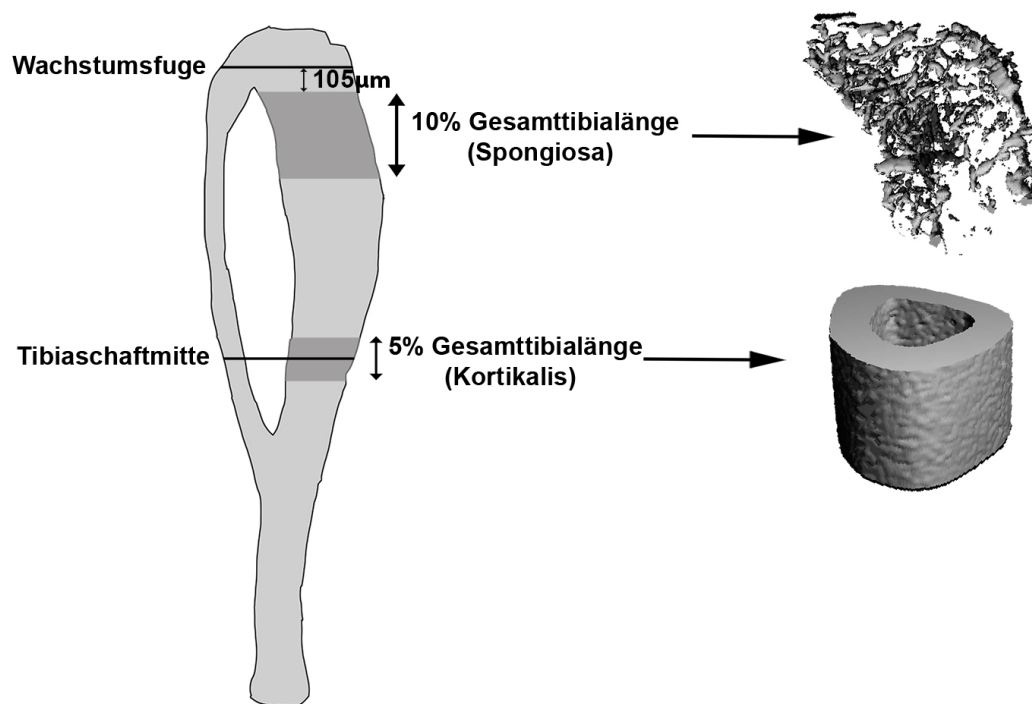


Abbildung 3.5: VOI Lage der Spongiosa und der Kortikalis. Für die sekundäre Spongiosa kurz unterhalb der Wachstumsfuge in der Tibiametaphyse und für die Kortikalis zentriert in der Tibiadiaphyse.

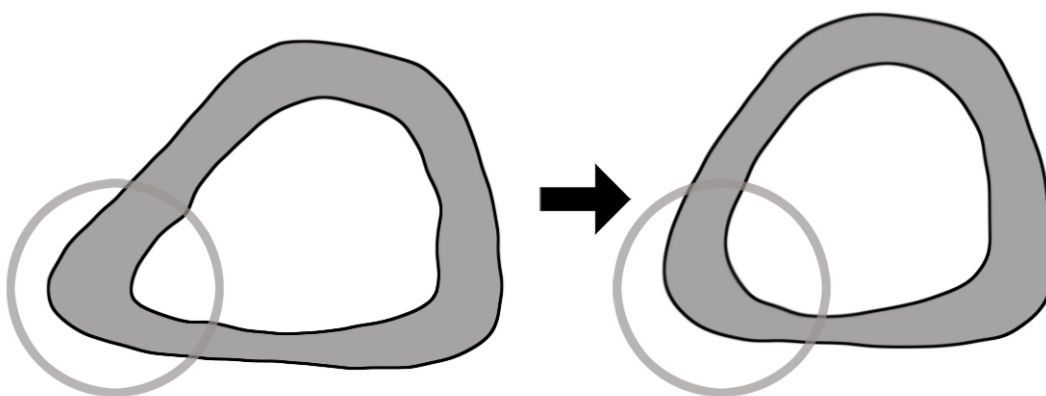


Abbildung 3.6: Anatomische Landmarke im kortikalen VOI. Schematische Darstellung: der eher trianguläre Innenwinkel (Kreis links) geht wenige Schichten distal in eine eher rundliche Form über (Kreis rechts).

of inertia, I_{max}/I_{min}), die kortikale Knochenfläche (=cortical bone area, Ct.Ar), die Gesamtfläche innerhalb des Periosts (=total cross-sectional area inside the periosteal envelope, Tt.Ar), die sich daraus ergebende kortikale Knochenfraktion (=cortical area fraction, Ct.Ar/Tt.Ar), die kortikale Dicke (=cortical thickness, Ct.Th) und die kortikale Knochenmineraldichte (=cortical volumetric tissue mineral density, Ct.vTMD). Für das trabekuläre VOI erfolgte die Analyse der trabekulären Knochenvolumenfraktion (=trabecular bone volume to total volume ratio, Tb.BV/TV), der Anzahl der Trabekel (=trabecular number, Tb.N), der trabekulären Separation untereinander (=trabecular separation, Tb.S), der Trabekeldicke (=trabecular thickness, Tb.Th) und des trabekulären Mineralgehaltes (=trabecular volumetric tissue mineral density, Tb.vTMD). Hinsichtlich der Terminologie der untersuchten Parameter wurde sich nach den etablierten Standards gerichtet (21, 62).

3.6 Dynamische Histomorphometrie

Zur Erfassung von Knochenformationsparametern erfolgte eine dynamische Histomorphometrie mittels fluoreszierender Farbstoffe, die sich in die Mineralstruktur von neu formiertem Knochen einbauen, durchgeführt. Dazu wurde den LC Mäusen Calcein (20mg/kg) an Tag 3 und 12 i.p. verabreicht (62, 63). Die *Sost* KO Mäuse wurden mit Calcein an Tag 3 und Alizarin (30mg/kg) an Tag 12 i.p. gefärbt. Die unterschiedliche Färbung der Genotypen geschah aufgrund eines menschlichen Experimentierfehlers: nach Färbung der *Sost* KO Tiere beider Altersgruppen mit Calcein/ Alizarin wurde die zweite Färbung an Tag 12 in den 10 Wochen alten LC Tieren fälschlicherweise ebenfalls mit Calcein durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit innerhalb des Genotyps zu gewährleisten und keine zusätzliche Mausgruppe zu benötigen, mussten daraufhin auch die 26 Wochen alten LC Mäuse mit Calcein am zweiten Färbungstag behandelt werden. Der dadurch entstandene Bias betrifft hauptsächlich den Vergleich zwischen den Genotypen und nicht den Vergleich innerhalb eines Genotyps (siehe dazu auch 5.3). Des Weiteren zeigten Sun et al., dass Calcein und Alizarin vergleichbare Ergebnisse erzielen und demnach auch Vergleiche zwischen den Genotypen zulässig sind (64, 65). Nach der Dissektion an Tag 15 erfolgte die Dehydrierung der Tibiae über mehrere Tage in aufsteigenden Graden bis hin zu 100% reinem Ethanol und eine anschließende Säuberung in Xylol (62). Die anschließende Einbettung in Polymethyl-Methacrylat (PMMA) erfolgte nach dem Schema des Herstellers des Polymerisationssystems Technovit 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland). Danach wurden die so entstandenen Proben für die kortikale Auswertung transversal am kortikalen Mittelschaft und für die trabekuläre Auswertung longitudinal entlang einer mittleren Ebene der proximalen Tibia und der Fibula mittels einer feinen Säge geschnitten. Anschließend erfolgte mittels eines automatischen Rotationsschleifapparates (Jean Wirtz Phoenix 3000, Wirtz-Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und feiner werdendem Schleifmaterial der Feinschliff sowie die Politur der Grobschnitte auf eine Dicke von ca. 60µm. Die Dicke der Proben wurde zwischen den einzelnen Schleifschritten wiederholt mit einem kalibrierten, elektronischen Messschieber überprüft. Danach wurde die Probe mittels eines UV-härtenden, durchsichtigen Klebers auf Plastikobjektträgern fixiert. Im Anschluss erfolgte unter 200facher Vergrößerung im Mikroskop

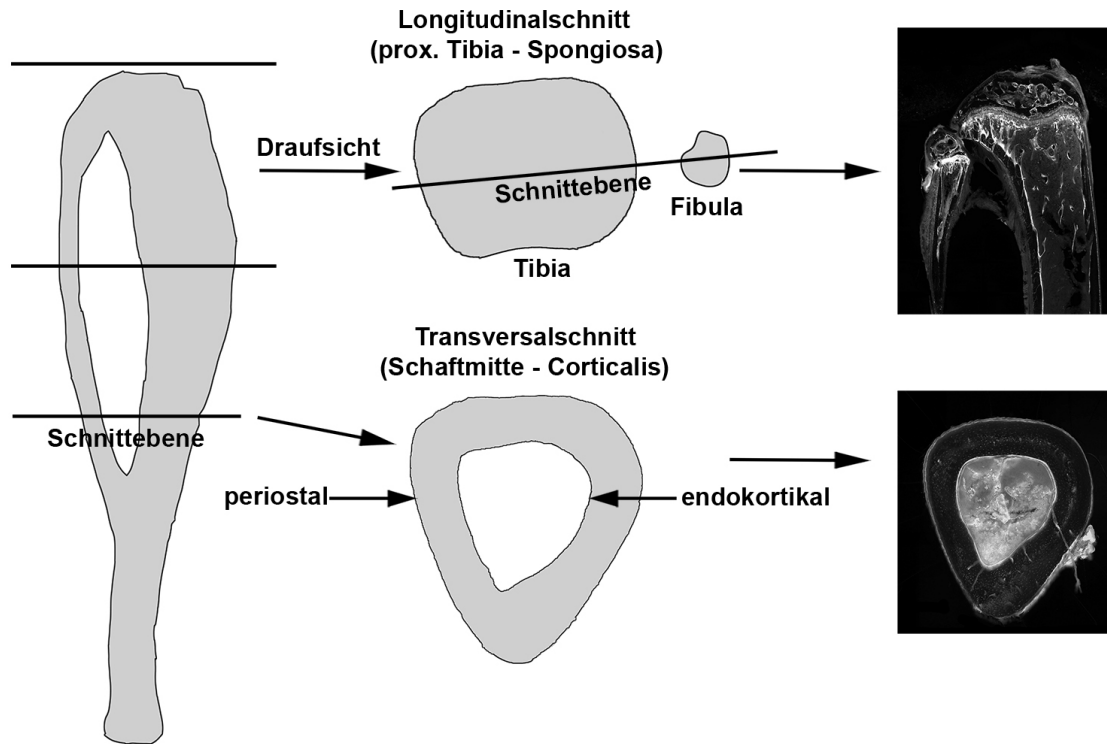


Abbildung 3.7: Schnittebenen der Histomorphometrie. Die Tibiametaphyse wurde longitudinal entlang einer Ebene mit der Fibula geschnitten und im Schnitt dann ein Bereich von 10% der TTL 105µm distal der Wachstumsfuge ausgewertet (analog zur microCT Evaluation); die Tibiadiaphyse wurde zentral transversal geschnitten und der entstehende Schnitt in der kompletten Zirkumferenz periostal und endocortical analysiert.

und Verwendung einer Quecksilberlampe (KS400 3.0, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) die Analyse hinsichtlich der Fluochrommarkierungen in der tibialen Kortikalis und im Trabekelnetzwerk der sekundären Spongiosa bei Exzitation mit den entsprechenden Wellenlängen (Calcein: grün bei 495–515nm/ Alizarin: rot bei 530–560nm). Für die Bildakquise wurde kommerziell erwerbbarere Software (Axiovision, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eingesetzt. Die analysierte Fläche (=Region of Interest, ROI) beinhaltete die sekundäre trabekuläre Spongiosa ab einer Distanz von 105µm unterhalb der Wachstumsfuge entlang 10% der TTL in den longitudinalen Schliffen (entsprechend der VOI für die microCT Analyse) und die komplette endocortikale und periostale Oberfläche im jeweiligen transversalen Schnitt des Mittelschaftes (Abbildung 3.7).

Die Analyse bekannter histomorphometrischer Parameter erfolgte mittels der Open-Source-Software ImageJ: Gesamtoberfläche (=bone surface, BS), einfach- und doppelmarkierte Gesamtfläche (single/ double labelled surface, sLS/ dLS), gesamtmineralisierte Oberfläche (=mineralized surface, MS), mineralisierte Knochenoberflächenfraktionen (sLS/BS, dLS/BS), gesamtmineralisierte Oberflächenfraktion (MS/BS), Mineralisierungsrate (=mineral apposition rate, MAR) und Knochenformationsrate (=bone-formation rate, BFR/BS) (66, 67). Die gesamtmineralisierte Oberflächenfraktion (MS/BS) berechnete sich wie vorbeschrieben: $0.5 \times \text{sLS/BS} + \text{dLS/BS}$ (68). Wie

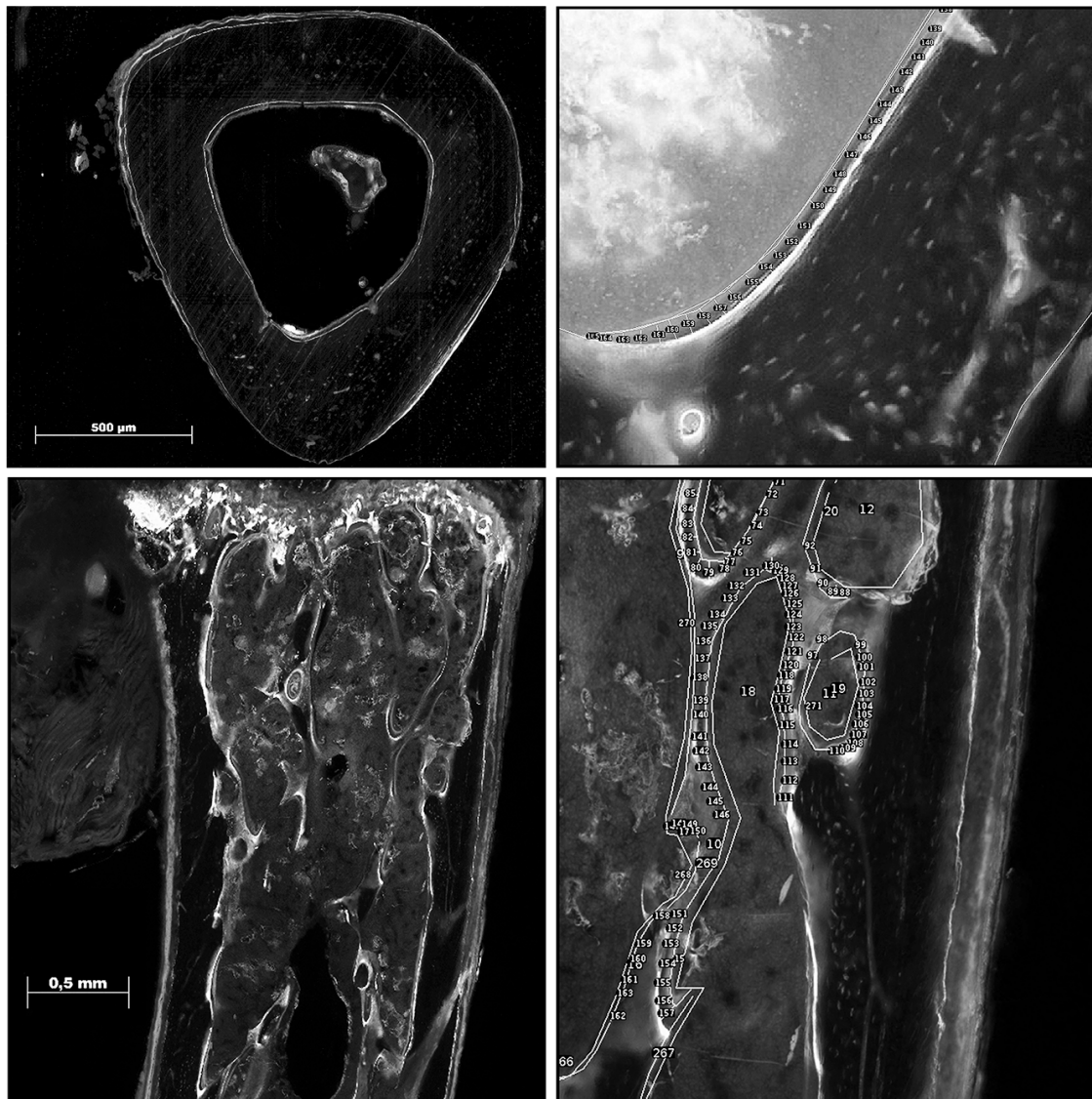


Abbildung 3.8: Beispiele der histomorphometrischen Auswertung. Einmal die unmarkierte kortikale und trabekuläre Totalansicht (links) und ausschnittsweise mit ImageJ Labeln zur Erfassung der dynamischen Knochenparameter (rechts).

empfohlen wurden Proben die keine Doppelmarkierungen aufwiesen ($dLS/BS = 0$) nicht in die Auswertung der MAR und BFR/BS aufgenommen (68). Die Mineralisierungsrate berechnete sich als der durchschnittliche Abstand der Doppelmarkierungen an der endokortikalen (Ec), der periostalen (Ps) oder der trabekulären (Tb) Oberfläche, jeweils geteilt durch den 9 tägigen Zeitraum zwischen den Färbungen. Dazu wurden in jedem doppelmarkierten Bereich im Abstand von wenigen Micrometern wenigstens 3, im Durchschnitt aber > 20 Messungen durchgeführt (Abbildung 3.8). Mit Ausnahme einer kortikalen Probe der Kontrolltibia einer 10 Wochen alten *Sost* KO Maus und einer trabekulären Probe der Kontrolltibia einer 26 Wochen alten *Sost* KO Maus, konnten jeweils 7 Proben pro Gruppe und Seite analysiert werden.

3.7 Statistische Analysen

Zur Analyse der Innersubjektfaktoren (Loaded und Kontrolle) und der Zwischengruppenfaktoren (Alter: 10 und 26 Wochen und Genotyp: *Sost* KO und LC) sowie der Interaktionen zwischen diesen wurden ANOVA's mit der Software SAS 9.3 (Cary, USA) für die absoluten Werte durchgeführt. Der Unterschied in Prozent zwischen belasteter linker (=Loaded) und rechter Kontrolltibia (=Kontrolle) wird für den Effekt der Belastung als $\% \Delta = ((\text{Loaded} - \text{Kontrolle}) / \text{Kontrolle} \times 100)$ dargestellt. Wo sinnvoll, wird der Effekt des Alters als $\% \Delta = ((26 \text{ Wochen} - 10 \text{ Wochen}) / 10 \text{ Wochen} \times 100)$ und der Effekt des Genotyps als $\% \Delta = ((\text{Sost KO} - \text{LC}) / \text{LC} \times 100)$ dargestellt. Eine zweite Auswertung mittels ANOVA's analysierte die Zwischengruppenfaktoren (Alter und Genotyp) und deren Interaktionen zwischen den Differenzen der absoluten Werte von belastetem und Kontrollbein (=interlimb difference, entspricht dem Netto-Effekt der mechanischen Belastung). Außerdem wurden, wo passend, übliche gepaarte oder ungepaarte Zweistichproben t-Tests durchgeführt. Ein $p\text{-Wert} < 0.05$ gilt als statistisch signifikant. Eine statistische Auswertung erfolgte nur an Tag 0 und 15, da diese den Start- und Endzeitpunkt des Experiments markieren. Die Daten von Tag 5 und 10 sind in den Ergebnistabellen aber ebenfalls enthalten, um einen Überblick über die Dynamik der Knochenveränderungen zu erhalten (siehe hierzu auch 5.3).

4 Ergebnisse

4.1 Dehnungs-Belastungs-Relationen am tibialen Mittelschaft

Sost KO Mäuse zeigen gegenüber den Kontrolltieren eine erhöhte ossäre Rigidität und damit eine veränderte Dehnungs-Belastungs-Relation am tibialen Mittelschaft.

Mittels des in 3.2 beschriebenen Aufbaus wurde der Zusammenhang zwischen axial-kompressiven Belastungen und der Verformung der Tibia an der mittleren Diaphyse untersucht. Einer Dehnungsbelastung von $+900\mu\epsilon$ an der medio-anterioren Seite des Mittelschaftes der Tibia entsprachen folgenden angelegten Kräften:

- 6.9N in 10 Wochen alten LC Mäusen,
- 7.3N in 26 Wochen alten LC Mäusen,
- 12.9N in 10 Wochen alten *Sost* KO Mäusen und
- 14.5N in 26 Wochen alten *Sost* KO Mäusen (Tabelle 4.1).

Die Steigungskoeffizienten der Dehnungs-Belastungskurven waren dabei:

- 10 Wochen LC Mäuse: $(-0.0076 \pm 0.0012\text{N}/\mu\epsilon)$,
- 26 Wochen LC Mäuse: $(-0.0079 \pm 0.0006\text{N}/\mu\epsilon)$,
- 10 Wochen *Sost* KO Mäuse: $(-0.0139 \pm 0.002\text{N}/\mu\epsilon)$ und
- 26 Wochen *Sost* KO Mäuse: $(-0.0161 \pm 0.0016\text{N}/\mu\epsilon)$ (Tabelle 4.1).

Die Werte der Steigungskoeffizienten für unsere gezüchteten LC Mäuse ähnelten dabei denen von kommerziell erwerbbaaren C57BL/6 Tieren, die bereits früher in der AG diesem Experiment unterzogen wurden:

- 10 Wochen alte C57BL/6 Mäuse: $(-0.0090 \pm 0.0024\text{N}/\mu\epsilon)$
- 26 Wochen alte C57BL/6 Mäuse: $(-0.0089 \pm 0.0006\text{N}/\mu\epsilon)$ (62).

Dies zeigt, dass unsere als „homozygote Wildtypen“ deklarierten Tiere in dieser Hinsicht mit früheren Experimenten vergleichbar sind (62). Der Vergleich der Steigungskoeffizienten zwischen den Genotypen innerhalb einer Altersgruppe lässt erkennen, dass zum Erreichen der gewünschten Dehnungsbelastung in *Sost* KO Mäusen im Durchschnitt höhere axiale Belastungen aufgewendet werden mussten (10 Wochen *Sost* KO zu 10 Wochen LC: +86% und 26 Wochen *Sost* KO zu 26 Wochen LC: +104%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0001$). Zu diesen Ergebnissen passen die später mittels microCT erhobenen Daten der minimalen und maximalen Flächenträgheitsmomente der unbelasteten Kontrollknochen zu Beginn des eigentlichen Belastungsexperiments. Diese waren in den *Sost* KO gegenüber den LC Mäusen gleichen Alters erhöht (junge *Sost* KO vs. junge LC Mäuse: I_{min} : +175%, I_{max} : +117%; adulte *Sost* KO vs. adulte LC Mäuse: I_{min} : +200%, I_{max} : +214%; ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0001$) (Tabelle 4.2). Diese Erkenntnisse suggerieren bereits einen möglichen Unterschied der Knochenmorphologie zwischen den untersuchten Genotypen. Vergleicht man den Effekt des Alters auf die ossäre Rigidität innerhalb der Genotypen, so stieg die mittlere benötigte Kraft zum Erreichen von +900 $\mu\epsilon$ am tibialen Mittelschaft in LC Mäusen nicht signifikant um 2.6% (ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.87$) und in den *Sost* KO Mäusen ebenfalls nicht signifikant, jedoch trendweise um 12.6% (ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.13$). Aufgrund des nur geringen Unterschiedes und der Beschaffenheit der DMS Daten wurde für die 10 und 26 Wochen alten LC Mäuse ein mittlerer Steigungskoeffizient von $-0.0078 \pm 0.0008 \text{ N}/\mu\epsilon$ und damit eine Spitzenbelastung für beide Altersgruppen von -7N im eigentlichen in vivo Belastungsexperiment gewählt. Die minimalen und maximalen Flächenträgheitsmomente erhöhten sich mit zunehmendem Alter ebenfalls und zeigten sogar signifikante Unterschiede zwischen jungen und adulten Tieren des gleichen Genotyps (LC: I_{min} : +50%, I_{max} : +17%; *Sost* KO: I_{min} : +64%, I_{max} : +69%; ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.001$) (Tabelle 4.2). Interessanterweise erhöhte sich die benötigte Kraft zum Erreichen der +900 $\mu\epsilon$ am tibialen Mittelschaft der adulten LC Mäuse trotz der höheren minimalen und maximalen Flächenträgheitsmomente, des größeren kortikalen Knochenvolumens und der höheren Knochenmineraldichte (siehe 4.2.1, Tabelle 4.2) nicht signifikant. Dies war auch in den C57BL/6 Mäusen in früheren Experimenten der Fall (62). Insbesondere in den *Sost* KO Tieren sprechen diese Daten für altersabhängige Veränderungen der Knochenmorphologie in beiden Genotypen. Mit diesen Erkenntnissen wurde anschließend das nachfolgende Experiment mit einer identischen Dehnungsbelastung von +900 $\mu\epsilon$ am tibialen Mittelschaft zwischen den Genotypen und Altersgruppen durchgeführt.

Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung	LC Mäuse		Sost KO Mäuse	
	10 Wochen	26 Wochen	10 Wochen	26 Wochen
Parameter	(n=9)	(n=14)	(n=12)	(n=8)
Durchschnittssteifigkeit (N/με) a	-0.0076 ± 0.0012	-0.0079 ± 0.0006	-0.0139 ± 0.002	-0.0161 ± 0.0016
Kraft gemessen bei 900με Dehnung (N) a	-6.9 ± 2.8	-7.3 ± 2.7	-12.9 ± 1.9	-14.5 ± 2.6

Tabelle 4.1: Ergebnisse der in vivo Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung. Ermittelte Durchschnittssteifigkeit der Tibiae von 10 und 26 Wochen alten LC und *Sost* KO Mäusen und gemessene durchschnittliche Kraft zum Erreichen einer Dehnungsbelastung von +900με am tibialen Mittelschaft; (Mittelwert ± Standardabweichung); ungepaarter Zweistichproben t-Test: (a) signifikanter Effekt des Genotyps innerhalb einer Altersgruppe, $p < 0.05$.

4.2 Einfluss der skeletalen Reifung auf die ossäre Morphologie und Formation in Abwesenheit zusätzlicher mechanischer Stimuli

Die Skelettreifung führt auch in Abwesenheit von zusätzlicher mechanischer Belastung in beiden Genotypen zu einer Größenzunahme der Kortikalis und einer erhöhten Trabekeldicke, während die Anzahl der Trabekel konstant bleibt. Gleichzeitig verringert sich die kortikale Knochenformation in beiden Genotypen, während die trabekuläre Knochenformation tendenziell zunimmt.

4.2.1 Kortikales Kompartiment

Die Kortikalis der unbelasteten Kontrolltibia von adulten LC Mäusen hatte signifikant größere statische Knochenparameter als die von jungen Mäusen dieses Genotyps (exemplarisch Ct.Ar: +14%, T.Ar: +11%, Ct.Th: +8%, Ct.vTMD: +4.3%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.019$) (Tabelle 4.2). Außerdem sank im Verlauf der skeletalen Reifung sowohl die endokortikale, als auch periostale Knochenformation und mineralisierte Fläche in adulten LC Mäusen gegenüber jungen LC Mäusen (exemplarisch Ec.MS/BS: -48%, Ec.BFR/BS: -138%, Ps.MS/BS: -47%, Ps.BFR/BS: -300%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.017$) (Tabelle 4.2). Dabei sank auch die Mineralisierungsrate, endokortikal signifikant und periostal trendweise, ab (Ec.MAR: -22%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p = 0.003$; Ps.MAR: -38%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.073$).

Die Kontrolltibia von adulten *Sost* KO Mäusen war gegenüber den jungen Mäusen dieses Genotyps ebenfalls signifikant größer und hatte eine höhere Knochendichte (exemplarisch Ct.Ar: +43%, T.Ar: +23%, Ct.Ar/T.Ar: +16%, Ct.Th: +26%, Ct.vTMD: +4.8%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.0001$) (Tabelle 4.2) und genau wie in den LC Mäusen zeigten adulte *Sost* KO Tiere abnehmende Knochenformationsparameter in der unbelasteten Kontrolltibia. Das galt sowohl für die periostale, als auch für die endokortikale Knochenformation (exemplarisch: Ec.BFR/BS: -65%, Ps.BFR/BS: -62%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.008$) (Tabelle 4.3).

Im Gegensatz zu den Kontrolltieren geschah dies endokortikal durch eine verringerte Mineralisationsfläche, bei konstanter Mineralisationsrate (Ec.MS/BS: -39%, ANOVA innerhalb der Geno-

typen: Alter $p < 0.0001$) (Tabelle 4.3), periostal hingegen durch eine konstante Mineralisationsfläche bei gesunkener Mineralisationsrate (Ps.MAR: -34%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.0001$) (Tabelle 4.3). Folglich reduzierte sich auch in den *Sost* KO Tieren während der skeletalen Reifung und in Abwesenheit eines zusätzlichen mechanischen Stimulus die kortikale Knochenformation bei insgesamt zunehmender Größe der Kortikalis.

kortikal, diaph. 5%	LC Mäuse				Sost KO Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle
Parameter	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Tag 0	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴) a, b, d, e	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Imin (mm ⁴) a, b, d	0.04 ± 0	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0	0.06 ± 0	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Ct.Ar (mm ²) a, b, d, e	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.85 ± 0.06	0.85 ± 0.05	1.27 ± 0.06	1.25 ± 0.05
T.Ar (mm ²) a, b, c	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.05	1.05 ± 0.04	1.05 ± 0.06	1.42 ± 0.08	1.41 ± 0.09	1.75 ± 0.04	1.75 ± 0.03
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²) a, b, d, e	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.03
Ct.Th (µm) a, b, d	152 ± 6	158 ± 5	184 ± 8	185 ± 7	250 ± 15	254 ± 13	346 ± 19	337 ± 16
Ct.vTMD (mg HA/cm ³) b, f	1239 ± 21	1263 ± 13	1320 ± 13	1316 ± 19	1263 ± 19	1268 ± 16	1326 ± 24	1309 ± 8
Tag 5	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=4)	(n=4)
Imax (mm ⁴)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01
Imin (mm ⁴)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Ct.Ar (mm ²)	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.55 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.86 ± 0.07	0.86 ± 0.06	1.29 ± 0.08	1.24 ± 0.05
T.Ar (mm ²)	0.97 ± 0.05	0.98 ± 0.08	1.06 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.41 ± 0.08	1.39 ± 0.06	1.75 ± 0.08	1.72 ± 0.04
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²)	0.47 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.74 ± 0.01	0.72 ± 0.03
Ct.Th (µm)	156 ± 5	160 ± 7	183 ± 7	184 ± 6	255 ± 20	259 ± 20	352 ± 24	342 ± 23
Ct.vTMD (mg HA/cm ³)	1234 ± 19	1264 ± 20	1316 ± 7	1314 ± 19	1261 ± 16	1270 ± 34	1363 ± 27	1313 ± 8
Tag 10	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Imin (mm ⁴)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Ct.Ar (mm ²)	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.91 ± 0.07	0.86 ± 0.06	1.29 ± 0.06	1.25 ± 0.06
T.Ar (mm ²)	0.96 ± 0.05	0.98 ± 0.07	1.06 ± 0.04	1.09 ± 0.04	1.46 ± 0.06	1.41 ± 0.06	1.76 ± 0.09	1.72 ± 0.07
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²)	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02
Ct.Th (µm)	163 ± 5	164 ± 6	184 ± 5	183 ± 7	264 ± 21	260 ± 17	347 ± 18	340 ± 15
Ct.vTMD (mg HA/cm ³)	1252 ± 27	1283 ± 22	1318 ± 11	1333 ± 35	1275 ± 25	1262 ± 16	1325 ± 11	1315 ± 6
Tag 15	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴) a, b, c, d, e	0.06 ± 0	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01
Imin (mm ⁴) a, b, c, d, e	0.05 ± 0	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Ct.Ar (mm ²) a, b, c, d, e	0.5 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.94 ± 0.06	0.87 ± 0.06	1.3 ± 0.06	1.24 ± 0.06
T.Ar (mm ²) a, b, d	0.99 ± 0.04	0.97 ± 0.05	1.06 ± 0.04	1.08 ± 0.04	1.46 ± 0.05	1.42 ± 0.07	1.75 ± 0.06	1.74 ± 0.05
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²) a, b, c, d, e	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.64 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.71 ± 0.03
Ct.Th (µm) a, b, c, d, e	170 ± 3	168 ± 6	183 ± 6	181 ± 7	278 ± 19	260 ± 18	357 ± 28	328 ± 22
Ct.vTMD (mg HA/cm ³) b, e	1255 ± 13	1279 ± 11	1310 ± 9	1321 ± 14	1273 ± 26	1255 ± 17	1330 ± 8	1315 ± 10

Tabelle 4.2: Kortikale microCT Ergebnisse. Mittels microCT gemessene, kortikale (Ct), statische Knochenparameter am tibialen Mittelschaft an Tag 0, 5, 10 und 15 in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet (Loaded), rechte Tibia nicht belastet (Kontrolle)); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA an Tag 0 und 15: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung, $p < 0.05$ (69).

Histomorphometrie	LC Mäuse				Sost KO Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=6)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)
Ec.sLS/BS (%) b, f	11.9 ± 4.6	20.6 ± 7	38.7 ± 10.1	28.1 ± 7.4	7.3 ± 7.6	23.6 ± 20.4	23.5 ± 9.3	27.7 ± 15.4
Ec.dLS/BS (%) a, b, c, e, g	68.2 ± 7.7	53.1 ± 11.3	20.2 ± 10.8	19 ± 10	84.6 ± 9.2	66.5 ± 19.8	55.3 ± 13.5	33.8 ± 6.3
Ec.MS/BS (%) a, b, c	74.2 ± 8	63.5 ± 10.9	39.5 ± 9.5	33.1 ± 9.3	88.2 ± 7.7	78.3 ± 11.4	67.1 ± 10.8	47.6 ± 8.5
Ec.MAR (µm/day) a, b, c, d	1.5 ± 0.21	1.21 ± 0.21	1.11 ± 0.2	0.94 ± 0.22	1.61 ± 0.15	1.22 ± 0.16	1.61 ± 0.38	1.24 ± 0.41
Ec.BFR/BS (µm/day) a, b, c, d, e	1.11 ± 0.19	0.76 ± 0.12	0.45 ± 0.17	0.32 ± 0.12	1.42 ± 0.16	0.94 ± 0.08	1.08 ± 0.29	0.57 ± 0.13
Ps.sLS/BS (%) a, e	28.7 ± 14	25.6 ± 12	24.9 ± 16.9	21.3 ± 4.8	12.4 ± 13.2	49.4 ± 25.6	37.1 ± 10.7	35 ± 8.2
Ps.dLS/BS (%) a, b, c, e	19.6 ± 13.2	13.3 ± 7.5	4.8 ± 3	1.9 ± 1.6	83.2 ± 19.4	13.4 ± 7.5	59.1 ± 13.8	16 ± 10.2
Ps.MS/BS (%) a, b, c, e	34 ± 9.9	22.4 ± 13.2	16.5 ± 8.2	10.2 ± 5.5	89.4 ± 12.8	33.6 ± 15.4	77.7 ± 8.7	31.2 ± 11.5
Ps.MAR (µm/day) a, b, c, e	0.89 ± 0.31	0.92 ± 0.33	0.72 ± 0.22	0.57 ± 0.13	1.63 ± 0.1	0.95 ± 0.19	1.09 ± 0.11	0.63 ± 0.08
Ps.BFR/BS (µm/day) a, b, c, e, f, g	0.32 ± 0.16	0.28 ± 0.17	0.13 ± 0.09	0.07 ± 0.02	1.46 ± 0.23	0.34 ± 0.21	0.84 ± 0.09	0.21 ± 0.08

Tabelle 4.3: Kortikale dynamische Histomorphometrie Ergebnisse. Durch dynamische Histomorphometrie gewonnene endokortikale (Ec) und periostale (Ps) Knochenformationsparameter des tibialen Mittelschaftes zwischen Tag 3 und 12 in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet (Loaded), rechte Tibia nicht belastet (Kontrolle)); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung, $p < 0.05$ (69).

4.2.2 Trabekuläres Kompartiment

In den LC Kontrollen nahm die Trabekeldicke und -dichte im Verlauf des Alterungsprozesses in den unbelasteten Kontrolltibiae zu (Tb.Th: +31%, Tb.vTMD: +7.5%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.019$) (Tabelle 4.4), ohne dass dies jedoch das Trabekelgesamtvolumen beeinflusste (Tb.BV/TV, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p = 0.363$) (Tabelle 4.4). Die Anzahl der Trabekel und deren Separation in der proximalen Tibiadiaphyse veränderte sich ebenfalls nicht signifikant (Tb.N, Tb.Sp, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p > 0.707$) (Tabelle 4.4). Im Gegensatz zum kortikalen Kompartiment stieg die Mineralisierungsrate und -fläche der Trabekel in den LC Mäusen mit zunehmendem Skeletalter an (Tb.MS/BS: +7%, Tb.MAR: +60%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.002$) (Tabelle 4.5), jedoch ohne die Gesamtknochenformation im trabekulären Kompartiment signifikant zu verändern, obwohl ein Trend in diese Richtung zu erkennen war (Tb.BFR/BS: +130%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p = 0.164$) (Tabelle 4.5).

Im trabekulären Kompartiment der *Sost* KO Tiere führte der skeletale Reifungsprozess in den Kontrolltibiae zu einem Anstieg des Gesamttrabekelvolumens und der Trabekeldicke (Tb.BV/TV: +85%, Tb.Th: +40%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p < 0.001$) (Tabelle 4.4), während die Trabekelanzahl, -separation und Dichte konstant blieb (Tb.N, Tb.Sp, Tb.vTMD, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p > 0.210$) (Tabelle 4.4). Die trabekuläre Knochenformation in den *Sost* KO Mäusen verhielt sich ähnlich zu den Kontrolltieren. Es kam ebenfalls zu einem trend-

weisen Anstieg der trabekulären Mineralisierungsrate und Gesamtknochenformation (Tb.MAR: +19%, Tb.BFR/BS: 11%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p > 0.194$) (Tabelle 4.5). Die mineralisierte Fläche nahm in diesem Genotyp jedoch ab (Tb.MS/BS: -19%, ANOVA innerhalb der Genotypen: Alter $p = 0.025$) (Tabelle 4.5).

trabekulär, metaph. 10%	LC Mäuse				Sost KO Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle	Loaded	Kontrolle
Tag 0	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm^3/mm^3) a, b, d	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.24 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.43 ± 0.08	0.43 ± 0.06
Tb.N (1/mm) a	2.73 ± 0.6	2.95 ± 0.7	2.85 ± 0.28	2.82 ± 0.35	4.77 ± 0.42	4.39 ± 0.46	4.72 ± 0.58	4.53 ± 0.53
Tb.Th (μm) a, b, d	40 ± 0	39 ± 4	49 ± 2	51 ± 4	76 ± 5	77 ± 5	122 ± 13	118 ± 8
Tb.Sp (μm) a	390 ± 80	362 ± 91	363 ± 38	364 ± 45	205 ± 22	215 ± 29	238 ± 36	231 ± 40
Tb.vTMD ($\text{mg HA}/\text{cm}^3$) a, b	856 ± 23	858 ± 28	935 ± 25	948 ± 29	957 ± 15	972 ± 21	1041 ± 12	1046 ± 8
Tag 5	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=6)
Tb.BV/TV (mm^3/mm^3)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.42 ± 0.09	0.42 ± 0.06
Tb.N (1/mm)	3.02 ± 0.48	3.28 ± 0.63	2.73 ± 0.29	2.74 ± 0.3	4.95 ± 0.65	4.68 ± 0.67	4.76 ± 0.68	4.74 ± 0.78
Tb.Th (μm)	41 ± 2	41 ± 4	50 ± 2	48 ± 3	81 ± 5	80 ± 5	120 ± 12	117 ± 8
Tb.Sp (μm)	346 ± 54	318 ± 61	375 ± 39	375 ± 41	198 ± 26	208 ± 28	240 ± 39	229 ± 52
Tb.vTMD ($\text{mg HA}/\text{cm}^3$)	868 ± 19	864 ± 26	946 ± 29	947 ± 24	975 ± 15	980 ± 26	1040 ± 9	1043 ± 10
Tag 10	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm^3/mm^3)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.28 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.4 ± 0.06
Tb.N (1/mm)	2.61 ± 0.4	2.77 ± 0.46	2.66 ± 0.36	2.6 ± 0.29	5.02 ± 0.63	4.6 ± 0.6	4.76 ± 0.51	4.65 ± 0.47
Tb.Th (μm)	45 ± 3	42 ± 2	53 ± 2	49 ± 4	86 ± 6	80 ± 5	121 ± 11	114 ± 8
Tb.Sp (μm)	403 ± 59	374 ± 62	388 ± 54	392 ± 41	202 ± 27	216 ± 30	241 ± 31	230 ± 33
Tb.vTMD ($\text{mg HA}/\text{cm}^3$)	861 ± 34	876 ± 20	939 ± 25	949 ± 27	977 ± 35	968 ± 43	1035 ± 23	1028 ± 15
Tag 15	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm^3/mm^3) a, b, c, d, e	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.26 ± 0.06	0.2 ± 0.05	0.39 ± 0.07	0.37 ± 0.06
Tb.N (1/mm) a, e	2.42 ± 0.57	2.7 ± 0.51	2.51 ± 0.23	2.53 ± 0.24	4.48 ± 0.51	4.14 ± 0.54	4.41 ± 0.68	4.3 ± 0.58
Tb.Th (μm) a, b, c, d, e	49 ± 3	43 ± 2	53 ± 3	48 ± 5	90 ± 0.01	78 ± 6	119 ± 10	109 ± 8
Tb.Sp (μm) a, g	440 ± 85	387 ± 79	404 ± 34	401 ± 38	225 ± 29	240 ± 34	262 ± 40	250 ± 41
Tb.vTMD ($\text{mg HA}/\text{cm}^3$) a, e	893 ± 22	895 ± 15	963 ± 11	962 ± 19	998 ± 22	984 ± 23	1036 ± 22	1026 ± 11

Tabelle 4.4: Trabekuläre microCT Ergebnisse. Mittels microCT gemessene, trabekuläre (Tb), statische Knochenparameter an der tibialen Metaphyse, 105 μm distal der Wachstumsfuge an Tag 0, 5, 10 und 15 in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900 μe ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet (Loaded), rechte Tibia nicht belastet (Kontrolle)); (Mittelwert \pm Standardabweichung); ANOVA an Tag 0 und 15: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung, $p < 0.05$.

Histomorphometrie	LC Mäuse				Sost KO Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
trabekulär	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=7)	Loaded (n=7)	Kontrolle (n=6)
Tb.sLS/BS (%) a, b, d	33.34 ± 9.2	35.21 ± 9.14	35.17 ± 11.29	25.59 ± 11.68	39.98 ± 7.16	40.6 ± 8.45	31.68 ± 16.98	43.99 ± 10.74
Tb.dLS/BS (%) a, c, d, e	4.74 ± 4.5	1.51 ± 1.37	10.51 ± 6.7	10.35 ± 5.43	46.93 ± 6.33	27.17 ± 9.64	33.24 ± 8.47	22.59 ± 5.44
Tb.MS/BS (%) a, b, c, e, f	21.41 ± 5.04	18.9 ± 4.75	26.59 ± 7.25	20.19 ± 4.52	66.92 ± 5.1	47.47 ± 7.64	49.08 ± 9.22	38.22 ± 17.43
Tb.MAR (µm/day) a, b, d	0.96 ± 0.25	1.05 ± 0.26	1.68 ± 0.27	1.68 ± 0.38	2.24 ± 0.35	1.78 ± 0.18	2.42 ± 0.69	2.12 ± 0.19
Tb.BFR/BS (µm/day) a, c, e	0.2 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.46 ± 0.17	0.36 ± 0.14	1.49 ± 0.19	0.85 ± 0.22	1.17 ± 0.32	0.95 ± 0.14

Tabelle 4.5: Trabekuläre dynamische Histomorphometrie Ergebnisse. Durch dynamische Histomorphometrie gewonnene trabekuläre (Tb) Knochenformationsparameter an der tibialen Metaphyse, 105µm distal der Wachstumsfuge zwischen Tag 3 und 12 in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet (Loaded), rechte Tibia nicht belastet (Kontrolle)); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung, $p < 0.05$.

4.3 Einfluss des Genotyps auf die Knochenmasse und deren Dynamik während der skeletalen Reifung in Abwesenheit zusätzlicher mechanischer Stimuli

Langzeit-Sclerostin-Defizienz erhöht die Knochenmasse und -formation in beiden Kompartimenten während der Skelettreifung gegenüber den Kontrolltieren, auch in Abwesenheit von zusätzlicher mechanischer Belastung.

4.3.1 Kortikales Kompartiment

Junge und adulte *Sost* KO Mäuse hatten am tibialen Mittelschaft der Kontrolltibiae eine größere Kortikalis als LC Mäuse gleichen Alters (exemplarisch in jungen Mäusen: Ct.Ar: +85%, Ct.Ar/T.Ar: +26%, Ct.Th: +61% und in adulten Mäusen: Ct.Ar: +119%, Ct.Ar/T.Ar: +33%, Ct.Th: +82%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0001$) (Tabelle 4.2). Außerdem hatten junge *Sost* KO Mäuse aufgrund einer größeren endokortikalen Mineralisierungsfläche bei gleicher endokortikaler Mineralisierungsrate eine höhere endokortikale Knochenformation als LC Mäuse gleichen Alters in der Kontrolltibia (Ec.MAR, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.8957$; Ec.MS/BS: +23%, Ec.BFR/BS: +24%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0002$) (Tabelle 4.3). Die periostale Knochenformation der 10 Wochen alten Mäusen war hingegen zwischen den beiden Genotypen ähnlich (Ps.MS/BS, Ps.BFR/BS, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.2037$) (Tabelle 4.3), auch die periostale Mineralisierungsrate, obwohl statistisch signifikant größer in jungen *Sost* KO Mäusen, war in absoluten Werten nahezu identisch: LC 10 Wochen: 0.92 ± 0.33 µm/day; *Sost* KO 10 Wochen: 0.95 ± 0.19 µm/day (Ps.MAR: +3%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.0065$)

(Tabelle 4.3). In adulten *Sost* KO Tieren war sowohl die endokortikale, als auch die periostale Knochenformation bei gleicher Mineralisierungsrate aufgrund der signifikant größeren Mineralisierungsfläche größer als in den gleichaltrigen Kontrollen (Ec.MS/BS: +44%, Ec.BFR/BS: +80%, Ps.MS/BS: +162%, Ps.BFR/BS: +190%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0103$; Ec.MAR, Ps.MAR, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.1104$) (Tabelle 4.3).

Dem folgend war die Differenz der statischen kortikalen Knochenparameter in Abwesenheit zusätzlicher mechanischer Stimuli zwischen jungen und adulten Individuen in den *Sost* KO wesentlich größer als in den LC Mäusen (exemplarisch Ct.Ar: +428%, Ct.Ar/T.Ar: +100%, Ct.Th: +423%, ANOVA Genotyp*Alter $p < 0.0001$) (Tabelle 4.2). Diese höheren Zuwächse an kortikaler Knochenmasse wurden hauptsächlich über eine höhere Mineralisierungsfläche und weniger über eine erhöhte Mineralisierungsrate erreicht (Tabelle 4.3). Durch diese höheren Knochenmassenzuwächse stieg die Rigidität der Knochen in den *Sost* KO Mäusen während der skeletalen Reifung wesentlich stärker an als in den Kontrolltieren (Imin: +250%, Imax: +800%, ANOVA Genotyp*Alter $p < 0.0001$) (Tabelle 4.2).

4.3.2 Trabekuläres Kompartiment

Sost KO Mäuse hatten gegenüber LC Kontrollen sowohl mehr, als auch dickere Trabekel und folglich eine höhere trabekuläre Knochenfraktion und, dazu passend, eine erhöhte trabekuläre Knochenformation. Das gilt für junge (Tb.BV/TV: +300%, Tb.N: +49%, Tb.Th: 97%, Tb.MAR: +7%, Tb.MS/BS: +151%, Tb.BFR/BS: +305%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0001$) (Tabelle 4.4 und 4.5), als auch für adulte Tiere (Tb.BV/TV: +617%, Tb.N: +61%, Tb.Th: +131%, Tb.MAR: +89%, Tb.MS/BS: +89%, Tb.BFR/BS: +164%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0336$) (Tabelle 4.4 und 4.5).

Gleichsam zum kortikalen Kompartiment stieg das trabekuläre Gesamtvolumen und die Dicke der Trabekel in *Sost* KO Mäusen aufgrund der dauerhaft erhöhten Mineralisierungsfläche und -rate während der skeletalen Reifung stärker an als in den Kontrolltieren (Tb.BV/TV: +79%, Tb.Th: +41%, ANOVA Genotyp*Alter $p < 0.001$) (Tabelle 4.4). Die Anzahl der Trabekel blieb in beiden Genotypen während des Alterungsprozesses dabei nahezu konstant (Tb.N in *Sost* KO Mäusen: +5%, in LC Mäusen: -3%, ANOVA Genotyp*Alter $p = 0.821$) (Tabelle 4.4).

4.4 Einfluss des Genotyps auf die adaptive Knochenantwort bei mechanischer Belastung

Die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung ist bei Langezeit-Sclerostin-Defizienz in beiden Altersgruppen in der Kortikalis erhöht. Im trabekulären Kompartiment lässt sich dies nur für die jungen Individuen sicher nachweisen.

4.4.1 Kortikales Kompartiment

An Tag 0 gab es keine Unterschiede hinsichtlich der kortikalen statischen Knochenparameter der linken (belasteten) und der rechten (unbelasteten) Tibia in beiden Genotypen und Altersgruppen (Tabelle 4.2).

An Tag 15 wurden weder bei den jungen, noch bei den alten LC Mäusen signifikante Veränderungen der Kortikalisgröße durch die mechanische Belastung beobachtet (Ct.Th, Ct.Ar/T.Ar, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.103$) (Tabelle 4.2). Die kortikale Dichte verringerte sich sogar signifikant (10 Wochen alte LC Mäuse: -1.9%, 26 Wochen alte LC Mäuse: -0.8%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.016$) (Tabelle 4.2). Junge LC Mäuse reagierten jedoch endokortikal auf die mechanische Belastung mit erhöhten Knochenformationsparametern (Ec.MS/BS: +17%, Ec.MAR: +24%, Ec.BFR/BS: +46%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0488$) (Tabelle 4.3). Periostal war hingegen nur eine geringe Erhöhung der Mineralisationsfläche, nicht jedoch der Mineralisationsrate oder der Gesamtknochenformation zu beobachten (Ps.MS/BS: +52%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.0397$; Ps.MAR, Ps.BFR/BS, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.6504$) (Tabelle 4.3). Die statischen kortikalen Knochenparameter der 10 Wochen alten LC Mäuse wurden durch diese, in absoluten Zahlen nur gering erhöhte, endokortikale Mineralisation in Reaktion auf mechanische Belastung nicht signifikant verändert (Ct.Th, Ct.Ar/T.Ar, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.470$) (Tabelle 4.2). In 26 Wochen alten LC Mäusen hatte die mechanische Belastung keinen signifikanten Effekt auf die kortikale Mineralisation (Ec.MS/BS, Ec.MAR, Ec.BFR/BS, Ps.MS/BS, Ps.MAR, Ps.BFR/BS, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.1222$) (Tabelle 4.3).

Im Gegensatz dazu zeigten die *Sost* KO Tiere beider Altersgruppen eine signifikante, adaptive kortikale Knochenantwort der belasteten gegenüber der Kontrolltibia in nahezu allen statischen Parametern (10 Wochen alte *Sost* KO Mäuse: Ct.Ar: +8%, Ct.Ar/T.Ar: +3%, Ct.Th: +7%, Ct.vTMD: +1.4% und 26 Wochen alte *Sost* KO Mäuse: Ct.Ar: +5%, Ct.Ar/T.Ar: +4%, Ct.Th: +9%, Ct.vTMD: +1.1% (gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.05$)) (Tabelle 4.2). Die Ergebnisse der dynamischen Histomorphometrie waren dazu passend, da in beiden Altersgruppen sowohl die endokortikale, als auch die periostale Knochenformation durch mechanische Belastung erhöht war (10 Wochen alte *Sost* KO Mäuse: Ec.MS/BS: +13%, Ec.MAR: 32%, Ec.BFR/BS: +51%, Ps.MS/BS: +166%, Ps.MAR: +71%, Ps.BFR/BS: +329% und 26 Wochen alte *Sost* KO Mäuse: Ec.MS/BS: +41%, Ec.MAR: 30%, Ec.BFR/BS: +89%, Ps.MS/BS: +149%, Ps.MAR: +73%, Ps.BFR/BS: +300% (gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0254$)) (Tabelle 4.3). Diese deutliche anabole Reaktion auf mechanische Belastung führte weder in den jungen, noch in den adulten Tieren zu einer erhöhten Steifigkeit der Kortikalis innerhalb des Belastungszeitraums, wenngleich ein Trend in diese Richtung erkennbar war (Imin, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.130$; Imax, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.084$) (Tabelle 4.2).

Anhand der Differenz zwischen belasteter und Kontrolltibia an Tag 15 (= interlimb differences) lässt sich erkennen, dass die Reaktion der tibialen Kortikalis von Langzeit-Sclerostin-defizienten Tieren beider Altersgruppen auf mechanische Belastung signifikant größer war als in den LC Mäu-

sen (z.B. Tag 15: 10 Wochen alte Mäuse: Ct.Th: +800%; 26 Wochen alte Mäuse: Ct.Th: +1350%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.001$) (Tabelle 4.6). In jungen und adulten *Sost* KO Mäusen lag diesem größeren Zuwachs an z.B. kortikaler Flächenfraktion und Dicke gegenüber den LC Tieren eine signifikant höhere periostale Knochenantwort zugrunde (10 Wochen alte Mäuse: Ps.MS/BS: +369%, Ps.MAR: +99%, Ps.BFR/BS: +2475% und 26 Wochen alte Mäuse: Ps.MS/BS: +1157%, Ps.MAR: +100%, Ps.BFR/BS: +1425% (ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.001$)) (Tabelle 4.7). Die endokortikale Reaktion auf mechanische Belastung war in jungen *Sost* KO in etwa gleich groß wie in den LC Mäusen (Ec.MS/BS, Ec.MAR, Ec.BFR/BS, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.199$) (Tabelle 4.7). In adulten Mäusen war jedoch nicht nur die periostale, sondern auch die endokortikale Knochenformation des *Sost* KO Genotyps signifikant erhöht (Ec.BFR/BS: +292%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.041$) (Tabelle 4.7). Die übrigen histomorphometrischen Marker zeigten diese Erhöhung nur trendweise (Ec.MS/BS, Ec.MAR, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.106$) (Tabelle 4.7).

kortikal, diaph. 5%	LC Mäuse		<i>Sost</i> KO Mäuse	
	10 Wochen	26 Wochen	10 Wochen	26 Wochen
Parameter	Interlimb	Interlimb	Interlimb	Interlimb
Tag 15	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
lmax (mm ⁴) a	0 ± 0.01	0 ± 0	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01
lmin (mm ⁴) a	0 ± 0	0 ± 0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Ct.Ar (mm ²) a	0.01 ± 0.02	-0.01 ± 0.02	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.03
T.Ar (mm ²)	0.02 ± 0.03	-0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.08	0.02 ± 0.05
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²) a	0 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Ct.Th (µm) a	2 ± 6	2 ± 6	18 ± 6	29 ± 24
Ct.vTMD (mg HA/cm ³) a	-23.94 ± 15.88	-10.72 ± 8.5	17.41 ± 18.8	14.85 ± 11.8

Tabelle 4.6: Kortikale Interlimb Daten der microCT Ergebnisse an Tag 15. Differenz der absoluten Werte von belastetem und Kontrollbein an Tag 15 (=interlimb difference) der mittels microCT gemessenen kortikalen (Ct), statischen Knochenparameter am tibialen Mittelschaft in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet, rechte Tibia nicht belastet); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Genotyp*Alter, $p < 0.05$.

Histomorphometrie	LC Mäuse		Sost KO Mäuse	
	10 Wochen	26 Wochen	10 Wochen	26 Wochen
kortikal	Interlimb (n=7)	Interlimb (n=6)	Interlimb (n=6)	Interlimb (n=7)
Ec.sLS/BS (%) b	-8.6 ± 11.2	10.6 ± 10.8	-15.3 ± 22.9	-4.2 ± 19.1
Ec.dLS/BS (%) a, c	15 ± 9.9	1.1 ± 10.3	16.7 ± 13.1	21.6 ± 13.6
Ec.MS/BS (%)	10.7 ± 11.5	6.5 ± 10.9	9 ± 7	19.5 ± 16.4
Ec.MAR (µm/day)	0.28 ± 0.21	0.16 ± 0.29	0.39 ± 0.19	0.37 ± 0.71
Ec.BFR/BS (µm/day) a	0.35 ± 0.15	0.13 ± 0.2	0.46 ± 0.14	0.51 ± 0.37
Ps.sLS/BS (%) a	3 ± 24.6	4.1 ± 21.2	-36.4 ± 36	2 ± 17
Ps.dLS/BS (%) a	8.3 ± 11.1	3.7 ± 2.4	62.3 ± 16.6	43.4 ± 20.7
Ps.MS/BS (%) a	11.7 ± 11.8	5.5 ± 10.2	54.9 ± 13.8	46.5 ± 15.6
Ps.MAR (µm/day) a	-0.06 ± 0.33	0.04 ± 0.1	0.68 ± 0.15	0.44 ± 0.16
Ps.BFR/BS (µm/day) a, b, c	0.04 ± 0.21	0.04 ± 0.06	1.03 ± 0.14	0.61 ± 0.13

Tabelle 4.7: Kortikale Interlimb Daten der dynamischen Histomorphometrie. Differenz der absoluten Werte von belastetem und Kontrollbein (=interlimb difference) der durch dynamische Histomorphometrie gewonnenen, endokortikalen (Ec) und periostalen (Ps) Knochenformationsparameter des tibialen Mittelschaftes zwischen Tag 3 und 12 in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µe ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet, rechte Tibia nicht belastet); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Genotyp*Alter, $p < 0.05$.

4.4.2 Trabekuläres Kompartiment

An Tag 0 gab es keine Unterschiede hinsichtlich der statischen Knochenparameter (Tb.Th. Tb.BV/TV) der linken (belasteten) und rechten (unbelasteten) Tibia in beiden Genotypen und Altersgruppen (Tabelle 4.4).

In den LC Mäusen führte die mechanische Belastung zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der trabekulären Dicke und folglich der trabekulären Knochenfraktion in 10 und in 26 Wochen alten LC Mäusen (10 Wochen alte LC Mäuse: Tb.Th: +14%, Tb.BV/TV: +20%; 26 Woche alte LC Mäuse: Tb.Th: +10%, Tb.BV/TV: +25%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.018$) (Tabelle 4.4). Absolut war der Gesamtzuwachs an trabekulärer Dicke und Volumen aber nur minimal (Tb.BV/TV: +0.01 mm³/mm³ in beiden Altersgruppen; Tb.Th: junge LC Mäuse: +6µm, adulte LC Mäuse: +5µm (Tabelle 4.4)). Zu diesen Ergebnissen passend waren auch die meisten dynamischen Knochenformationsparameter in den LC Kontrollen in Reaktion auf mechanische Belastung nicht signifikant erhöht (10 Wochen alte LC Mäuse: Tb.MS/BS, Tb.MAR, Tb.BFR/BS; 26 Wochen alte LC Mäuse: Tb.MAR, Tb.BFR/BS, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.1171$) (Tabelle 4.5). Lediglich die Mineralisationsfläche in den 26 Wochen alten Mäusen zeigte eine statistisch signifikante Reaktion auf mechanische Belastung (Tb.MS/BS: +32%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.0374$) (Tabelle 4.4).

An Tag 15 hatte die mechanische Belastung im Gegenzug dazu einen deutlichen Effekt auf die trabekuläre Dicke, Dichte und Anzahl und folglich auch auf die trabekuläre Knochenfraktion in jungen *Sost* KO Mäusen (Tb.BV/TV: +30%, Tb.Th: +15%, Tb.N: +8%, Tb.vTMD: +1.4%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.045$) (Tabelle 4.4). Passend dazu war auch die trabekuläre Mineralisierung in diesen Mäusen deutlich erhöht (Tb.MAR: 26%, Tb.MS/BS: +41%, Tb.BFR/BS: +75%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.0328$) (Tabelle 4.5). Auch in adulten *Sost* KO Mäusen nahm die trabekuläre Dicke und Dichte in Reaktion auf die mechanische Belastung signifikant zu (Tb.Th: +9%, Tb.vTMD: +1%, gepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.014$) (Tabelle 4.4). Die zwar vorhandenen Zuwächse an trabekulärem Knochenvolumen und in der trabekulären Anzahl waren nicht statistisch signifikant (Tb.BV/TV, Tb.N, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.149$) (Tabelle 4.4). Zu dieser geringeren Reaktion der statischen Parameter passend war ebenfalls nur ein Trend ohne statistische Signifikanz zu erhöhter trabekulärer Mineralisation erkennbar (Tb.MAR, Tb.MS/BS, Tb.BFR/BS, gepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.0811$) (Tabelle 4.5).

Zusammenfassend war der Effekt der mechanischen Belastung im trabekulären Kompartiment in jungen *Sost* KO Mäusen deutlich ausgeprägter, als in den Kontrolltieren (z.B. Tag 15: Tb.BV/TV: +500%, Tb.Th: +100%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.008$) (Tabelle 4.8). Während die insgesamt schwächere trabekuläre Reaktion in den adulten Tieren sich zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschied (z.B. Tag 15: Tb.BV/TV: +200%, Tb.Th: +50%, Tb.MS/BS: -1,5%; Tb.MAR: +223%, Tb.BFR/BS: +64%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.47$) (Tabelle 4.9). Die erhöhte trabekuläre Reaktion auf mechanische Belastung in den jungen *Sost* KO Tieren zeigte sich dabei in einer trendweise erhöhten Mineralisationsrate, einer signifikant erhöhten Mineralisationsfläche und einer dadurch ebenfalls signifikant erhöhten Knochenformation (Tb.MAR: +1633%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p = 0.056$; Tb.MS/BS: +680%, Tb.BFR/BS: +6300%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p < 0.002$) (Tabelle 4.9).

trabekulär, metaph. 10%	LC Mäuse		Sost KO Mäuse	
	10 Wochen	26 Wochen	10 Wochen	26 Wochen
Parameter	Interlimb	Interlimb	Interlimb	Interlimb
Tag 15	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm ³ /mm ³) a	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.04
Tb.N (1/mm) a	-0.28 ± 0.33	-0.01 ± 0.27	0.34 ± 0.35	0.11 ± 0.48
Tb.Th (µm) a	6 ± 4	6 ± 5	12 ± 5	9 ± 7
Tb.Sp (µm)	53 ± 60	3 ± 45	-15 ± 25	12 ± 30
Tb.vTMD (mg HA/cm ³) a	-2.17 ± 14.3	1.43 ± 14.28	13.86 ± 13.57	9.57 ± 16.72

Tabelle 4.8: Trabekuläre Interlimb Daten der microCT Ergebnisse an Tag 15. Differenz der absoluten Werte von belastetem und Kontrollbein an Tag 15 (=interlimb difference) der mittels microCT gemessenen, trabekulären (Tb), statischen Knochenparameter an der tibialen Metaphyse, 105µm distal der Wachstumsfuge in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet, rechte Tibia nicht belastet); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Genotyp*Alter, p <0.05.

Histomorphometrie	LC Mäuse		Sost KO Mäuse	
	10 Wochen	26 Wochen	10 Wochen	26 Wochen
trabekulär	Interlimb (n=7)	Interlimb (n=6)	Interlimb (n=6)	Interlimb (n=7)
Tb.sLS/BS (%) c	-1.9 ± 9	9.6 ± 16.9	-0.6 ± 5.3	-8 ± 12.4
Tb.dLS/BS (%) a	3.8 ± 4.9	2.4 ± 9.1	19.8 ± 9.9	10.3 ± 8.3
Tb.MS/BS (%) a, c	2.5 ± 3.6	6.4 ± 6.4	19.5 ± 10.7	6.3 ± 7.2
Tb.MAR (µm/day)	-0.03 ± 0.36	0.03 ± 0.36	0.46 ± 0.44	0.07 ± 0.4
Tb.BFR/BS (µm/day) a, c	0.01 ± 0.09	0.11 ± 0.19	0.64 ± 0.29	0.18 ± 0.29

Tabelle 4.9: Trabekuläre Interlimb Daten der dynamischen Histomorphometrie. Differenz der absoluten Werte von belastetem und Kontrollbein (=interlimb difference) der durch dynamische Histomorphometrie gewonnenen, trabekulären (Tb) Knochenformationsparameter an der tibialen Metaphyse, 105µm distal der Wachstumsfuge in 10 bzw. 26 Wochen alten Mäusen, die einer axial-kompressiven Belastung von +900µε ausgesetzt waren (linke Tibia dynamisch belastet, rechte Tibia nicht belastet); (Mittelwert ± Standardabweichung); ANOVA: signifikanter Effekt von (a) Genotyp, (b) Alter (c) Genotyp*Alter, p <0.05.

4.5 Einfluss des Alters auf die adaptive Knochenantwort bei mechanischer Belastung

Die Skelettreifung verringert die adaptive Mineralisierung der Kortikalis in Reaktion auf mechanische Belastung in beiden Genotypen, insbesondere in den Sost KO Mäusen. Dieser Effekt ist

im trabekulären Kompartiment in diesem Experiment jedoch nur in Sost KO Mäusen statistisch nachweisbar.

4.5.1 Kortikales Kompartiment

In adulten LC Mäusen war der Einfluss des Alters auf die Mechanosensibilität bei insgesamt geringer Reaktion auf die mechanische Belastung nur deutlich eingeschränkt zu evaluieren (siehe 4.3). Die endokortikale Knochenformation in Reaktion auf mechanische Belastung war in adulten gegenüber den Jungtieren verringert, die übrigen endokortikalen dynamischen Knochenparameter zeigten diese Signifikanz jedoch nicht (Ec.BFR/BS: -62%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p=0.036$; Ec.MS/BS, Ec.MAR, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p>0.392$) (Tabelle 4.7). In der adaptiven periostalen Mineralisierungsaktivität war kein altersabhängiger Effekt auf die Mechanosensibilität nachweisbar (Ps.MS/BS, Ps.MAR, Ps.BFR/BS, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p>0.343$) (Tabelle 4.7). In erster Linie ist dies jedoch auf die insgesamt nahezu ausgebliebene periostale Reaktion auf mechanische Belastung zurückzuführen. Aus diesem Grund ist in diesem Genotyp statistisch auch kein Effekt des Alters auf die adaptiven Veränderungen der statischen Knochenparameter nachweisbar (siehe 4.3).

In *Sost* KO Mäusen verringerte sich die adaptive Knochenformation mit zunehmendem Alter. Hauptsächlich nahm dabei die periostale Mineralisierungsaktivität ab (Ps.BFR/BS: -34%, Ps.MAR: -35%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p<0.046$, Ps.MS/BS: -15%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p=0.331$) (Tabelle 4.7). Die endokortikale Mineralisierungsaktivität in Reaktion auf mechanische Belastung blieb mit zunehmendem Alter hingegen etwa konstant (Ec.MS/BS, Ec.BFR/BS, Ec.MAR, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p>0.178$) (Tabelle 4.7). Trotz dieses Ungleichgewichtes zwischen im wesentlichen konstanter endokortikaler und abnehmender periostaler Mineralisierungsaktivität blieben die Zuwächse der Kortikalis in Reaktion auf mechanische Belastung mit zunehmendem Alter konstant (Ct.Th, Ct.Ar/T.Ar, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p>0.255$) (Tabelle 4.6).

4.5.2 Trabekuläres Kompartiment

Ein altersabhängiger Effekt auf die trabekuläre Mineralisierung konnte in LC Mäusen nicht nachgewiesen werden, da bereits wie in 4.3 ersichtlich in beiden Altersgruppen dieses Genotyps kaum eine Reaktion dieses Kompartiments auf mechanische Belastung erkennbar war (Tb.MS/BS, Tb.MAR, Tb.BFR/BS, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p>0.65$) (Tabelle 4.9).

Adulte *Sost* KO Mäuse reagierten trabekulär mit einer trendweise geringeren Mineralisationsrate, einer signifikant geringeren Mineralisationsfläche und folglich einer signifikant geringeren Knochenformationsrate auf mechanische Belastung als junge Mäuse dieses Genotyps auf mechanische Belastung (Tb.MS/BS: -68%, Tb.BFR/BS: -72%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p<0.027$, Tb.MAR: -85%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p=0.129$) (Tabelle 4.9). Diese verringerte altersabhängige Mechanosensibilität zeigte sich trendweise auch in verringerten statischen Knochen-

massenzuwächsen der Spongiosa (Tb.BV/TV: -50%, Tb.N: -68%, Tb.Th: -25%, ungepaarter Zweistichproben t-Test $p > 0.132$) (Tabelle 4.8).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde untersucht wie sich Langzeit-Sclerostin-Suppression und zunehmendes Skeletalter auf die Mechanosensibilität von Knochen in weiblichen Mäusen auswirkt. Die Hypothesen waren:

1. Langzeit-Sclerostin-Defizienz führt zu erhöhten trabekulären und kortikalen Knochenmassenzuwächsen während der skeletalen Reifung gegenüber dem Wildtyp.
2. Die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung ist sowohl in jungen, als auch in adulten weiblichen, langzeit-Sclerostin-defizienten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren verändert.
3. Mit zunehmendem Alter nimmt die knochenanabole Antwort auf mechanische Belastung in beiden Genotypen und Kompartimenten ab.

Im Vorfeld wurden Daten zur Dehnungs-Belastungs-Relation am tibialen Mittelschaft der Mausgruppen durch Experimente mit Dehnungsmessstreifen gewonnen. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die resultierenden Dehnungskräfte bei gleich großen axialen-kompressiven Kräften am kortikalen Mittelschaft in den *Sost* KO Mäusen niedriger waren als in den LC Mäusen. Es lag demnach keine erhöhte Verformbarkeit und somit auch keine erhöhten lokalen Dehnungskräfte in *Sost* KO gegenüber LC Mäusen vor. Die Ergebnisse der Dehnungs-Belastungsexperimente und die der microCT Daten zeigen eher das Gegenteil: der Knochen von *Sost* KO ist steifer als derjenige von altersgleichen Kontrollen. Gleichzeitig wurde das eigentliche Belastungsexperiment auf eine gleiche Dehnungsbelastung von $+900\mu\epsilon$ und nicht nach der applizierten Kraft in N kalibriert, um möglichst gleiche lokale Belastungen am tibialen Mittelschaft zu erreichen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstens, dass Langzeit-Sclerostin-Defizienz in weiblichen Mäusen sowohl kortikal als auch trabekulär zu einem hypertrophen Knochenphänotyp gegenüber dem Wildtyp führt. Dazu passend waren bereits in Abwesenheit von zusätzlicher mechanischer Belastung die Zuwächse an kortikaler und trabekulärer Knochenmasse im Verlauf der Skelettreifung in *Sost* KO Mäusen größer. Gleichzeitig verringert sich mit zunehmendem Skeletalter die kortikale Knochenformation in beiden Genotypen, während die trabekuläre Knochenformation tendenziell zunimmt.

Zweitens bestätigen die hier vorgestellten Ergebnisse im Prinzip Erkenntnisse von Morse und Robling et al.: die adaptive Knochenantwort auf mechanische Belastung der Kortikalis ist in jungen

weiblichen *Sost* KO Mäusen nicht zwingend von der Downregulation von Sclerostin abhängig (59, 60). Erstmals wurde in dieser Studie gezeigt, dass dies auch für die Kortikalis von skeletal ausgereiften, weiblichen *Sost* KO Mäusen gilt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Morse et al. zeigte sich eine anabole Reaktion der Spongiosa von jungen *Sost* KO Mäusen auf mechanische Belastung und diese Reaktion war gegenüber den Kontrolltieren sogar signifikant erhöht. In adulten Tieren war die trabekuläre, adaptive Reaktion auf mechanische Belastung dieser Tiere gegenüber den Kontrolltieren hingegen nur gering akzentuiert. Die erhöhte adaptive kortikale Knochenformation der *Sost* KO Mäuse wurde in beiden Altersgruppen hauptsächlich durch eine erhöhte periostale adaptive Knochenformation erreicht. Zusätzlich war in adulten *Sost* KO Mäusen auch die endokortikale adaptive Knochenformation gegenüber den Wildtypen erhöht.

Drittens wurde gezeigt, dass die in Wildtypen bereits bekannte Altersabhängigkeit der Mechanosensibilität auch in langzeit-Sclerostin-defizienten Mäusen auftritt. Kortikal war die periostale adaptive Knochenformation in skeletal ausgereiften *Sost* KO Mäusen gegenüber den Jungtieren vermindert, während die endokortikale adaptive Knochenantwort vom Alter nicht beeinflusst wurde. Auch das trabekuläre Kompartiment in *Sost* KO Mäusen zeigte mit zunehmendem Skeletalalter eine geringere adaptive Knochenformation auf mechanische Belastung. Das dieser altersabhängige Effekt hauptsächlich in den dynamischen und nicht den statischen Knochenparametern der Kortikalis und der Spongiosa der *Sost* KO Mäuse erkennbar war, könnte an der bereits signifikant größeren kortikalen Knochenoberfläche bzw. dem signifikant größeren trabekulären Knochengesamtvolumen bereits an Tag 0 zwischen adulten und jungen Tieren liegen. Dadurch führt auch eine niedrigere Mineralisationsrate in Reaktion auf mechanische Belastung in den adulten Tieren zu gleich großen Knochenmassenzuwächsen und damit nicht signifikanten Differenzen zwischen jungen und adulten *Sost* KO Mäusen.

5.2 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschung

Im Zuge der Entdeckung des Sclerostin-Wnt/ β -Catenin-Signalweges wurde die These von Tu und Kollegen aufgestellt, dass die Herabregulation von *Sost* und damit eine reduzierte Expression von Sclerostin durch die Osteozyten ein notwendiger Schritt in der kortikalen knochenanabolen Reaktion auf mechanische Belastung sei (48). Im Umkehrschluss dürfte mechanische Belastung in *Sost* KO Tieren zu keinem knochenanabolen Effekt führen. Diese These wurde vor kurzem von Morse et al. und Robling et al. für junge, weibliche *Sost* Ko Mäuse widerlegt. Deren Ergebnisse zeigten einen Effekt von mechanischer Belastung auf das Knochenwachstum der Tibia/Ulna (59, 60). Morse et al. zeigten dabei deutliche regionenspezifische Unterschiede der kortikalen knochenanabolen Reaktion der Tibia auf mechanische Belastung. In der Metaphyse war die Reaktion in *Sost* KO Mäusen gegenüber den Kontrolltieren erhöht (z.B. Ct.Th: +23 % *Sost* KO und +8 % Kontrolltiere), in der mittleren Tibia, etwa am Übergang des proximalen zum mittleren Tibiadrittels (37 % VOI) war die Reaktion etwa gleich groß (z.B. Ct.Th: +15 % *Sost* KO und +15 % Kontrolltiere) und in der mit dieser Studie vergleichbaren 50 % VOI in der mittleren Tibiadiaphyse war die kortikale

Reaktion der *Sost* KO Mäuse sogar etwas geringer als in den Kontrollen (z.B. Ct.Th: +11 % *Sost* KO und +14 % Kontrolltiere) (59). Im Gegensatz dazu zeigten die Daten von Robling et al. netto eine etwa gleich hohe Reaktion der periostalen ulnaren Kortikalis auf mechanische Belastung (MAR, BFR/BS und MS/BS) in 16 Wochen alten *Sost* KO und Kontrollmäusen (60). In dieser Studie wiederum reagierten sowohl die jungen, als auch die skeletal ausgereiften *Sost* KO Tiere mit einer gegenüber den LC Mäusen erhöhten adaptiven kortikalen Knochenantwort. Da Robling et al. die Reaktion der Ulna auf mechanische Belastung untersuchten ist es nicht sinnvoll, deren Ergebnisse direkt mit den hier vorliegenden zu vergleichen.

Auch der direkte Vergleich der kortikalen Ergebnisse von Morse et al. mit denen dieser Studie ist nur eingeschränkt möglich. Die VOI's in der Studie von Morse et al. bezogen sich auf einen starren Anschnitt der Tibia von 7.8mm Länge, beginnend 0.5mm distal der Wachstumsfuge. Die trabekuläre VOI erstreckte sich von 0.5mm distal der Wachstumsfuge 1.2mm nach distal. Die Kortikalis am Mittelschaft wurde in 2 VOI's, jeweils mit einer Länge 0.5mm in proximal-distaler Ausrichtung untersucht (einmal 37 % und einmal 50 % der 7.8mm distal der Wachstumsfuge). Um diese VOI's definieren zu können, scannten Morse et al. jeweils die komplette proximale bis mittlere Tibia auf einer Länge von 7.8mm, beginnend 0.5mm distal der Wachstumsfuge. Die dafür benötigte Scanzeit wurde in der Veröffentlichung nicht genannt (59).

Das kortikale VOI dieser Studie entspricht von der Lage eher dem 50 % kortikalen VOI von Morse et al., es repräsentierte jedoch 5 % der TTL und war damit rund 72 % bzw. 84 % größer (59). Die präsentierten Daten der Studie von Morse et al. für das kortikale VOI umfassen: das kortikale Knochenvolumen (=BV, in mm³), die kortikale Dicke (=Ct.Th, in mm), die periostale und endokortikale Gesamtfläche (=Ps und Ec, in mm) und die Knochenmineraldichte (=TMD, in g/cm³) (59). Diese Studie verwendet hinsichtlich der statischen kortikalen Knochenparameter überwiegend flächen- und nicht volumenbezogene Parameter. Diese Vorgehensweise ist eine internationale Empfehlung und normalerweise Standard in den führenden Fachzeitschriften (wie auch dem Journal of Bone and Mineral Research), da sie den Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien untereinander erlaubt, auch wenn die VOI's unterschiedlich definiert sind (siehe Methodik) (21).

Morse et al. präsentieren des Weiteren die Ausgangsdaten zu Experimentbeginn nicht. In den unbelasteten Tibiae fällt jedoch auf, dass die kortikale Dicke, sowohl der 37 %, als auch der 50 % VOI, in den 10 Wochen alten *Sost* KO Mäusen mit ca. 340µm bzw. 370µm deutlich über denen dieser Studie liegt (ca. 250µm in jungen bzw. ca. 340µm in adulten *Sost* KO Mäusen). Gleiches gilt für die Knochenmineraldichte: Morse et al.: ca. 1.56g/cm³ bzw. 1.74g/cm³ in 10 Wochen alten *Sost* KO gegenüber ca. 1.26g/cm³ in jungen und ca. 1.31g/cm³ in adulten *Sost* KO Mäusen in dieser Studie (59).

Ähnliche Verhältnisse zeigen sich auch im Vergleich der verwendeten Kontrolltiere zwischen Morse et al. und dieser Studie: die kortikale Dicke und Mineraldichte in deren unbelasteten Beinen lagen jeweils über denen der jungen und sogar adulten Kontrolltiere dieser Studie (59). Auch die von Morse et al. berichteten Werte der kortikalen Dicke und Knochenmineraldichte von C57BL/6

Mäusen waren höher, als bereits früher durch unsere AG publizierten Werte für diesen Genotyp: Ct.Th: 0.14-0.17mm bzw. Ct.vTMD 1.21 -1.30 g/cm³ (59, 62).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, widersprechen die von Morse et al. für die knochenanabole Reaktion der Spongiosa auf mechanische Belastung gezeigten Ergebnisse den hier vorgestellten und für die verwendeten Kontrolltiere bekannten Erkenntnissen (59, 62). Obwohl die präsentierten Parameter des trabekulären VOI von Morse et al. denen dieser Studie entsprechen: BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N und vTMD, war im Detail jedoch die Definition des trabekulären VOIs eine andere. In dieser Studie erstreckte sich das trabekuläre VOI von 0.105mm distal der Wachstumsfuge 10 % der TTL nach distal. Sie war damit rund ein Drittel größer und umfasste im proximalen Anteil einen Bereich, der bei Morse et al. ausgeschlossen wurde. Wie bereits in der Kortikalis waren auch die trabekuläre Dicke und Knochenmineraldichte sowohl in den Kontrolltieren, als auch in den *Sost* KO Tieren größer als in den entsprechenden Gruppen dieser Studie (59, 62).

Letztlich bleiben die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den eingangs erwähnten Studien unklar. Möglicherweise liefern unterschiedliche Belastungsprotokolle bei gleicher Spitzenbelastung unterschiedliche Ergebnisse. Eine weitere mögliche Ursache ist die Verwendung unterschiedlicher VOI's/ untersuchter Knochen (Ulna und Tibia). Insbesondere für den direkten Vergleich dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Morse et al. ist dies von Bedeutung. Daten dieser Arbeitsgruppe zeigten kürzlich, dass sich in der Maustibia die „Grenzwerte“ für mechanischen Stress und die Beziehung zwischen Dehnung/ Belastung und der anabolen Knochenantwort in der Meta- und Diaphyse unterscheiden (70). Weiterhin verwendeten Morse et al. kommerziell erwerbbarer C57BL/6 Mäuse als Kontrollen, während in dieser Studie die homozygoten Wildtyp-Wurfgeschwister der *Sost* KO Mauszucht benutzt wurden (59). Letztlich berichteten Morse et al. auch eine andere Dehnungs-Belastungs-Relationen in den *Sost* KO Mäusen: -12.5N führten dort zu +1200µε in 10 Wochen alten weiblichen *Sost* KO Mäusen, während in unserem Experiment -17N zu +1200µε am tibialen Mittelschaft in dieser Altersgruppe führten (59). Der Unterschied in der Dehnungs-Belastungs-Relation der beiden Experimente fällt insbesondere vor den erhöhten kortikalen Knochenparametern in den *Sost* KO Mäusen bei Morse et al. auf, denn eine Erhöhung dieser Werte führte in diesem Experiment zu höheren benötigten axial-kompressiven Kräften (59).

Der Grund für diese Unterschiede bleibt letztlich unklar, denn die Methodik bei der Ermittlung der Dehnungs-Belastungs-Relation unterschied sich rein formell nicht und sowohl die Ausgangstiere für die Mauszucht als auch die verwendeten *Sost* KO Tiere bei Morse et al. kamen von Novartis (59).

Wie weiter oben beschrieben wurden -12.9N zum Erreichen einer Dehnungsbelastung von +900µε am tibialen Mittelschaft genutzt. Als ein initiales Subset von 10 Wochen alten weiblichen *Sost* KO Mäusen mit +1200µε (entspricht -17N) belastet wurde, mussten diese Experimente aufgrund deutlicher Gelenkschwellungen und Schonhaltungen der Tiere ausgesetzt werden. Morse et al. berichteten mit einer Maximalbelastung von -9.0N ca. +1200µε in den C57BL/6 Kontrollen erreicht zu haben (59). Dieser Wert liegt rund 2N unterhalb dessen, was von unserer AG in früheren Experimenten mit denselben Tieren zum Erreichen von +1200µε gemessen wurde (62). Weder Mor-

se noch Robling et al. veröffentlichten Daten welche belegen, dass an Tag 0 zwischen belastetem und kontralateralem Bein kein signifikanter Unterschied bestand und der Vergleich beider Seiten zur Evaluation eines Effektes durch die applizierte Belastung überhaupt sinnvoll ist (wenngleich dies zu vermuten ist) (59, 60). Diese Studie kann mit den Daten von Tag 0 beweisen, dass zwischen den beiden Gliedmaßen zu Beginn des Experiments keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der statischen Knochenparameter in beiden Altersgruppen und Genotypen bestanden und daher die aufgetretenen Unterschiede zwischen beiden Seiten zum Ende des Experimentzeitraumes zu aller erst durch die applizierte mechanische Belastung zu erklären sind.

Bei allen Unterschieden bleibt eine Grundaussage der drei Studien dieselbe: die kortikale knochenanabole Reaktion von jungen weiblichen, langzeit-Sclerostin-defizienten Mäusen auf mechanische Belastung kann unabhängig von der Sclerostin-Downregulation stattfinden (59, 60). Dieses Experiment hat neu gezeigt, dass dies auch für skeletal ausgereifte Tiere gilt. Die zugrundeliegenden biochemischen Signalwege sind noch nichtvollständig verstanden. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch zeigen, dass in *Sost* KO Mäusen der Wnt-Inhibitor Dickkopf-1 kompensatorisch hochreguliert ist und auf mechanische Belastung reagiert (69). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in *Sost* KO Mäusen die Wnt-Target Gene *Lef1* und *Axin2* durch mechanische Belastung hochreguliert wurden (71). Es scheinen also andere Signalwege in die Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges involviert zu sein, die den Verlust von Sclerostin zumindest teilweise kompensieren.

Es wird außerdem vermutet, dass Sclerostin nicht nur einen Effekt als Inhibitor im Knochenanabolismus, sondern auch einen Effekt als Stimulator auf die Knochenresorption hat. So waren in *Sost* KO Mäusen bei Morse et al. die Osteoklastenzahl, die Osteoklastenoberfläche und die mit Osteoklasten besiedelte Knochenfraktion in den Entlastungsversuchen gegenüber den Kontrollen stabil, während die Kontrolltiere erhöhte Knochenresorptionsparameter zeigten (59). Auch Tian et al. konnten zeigen, dass unter Sclerostin-Inhibition die Knochenresorption in 10 Monate alten Ratten gegenüber der immobilisierten Kontrollgruppe reduziert war (72, 73). Der gleiche resorptionsinhibierende Effekt durch kurzzeitige Sclerostin-Inhibition konnte auch für ovariectomierte Ratten gezeigt werden (74). In Zellexperimenten zeigte sich dazu passend, dass Sclerostin zum einen über eine Stimulation der Carbo-Anhydrase-2-Expression und zum anderen über die Regulation von RANK-RANKL die Osteolyse fördert (75–77).

5.3 Limitationen

Die zurückgekreuzten homozygoten Wildtyp-Wurfgeschwister der ursprünglich von Novartis bereitgestellten *Sost* KO Mäuse unseres Zuchtprogramms waren eine akkurate Kontrollgruppe um den Effekt von Langzeit-Sclerostin-Defizienz auf die knochenanabole adaptive Knochenantwort zu untersuchen, da sich diese Tiere lediglich im Vorhandensein des *Sost* Gens unterschieden. Die gezüchteten Kontrolltiere zeigten dabei mit kommerziell erwerbbaaren C57BL/6 Tieren vergleichbare

Ergebnisse hinsichtlich der Dehnungs-Belastungs-Relation sowie der kortikalen und trabekulären Knochenparameter (62, 78).

Die Ergebnisse der Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung unterliegen naturgemäß relativ breiten Schwankungen da bereits ein minimal versetzter DMS oder unterschiedliche Mengen Klebstoff einen deutlichen Einfluss haben können. Diesen Umständen wurde durch eine relativ große Untersuchungsgruppe, jeweils mehrfachen Versuchsdurchläufen und einer anschließenden Fehleranalyse der ermittelten Daten Rechnung getragen. Insgesamt passten die ermittelten Daten gut zu anderen Versuchsergebnissen der AG und bildeten damit eine solide Grundlage für das eigentliche Belastungsexperiment (62).

Hinsichtlich der Dehnungs-Belastungs-Beziehung in den LC Mäusen war auffällig, dass die notwendige Kraft zum Erreichen der gewünschten Dehnungsbelastung zwischen den beiden Altersgruppen nicht wesentlich schwankte, obwohl zwischen den beiden deutliche Unterschiede in der Knochenmorphologie bestanden (siehe Tabelle 4.1 und 4.2).

Ursächlich dafür sind möglicherweise altersbedingte Veränderungen der Knochengeometrie. Es ist bekannt, die Tibiae von 26 Wochen alten C57BL/6 Mäusen eine stärkere Krümmung als die von 10 Wochen Mäusen aufweisen. Das führt unter einer axial-kompressiven Belastung zu erhöhten Deformationskräften, folglich erhöhten lokalen Spitzenbelastungen und damit zu einem, der zunehmendem Rigidität und Knochenmasse gegenteiligen, Effekt (50, 79, 80).

Eine wichtige Limitation dieser Studie ist, dass keine senilen Altersgruppen verwendet wurden. Da Holguin et al. zeigten, dass die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und dessen Reagibilität auf mechanische Belastung vom Alter abhängig ist, wäre diese Altersgruppe eine sinnvolle Ergänzung gewesen (81). Für das Fehlen dieser Altersgruppe gibt es mehrere Gründe:

- a) Die nötige Kraft zum Erreichen von bereits $+900\mu\epsilon$ am Mittelschaft der Tibia steigt mit zunehmendem Alter (und damit zunehmender Knochenmasse) der Tiere an. Prognostiziert man den Unterschied von 2.6N zwischen 10 und 26 Wochen alten *Sost* KO Mäusen in ein seniles Lebensalter, so ist es möglich, dass man den Bereich von 17N deutlich überschreitet (26 Wochen alte weibliche *Sost* KO Mäuse benötigten für $+1200\mu\epsilon$ bereits 19.3N). Dieser Bereich zeigte aber bereits in jungen Tieren deutlich gelenkschädigende Wirkungen und zwang zum Experimentabbruch.
- b) Die Sterblichkeit der *Sost* KO Mäuse stieg mit dem Alter aus unklarer Ursache an. Daher hätte eine entsprechende Zucht zu einer nicht mehr zu rechtfertigenden Populationsgröße geführt.
- c) In C57BL/6 Mäusen wurde postuliert, dass der Hauptunterschied in Mechanosensibilität auf mechanische Belastung bereits früh im Reifungsprozess auftritt. Daher kann auch aus dem Vergleich zwischen jungen und adulten Tieren ein großer Erkenntnisgewinn erfolgen (51–54, 82).

In dieser Studie zeigten die Kontrolltiere insgesamt nur einen geringen Effekt auf die mechanische Belastung. Der Grund dafür ist, dass die adaptive anabole Knochenantwort abhängig von den maximal verwendeten Dehnungsbelastungen ist (83). Da das Experiment mit $+900\mu\epsilon$ durchgeführt werden musste, war die anabole Knochenformation in LC Mäusen in diesem Experiment erwartungsgemäß geringer, als in vergleichbaren Studien in C57BL/6 Mäusen mit $+1200\mu\epsilon$ (61). Dennoch lag die verwendete Belastung über dem, was natürlicherweise beim Gehen (ca. $<300\mu\epsilon$) oder Springen (ca. $<600\mu\epsilon$) von C57BL/6 Mäusen erreicht wird (78).

Wie in 5.2 erwähnt hat Sclerostin nicht nur einen Einfluss auf den Knochenanabolismus, sondern auch auf die Knochenresorption. Der Einfluss auf die Knochenresorption durch Langzeit-Sclerostin-Defizienz und zunehmende Skelettreife war kein Gegenstand dieser Studie. Jedoch wurde mit den gewonnenen microCT Datensätzen in einem weiteren Projekt eine 4D-Morphometrie durchgeführt und dabei sowohl die Knochenformation- und -resorption über die gesamten VOI's analysiert. Die Methodik der 4D-Morphometrie wurde durch unsere AG entwickelt und vorgestellt (84). Sie ist in der Erfassung der dynamischen Knochenparameter durch die computergestützte Erfassung und Auswertung eines dreidimensionalen Volumens exakter als klassische Histomorphometrie, da hier subjektive Fehler, z.B. durch schlecht differenzierbare Ebenen oder schnittweise bedingte geringe Trabekelzahlen vermeidbar sind (84). Die Ergebnisse dieser 4D-Morphometrie-Studie passen hinsichtlich des Knochenanabolismus in Reaktion auf mechanische Belastung gut zu den histomorphometrischen Daten dieser Studie, sind teilweise in der eingangs erwähnten Veröffentlichung integriert, werden hier jedoch im Detail nicht vorgestellt (69).

Obwohl die verwendeten Färbungen der dynamischen Histomorphologie unterschiedlich waren (LC: Calcein/ Calcein und *Sost* KO: Calcein/ Alizarin) sind die Unterschiede in der knochenanabolen Reaktion zwischen den Genotypen jedoch zu deutlich, um allein mit dem unterschiedlichen Farbstoff erklärt werden zu können und passen auch zu den statischen Knochenparametern. Des Weiteren zeigten Sun et al. und Pautke et al., dass Calcein und Alizarin miteinander vergleichbare Ergebnisse erzielen (64, 65).

Die Aussagen über die Wirkung von axial-kompressiven Kräften am tibialen Mittelschaft begrenzen sich in dieser Studie auf die Dehnungsbelastung in der anterioren Knochenoberfläche und wurden lediglich mit einem DMS bestimmt. Eine Auswertung hinsichtlich der genauen Dehnungs- und Kompressionswirkung über den gesamten Knochen mit Hilfe von Finite-Elemente-Modellen würde detailliertere Erkenntnisse über die Knochenmorphologie unter Belastung ermöglichen. Die Untersuchungen hierzu wurden ebenfalls in einem Partnerprojekt durchgeführt und werden hier nicht im Detail vorgestellt (85). Möglichweise fände sich dadurch eine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse im trabekulären und kortikalen Kompartiment zwischen Morse et al. und dieser Studie finden. Auch in der Studie von Robling et al. fielen zwischen den Genotypen veränderte örtliche Belastungs-Reaktions-Zusammenhänge auf. Während in Regionen mit hoher Dehnungsbelastung (medial und lateral) in den Kontrolltieren die höchste Reaktion auf die mechanische Belastung stattfand, zeigten die *Sost* KO Mäuse eine gegensätzliche Reaktion, daher vermuteten Robling et al. in Sclerostin und dessen Regulation einen Sensormechanismus für die

lokalen Spitzenbelastungen im Knochen (60). Die Ergebnisse dieser Studie sind weiterhin nur eingeschränkt auf ein klinisches Setting übertragbar, da der Effekt einer genetisch verursachten Langzeit-Sclerostin-Defizienz untersucht wurde. Ein klinisch relevanteres Setting wäre eine zeitlich begrenzte, erst nach der Skelettreifung einsetzende Sclerostin-Defizienz (z.B. im Rahmen einer Behandlung mit entsprechenden Antikörpern), wie sie in natura beobachtet bzw. durch neue Behandlungsmethoden erzeugt wird. Jedoch müsste dafür entweder das *Sost* Gen erst nach Erreichen der Skelettreife ausgeknockt oder Tieren über Monate oder Jahre eine entsprechende Therapie mit ebensolchen Antikörpern verabreicht werden. In einem solchen Tiermodell wären mögliche Kompensationsmechanismen der Sclerostin-Defizienz unter Umständen anders reguliert und damit die Mechanosensibilität gegenüber dem Knockout-Modell verändert. Dies ist jedoch technisch, aufgrund der notwendigen Populationsgrößen und des Zeit- und Kostenaufwandes nur eingeschränkt möglich. Daher ist das hier verwendete Tiermodell als Grundlagenerkenntnisgewinn ein sinnvoller Schritt im Verständnis der knochenanabolen Reaktion auf mechanische Belastung.

5.4 Fazit und Ausblick

Die Schlüsselergebnisse dieser Studie sind:

1. Die knochenanabole Reaktion gegenüber mechanischer Belastung ist in weiblichen *Sost* KO Mäusen gegenüber weiblichen LC Mäusen sowohl in jungen, als auch in adulten Tieren erhöht. Daher ist die kortikale und trabekuläre Knochenformation in Reaktion auf mechanische Belastung in beiden Altersgruppen nicht zwingend von Sclerostin und dessen Downregulation abhängig.
2. Die knochenanabole Reaktion bei Langzeit-Sclerostin-Defizienz gegenüber mechanischer Belastung ist sowohl kortikal als auch trabekulär altersabhängig und nimmt mit zunehmendem Alter ab.

Auch wenn wir keine Erkenntnisse von senilen Mäusen gewinnen konnten, legen diese Daten nahe, dass zukünftige Behandlungsstrategien gegen Osteoporose, welche eine dauerhafte Sclerostinsuppression beinhalten, einen altersabhängigen Effekt dieser Behandlung beachten sollten. Dies gilt insbesondere in der Kombination von (langanhaltender) Sclerostin-suppressiver Behandlung und mechanischer Belastung zum Erzielen synergistischer Effekte, da diese Kombination prinzipiell möglich scheint.

Weitere Studien zum besseren Verständnis der Funktionsweise des Knochenstoffwechsels beziehungsweise der Signaltransduktion bei mechanischer Belastung und hier im Detail des *Sost*/Sclerostin - Wnt/ β -Catenin-Signalwegs sind notwendig, um die Behandlung von Patienten mit geringer Knochenmasse zu verbessern.

Literaturverzeichnis

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2001; 285(6):785–95.
2. Dennison E, Cooper C. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Hormone research* 2000; 54 Suppl 1:58–63.
3. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012; 23(11):576–81.
4. Li G, Thabane L, Papaioannou A, Ioannidis G, Levine, Mitchell A H, Adachi JD. An overview of osteoporosis and frailty in the elderly. *BMC musculoskeletal disorders* 2017; 18(1):46.
5. Rizzoli R, Bruyere O, Cannata-Andia JB, Devogelaer J, Lyritis G, Ringe JD, Vellas B, Reginster JY. Management of osteoporosis in the elderly. *Current medical research and opinion* 2009; 25(10):2373–87.
6. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM. Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2005; 20(2):185–94.
7. Strobe MA, Nigh P, Carter MI, Lin N, Jiang J, Hinton PS. Physical Activity-Associated Bone Loading During Adolescence and Young Adulthood Is Positively Associated With Adult Bone Mineral Density in Men. *American journal of men's health* 2015; 9(6):442–50.
8. . Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. 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* 2013; 8:136.
9. Becker DJ, Kilgore ML, Morrissey MA. The societal burden of osteoporosis. *Current rheumatology reports* 2010; 12(3):186–91.

10. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Archives of osteoporosis* 2013; 8:137.
11. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R. The epidemiology of osteoporosis–Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Arzteblatt international* 2013; 110(4):52–7.
12. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2007; 22(3):465–75.
13. Zaheer S, LeBoff M. Osteoporosis: Prevention and Treatment. [Updated 2016 Aug 3]. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Hershman JM., editors; *Endotext* [Internet]; 2000 - 2017. Available from: URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279073/.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279073/) (Zugriff Oktober 2017)
14. Lim SY, Bolster MB. Current approaches to osteoporosis treatment. *Current opinion in rheumatology* 2015; 27(3):216–24.
15. McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Austin M, Siris E, Wang A, Lewiecki EM, Lorenc R, Libanati C, Kanis JA. Denosumab reduces the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women, particularly in those with moderate to high fracture risk as assessed with FRAX. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2012; 27(7):1480–6.
16. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster J-Y, Zanchetta JR, Wasserman SM, Katz L, Maddox J, Yang Y-C, Libanati C, Bone HG. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England journal of medicine* 2014; 370(5):412–20.
17. McColm J, Hu L, Womack T, Tang CC, Chiang AY. Single- and multiple-dose randomized studies of blosozumab, a monoclonal antibody against sclerostin, in healthy postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2014; 29(4):935–43.
18. Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch* (2015). 266., neu bearb. Aufl. Berlin: De Gruyter; 2014.
19. PROMETHEUS *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: LernAtlas der Anatomie*. 4., Auflage. Stuttgart: Thieme; 2014.

20. Christ B. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 17., durchges. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. (Anatomie; vol 1).
21. Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2010; 25(7):1468–86.
22. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of bone biology. 3rd ed. Amsterdam, London: Elsevier; 2008.
23. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1116:281–90.
24. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone* 2015; 80:14–8.
25. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
26. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology* 2004; 14(2):86–93.
27. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002; 22(4):549–53.
28. Wolff JH. Julius Wolff und sein „Gesetz der Transformation der Knochen“. *Der Orthopäde* 1995; 24(5):378–86
29. Issack PS, Helfet DL, Lane JM. Role of Wnt signaling in bone remodeling and repair. *HSS journal: the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery* 2008; 4(1):66–70.
30. Kang KS, Robling AG. New Insights into Wnt-Lrp5/6- β -Catenin Signaling in Mechanotransduction. *Frontiers in endocrinology* 2014; 5:246.
31. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009; 24(10):1651–61.
32. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42(4):606–15.

33. Li X, Ominsky MS, Niu Q, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara CG, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi, I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008; 23(6):860–9.
34. Balemans W, Ebeling M, Patel N, van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Human molecular genetics* 2001; 10(5):537–43.
35. Brunkow ME, Gardner JC, van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *American journal of human genetics* 2001; 68(3):577–89.
36. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(20):19883–7.
37. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287(5785):795–801.
38. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31(1):99–109.
39. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO journal* 2012; 31(12):2670–84.
40. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6):1192–205.
41. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 2004; 20:781–810.
42. van Bezooijen, Rutger L, Roelen, Bernard A J, Visser A, van der Wee-Pals, Lianne, Wilt E de, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SW, Dijke P, Löwik CWGM. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* 2004; 199(6):805–14.
43. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004; 35(4):828–35.

44. Zhang D, Park BM, Kang M, Nam H, Kim EJ, Bae C, Lim SK. The systemic effects of sclerostin overexpression using Φ C31 integrase in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 2016; 472(3):471–6.
45. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektir DJ, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal* 2003; 22(23):6267–76.
46. Levasseur R, Lacombe D, de Vernejoul, Marie Christine. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme* 2005; 72(3):207–14.
47. Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S, Wu D. The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Molecular and cellular biology* 2004; 24(11):4677–84.
48. Tu X, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Turner CH, Robling AG, Plotkin L, Bellido T. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* 2012; 50(1):209–17.
49. Holguin N, Brodt MD, Sanchez ME, Silva MJ. Aging diminishes lamellar and woven bone formation induced by tibial compression in adult C57BL/6. *Bone* 2014; 65:83–91.
50. Lynch ME, Main RP, Xu Q, Schmicker TL, Schaffler MB, Wright TM, van der Meulen MCH, . Tibial compression is anabolic in the adult mouse skeleton despite reduced responsiveness with aging. *Bone* 2011; 49(3):439–46.
51. Razi H, Birkhold AI, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S. Aging Leads to a Dysregulation in Mechanically Driven Bone Formation and Resorption. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2015; 30(10):1864–73.
52. Aido M, Kerschnitzki M, Hoerth R, Checa S, Spevak L, Boskey AL, Fratzl P, Duda GN, Wagermaier W, Willie BM. Effect of in vivo loading on bone composition varies with animal age. *Experimental gerontology* 2015; 63:48–58.
53. Birkhold AI, Razi H, Duda GN, Weinkamer R, Checa S, Willie BM. Mineralizing surface is the main target of mechanical stimulation independent of age: 3D dynamic in vivo morphometry. *Bone* 2014; 66:15–25.
54. Birkhold AI, Razi H, Duda GN, Weinkamer R, Checa S, Willie BM. The influence of age on adaptive bone formation and bone resorption. *Biomaterials* 2014; 35(34):9290–301.

55. Bassey EJ, Rothwell MC, Littlewood JJ, Pye DW. Pre- and postmenopausal women have different bone mineral density responses to the same high-impact exercise. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1998; 13(12):1805–13.
56. Srinivasan S, Gross TS, Bain SD. Bone mechanotransduction may require augmentation in order to strengthen the senescent skeleton. *Ageing research reviews* 2012; 11(3):353–60.
57. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ, Khosla S. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011; 26(2):373–9.
58. Bhattoa HP, Wamwaki J, Kalina E, Foldesi R, Balogh A, Antal-Szalmas P. Serum sclerostin levels in healthy men over 50 years of age. *Journal of bone and mineral metabolism* 2013; 31(5):579–84.
59. Morse A, McDonald MM, Kelly NH, Melville KM, Schindeler A, Kramer I, Kneissel M, van der Meulen MCH, Little DG. Mechanical load increases in bone formation via a sclerostin-independent pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2014; 29(11):2456–67.
60. Robling AG, Kang KS, Bullock WA, Foster WH, Muruges D, Loots GG, Genetos DC. Sost, independent of the non-coding enhancer ECR5, is required for bone mechanoadaptation. *Bone* 2016; 92:180–8.
61. Biewener AA. *Biomechanics: structures and systems. A practical approach.* Oxford, New York: IRL Press at Oxford University Press; 1992. (The Practical approach series).
62. Willie BM, Birkhold AI, Razi H, Thiele T, Aido M, Kruck B, Schill A, Checa S, Main RP, Duda GN. Diminished response to in vivo mechanical loading in trabecular and not cortical bone in adulthood of female C57Bl/6 mice coincides with a reduction in deformation to load. *Bone* 2013; 55(2):335–46.
63. van Gaalen, Steven M, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn, Joost D, Alblas J, Dhert, Wouter J A. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2010; 16(2):209–17.
64. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone* 1992; 13(6):443–6.
65. Pautke C, Vogt S, Tischer T, Wexel G, Deppe H, Milz S, Schieker M, Kolk A. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 2005; 37(4):441–5.

66. Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). *Bone* 1988; 9(1):67–9.
67. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. 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* 2013; 28(1):2–17.
68. Foldes J, Shih MS, Parfitt AM. Frequency distributions of tetracycline-based measurements: implications for the interpretation of bone formation indices in the absence of double-labeled surfaces. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1990; 5(10):1063–7.
69. Pflanz D, Birkhold AI, Albiol L, Thiele T, Julien C, Seliger A, Thomson E, Kramer I, Kneissel M, Duda GN, Kornak U, Checa S, Willie BM. Sost deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression. *Scientific reports* 2017; 7(1):9435.
70. Birkhold AI, Razi H, Duda GN, Checa S, Willie BM. Tomography-Based Quantification of Regional Differences in Cortical Bone Surface Remodeling and Mechano-Response. *Calcified tissue international* 2017; 100(3):255–70.
71. Niziolek PJ, Warman ML, Robling AG. Mechanotransduction in bone tissue: The A214V and G171V mutations in Lrp5 enhance load-induced osteogenesis in a surface-selective manner. *Bone* 2012; 51(3):459–65.
72. Tian X, Jee, Webster S S, Li X, Paszty C, Ke HZ. Sclerostin antibody increases bone mass by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a hindlimb-immobilization rat model. *Bone* 2011; 48(2):197–201.
73. Tian X, Setterberg RB, Li X, Paszty C, Ke HZ, Jee, Webster S S. Treatment with a sclerostin antibody increases cancellous bone formation and bone mass regardless of marrow composition in adult female rats. *Bone* 2010; 47(3):529–33.
74. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu Q, Ke, HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009; 24(4):578–88.

75. Kogawa M, Wijenayaka AR, Ormsby RT, Thomas GP, Anderson PH, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin regulates release of bone mineral by osteocytes by induction of carbonic anhydrase 2. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2013; 28(12):2436–48.
76. Sapir-Koren R, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2014; 25(12):2685–700.
77. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PloS one* 2011; 6(10):e25900.
78. De Souza, Roberto L, Matsuura M, Eckstein F, Rawlinson, Simon C F, Lanyon LE, Pitsillides AA. Non-invasive axial loading of mouse tibiae increases cortical bone formation and modifies trabecular organization: a new model to study cortical and cancellous compartments in a single loaded element. *Bone* 2005; 37(6):810–8.
79. Main RP, Lynch ME, van der Meulen, Marjolein C H. In vivo tibial stiffness is maintained by whole bone morphology and cross-sectional geometry in growing female mice. *Journal of biomechanics* 2010; 43(14):2689–94.
80. Somerville JM, Aspden RM, Armour KE, Armour KJ, Reid DM. Growth of C57BL/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia. *Calcified tissue international* 2004; 74(5):469–75.
81. Holguin N, Brodt MD, Silva MJ. Activation of Wnt Signaling by Mechanical Loading Is Impaired in the Bone of Old Mice. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2016; 31(12):2215–26.
82. Razi H, Birkhold AI, Zaslansky P, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S. Skeletal maturity leads to a reduction in the strain magnitudes induced within the bone: a murine tibia study. *Acta biomaterialia* 2015; 13:301–10.
83. Sugiyama T, Meakin LB, Browne WJ, Galea GL, Price JS, Lanyon LE. Bones' adaptive response to mechanical loading is essentially linear between the low strains associated with disuse and the high strains associated with the lamellar/woven bone transition. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2012; 27(8):1784–93.
84. Birkhold AI, Razi H, Weinkamer R, Duda GN, Checa S, Willie BM. Monitoring in vivo (re)modeling: a computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements. *Bone* 2015; 75:210–21.

85. Albiol Sanchez L, Pflanz D, Cilla M, Kramer I, Kneissel M, Duda G, Zaslansky P, Willie BM, Checa S, *Sost* deficiency leads to a reduction in the mechanical strains induced within the mouse tibia, ORS 2017 Annual Meeting Poster No.0736

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BFR/BS	Bone-Formation Rate
BS	Bone Surface
CK1	Casein Kinase 1
Ct	Cortical
Ct.Ar	Cortical Bone Area
Ct.Th	Cortical Thickness
Ct.vTMD	Cortical volumetric Tissue Mineral Density
DKK1	Dickkopf-1
DMS	Dehnungsmessstreifen
Ec	Endocortical
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HU	Hounsfield Units
i.p.	Intraperitoneal
I _{max} / I _{min}	Maximal/ Minimal principal Area Moments of Inertia
Int	Integration Site
KO	Knockout
LC	Littermate Controls
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor
LRP	Low-Density Lipoprotein Rezeptor-Related Protein
MAR	Mineral Apposition Rate
microCT	Micro-Computer-Tomographie
MS	Mineralized Surface
PMMA	Polymethyl-Methacrylat
P _s	Periosteal
ROI	Region of Interest
sLS/ dLS	Single/ Double Labelled Surface
T.Ar	Total Cross-Sectional Area
Tb	Trabecular
Tb.BV/TV	Trabecular Bone Volume to Total Volume Ratio
Tb.N	Trabecular Number
Tb.S	Trabecular Separation

Tb.Th	Trabecular Thickness
Tb.vTMD	Trabecular volumetric Tissue Mineral Densitiy
TCF	T-Cell-Factor
TTL	Total Tibia Length
VOI	Volume of Interest
Wnt	W für „Wingless“ und „nt“ für „Int-1“
ε	Epsilon Compression oder Strain
$\mu\varepsilon$	Micro Epsilon Compression oder Microstrain

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2.1	Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs
Abbildung 3.1	Position des Dehnungsmessstreifens
Abbildung 3.2	Zeitlicher Ablauf und verwendete Belastungskurve des in vivo Belastungsexperiments
Abbildung 3.3	In vivo Belastungsexperiment
Abbildung 3.5	VOI Lage der Spongiosa und der Kortikalis
Abbildung 3.6	Anatomische Landmarke im kortikalen VOI
Abbildung 3.7	Schnittebenen der Histomorphometrie
Abbildung 3.8	Beispiele der histomorphometrischen Auswertung
Tabelle 3.4	Tibiallänge, Start- und Endgewicht der Mäuse
Tabelle 4.1	Ergebnisse der in vivo Dehnungs-Belastungs-Kalibrierung
Tabelle 4.2	Kortikale microCT Ergebnisse
Tabelle 4.3	Kortikale dynamische Histomorphometrie Ergebnisse
Tabelle 4.4	Trabekuläre microCT Ergebnisse
Tabelle 4.5	Trabekuläre dynamische Histomorphometrie Ergebnisse
Tabelle 4.6	Kortikale Interlimb Daten der microCT Ergebnisse an Tag 15
Tabelle 4.7	Kortikale Interlimb Daten der dynamischen Histomorphometrie
Tabelle 4.8	Trabekuläre Interlimb Daten der microCT Ergebnisse an Tag 15
Tabelle 4.9	Trabekuläre Interlimb Daten der dynamischen Histomorphometrie

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, David Pflanz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der Skelettreifung auf die Knochenmasse und die adaptive Knochenantwort bei mechanischer Belastung in *Sost* KO/ Sclerostin-defizienten Mäusen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE, www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

David Pflanz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1

Pflanz D, Birkhold AI, Albiol L, Thiele T, Julien C, Seliger A et al. *Sost* deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression. *Scientific reports* 2017; 7(1):9435.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der Dehnungs-Kalibrierungs- und Belastungsexperimente sämtlicher Mausgruppen; Akquise sämtlicher microCT und Histomorphometrie-Daten; Auswertung der statischen microCT Daten und der Histomorphometrie; Dateninterpretation; Hauptverantwortlicher Verfasser der Veröffentlichung.

Publikation 2

Albiol L, Cilla M, Pflanz D, Kramer I, Kneissel M, Duda GN et al. *Sost* deficiency leads to reduced mechanical strains at the tibia midshaft in strain-matched in vivo loading experiments in mice. *J R Soc Interface* 04/2018: (DOI: 10.1098/rsif.2018.0012).

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der microCT Scans und der Belastungsexperimente, Dateninterpretation, Mitverfasser der Veröffentlichung.

.....
Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschul-
lehrerin

.....
Unterschrift, Datum des Doktoranden/ der Doktorandin

Danksagung

Herrn Prof. Duda danke ich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt auch Fr. Prof. Willie, für ihre Unterstützung während der Planung und Durchführung der Arbeit in ihrer AG.

Herzlichst möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Bone und dem JWI, insbesondere den Herren Tobias Thiele (für seine tatkräftige Unterstützung bei der Experimentdurchführung) und Mario Thiele (für seine Unterstützung in der Handhabung des microCT und der Mikroskope im JWI), Fr. Dr. Annette Birkhold (für die Einarbeitung und Unterstützung während meiner Zeit in der AG) und Fr. Marzena Princ (für die Unterstützung im Histologielabor) danken.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und hier besonders meiner Partnerin, Juliane Irmner und meinem Bruder, Georg Pflanz, die mich auf diesem langen Weg unterstützt und mir mit kritischen Kommentaren geholfen haben diese Arbeit zu verfassen.