

Aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die CHD9-Genmutation der Maus und ihre Folgen
für den Knochen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christin Klemm, geb. Birkner
aus Freital

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Wuttke
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. D. Doenecke
3. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	29. April 2014

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das CHD9-Gen („chromodomain helicase DNA binding protein 9 gene“)	1
1.2. Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) und die Stammzelltherapie	3
1.3. Der Knochen	4
1.4. Das Versuchstier	6
1.5. Die Untersuchungsmethoden	8
1.6. Kastration von männlichen und weiblichen Tieren und die Auswirkung auf verschiedene Organe.....	9
1.7. Das Ziel der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Der Versuchsablauf und die Nomenklatur.....	11
2.2. Die Versuchstiere und deren Haltung	11
2.3. Die Stallbedingungen und Nahrung.....	11
2.4. Die Gruppeneinteilung der Tiere	12
2.5. Die Identifizierung der Tiere	13
2.6. Das CT-Gerät und der Messvorgang Research Bone Scanner (qCT).....	14
2.7. Die ermittelten Parameter	16
2.7.1. Die histologischen Parameter	17
2.8. Herstellung der Knochenpräparate	19
2.9. Die Gewichtsbestimmung	20
2.10. Die statistischen Methoden	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1. Die weiblichen Tiere.....	21
3.1.1. Die Körpergewichte.....	21

3.1.2.	Die Muskelfläche.....	22
3.1.3.	Das paratibiale Fettdepot.....	23
3.1.4.	Die endostale Dichte (ED).....	25
3.1.5.	Die kortikale Dichte (KD).....	26
3.1.6.	Die Querschnittfläche (QF).....	29
3.1.7.	Die kortikale Fläche (KF).....	30
3.1.8.	Die endostale Fläche (EF).....	32
3.1.9.	Die histologische Auswertung.....	34
3.2.	Die männlichen Tiere.....	38
3.2.1.	Die Körpergewichte.....	38
3.2.2.	Die Muskelfläche.....	39
3.2.3.	Das paratibiale Fettdepot.....	40
3.2.4.	Die endostale Dichte (ED).....	43
3.2.5.	Die kortikale Dichte (KD).....	44
3.2.6.	Die Querschnittfläche (QF).....	46
3.2.7.	Die kortikale Fläche (KF).....	48
3.2.8.	Die endostale Fläche (EF).....	50
3.2.9.	Die histologische Auswertung.....	52
3.3.	Zusammenfassung relevanter Ergebnisse.....	55
3.3.1.	Weibliche Tiere.....	55
3.3.2.	Männliche Tiere.....	56
4.	Diskussion.....	57
4.1.	Die Körpergewichte, das paratibiale Fettdepot und die Muskelflächen.....	57
4.2.	Die ossären Flächen.....	59
4.3.	Die Dichten.....	62
4.4.	Die Knochenhistologie.....	63
5.	Zusammenfassung.....	65

6. Methodischer Anhang67

 6.1. Herstellung der Knochenpräparate67

 6.2. Histologisches Bildmaterial70

Literaturverzeichnis74

Abbildungsverzeichnis78

Tabellenverzeichnis80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bspw.	beispielsweise
CHD	chromodomain helicase DNA binding gene
CReMM	chromatin- related mesenchymal modulator
CT	Computertomographie
CT1	Computertomographie im Alter von 5 Monaten
CT2	Computertomographie im Alter von 7 Monaten
CT3	Computertomographie im Alter von 9 Monaten
CT4	Computertomographie im Alter von 12 Monaten
Cu	Kupfer
DNA	engl. Desoxyribonukleinsäure
ED	endostale Dichte
EF	endostale Fläche
ESC	embryonale Stammzellen
GF	Gesamtquerschnittfläche
homozygot-intakt-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp homozygot, nicht gonadektomiert
homozygot-orx-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp homozygot, orchiektomiert
homozygot-ovx-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp homozygot, ovairektomiert
KF	kortikale Fläche
KG	Körpergewicht
MSC	mesenchymale Stammzellen
Obd	Obduktion
Orx	Orchiektomie
orx	orchiektomiert(e, en)
Ovx	Ovairektomie

Abkürzungsverzeichnis

ovx	ovarektomiert(e, en)
π	3,14159265
qCT	quantitative(r) Computertomographie(-graph)
RTG	Röntgen
U	Umfang
Uni	Universität
wild-intakt-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp wild, nicht gonadektomiert
wild-orx-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp wild, orchiektomiert
wild-ovx-Gruppe	Tiere mit dem Genotyp wild, ovarektomiert
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Viele unklare Symptomkombinationen in der Medizin können mit Hilfe von genetischen Datenbanken zu einem Syndrom zusammengefasst und häufig Genorten zugeordnet werden. Dies vereinfacht oft den weiteren Verlauf der Diagnostik und Therapie sowie der genetischen Beratung.

In meiner Arbeit wurden Mäuse mit einer CHD9-Genmutation über ein Jahr beobachtet und ihre knochenspezifischen Parameter ausgewertet. Bei der Mauslinie handelte es sich um einen Mix Background der Linien C57 Black und 129 SV. Den Tieren wurde in der Abteilung für Humangenetik der Universität Göttingen durch ein genetisches Verfahren („gene trap“) das Genom verändert, sodass eine CHD9-Genmutation entstanden ist. Die genetische Einteilung nach homozygoten und heterozygoten Tieren erfolgte bereits in der Humangenetik. 45,4 % der Mäuse entwickelten einen „Buckel“ als markantes Merkmal dieses skelettalen Phänotyps. Die Tibia ist in der Osteologie ein geeigneter Knochen zur wissenschaftlichen Darstellung, da die einzelnen Bestandteile des Knochen, die Kortikalis, die Spongiosa, der Knorpel und die Epiphyse sowohl in den qCT-Daten als auch in der histologischen Abbildung auf ein Bild projizierbar sind. Die Tibia wurde aus den genannten Gründen als Material für die Messungen in vivo und post mortem zur histologischen Auswertung der Knochenparameter genutzt. Im Folgenden werde ich den knöchernen Phänotyp der CHD9-Genmutation darstellen und anhand der gewonnenen Ergebnisse diskutieren.

1.1. Das CHD9-Gen („chromodomain helicase DNA binding protein 9 gene“)

Das CHD9-Gen gehört zu einer großen Familie von CHD-Genen. Die CHD-Gene werden in drei Untergruppen eingeteilt (Flaus et al. 2006). Gruppe I CHD: 1, 2; Gruppe II: CHD 3, 4, 5 und die Gruppe III CHD 6, 7, 8, 9 und CReMM („chromatin-related mesenchymal modulator“), wobei CReMM als Cluster mit dem CHD6 verbunden zu sein scheint und artverwandt zu CHD9 ist. Die Unterschiede zwischen CHD9 und CReMM können zu unterschiedlichen Regulationen und Funktionen der übersetzten Proteine führen (Shur und Benayahu 2005). Die Mitglieder der Gruppe III bestehen aus zwei Chromodomänen: Helikase-C-Domäne und A/T-DNA-bindende Domäne. Die Helikase-C-Domäne ist die Aktivierungsdomäne. Sie tritt mit Proteinen in Wechselwirkung und steuert so die Transkription. Die zweite Domäne ist die DNA-bindende Domäne. Sie heftet sich an eine bestimmte Basenpaarsequenz. Bei der Gruppe

III ist es eine A/T-DNA-bindende Domäne; das bedeutet, sie geht mit den Nukleinbasen Adenin und Thymin eine Bindung ein. Ein weiterer Bestandteil ist die SNF2/ATPase. Diese Enzyme wirken als molekulare Motoren (*Shur und Benayahu 2005; Delmas et al. 1993; Woodage et al. 1997*). Sie gleiten unter Energieverbrauch an dem DNA-Strang entlang, dabei entsteht wahrscheinlich ein „Drehmoment“, der die DNA von ihren assoziierten Proteinen trennt (*Lewis et al. 2008*). Des Weiteren besitzt die dritte Gruppe der CHD-Familie zwei weitere Bestandteile, welche in ihrer Funktion ungeklärt sind. Die BRK-Domäne (*Elfring et al. 1998; Marfella und Imbalzano 2007*), welche auch in anderen SWI/SNF2-Proteinen gefunden wurde, und CR1-CR3 (*Schuster und Stöger 2002*), dessen Funktion und Wirkung ebenfalls noch nicht bekannt sind.

CHD9 ist ein Teil eines Helikase-DNA-Binde-Proteins, welches für den Abwickelprozess der DNA von den Histonen verantwortlich ist. Die Transkriptionsregulation und die Genaktivierung sind über ‚chromatin remodeling‘ vermittelt. Erst durch die Chromatinorganisation ist der Zugang für DNA-bindende Faktoren und Promotoren zur DNA möglich (*Shur und Benayahu 2005*). Promotoren spielen eine Rolle in der Regulation der Gentranskription beim Andocken der Helikase an die ATP-Bindestellen an der DNA (*Shur et al. 2006 b*). In Abb. 1 wird der DNA-Abwickelprozess schematisch dargestellt. Wenn die Helikase die DNA fehlerfrei abwickelt, können später die Polymerasen die DNA ablesen. CHD9 ist vermutlich für den Teil der DNA zuständig, der die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen codiert. Ist das CHD9 genetisch verändert (heterozygot oder homozygot), kann dieser Teil der DNA nicht einwandfrei abgewickelt und später nicht fehlerfrei abgelesen werden.

Die CHD-Familie ist somit wichtig für die Regulation der Genexpression (*Shur et al. 2006 a*). Ebenso sind CHDs in Prozesse der DNA-Reparatur, Regulation der Transkription und bei der Modifikation von Chromatinstrukturen involviert (*Woodage et al. 1997*).

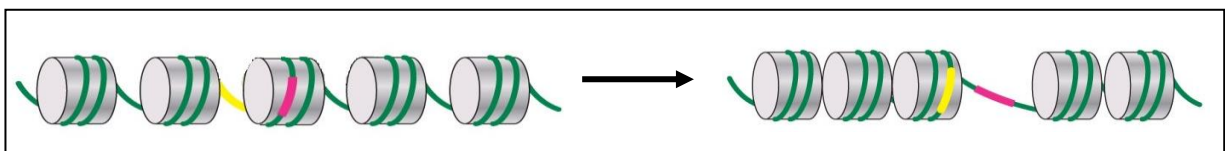


Abbildung 1: DNA- Abwickelvorgang, die DNA wird von den Histonkörpern abgewickelt um von den Polymerasen abgelesen werden zu können, modifiziert, *Allis et al. 2006, Fig. 6*.

Die Mäuse in dieser Studie wurden durch gezielt eingebaute Vektoren in das CHD9-Gen genetisch manipuliert. Durch Fortpflanzung der genetisch veränderten Tiere wurden eine homozygote und eine heterozygote Gruppe geschaffen. Die homozygote Gruppe wird mit einer

Gruppe von Wildtypen verglichen. Die heterozygoten Tiere werden in dieser Arbeit nicht vorgestellt.

1.2. Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) und die Stammzelltherapie

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind eine heterogene Form von Zellen, die einen pluripotenten Charakter besitzen und sich in mesodermale, ektodermale und endodermale Zelllinien differenzieren können. Sie ähneln den embryonalen Stammzellen (ESC), haben aber dennoch einen Unterschied zu den ESC, denn im Gegensatz zu den ESC sind die MSC bereits vorgeprägt und erfahren ihre schlussendliche Differenzierung in dem jeweiligen spezifischen Gewebe (*Gehwolf et al. 2011*). Die mesodermale Zelllinie differenziert sich in Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Myoblasten und Fibroblasten, die ektodermale Zelllinie in Neuronen und die endodermale Zelllinie in Hepatozyten (*Pittenger et al. 1999*). Die Abb. 2 gibt einen schematischen Überblick über die Differenzierung der MSC.

Die mesodermalen Stammzellen sind für die Gewebe- und Organogenese in der Embryonalzeit verantwortlich und verlieren ihr Stammzellpotential das ganze Leben lang nicht. Das macht sie so wichtig für die Reparatur und Regeneration von Geweben (*Shur et al. 2006 a*). Eine weitere wichtige Eigenschaft der MSC ist die Selbstregenerationskapazität, welche sich in der Eigenschaft genetisch identische Zellen nachzubilden und der multiplen Zellliniendifferenzierung widerspiegelt. Die MSC behalten ihre pluripotente Eigenschaft auch nach mehrfacher Teilung. Hauptsächlich befinden sich die MSC im Knochenmark, sie werden aber auch in anderen Kompartimenten exprimiert, wie z.B. im Fettgewebe, im peripheren Blut, im Nabelschnurblut, in der Leber, in fetalen Geweben, im Periost, in den Synovialzellen, in den Milchzähnen und vielen Organen. Stimulierende spezifische Signale können die MSC aus ihren Nischen mobilisieren und zur Differenzierung in den Kreislauf zum Zielgewebe bringen. In den jeweiligen Zielgeweben werden die MSC entweder zur Regeneration oder zur Homöostase genutzt. Diese Eigenschaften der MSC machen sie so interessant für die therapeutische regenerative Medizin und Gewebsentwicklung (*Liu et al. 2009*).

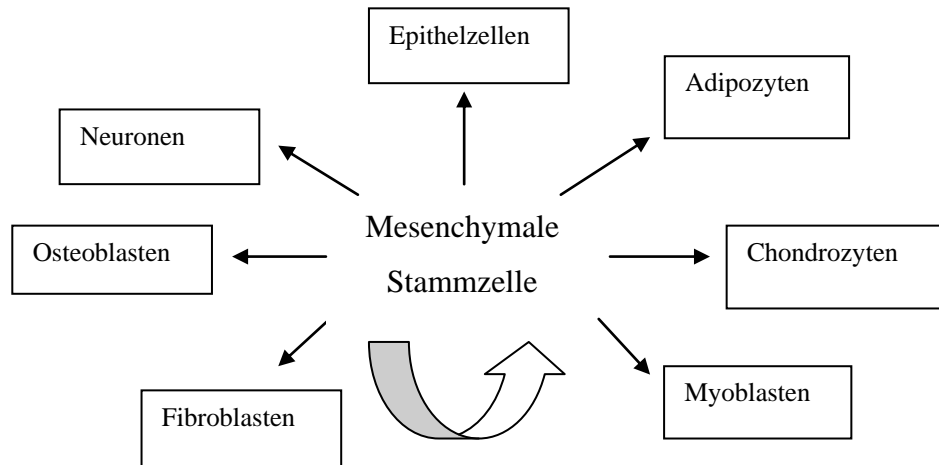


Abbildung 2: Mesenchymale Stammzellendifferenzierung.

Die Verwendung von MSC birgt ein enormes Potential für die Regeneration und Rekonstruktion von Gewebe des muskulo-skelettalen Systems (*Gehwolf et al. 2011*). Die Stammzellen, auch als „Mutter-oder Meisterzelle“ bezeichnet, besitzen zwei Fähigkeiten, die sie so einzigartig und gleichzeitig in Medizin und Forschung beliebt machen. Sie können sich unbegrenzt vermehren und sich dadurch dauerhaft selbst erneuern. Man kann die Stammzellen nach ihrem Ursprung und gleichzeitig nach ihrer Fähigkeit einteilen. Die ESC ist totipotent und kann sich in ein ganzes Individuum entwickeln. Die adulte Stammzelle ist pluripotent und kann sich „nur“ noch in Gewebe oder Organe differenzieren, wie auch die MSC. In der Medizin gibt es zahlreiche Forschungen an Stammzellen. Die Stammzelltherapie wird unter anderem in der Zellersatztherapie, regenerativen Medizin (Herstellung von Biokonstrukten), interistischen Onkologie (Leukämietherapie) und vielen anderem mehr eingesetzt oder erforscht (*Ho und Beyreuther, 2001*). Da das CHD9-Gen eine wichtige Rolle in der Modifikation der Chromatinstruktur, Regulation der Transkription (*Woodage et al. 1997*) und der Genexpression (*Shur et al. 2006a*) spielt, ist es für die Differenzierung der MSC entscheidend, dass das CHD9 den richtigen Abschnitt auf der DNA abwickelt. Ist das CHD9 genetisch verändert, führt es dazu, dass die DNA nicht richtig abgewickelt werden kann und damit die Differenzierung der MSC beeinflusst. Somit ist die Differenzierung der MSC zu Gunsten einer Zelllinie verschoben.

1.3. Der Knochen

Da sich adulte MSC zu großen Teilen im Knochen und Knochenmark befinden, beschäftige ich mich in dieser Arbeit mit der Knochenstruktur. In der Abteilung Endokrinologie der Universität Göttingen befindet sich ein Kleintier-quantitativer Computertomograph („qCT Rese-

arch SA+, qCT, STRATEC XCT 450; Stratec[®], Pforzheim, Deutschland), welcher eine genaue Analyse der Knochenparameter ermöglicht.

In einem menschlichen Organismus gibt es verschiedene Knochentypen. Um den Knochenaufbau zu erläutern, bietet sich der auch in dieser Phänotypstudie analysierte Knochentyp des Röhrenknochens an. Generell lassen sich die Röhrenknochen in vier Abschnitte einteilen. In Abb. 4 werden diese Abschnitte erklärt. Im Knochen existieren zwei Bauformen: zum einen die solide Bauform im Sinne der Kompakta bzw. Kortikalis (Substantia corticalis), sie wird auch als Rindenschicht des Knochens bezeichnet und kann je nach Beanspruchung bis zu mehreren Millimetern Dicke im Schaft betragen. Die zweite Bauform ist die Substantia spongiosa, Knochenbälkchen oder auch Trabekel (Abb. 3) genannt. Die Spongiosa befindet sich hauptsächlich in den Epi- und Metaphysen. Die Kortikalis wird aus lamellaren Knochenbälkchen aufgebaut, diese bestehen aus Osteonen, welche sich zirkulär um die Havers-Kanäle, die sich um die zentralen Blutgefäßkanäle darstellen, anordnen. Die Blutgefäße sprossen über die „Volkmann-Kanäle“ aus dem Periost in den Knochen. Weiter nach innen zum Markraum schließt sich die Spongiosa an, welche aus lamellaren, platten und stabförmigen Formationen besteht. Die Spongiosa bildet ein dreidimensionales Netzwerk, in dem sich das Knochenmark und die Gefäße einlagern (*Lippert und Deller 2003*).

In früheren Untersuchungen von Priv. Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke wurde eine signifikant erhöhte kortikale Dichte gemessen. Aus diesen Gründen und den mir zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden wählte ich den Knochen als Untersuchungsmaterial. In den knöchernen Parametern wird eine ebenfalls signifikante Veränderung erwartet. Die folgende Abb. 4 zeigt eine schematische Übersicht eines langen Röhrenknochens. Den Aufbau und die Einteilung der Knochen kann man vom Menschen auf die Maus übertragen.

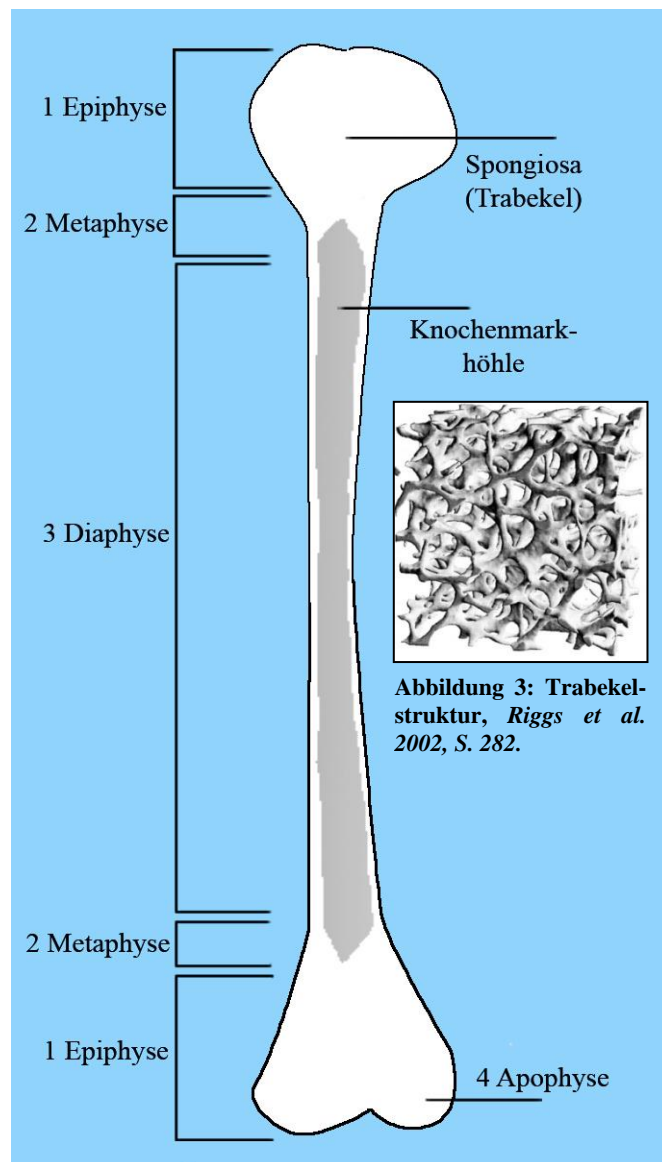


Abbildung 4: Knochenübersicht mit Erläuterung, eigene Darstellung in Anlehnung an <http://de.wikipedia.org/wiki/Spongiosa>, 2013.

1.4. Das Versuchstier

Bei den Mäusen handelte es sich um einen Mix Background der Linien C57 Black und 129 SV. Die embryonale Stammzelle (RRU386) wurde durch die Humangenetik bei der Firma BayGenomics erworben. BayGenomics besitzt eine weltweite Datenbank, wo embryonale Stammzellen mit den unterschiedlichsten Mutationen kommerziell erworben werden können. BayGenomics bedient sich dabei einer Kombination von sekretorischen und nicht-sekretorischen ‚gene trap‘ Vektoren, um damit Gene in den embryonalen Stammzellen von Mäusen zu inaktivieren (Stryke et al. 2003).

1 Epiphyse

Die Epiphyse ist das Gelenkende und tritt mit den kongruenten Gegenknochen als Gelenk in Kontakt. Dabei ist die Epiphyse mit hyalinem Knorpel überzogen.

2 Metaphyse

Die Metaphyse ist der Übergangsbereich von Epiphyse zur Diaphyse und enthält die Epiphysenfuge (Wachstumszone), in welcher sich während des Längenwachstums eine Knorpelzone befindet. In der Epiphysenfuge vollzieht sich die Knochenentwicklung.

3 Diaphyse

Die Diaphyse ist der Schaft des Knochens und enthält die Markhöhle, diese besteht aus gelbem (Fett) und rotem (blutbildendem) Knochenmark und Trabekel.

4 Apophyse

Die Apophysen sind die Muskelansatzhöcker, Befestigungsstellen von Muskeln.

Der Funktionsverlust des mutierten Gens lässt Rückschlüsse auf die Funktion im gesunden Organismus zu.

Der Unterschied besteht darin, dass kein spezielles Gen „weggelassen“ wird, sondern es werden bestimmte Vektoren, die eine 3'-Slice-Stelle und ein Polyadenylationssignal, welcher als Transkriptions-Terminationsstelle fungiert, in das Intron eingebaut. Die Transkription bricht an dieser Stelle ab und die RNA ist mit dem Markerprotein verbunden. Das Resultat ist in der Regel die völlige Inaktivierung des ‚trapped‘ Gens, dies wird allerdings nicht garantiert (<http://www.genetrap.org/tutorials/overview.html>, 2013). Eine detailliertere Beschreibung der ‚gene trap‘ Methode ist in der Arbeit Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond von *Stanford et al. 2001* dargestellt.

Anders als bei den knock-out-Mäusen gibt es am Ende des ‚gene trap‘ keinen einheitlichen Genotyp. Bei den ‚gene trap‘ Mäusen liegt die Veränderung auf Proteinebene, das heißt, das betreffende Gen wird nicht entfernt, sondern es wird durch Einbringen von Vektoren, die ein verstärktes Splicesignal besitzen, verkürzt. Das Gen ist weiterhin erhalten, aber manipuliert, und dadurch werden die Struktur und die Länge des Proteins verändert. Durch das veränderte Protein kommt es zum Funktionsverlust. Nicht der Genverlust, wie bei der knock-out-Maus, sondern der Funktionsverlust des Proteins ist das Ergebnis.

Für die in-vivo-Studie wurden männliche und weibliche Tiere, jeweils intakte sowie orch(ovar)ektomierte Wildtypen (als Vergleichsgruppe), Heterozygote und Homozygote analysiert und beobachtet. Die ovx Tiere wurden mit in die Studie einbezogen, da es unter dem Östrogenmangel zu einer Osteoporose kommt und darunter die Knochenphänomene deutlicher zur Geltung kommen. Für die Arbeit werden die Heterozygoten aufgrund der enormen Datenmenge und der Vielfalt der pathologischen Werte nicht betrachtet.

In der Abbildung 5 wird eine 12 Monate alte homozygote männliche orx Maus gezeigt. Dieser sehr deutliche „Buckel“ charakterisierte sich im Laufe des Versuches bei vielen homozygoten Tieren.



Abbildung 5: männliche homozygote orx-Maus 13B, RTG-Bild Kieferorthopädie Uni-Göttingen

Die Gentypisierung der Tiere in Wildtyp, Heterozygote und Homozygote erfolgte bereits in der Humangenetik (Siehe 2.4., S. 12).

1.5. Die Untersuchungsmethoden

Die Vermutung ist naheliegend, dass sich die genetische Veränderung in allen Bereichen der Differenzierung der MSC, also auch im Knochen, manifestieren kann. Um Veränderung zu erkennen und zu klassifizieren, bedienen wir uns der Technik der quantitativen Computertomographie (,xCT Research SA+, qCT, STRATEC XCT 450; Stratec, Pforzheim, Deutschland) (Ferretti 2000). Mit dieser bewährten Methode, die schon oft in der Abteilung für Endokrinologie ihre Anwendung fand, besteht die Möglichkeit, in kurzer Zeit viele relevante Parameter bestimmen zu können (Seidlová-Wuttke et al. 2012). Bei dem Prinzip der Computertomographie handelt es sich um ein Röntgenverfahren, in dem die Röntgenröhre um das zu untersuchende Objekt rotiert. Die linken Tibiae der Mäuse wurden dafür standardisiert gemessen. Die ermittelten knöchernen Parameter sind: die endostale Dichte (mg/cm^3), die kortikale Dichte (mg/cm^3), die Querschnittfläche (QF) in mm^2 , die kortikale Fläche (KF) in mm^2 , die endostale Fläche (EF) in mm^2 . Die genaueren Definitionen werden im Kapitel 2.7. S. 16 gegeben. Desweiteren werden die Körpergewichte und Fettanteile sowie die Muskelfläche dargestellt.

Am Ende der in-vivo-Studie, nach 12 Monaten, wurden die Tiere obduziert. Die Knochenstrukturen wurden nach Aufbereitung der Knochen mit Hilfe eines Zeiss Axiophot Mikroskops mit eingebauter Kamera analysiert. Dabei wurden die Kortikalisdiameter der Tibiae, die Epiphysenfugendiameter sowie die Diameter des tibialen Kniegelenkknorpels gemessen und ausgewertet.

1.6. Kastration von männlichen und weiblichen Tieren und die Auswirkung auf verschiedene Organe

Für diese Arbeit wurden intakte Mäuse, aber auch kastrierte Mäuse untersucht. Die Tiere wurden im 2. Lebensmonat ovariectomiert bzw. orchietomiert. Zum Zeitpunkt des 1. qCTs waren die Tiere 5 Monate alt, die kastrierten Tiere bereits 3 Monate in dem durch Ovariectomie/Orchietomie bedingten Östrogen- bzw. Testosteronmangel. Durch einen Mangel an Sexualhormone zeigen sich Knochenphänomene deutlicher und knochenspezifische Veränderungen könnten eindeutiger zum Vorschein treten.

Östrogene schaffen eine Ausgeglichenheit zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau und damit ein Aufrechterhalten der Knochenmasse. Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie die Lebensdauer und die funktionelle Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten (*Riggs et al. 2002*). Die Ovariectomie induziert die Apoptose der Osteozyten (*Tomkinson et al. 1998*). Bei einem Östrogenmangel, welcher auf unterschiedlichste Weise entstehen kann, in diesem Fall durch eine komplette Ovariectomie, kommt es zum Verlust des Gleichgewichtes zwischen Knochenab- und -aufbau, dem sogenannten ‚Remodeling‘. Es entsteht die postmenopausale Osteoporose mit einer Rarifizierung des Knochens und einem starken Verlust an trabekulärer Knochensubstanz (*Clarke und Khosla 2010*). Es kommt im weiteren Verlauf zu vermehrten Knochenbrüchen. Die Entfernung der Ovarien und Testes bei den Mäusen und die damit entfallende Expression von Steroidhormonen aus den Gonaden induziert eine Osteoporose, wie sie bei postmenopausalen Frauen durch Östrogenmangel eintritt (*Lazner et al. 1999*). Ein Östrogenmangel ist der Hauptgrund für die postmenopausale Osteoporose und spielt wahrscheinlich eine ebenso wichtige Rolle bei der Osteoporose des Mannes (*Bilezikian et al. 1999*).

Durch die Ovariectomie werden die Tiere mit der Zeit adipös. Der Östrogenmangel begünstigt die Entstehung einer Obesitas (*Seidlová-Wuttke et al. 2008*). Auch in dieser Arbeit spiegelt sich diese Tatsache in den steigenden Körpergewichten und dem rasant ansteigendem paratibialen Fettdepot (Abb. 16) wider. Bei den männlichen Tieren stiegen nach Orchietomie ebenfalls das paratibiale Fettdepot sowie das Körpergewicht an. Ein Testosteronmangel bei männlichen Tieren beeinflusst die Knochensubstanz (*Riggs et al 2002*) und die Entwicklung der Muskelmasse (*Lang 2011*).

1.7. Das Ziel der Arbeit

Ist es möglich, am Ende dieser einjährigen Phänotypstudie an der CHD9-Maus einen einheitlichen Phänotyp anhand der unterschiedlichen Tibiastrukturen zu differenzieren?

Gelingt es die Hauptmerkmale mit ihren Veränderungen in den Organen Knochen, Muskel (M.gastrocnemius) und Fettgewebe herauszufiltern?

Besteht vielleicht die Möglichkeit einer syndromalen Erkrankung?

Diese Fragen stellten sich am Anfang dieser Studie und mit Hilfe der qCT-Daten, der histologischen Auswertung am Ende der Studie und der Beobachtung der Tiere möchte ich zur weiteren Aufklärung über die Funktion der CHD9-Familie beitragen. Die etablierte Methode der qCT-Messung erlaubt es uns verschiedenste Parameter zu bestimmen. Ich werde vor allem die Strukturen der Knochen, des Fettes und des Muskels genau betrachten und in dieser Arbeit darstellen.

2. Material und Methoden

2.1. Der Versuchsablauf und die Nomenklatur

Die Tiere wurden im Alter von fünf Monaten das erste Mal einer qCT der linken Tibia unterzogen. Diese Abläufe wiederholten sich alle zwei Monate, sodass die Tiere im Alter von etwa 12 Monaten ihr letztes viertes CT erhielten.

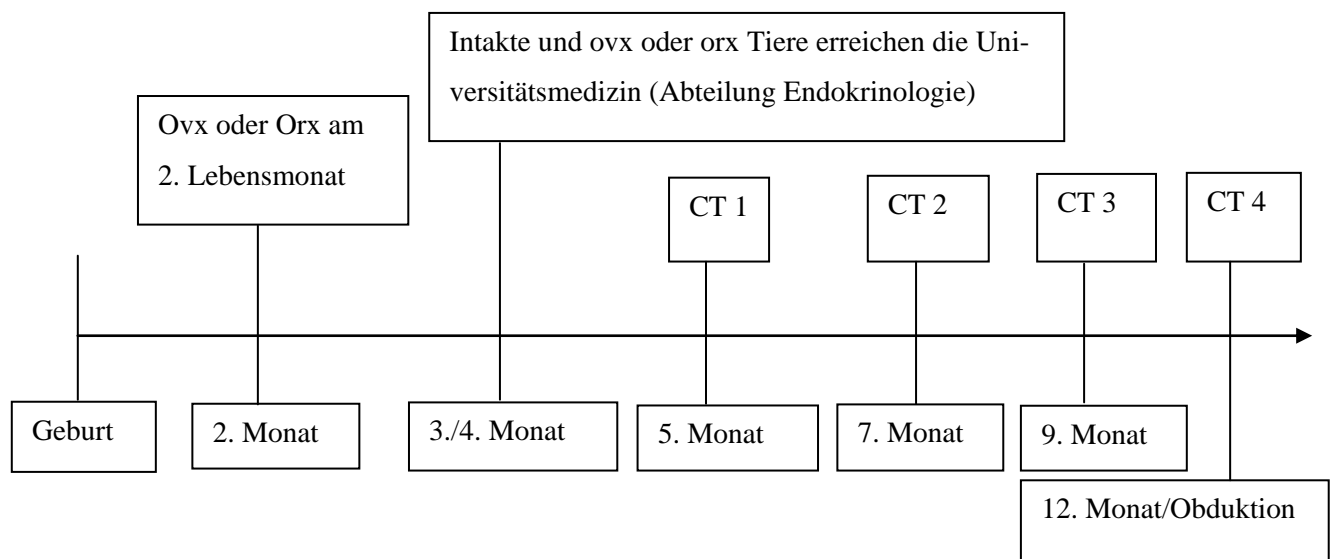


Abbildung 6: Versuchsverlauf

2.2. Die Versuchstiere und deren Haltung

Die Phänotypstudie mit der Tierschutzantragsnummer: 33.42502-04-024/07 wurde in den Tierställen der Abteilung Endokrinologie der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Diese Arbeit basiert auf einer Beobachtung an genetisch veränderten Mäusen. Die Mäuse stammen aus der Linie C57BL/6 der Abteilung Humangenetik der Universität Göttingen und wurden dort durch Gentransferverfahren am CHD9-Gen modifiziert. Mit drei Monaten wurden der Abteilung Endokrinologie die 113 Mäuse aus der Humangenetik in zum Teil sterilisierten und nicht-sterilisierten Zustand für eine phänotypische Studie bereitgestellt.

2.3. Die Stallbedingungen und Nahrung

Die Tiere waren in einem separaten Raum untergebracht. Männliche und weibliche Tiere wurden separiert gehalten. In der Regel wurden die weiblichen Tiere in Dreier- oder Vierer-

Gruppen in einem Makrolon-Käfig (Typ II lang Käfig: 540 cm³, Firma Techniplast, Deutschland) gehalten. Die männlichen intakten Tiere wurden dagegen einzeln und die orx in Zweier- oder Dreier-Gruppen gehalten. Im Haltungsraum wurde über eine Zeitschaltuhr während des gesamten Versuchszeitraumes ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden geschaffen. Es herrschte eine konstante Temperatur von ca. 20-23°C und eine Luftfeuchtigkeit von etwa 50-55 %. Die Versorgung der Tiere übernahmen die Tierpfleger in den Tierställen.

Die Mäuse erhielten das Erhaltungsfutter der Firma ssniff® (V 1534-000, ssniff® R/M-H, 10mm) über eine Futterraufe am Käfig und das Trinkwasser über eine spezielle Vorrichtung im Tierstall, somit konnten sie jederzeit Frischwasser und Futter zu sich nehmen.

Eine Tabelle über genaue Angaben der Inhaltsstoffe des Erhaltungsfutters befindet sich in 6. Methodischer Anhang Tabelle 3, S. 67.

2.4. Die Gruppeneinteilung der Tiere

Die C57BL/6-Mäuse wurden in 12 Gruppen von der Humangenetik voreingeteilt. Es gab zum einen männliche und weibliche Tiere, intakte und gonadektomierte Tiere und in jeder dieser Gruppen drei weitere Untergruppen, die aufgrund ihrer Genotypen in Wildtyp, heterozygot und homozygot eingeteilt wurden.

Dabei handelte es sich bei der Heterozygotie um die Mischerbigkeit, eine Maus mit einem diploiden Chromosomensatz ist heterozygot in Bezug auf ein Merkmal, wenn das Gen in diesen Chromosomensätzen in zwei verschiedenen Allelen vorliegt. Die Homozygotie ist im Gegensatz dazu die Reinerbigkeit, dabei besitzt der diploide Chromosomensatz nicht zwei verschiedene Allele, sondern zwei gleiche und die Maus ist in diesem Merkmal dann reinerbig, homozygot (*Murken 2006*).

Die Genotypisierung und die Züchtung der Maus erfolgten in der Humangenetik. Anhand der Ohrmarkierung wurde den Tieren eine Nummer zugeteilt. Aus dem Gewebe der Schwanzspitze der Tiere wurde eine DNA-Isolierung durchgeführt. Es folgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Genotypisierung. Nach dem Genotypisierungsbe- fund wurden die Tiere zur Verpaarung ausgewählt. Zur Generierung von homozygoten ‚genetrapped‘-Mäusen wurde jeweils ein heterozygoten Weibchen mit einem heterozygoten Männchen verpaart. Die Tiere wurden uns im Alter von 3 Monaten für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Aufteilung der Tiere in die jeweiligen Gruppen

Männlich (55)		Weiblich (58)	
intakt (30)	orx (25)	intakt (29)	ovx (29)
Wildtyp (10)	Wildtyp (8)	Wildtyp (10)	Wildtyp (10)
heterozygot (10)	heterozygot (9)	heterozygot (9)	heterozygot (10)
homozygot (10)	homozygot (8)	homozygot (10)	homozygot (9)

2.5. Die Identifizierung der Tiere

Nach Ankunft der drei Monate alten Tiere aus der Humangenetik im Tierstall der Abteilung Endokrinologie wurden die Tiere anhand ihrer Ohrmarkierungen identifiziert und zusätzlich mit einem Transponderchip (Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder, Firma Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Niederlande) versehen. Der Transponderchip wurde in die Nackenfalte implantiert und die Chipnummer mit Hilfe eines externen Lesegerätes ermittelt und in den Aufzeichnungen festgehalten. Somit war die Identifizierung der Tiere zu jeder Zeit gewährleistet.



Abbildung 7: Transponderchiplesegerät

2.6. Das CT-Gerät und der Messvorgang Research Bone Scanner (qCT)

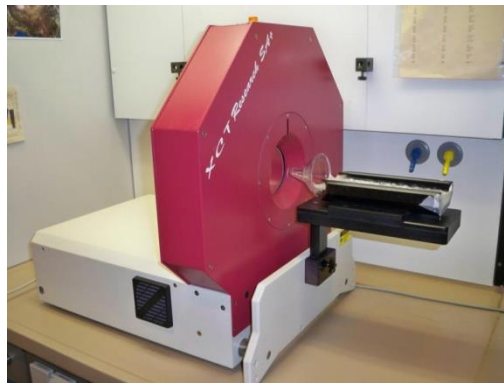


Abbildung 8: ‚qCT Research Bone Scanner‘

Um die Veränderung im Bereich der Knochen und Gewebe zu analysieren, wurden die Mäuse in einem speziell für Kleintiere entwickelten peripheren, quantitativen Computertomografen (‚xCT Research SA+, qCT, STRATEC XCT 450; Stratec‘, Pforzheim, Deutschland) gescannt, einem Röntgenverfahren, in dem die Röntgenröhre um das zu untersuchende Objekt rotiert. Dieses grundlegende Prinzip der Knochenvolumenmineraldichtemessung mit dem qCT wurde in zahlreichen Publikationen der Abteilung für Endokrinologie ausführlich beschrieben (*Seidlová-Wuttke et al. 2012*). Dennoch wird hier ein kurzer Überblick des Prinzips dargestellt. Die linken Tibiae der Mäuse wurden standardisiert gemessen. Um Störungen während des Messvorgangs durch Bewegungen der Tiere auszuschließen, erfolgte die Messung unter einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (‚Forene®‘, anfangs 5 L/min im weiteren CT-Verlauf 3,6 L/min; Sauerstoff 0,2-0,3 L/min; Luft 0,2-0,4 L/min). Das Narkosemittel wurde mithilfe eines Kleintiernarkosegerätes (‚Penlon Sigma Delta‘, der Firma ‚Zevenaar‘) und einer Mund-Nase-Maske dem Tier verabreicht. An dem Narkosegerät ist ein Flow-Meter angeschlossen, mit dem ein beliebiges Sauerstoff-Luftgemisch zugeführt werden konnte. Über einen Regler konnte das Narkosemittel während der Messung jedem Tier individuell angepasst werden. Das Gasgemisch wurde über einen Schlauch zur Mund-Nase-Maske geleitet und vom Tier eingeatmet, während der gesamten Messung hatte das Tier die Mund-Nase-Maske auf und die Narkose konnte gut angepasst werden.

Die Daten der Messung wurden auf einen Computer übertragen und später gespeichert. Als ersten Schritt entsteht ein Übersichtsbild (Abb. 9) in Form eines Längsschnittes des gescannten Objektes. An diesem farblich codierten digitalisierten Rasterbild wurde nun die Referenzlinie bestimmt. Anhand dieser Einstellung wurden die drei Schichten definiert und dadurch eine standardisierte Messung bei jedem Tier garantiert.

2. Material und Methoden

Die Referenzlinie wurde in den Bereich der Epiphyse gelegt und die drei Messebenen folgten im definierten Abstand oberhalb der Referenzlinie. Schicht eins bei 1,75 mm, Schicht zwei bei 2,0 mm und Schicht drei bei 7,5 mm (Abb. 10). Dabei liegen die ersten beiden Schichten in der Metaphyse und dienen zur Auswertung des spongiösen Knochens sowie der Auswertung von Muskulatur und Fettgewebe. Der dritte Schnitt bei 7,5 mm liegt in der Diaphyse und wurde zur Auswertung der Kortikalis genutzt. Wenn die Referenzlinie bestimmt wurde, konnte der eigentliche Messvorgang gestartet werden.

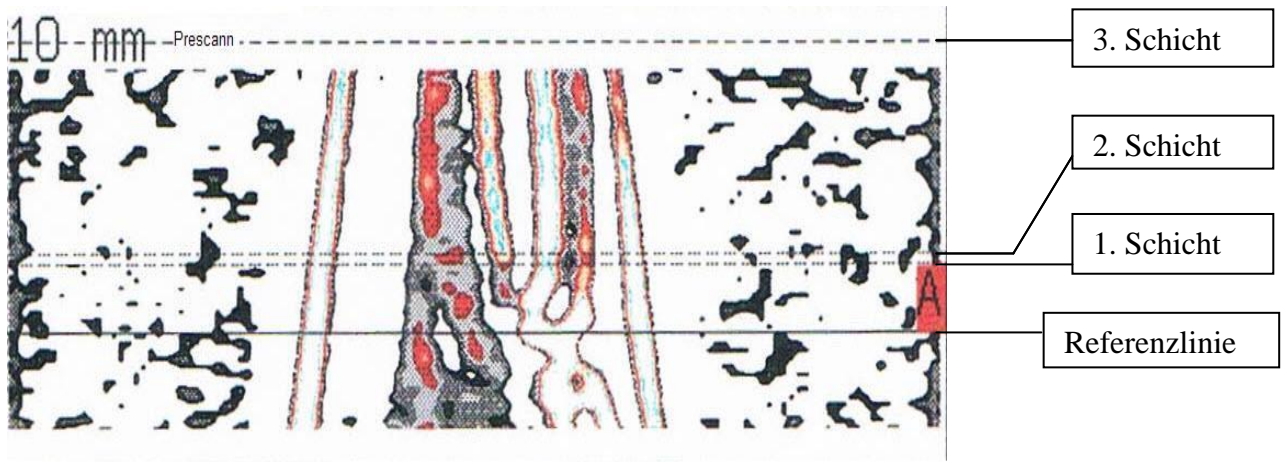


Abbildung 9: Prescann, Übersichtsbild

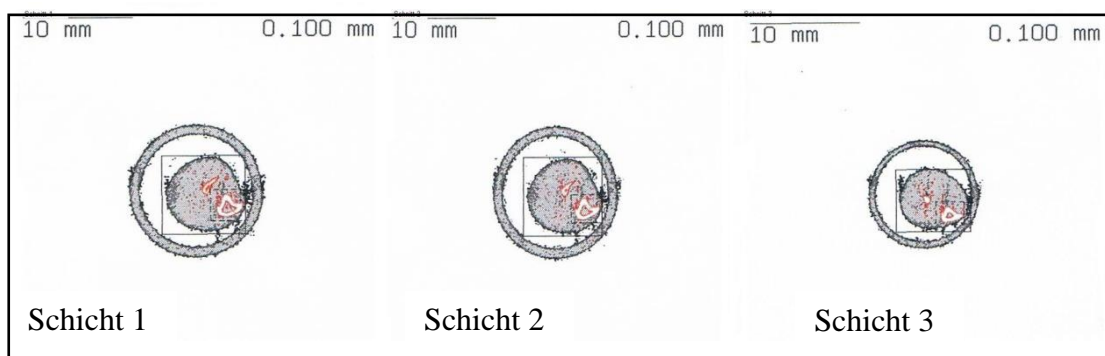


Abbildung 10: Schicht 1-3 im Querschnitt

Dabei wurde die linke Tibia der Maus in einem eigens dafür entwickelten Hartplastiktrichter fixiert, damit die Messung der Metaphyse und Diaphyse optimal gewährleistet werden konnte. Das „Schiffchen“ mit Maus und Trichter wurde dann auf eine Vorrichtung geschoben und die Messung konnte gestartet werden.

Die Dauer einer Messung mit Narkose belief sich auf ca. 10-15 Minuten.

Der Computer speichert alle Daten in einem dazugehörigen Computerprogramm (XCT5, 40; Stratec, Pforzheim) und mit Hilfe dieses Programmes konnten die verschiedenen Parameter, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, ausgewertet und bestimmt werden.

Nach Beendigung des Messvorganges und der Narkose standen die Mäuse in einem separaten Käfig unter ständiger Beobachtung.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Monaten beobachtet und alle zwei Monate gesannt. Somit gibt es von jedem Tier vier CTs. Nach jedem CT wurden die noch narkotisierten Mäuse auf einer Sartorius-Waage gewogen, um ihre Körpergewichtsentwicklung zu dokumentieren.

2.7. Die ermittelten Parameter

Abgesehen von dem Körpergewicht wurden alle Werte entweder vom Computerprogramm selbst ermittelt oder anhand der von diesem ermittelten Parameter berechnet. Die endostale Dichte (in mg/cm^3 angegeben), auch als Spongiosadichte bezeichnet, ist die Dichte des Trabekelgeflechts innerhalb des endostalen Raumes, welcher wiederum von Kortikalis umgeben wird. Den Querschnitt des Knochens kann man in drei Bereiche einteilen. Die Querschnittsfläche (QF) des Knochens mit Kortikalis und Spongiosa. Wenn man nur die Kortikalis betrachtet, bezeichnet man diese Querschnittsfläche als kortikale Fläche (KF) und die dritte Fläche ist die endostale Fläche (EF), sie beschreibt die Knochenquerschnittsfläche ohne die kortikale Fläche. Sie entspricht der Markkanalquerschnittsfläche und wird ebenso wie die anderen Querschnitte in mm^2 angegeben. In 3.1.6. (Abb. 22, S. 29) werden die einzelnen Querschnitte nochmals schematisch dargestellt. Die kortikale Dichte (in mg/cm^3 angegeben) ist die Dichte der Kortikalis, sie umgibt als starker Knochenmantel die Spongiosa und den Markkanal. Der Fettanteil wird in Prozent angegeben. Dieser wird im Tibiaquerschnitt in der Metaphyse sowie Diaphyse, abzüglich der knöchernen Strukturen und der Muskulatur, bestimmt. Die Muskel-dichte ist noch unzureichend definiert, in dieser Arbeit wurde sie als röntgenologische Dichte, abhängig von der Menge an Elastinfasern pro mm^2 , festgelegt. Im Ergebnisteil werden die tatsächlichen Muskelflächen des M. gastrocnemius im Bereich der Metaphyse und Diaphyse dargestellt. Diese Flächen der Muskulatur ergeben sich aus dem gesamten tibialen Querschnitt abzüglich knöcherne Strukturen sowie Fettanteil. Die Muskelfläche wird in mm^2 angegeben. In der Abb. 11 wird an einem Unterschenkelquerschnitt einer Maus verdeutlicht, wo die Messfelder gewählt wurden.

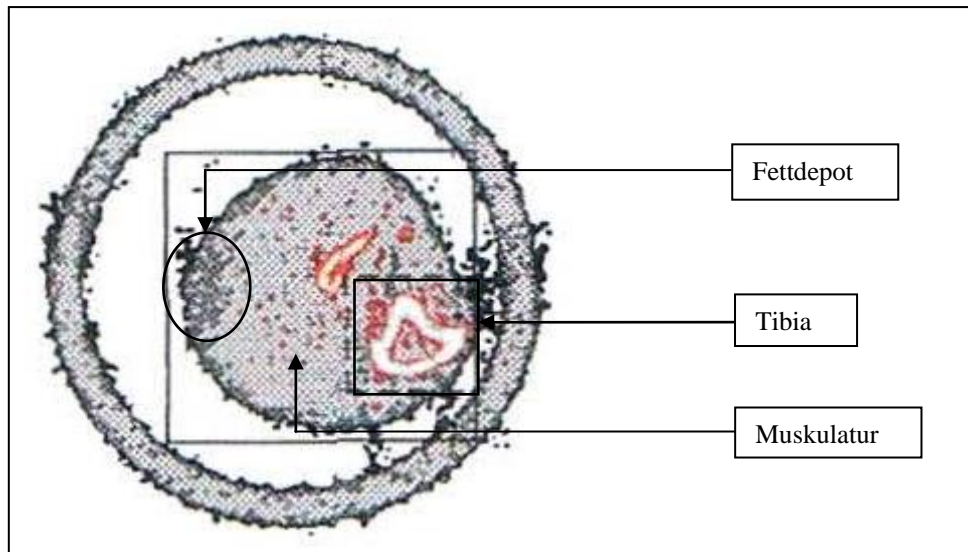


Abbildung 11: Unterschenkelquerschnitt einer Maus (Die Qualität ist aufgrund der starken Vergrößerung herabgesetzt)

In der Auswertung wurden die Gewebe nach ihrer Dichte gemessen und eingeteilt. Gewebe, die eine Dichte von 40 mg/cm^3 und weniger aufwiesen, wurden als Fettgewebe definiert. Bei dem bestimmten Fettanteil handelt es sich um das paratibiale Fettdepot. Die Dichte zwischen 40 und 99 mg/cm^3 sprach für das Vorliegen von Muskulatur. Die Gewebe mit einer Dichte zwischen 280 und 400 mg/cm^3 wurden als spongiöses Knochengewebe festgelegt und in der dritten Ebene (Schicht 3) wurden die kortikalen Knochengewebe ausgewertet, diese Dichten lagen über 710 mg/cm^3 . Die Abb. 12 zeigt einen Überblick der Dichteinteilung bei der qCT-Messung.

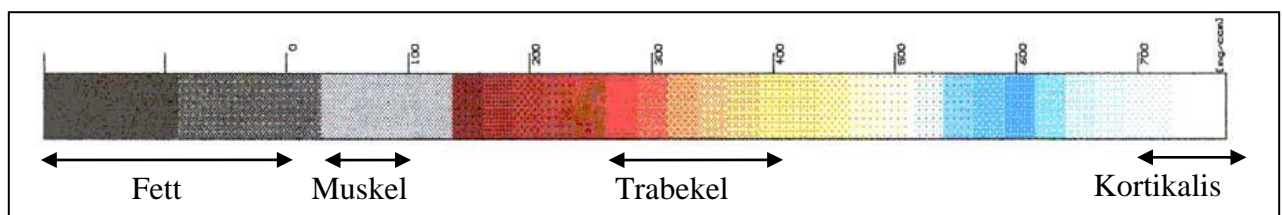


Abbildung 12: Dichtebereich bei der qCT-Messung

2.7.1. Die histologischen Parameter

Für die Knochenpräparate der Tibiae wurde ein Zeiss Axiophot Mikroskop mit eingebauter Kamera und der dazugehörigen Bildanalysesoftware analySIS® 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburg) verwendet.

Mit Hilfe der Software wurden in jeweils zwei Präparaten desselben Tieres beliebige Abstände gemessen. In der Vergrößerung $1,25 \times 2,5 = 3,125$ (entspricht $500 \mu\text{m}$) wurden die Dicken

2. Material und Methoden

der Kortikalis der Metaphyse und der Diaphyse gemessen und in der Vergrößerung $1,25 \times 10 = 12,5$ (entspricht $100 \mu\text{m}$) die Dicken der epiphysären Fuge sowie des tibialen hyalinen Kniegelenkknorpels.

Abb. 13 zeigt eine schematische Darstellung der Platzierungen der Messpunkte und Abstände.

Dabei werden die Dicken der einzelnen Parameter wie folgt zugeordnet:

- Kortikalis im metaphysären Bereich - rote Linie
- Kortikalis im diaphysären Bereich - grüne Linie
- epiphysale Fuge - schwarze Linie
- tibialer hyaliner Kniegelenkknorpel - violette Linie.

Es wurden bei jedem Tier von jedem Parameter 10 Einzelmessungen durchgeführt.

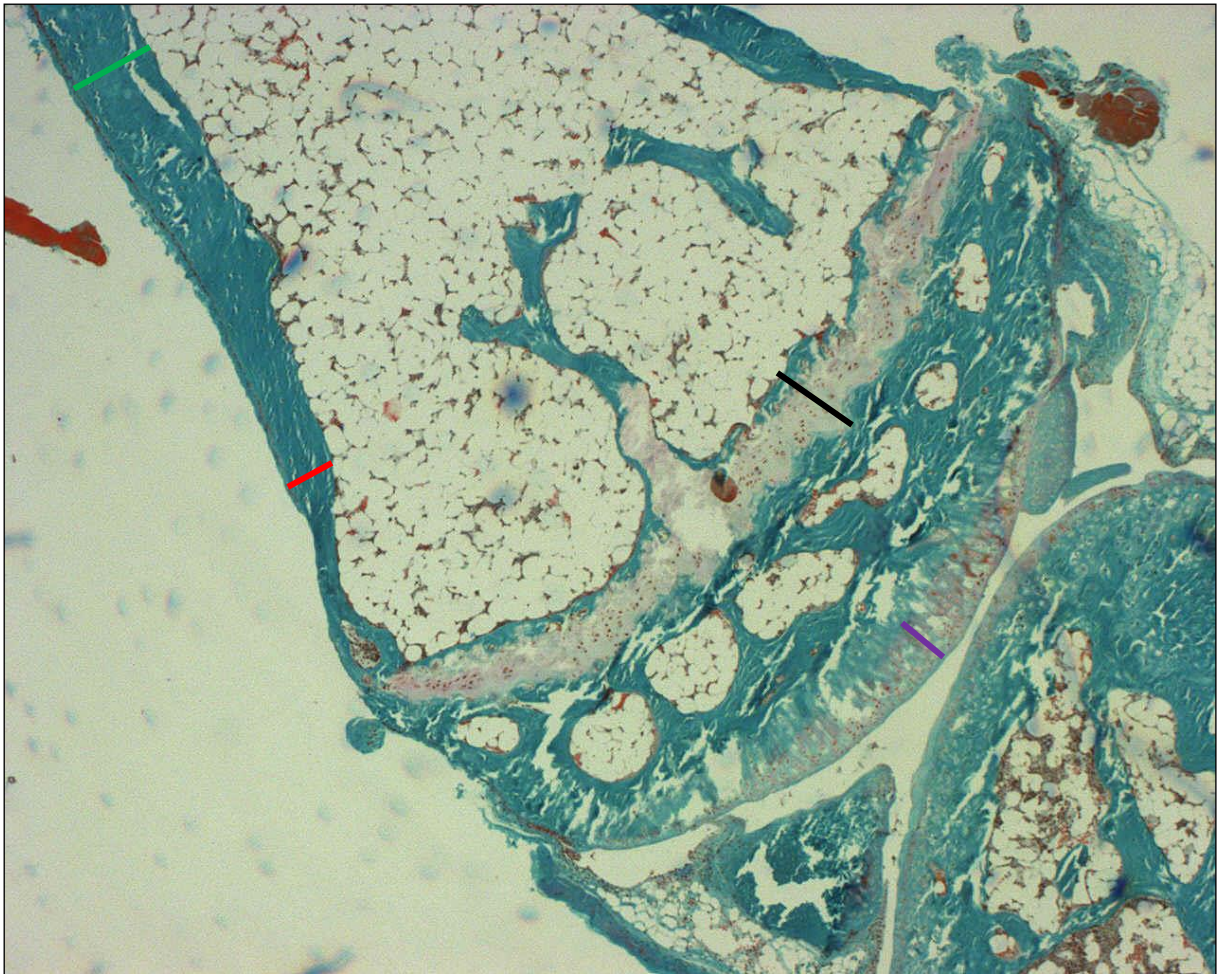


Abbildung 13: Weibliche Maus, homozygot, ovariectomiert, Nr. 83C

Rote Linie: Dicke der Kortikalis im metaphysären Bereich, in jedem Präparat an 10 verschiedenen Stellen gemessen.

Grüne Linie: Dicke der Kortikalis im diaphysären Bereich, in jedem Präparat an 10 verschiedenen Stellen gemessen.

Schwarze Linie: Dicke der Epiphysenfuge, in jedem Präparat an 10 verschiedenen Stellen gemessen.

Violette Linie: Dicke des tibialen Kniegelenkknorpels, in jedem Präparat an 10 verschiedenen Stellen gemessen.

2.8. Herstellung der Knochenpräparate

Die Herstellung der Knochenpräparate wurde freundlicherweise von den Medizinisch-Technischen Assistentinnen der Abteilung Endokrinologie übernommen.

Nach der Obduktion der Tiere wurden Tibiae, Fett und Blut für weitere Untersuchungen gewonnen. Die linke Tibia der Mäuse wurde frei präpariert und im Einbettkörbchen über 36 Stunden in 4 % neutraler gepufferter Formalinlösung fixiert.

Details zur histologischen Weiterverarbeitung sind in 6. Methodischen Anhang dargestellt.

2.9. Die Gewichtsbestimmung

Um die Gewichtsentwicklung der Mäuse im Laufe des Versuches zu erfassen, wurden die Tiere im narkotisierten Zustand nach jedem CT gewogen. Das erste Gewicht wurde nach dem Ankommen der Tiere aus der Humangenetik erfasst. Die Gewichtsbestimmung erfolgte mittels einer Sartoriuswaage („BL 3100“). Die Daten wurden für den Versuch dokumentiert.

2.10. Die statistischen Methoden

Die statistischen Werte wurden mit dem Computerprogramm „Graph Pad Prism 5®“ ausgewertet und berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und mit Symbolen gekennzeichnet.

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der unpaarigen t-Tests durchgeführt.

In allen Abbildungen sind die Mittelwerte als Säulendiagramme dargestellt. Zusätzlich sind die Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM) als Antennen auf den Säulen gezeichnet.

3. Ergebnisse

Die fünf Monate alten Mäuse wurden in Gruppen zusammengefasst. Jeweils männliche und weibliche Tiere in intakte und orx (ovx), Wildtypen und homozygote Tiere.

Alle Ergebnisse werden mit den Kontrolltieren (wild, intakt) in den jeweiligen Bereichen verglichen.

3.1. Die weiblichen Tiere

3.1.1. Die Körpergewichte

Die Körpergewichte der Mäuse wurden nach jedem qCT gemessen. In den Abbildungen werden Anfangs- und Endgewichte gezeigt, da im Verlauf eine kontinuierliche Gewichtsentwicklung stattfand.

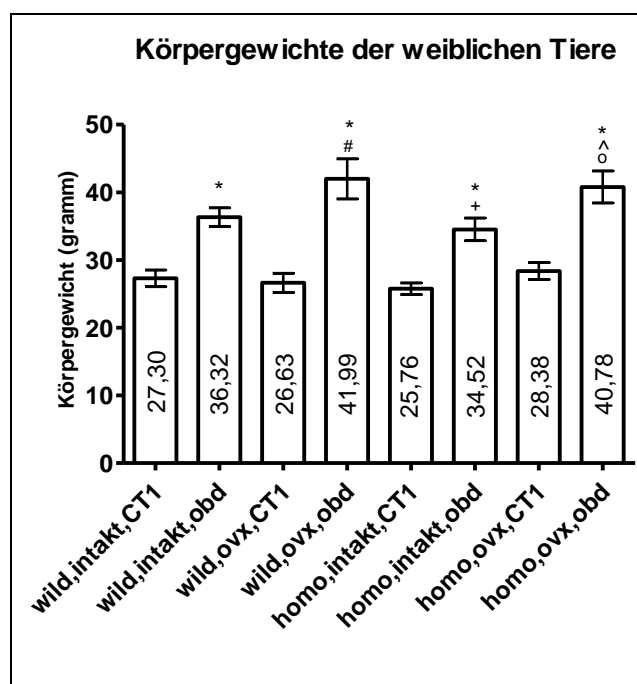


Abbildung 14: Körpergewichte der weiblichen Tiere über ein Jahr und Mittelwerte. CT1: Tiere bereits 3 Monate ovx. Legende: * vs wild, intakt, CT1; # vs wild, ovx, CT1; + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, ovx, CT1; ^ vs homo, intakt, obd.

In allen Gruppen ist eine signifikante Gewichtszunahme zu verzeichnen. Die weiblichen Tiere reagieren stärker mit einer Gewichtszunahme auf die Ovariectomie als die männlichen Tiere auf die Orchiektomie. In der Gruppe der weiblichen Tiere waren die ovx Wildtypen mit 41,99 g die schwerste Gruppe. In den männlichen Gruppen waren die intakten Wildtypen mit 41,24 g die schwersten Tiere (Abb. 33). Bei den Homozygoten zeigt sich im Gegensatz zu

den Intakten eine signifikante Gewichtszunahme bei den Obduktionsgewichten zwischen intakter und ovx Gruppe.

Um die Verteilung des Körpergewichtes besser qualifizieren zu können, wurden die Muskelflächen (in mm²) und das paratibiale Fettdepot (in %) der einzelnen Tiere bestimmt.

3.1.2. Die Muskelfläche

Die Muskelflächen wurden einmal im Bereich der ersten und zweiten Schicht (1,75 mm und 2,0 mm) und einmal im Bereich der dritten Schicht bei 7,5 mm dargestellt. Zur besseren Übersicht wird die Muskelfläche im CT1 und im Verlauf im CT4 gezeigt.

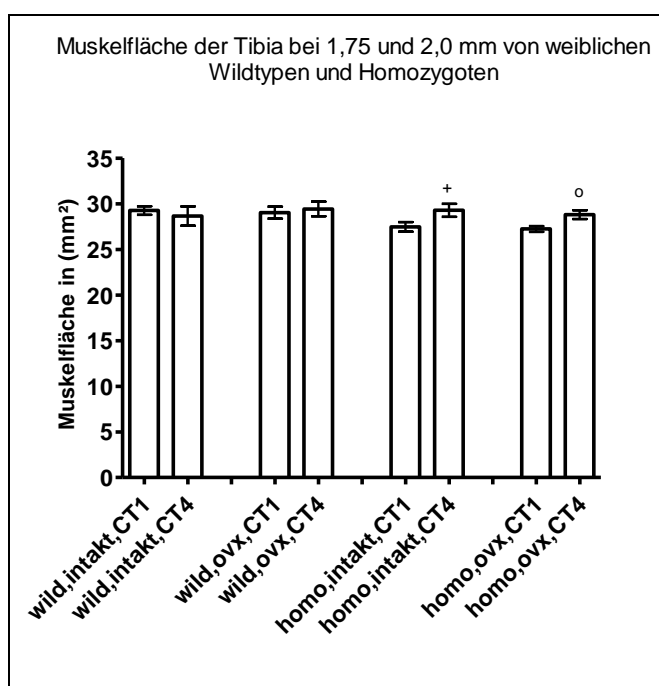


Abbildung 15: Muskelfläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 bei 1,75 und 2,0 mm.

Legende: + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, ovx, CT1.

Im zeitlichen Verlauf ist eine signifikante Zunahme der Muskelfläche in den beiden homozygoten Gruppen festzustellen.

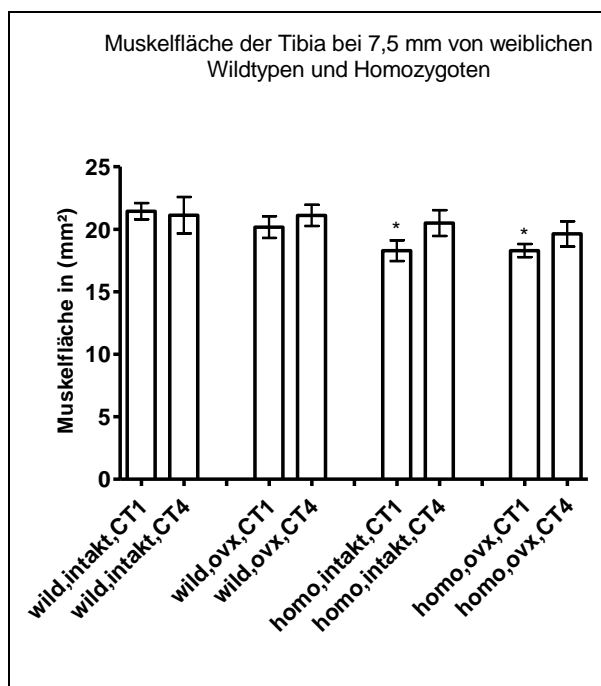


Abbildung 16: Muskelfläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 bei 7,5 mm. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

Im diaphysären Bereich haben die homozygoten Gruppen eine signifikant kleinere Muskelfläche im CT1 als ihre Kontrollgruppe. Die Muskelflächenzunahme im zeitlichen Verlauf ist sichtbar, allerdings nicht signifikant.

3.1.3. Das paratibiale Fettdepot

Das paratibiale Fettdepot des Unterschenkels wird auf Höhe der Metaphyse (im Bereich 1,75 mm und 2,0 mm) und auf Höhe der Diaphyse (bei 7,5 mm) dargestellt. Es werden zur Verlaufskontrolle die Fettdepots des CT1 und des CT4 nebeneinander gestellt.

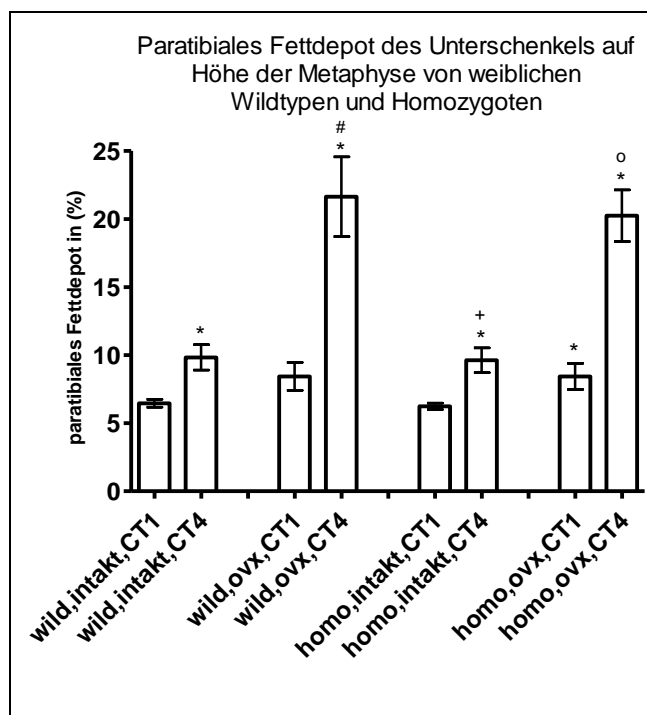


Abbildung 17: Paratibiales Fettdepot des Unterschenkels der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 auf Höhe der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; # vs wild, ovx, CT1; + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, ovx, CT1.

Die weiblichen ovx Tiere reagieren auf die Ovariectomie durch eine signifikante Zunahme des paratibialen Fettdepots. Zwischen den Wildtypen und Homozygoten gibt es keinen signifikanten Unterschied. Im zeitlichen Verlauf zeigen alle Gruppen eine signifikante Zunahme des paratibialen Fettdepots im Vergleich zum jeweiligen CT1.

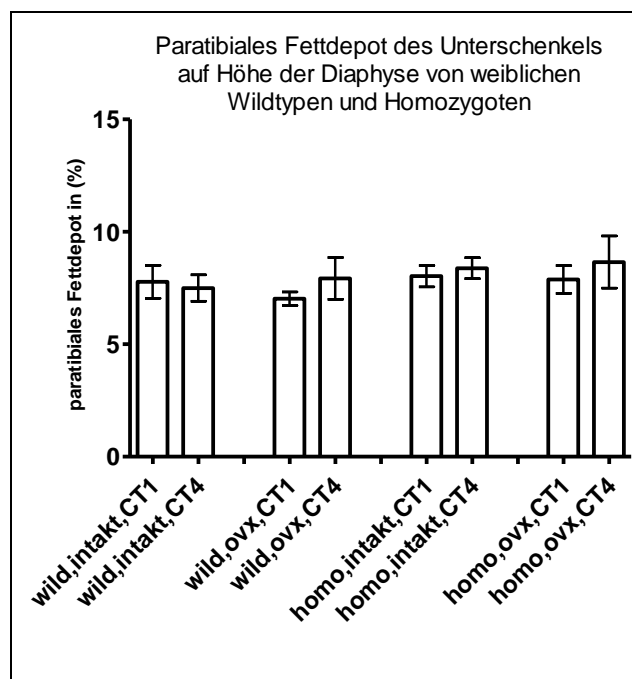


Abbildung 18: Paratibiales Fettdepot des Unterschenkels der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 auf Höhe der Diaphyse.

Die Aufzeichnung zeigt, dass alle Tiere im Laufe ihres Lebens an Fett zunehmen. Bei den Weibchen hat der Genotyp keinen gravierenden Einfluss auf das paratibiale Fettdepot. Entscheidend für die extreme Fettzunahme ist die Ovariectomie. In der Diaphyse der Tibia der weiblichen Tiere ist die Zunahme des Fettdepots nicht so deutlich zu sehen wie in der Metaphyse der Tibia.

3.1.4. Die endostale Dichte (ED)

Die endostale Dichte, welche auch als Substantia spongiosa bezeichnet wird, stellt eine Erscheinungsform des Knochens dar. Es handelt sich dabei um ein schwammig aufgebautes System aus Trabekeln. Die Spongiosa wird nach außen hin von der Kortikalis umschlossen.

Die endostale Dichte wird in mg/cm^3 angegeben.

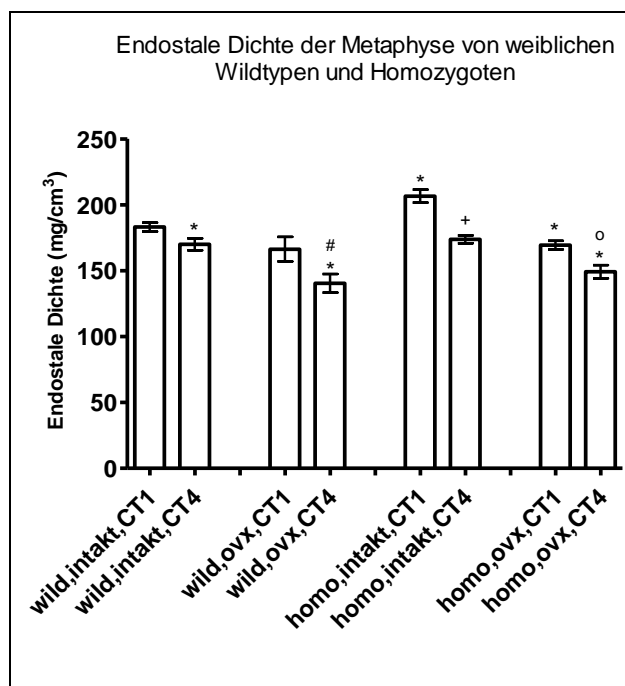


Abbildung 19: Endostale Dichte der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; # vs wild, ovx, CT1; + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, ovx, CT1.

Die weiblichen Tiere beginnen mit einer geringeren endostalen Dichte als die Männchen. Im Mittel ist die Dichte ca. 183 mg/cm³. Ebenso wie bei den männlichen Tieren ist auch bei den weiblichen Tieren die physiologische endostale Dichteabnahme im zeitlichen Verlauf zu sehen. Die Weibchen sind nach Ovariectomie empfindlicher auf endostale Dichteänderungen als die Männchen. Im zeitlichen Verlauf sinkt die endostale Dichte bei den ovx Tieren um ca. 20 mg/cm³. Bei den Männchen ist es nur halb so viel.

3.1.5. Die kortikale Dichte (KD)

Die kortikale Dichte wird in mg/cm³ angegeben. Die Kortikalis, auch als Substantia compacta bezeichnet, ist eine Ausprägung der Knochensubstanz. Sie bildet die äußere Schicht des Knochens und umgibt die Spongiosa sowie den Markkanal.

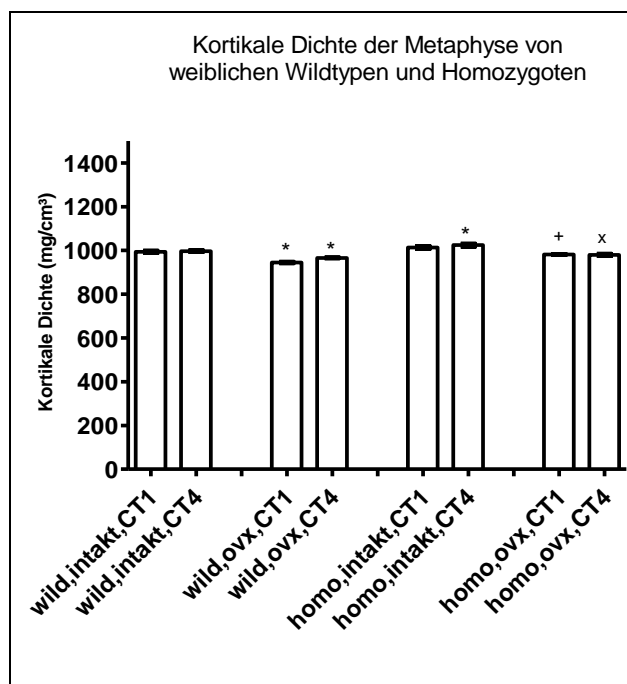


Abbildung 20: Kortikale Dichte der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1; x vs homo, intakt, CT4.

Die Weibchen zeigten eine andere, aber dennoch zu erwartende Verteilung der kortikalen Dichte als die männlichen Tiere. In der Metaphyse hatte die wild-intakt-CT1-Gruppe einen Mittelwert von 994 mg/cm³. Die ovx Tiere zeigten eine signifikante Abnahme der kortikalen Dichte auf 945 mg/cm³ im CT1. In der homozygot-intakt-CT4-Gruppe ist eine signifikante Zunahme der kortikalen Dichte zu sehen.

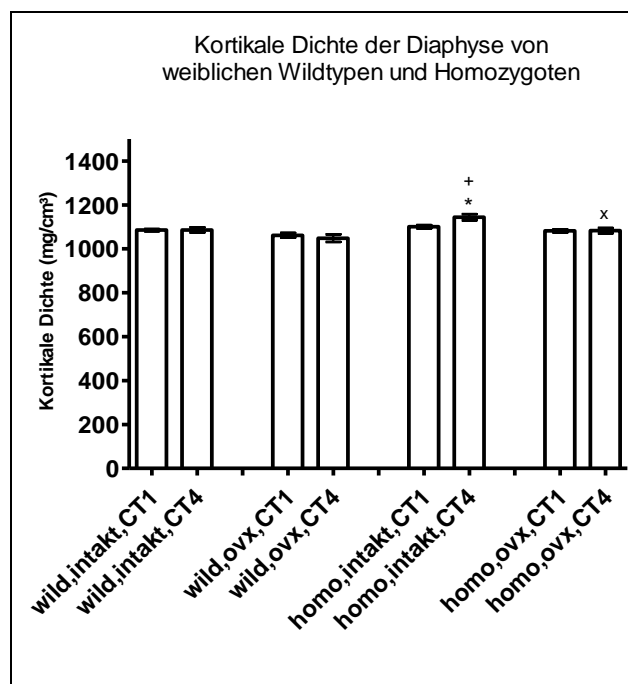


Abbildung 21: Kortikale Dichte der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; x vs homo, intakt, CT4; + vs homo, intakt, CT1.

In der Diaphyse ist ebenfalls nur in der homozygot-intakt-CT4-Gruppe eine signifikante Zunahme der kortikalen Dichte zu verzeichnen. In dieser Gruppe beträgt der Mittelwert 1144 mg/cm³. Bei den weiblichen homozygoten-intakten Mäusen tritt erst im zeitlichen Verlauf eine signifikante Zunahme der kortikalen Dichte ein. Die homozygot-ovx-CT4-Gruppe hat eine signifikant kleinere kortikale Dichte als die homozygot-intakt-CT4-Gruppe. In der Diaphyse fehlt ebenfalls die signifikante Abnahme der kortikalen Dichte bei den ovx Tieren. Dennoch ist die kortikale Dichte in allen Gruppen stets über 1045 mg/cm³.

3.1.6. Die Querschnittfläche (QF)

Die Querschnittfläche des Knochens wird in Quadratmillimeter (mm^2) angegeben. In der folgenden Abbildung werden die Querschnittfläche, kortikale Fläche (KF) und endostale Fläche (EF) schematisch dargestellt.

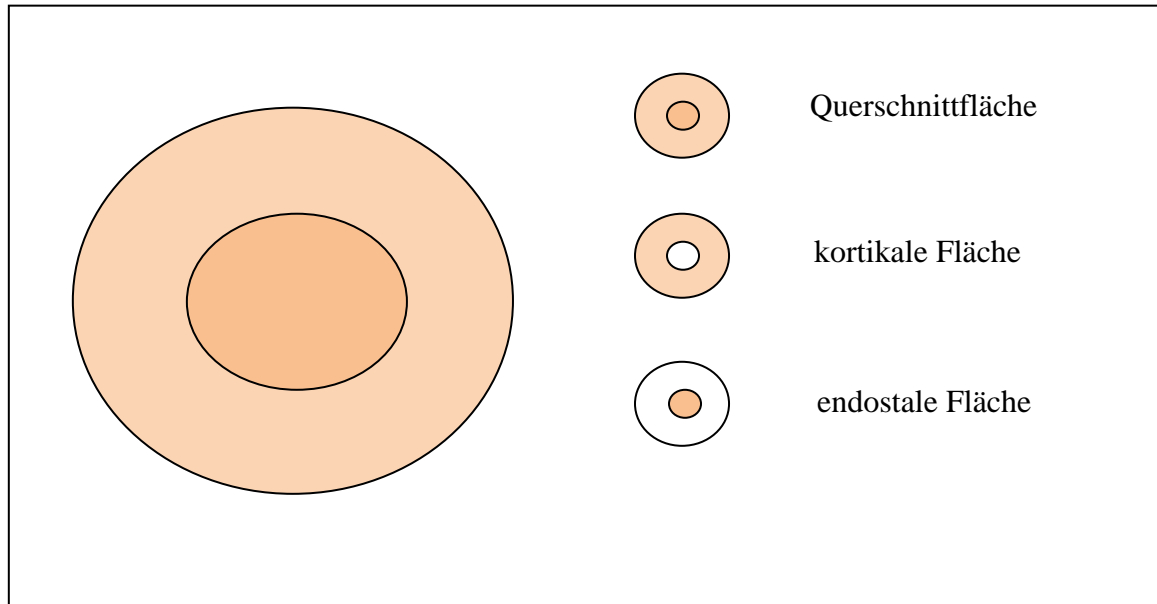


Abbildung 22: Überblick der einzelnen Flächen im Knochenquerschnitt

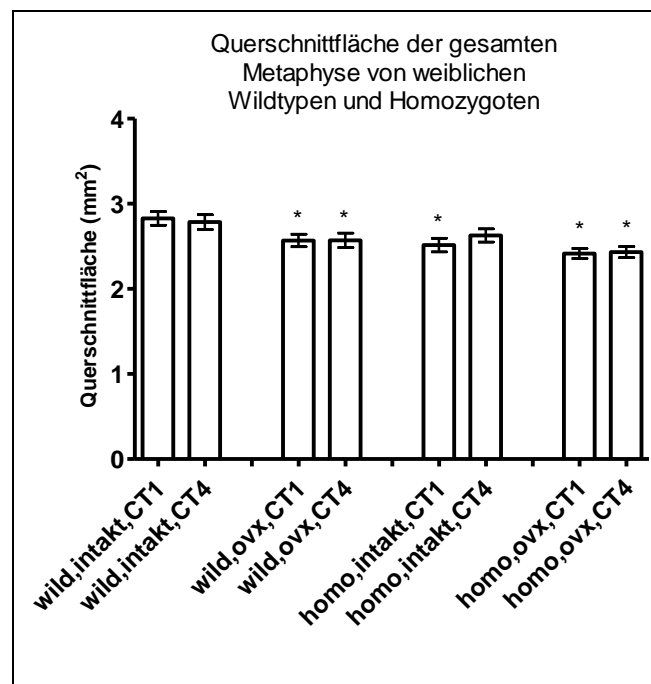


Abbildung 23: Querschnittfläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

Bei den weiblichen Tieren ist eine signifikante Abnahme der Querschnittfläche in der Metaphyse zu sehen. Die Querschnittfläche nimmt bei den intakten Homozygoten nicht ab, sondern zu.

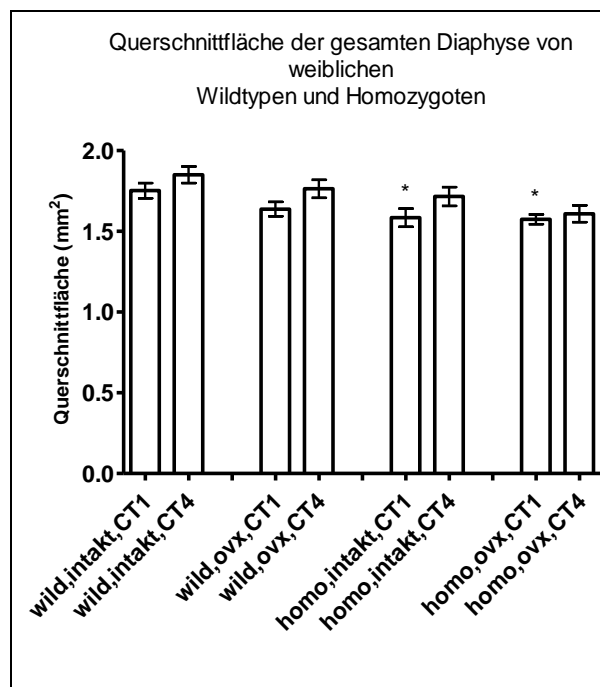


Abbildung 24: Querschnittfläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

In der Diaphyse der weiblichen Tiere ist keine Abnahme der Querschnittfläche, sondern eine Zunahme zu verzeichnen. Eine signifikant kleine Querschnittfläche hat die homozygot-intakt-CT1-Gruppe und die homozygot-ovx-CT1-Gruppe.

3.1.7. Die kortikale Fläche (KF)

Die kortikale Fläche beschreibt die Querschnittfläche der Tibia in Meta- und Diaphyse ohne den Markraum der Tibia und wird in Quadratmillimeter (mm²) angegeben. Die Daten der kortikalen Fläche wurden durch das Computerprogramm des qCTs gemessen und berechnet. Sie kann aber ebenso aus der Differenz von Querschnittfläche und der endostalen Fläche berechnet werden.

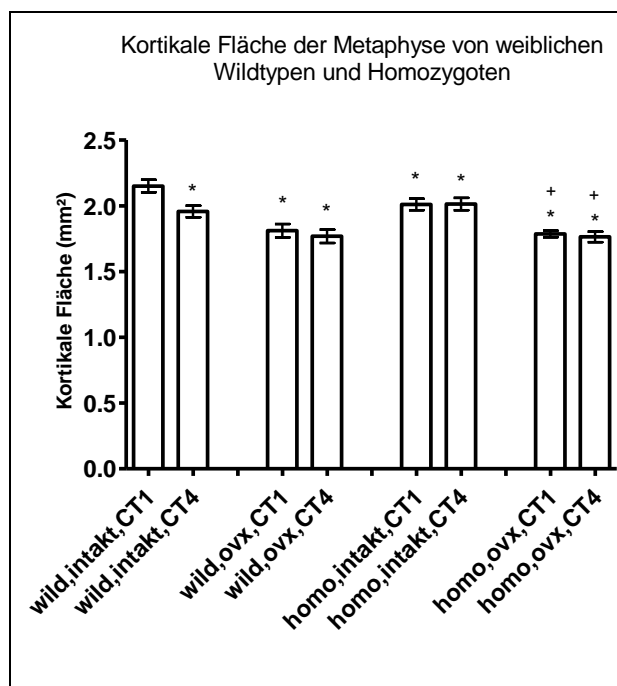


Abbildung 25: Kortikale Fläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1.

Bei den weiblichen Tieren ist in allen Gruppen eine signifikante Abnahme der kortikalen Fläche zu beschreiben.

In den beiden Wildtyp-Gruppen (intakt und ovx) ist auch eine signifikante (in wild, intakt) und eine geringe (in wild, ovx) Abnahme der Kortikalisfläche im zeitlichen Verlauf zu verzeichnen. Die beiden homozygoten Gruppen (wild, ovx) verändern ihre kortikale Fläche im zeitlichen Verlauf fast nicht. Die homozygot-ovx-Gruppe hat eine signifikant kleinere KF als die intakten Homozygoten.

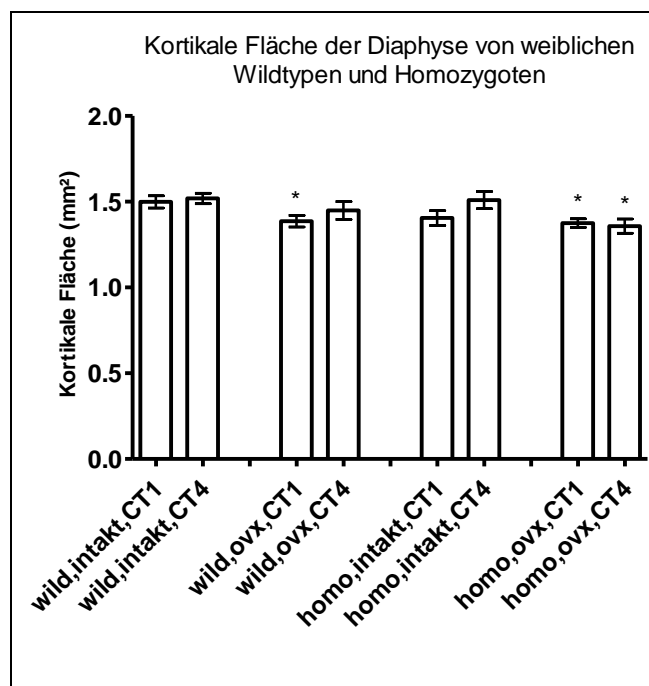


Abbildung 26: Kortikale Fläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

In der Diaphyse der weiblichen Tiere zeigt sich ein anderes Bild als bei den vorangegangenen Werten. In den Gruppen wild-intakt, wild-ovx und homo-intakt zeigt sich eine Zunahme der kortikalen Fläche. Am deutlichsten zeigt sich die Zunahme auch hier in der homozygot-intakt-Gruppe. Lediglich in der homozygot-ovx-Gruppe zeigt sich eine minimale Abnahme der kortikalen Fläche.

3.1.8. Die endostale Fläche (EF)

Die endostale Fläche beschreibt die Querschnittsfläche der Tibia in Meta- und Diaphyse ohne die kortikale Fläche der Tibia und wird in Quadratmillimeter (mm²) angegeben. Sie entspricht dem Markraum der Tibia und kann demzufolge auch als Trabekel-Fläche bezeichnet werden, denn im Markraum eines jeden Knochens befinden sich Trabekel, welche die Gerüststrukturen der Knochen darstellen. Die Daten der endostalen Fläche wurden ebenfalls durch das Computerprogramm des qCTs gemessen und berechnet. Sie kann aber auch aus der Differenz der Querschnittsfläche und der kortikalen Fläche berechnet werden.

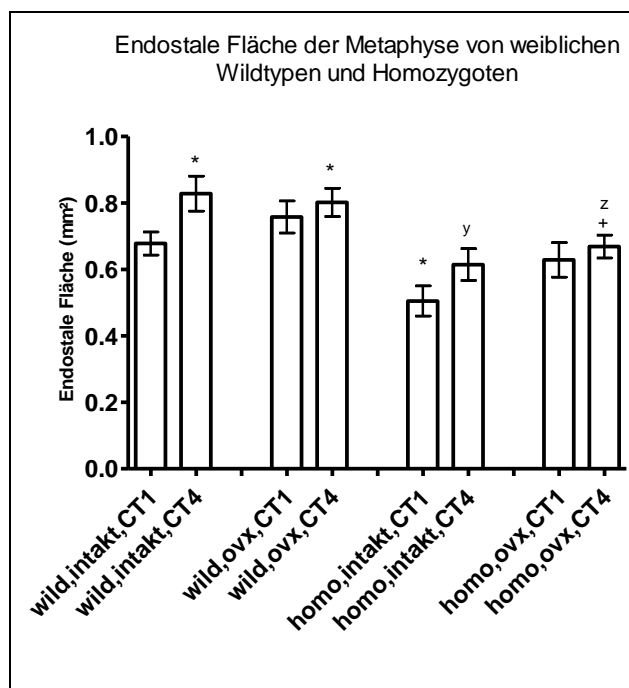


Abbildung 27: Endostale Fläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1; y vs wild, intakt, CT4; z vs wild, ovx, CT4.

Die weiblichen Tiere zeigen in der homozygot-intakt-Gruppe gegenüber der wild-intakt-Gruppe eine signifikante Abnahme der endostalen Fläche. Eine signifikante Zunahme ist bei der wild-intakt-CT4-Gruppe und in der wild-ovx-CT4-Gruppe zu verzeichnen.

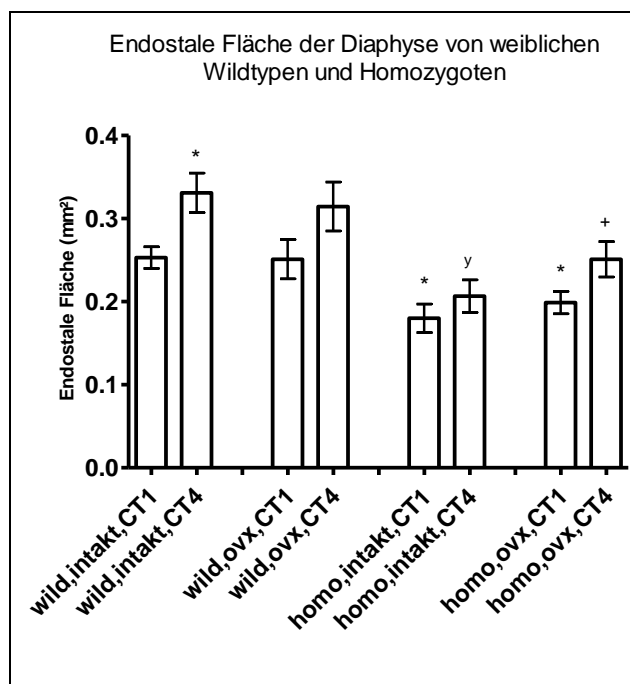


Abbildung 28: Endostale Fläche der Tibia der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate ovx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1; y vs wild, intakt, CT4.

Auch in der Diaphyse der weiblichen Homozygoten zeigt die Homozygot-intakt-Gruppe gegenüber der Wild-intakt-Gruppe eine signifikante Abnahme der endostalen Fläche. Die wild-intakt-CT4-Gruppe zeigt eine signifikante Zunahme der endostalen Fläche.

3.1.9. Die histologische Auswertung

Am Ende des Versuches, nach einer Zeit von etwa 12 Monaten, wurden die Tiere obduziert und die Tibiae zur weiteren Auswertung verwendet. Bei den fixierten Tibiapräparaten wurden unter dem Zeiss Axiophot Mikroskop die Kortikalisdicken der Diaphyse und der Metaphyse gemessen. Des Weiteren wurden der Bereich der epiphysalen Fuge und des tibialen Kniegelenkknorpels vermessen. Repräsentative Fotos finden sie im Methodischen Anhang, 6.2. histologisches Bildmaterial. Die Messungen wurden an jedem Präparat 10mal durchgeführt um ausreichend Messwerte zur Verfügung zu haben.

Die Kortikalisdicke

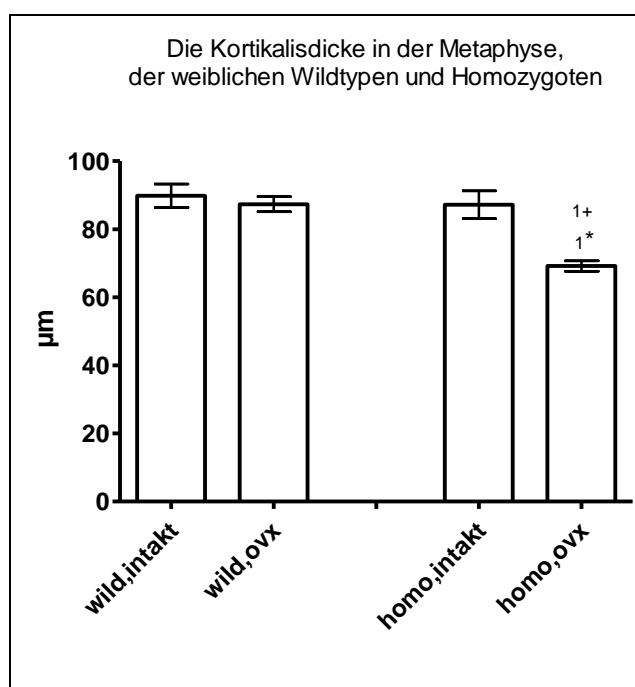


Abbildung 29: Histologische Auswertung der Kortikalisdicke der Metaphyse, der Tibia, der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt; 1+ vs homo, intakt.

In dieser Gruppe ist keine signifikante Zunahme, sondern eine signifikante Abnahme in der homozygot-ovx-Gruppe zu verzeichnen.

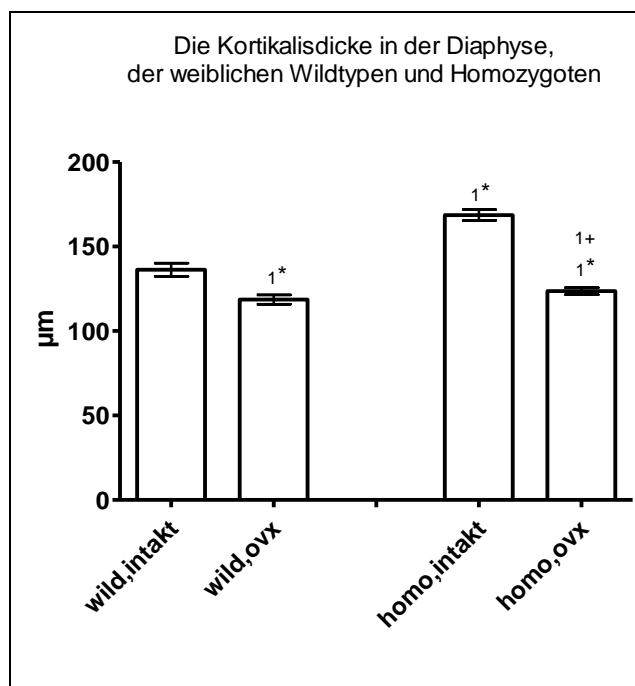


Abbildung 30: Histologische Auswertung der Kortikalisdicke der Diaphyse, der Tibia, der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt; 1+ vs homo, intakt.

Die weiblichen Tiere zeigen auch in der Diaphyse ein anderes Verhalten als die männlichen Tiere. Während in der homozygot-intakt-Gruppe eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke gemessen werden konnte, zeigte sich bei beiden ovx-Gruppen eine signifikante Abnahme der Kortikalisdicke.

Die Dicke der epiphysalen Fuge

Die Epiphysenfuge, auch als Wachstumsfuge bezeichnet, ist der hyaline knorpelige Anteil zwischen Epiphyse und Metaphyse, in dem die Entwicklung des Knochens als enchondrale Ossifikation stattfindet.

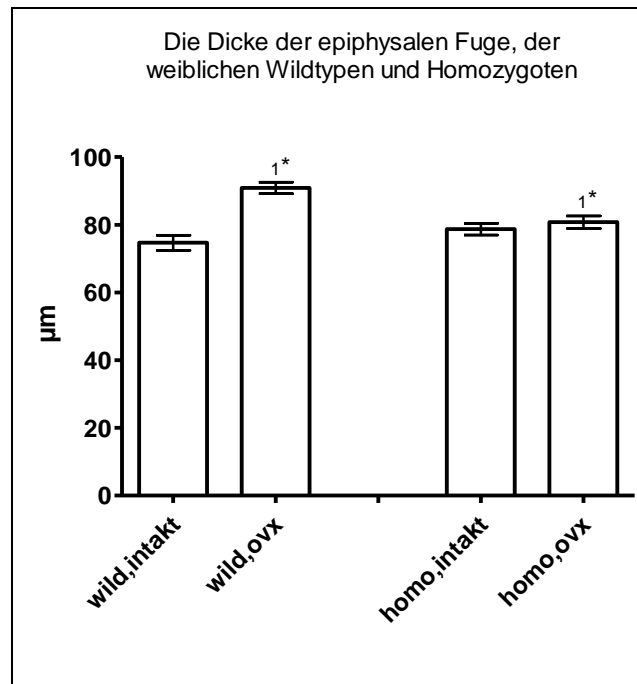


Abbildung 31: Histologische Auswertung der epiphysalen Fuge, der Tibia, der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt.

Wie schon in den Kortikalisdicken ist auch in der Dicke der Epiphysenfuge eine Diskrepanz zwischen der Entwicklung männlicher und weiblicher Tiere zu sehen. Nur die beiden ovx-Gruppen zeigen eine signifikante Zunahme der Dicke der epiphysalen Fuge.

Die Dicke der hyalinen Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels

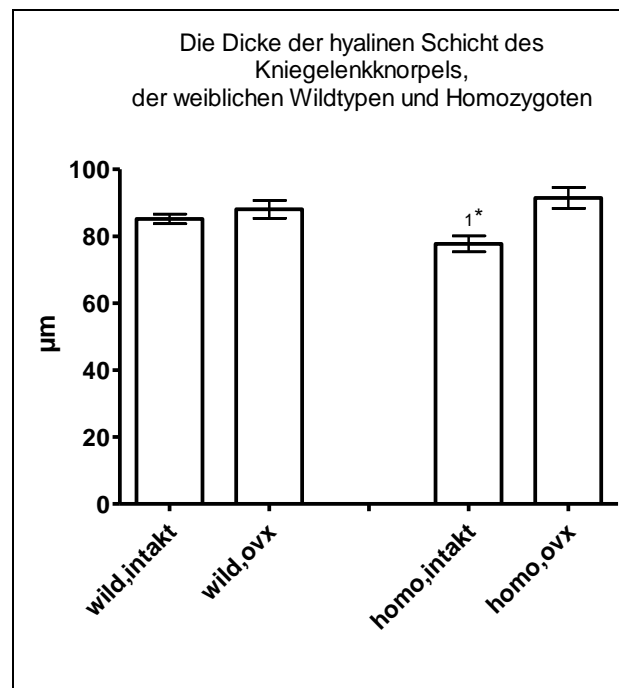


Abbildung 32: Histologische Auswertung der Dicke der hyalinen Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels, der weiblichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und ovx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt.

Bei den weiblichen Tieren ist eine signifikante Abnahme der hyalinen Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels in der homozygot-intakt-Gruppe zu verzeichnen.

3.2. Die männlichen Tiere

3.2.1. Die Körpergewichte

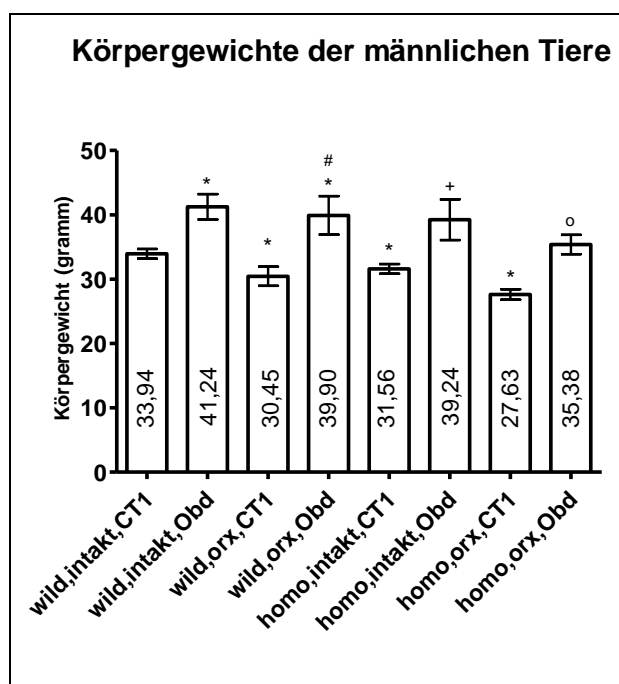


Abbildung 33: Körpergewichte der männlichen Tiere über ein Jahr und Mittelwerte. CT1: Tiere bereits 3 Monate orx. Legende: * vs wild, intakt, CT1; # vs wild, orx, CT1; + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, orx, CT1.

Wie zu erwarten, zeigen alle Tiere eine signifikante Gewichtszunahme vom CT1 bis zum Zeitpunkt der Obduktion. Wild-orx-CT1, homozygot-intakt-CT1 und homozygot-orx-CT1 Gruppen haben ein signifikant kleineres Anfangsgewicht als die wild-intakt-CT1-Gruppe.

3.2.2. Die Muskelfläche

Die Muskelflächen wurden einmal im Bereich der ersten und zweiten Schicht (bei 1,75 mm und 2,0 mm) und einmal im Bereich der dritten Schicht bei 7,5 mm dargestellt. Zur besseren Übersicht wird die Muskelfläche im CT1 und im Verlauf im CT4 gezeigt.

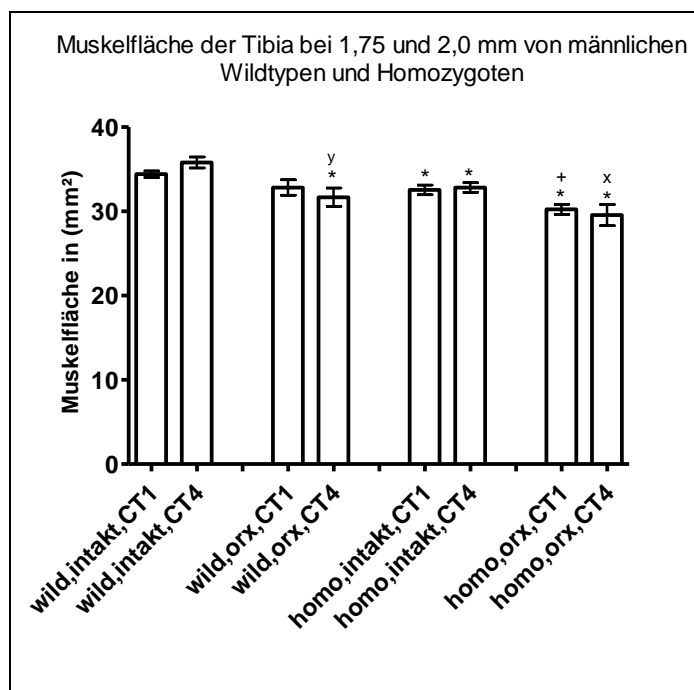


Abbildung 34: Muskelfläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 bei 1,75 und 2,0 mm. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1; x vs homo, intakt, CT4; y vs wild, intakt, CT4.

Die Muskelflächen der homozygot-Gruppen sind signifikant kleiner als die Muskelflächen der Kontrollgruppe. Im zeitlichen Verlauf verringert sich die Muskelfläche in der wild-orx-Gruppe, sodass sie ebenfalls signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe ist.

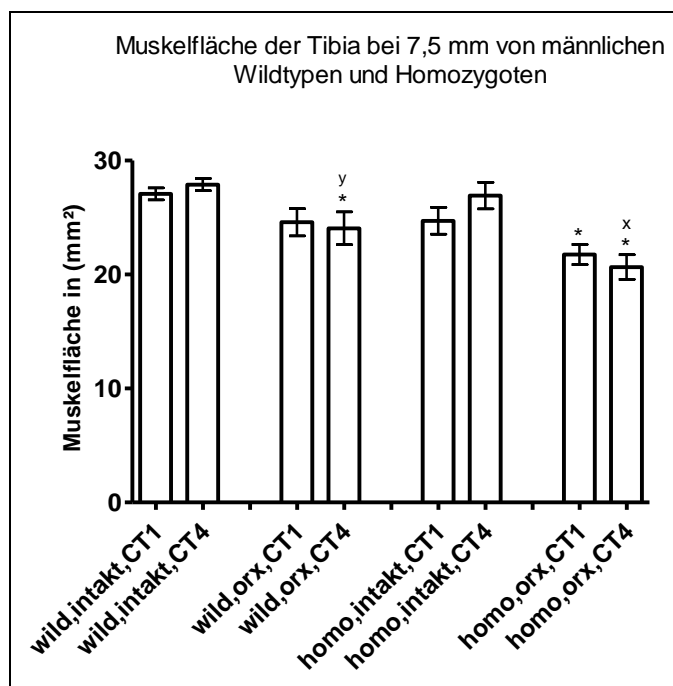


Abbildung 35: Muskelfläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 bei 7,5 mm. Legende: * vs wild, intakt, CT1; y vs wild, intakt, CT4; x vs homo, intakt, CT4.

Eine signifikante Abnahme der Muskelfläche ist in der homozygot-orx-Gruppe zu sehen.

3.2.3. Das paratibiale Fettdepot

Das paratibiale Fettdepot wird im metaphysären (bei 1,75 und 2,0 mm) und im diaphysären Bereich (bei 7,5 mm) dargestellt. Es werden zur Verlaufskontrolle die Fettdepots im CT1 und im CT4 nebeneinander gestellt.

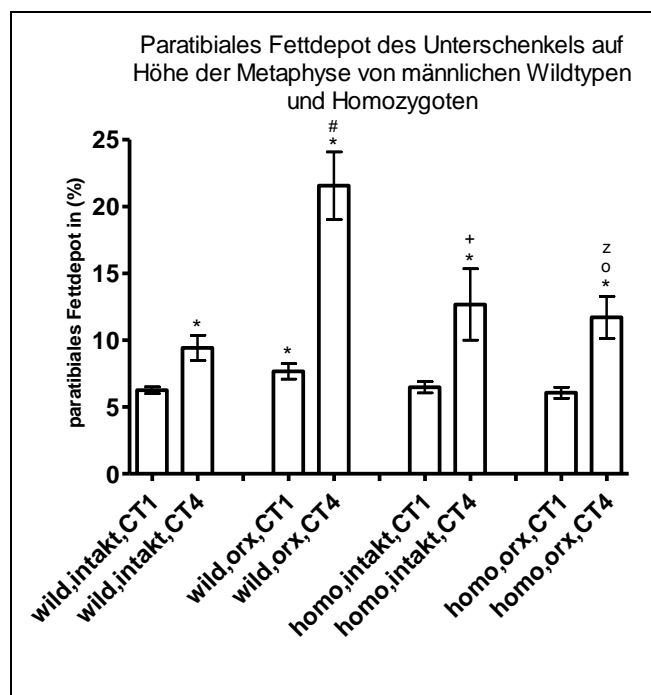


Abbildung 36: Paratibiales Fettdepot des Unterschenkels der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; # vs wild, orx, CT1; + vs homo, intakt, CT1; o vs homo, orx, CT1; z vs wild, orx, CT4.

Alle Gruppen zeigen eine signifikante Zunahme des Fettdepots im Verlauf des Versuches. Die Wild-orx-Gruppe hat schon bei CT1 ein signifikant größeres paratibiales Fettdepot als die Wild-intakt-CT1-Gruppe. Im zeitlichen Verlauf ist eine extreme Fettdepotzunahme zu sehen. Die homozygot-orx-Tiere scheinen keinen derart extremen Fettdepotzuwachs vom CT1 zum CT4 zu durchlaufen. Die homozygot-orx-CT4-Gruppe hat ein signifikant kleineres paratibiales Fettdepot als die Wild-orx-CT4-Gruppe.

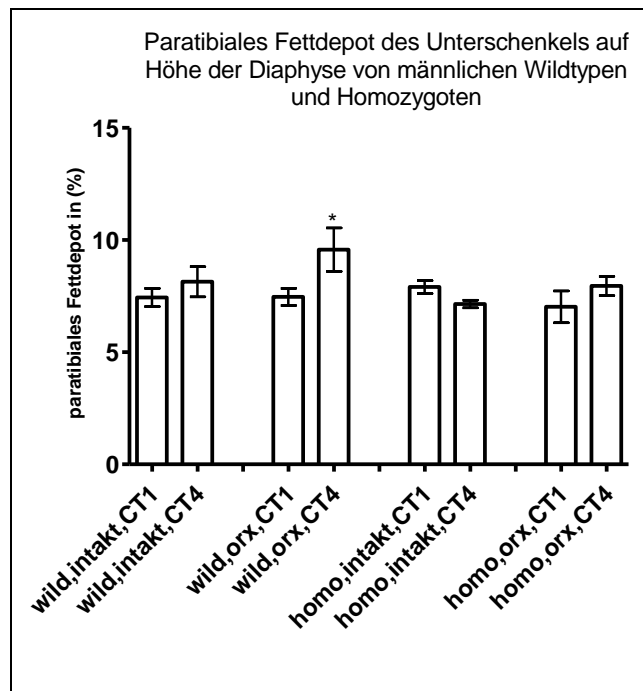


Abbildung 37: Paratibiales Fettdepot des Unterschenkels der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Diaphyse.
Legende: * vs wild, intakt, CT1.

In der Diaphyse ist eine signifikante Zunahme des paratibialen Fettdepots nur in der wild-orx-CT4-Gruppe zu sehen.

3.2.4. Die endostale Dichte (ED)

Die endostale Dichte wird in mg/cm^3 angegeben.

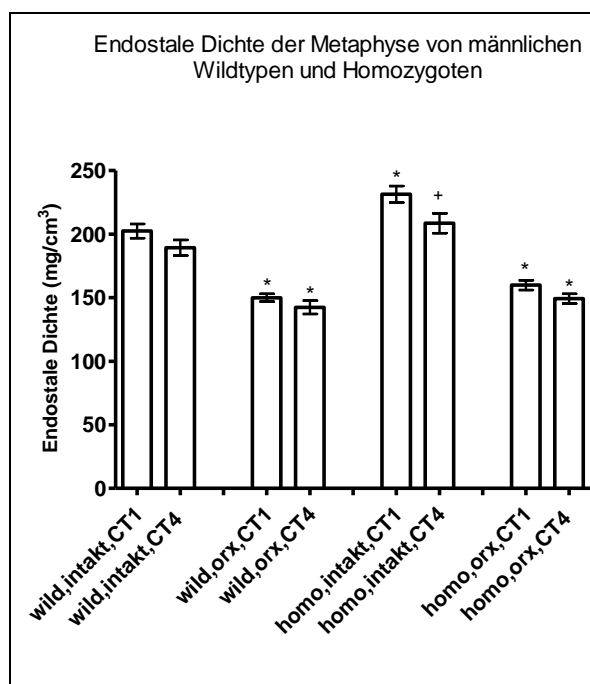


Abbildung 38: Endostale Dichte der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. **Legende:** * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1.

Die endostale Dichte der männlichen Wildtypen liegt bei ca. $200 \text{ mg}/\text{cm}^3$. Im zeitlichen Verlauf von CT1 zu CT4, dies entspricht einer Zeitspanne von etwa 12 Monaten, nimmt die endosteale Dichte physiologisch ab. Bei der Kontrollgruppe (wild, intakt) sind das ca. $10 \text{ mg}/\text{cm}^3$. In allen anderen Gruppen ist die physiologische Abnahme der endostalen Dichte zu sehen. In der homozygot-intakt-Gruppe ist auffällig, dass diese schon mit einer signifikant höheren endostealen Dichte ($230 \text{ mg}/\text{cm}^3$) startet als die wild-intakt-Gruppe.

3.2.5. Die kortikale Dichte (KD)

Die kortikale Dichte wird in mg/cm^3 angegeben.

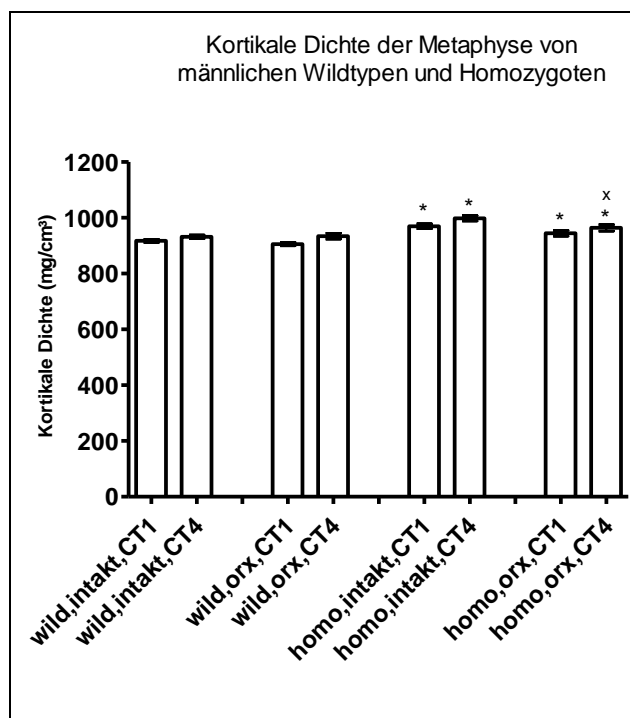


Abbildung 39: Kortikale Dichte der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; x vs homo, intakt, CT4.

Die kortikale Dichte der Referenzgruppe (wild, intakt, CT1) lag in der Metaphyse bei den männlichen Tieren im Mittel bei $917 \text{ mg}/\text{cm}^3$. Die orx Tiere hatten einen Mittelwert von $906 \text{ mg}/\text{cm}^3$. Alle vier homozygoten Gruppen hatten eine signifikant höhere kortikale Dichte als die Referenzgruppe, wobei die homozygot-intakt-CT4-Gruppe die höchste kortikale Dichte mit $998 \text{ mg}/\text{cm}^3$ aufwies. In den homozygoten Gruppen ist eine signifikante Abnahme der kortikalen Dichte zwischen der homozygot-intakt-CT4-Gruppe und der homozygot-orx-CT4-Gruppe zu sehen.

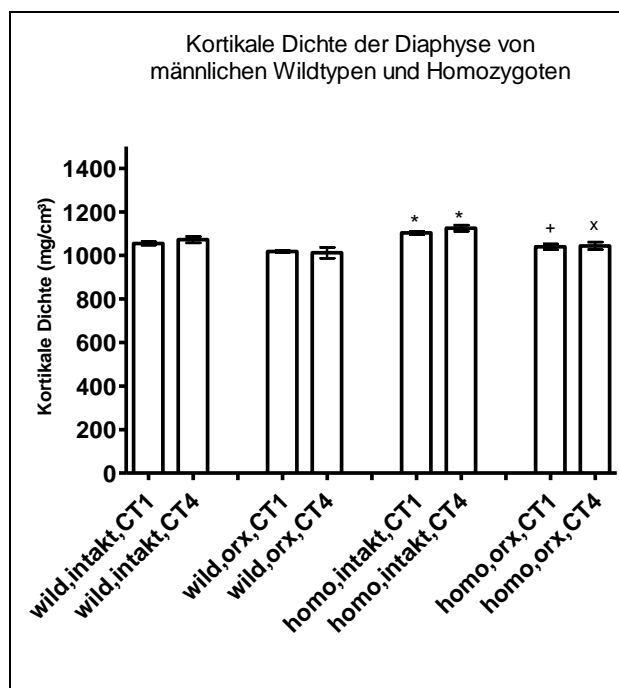


Abbildung 40: Kortikale Dichte der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1; x vs homo, intakt, CT4.

In der Diaphyse lag der Mittelwert der Referenzgruppe bei 1055 mg/cm³. Die orx Tiere hatten eine geringfügig kleinere kortikale Dichte. Eine signifikante Veränderung in der kortikalen Dichte zeigte sich lediglich bei den homozygot-intakt-Tieren. Die homozygot-orx-Gruppe hatte mit 1040 mg/cm³ im Mittel noch eine geringere kortikale Dichte als die Referenzgruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen der homozygot-intakt-Gruppe und der homozygot-orx-Gruppe ist zu erkennen.

3.2.6. Die Querschnittfläche (QF)

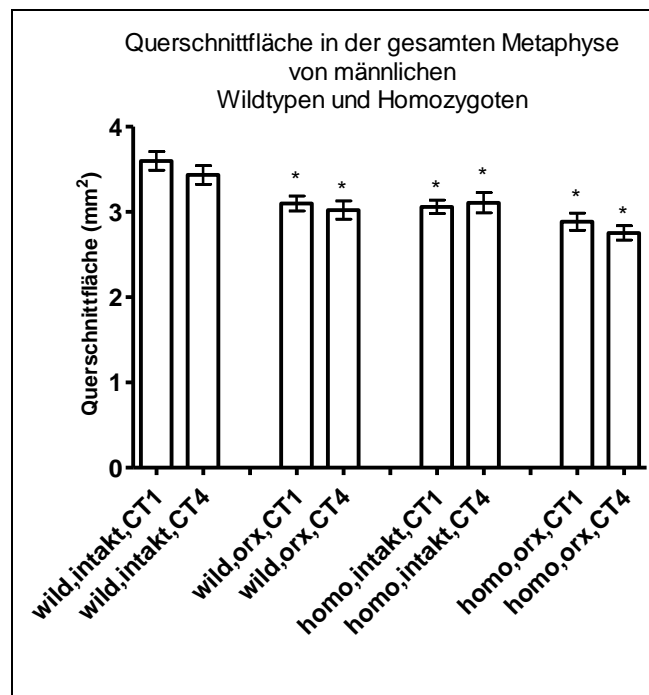


Abbildung 41: Querschnittfläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. **Legende:** * vs wild, intakt, CT1.

Die Querschnittfläche nimmt in der Metaphyse bei allen männlichen Tieren im zeitlichen Verlauf von CT1 zu CT4 ab. Eine Ausnahme bildet lediglich die homozygot-intakt-Gruppe. Dort ist eine Zunahme der Querschnittfläche vom CT1 zu CT4 zu erkennen.

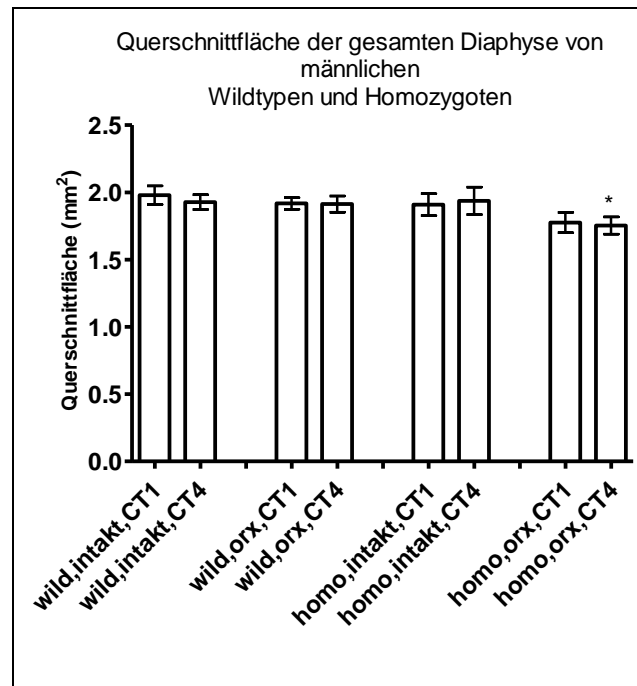


Abbildung 42: Querschnittfläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

In der Diaphyse ist nur in der homozygot-orx-CT4-Gruppe eine signifikante Abnahme der Querschnittfläche zu verzeichnen. In allen anderen Gruppen gibt es keine signifikanten Veränderungen.

3.2.7. Die kortikale Fläche (KF)

Die kortikale Fläche wird in Quadratmillimeter (mm²) angegeben.

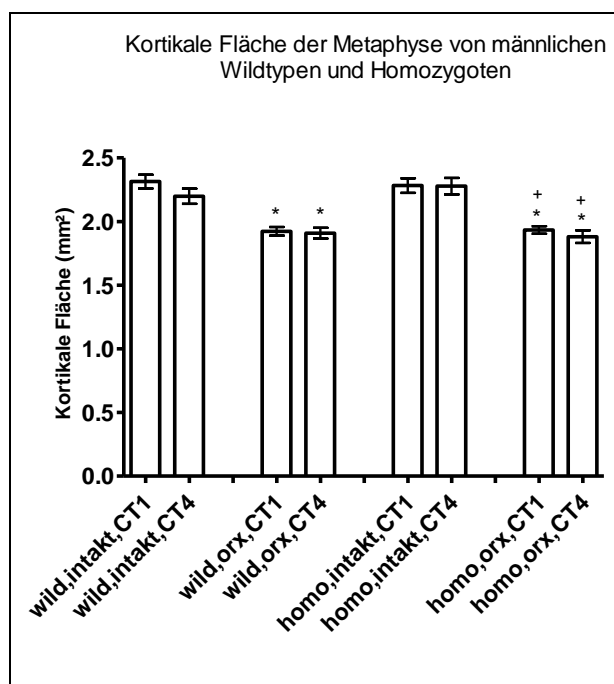


Abbildung 43: Kortikale Fläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1.

Die kortikale Fläche der männlichen wild-intakt-Gruppe in der Metaphyse nimmt im zeitlichen Verlauf ab. Auch in der wild-orx-Gruppe und in der homozygot-orx-Gruppe ist ein sehr dezenter Kortikalisschwund zu verzeichnen. In der homozygot-intakt-Gruppe verändert sich die kortikale Fläche im Verlauf nicht. Die homozygot-orx-CT1-Gruppe und die homozygot-orx-CT4-Gruppe haben eine signifikant kleinere kortikale Fläche als die homozygot-intakt-CT1-Gruppe.

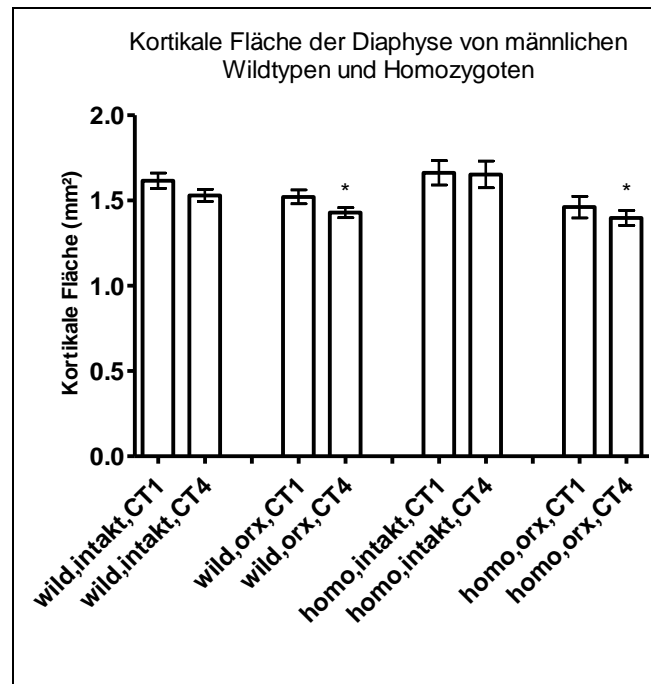


Abbildung 44: Kortikale Fläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1.

In der Diaphyse ist die Abnahme der kortikalen Fläche in der wild-intakt-Gruppe, wild-orx-Gruppe und der homozygot-orx-Gruppe deutlicher zu sehen als in der Metaphyse. Die homozygot-intakt-Gruppe zeigt keine Veränderungen.

3.2.8. Die endostale Fläche (EF)

Die endostale Fläche wird in Quadratmillimeter (mm²) angegeben.

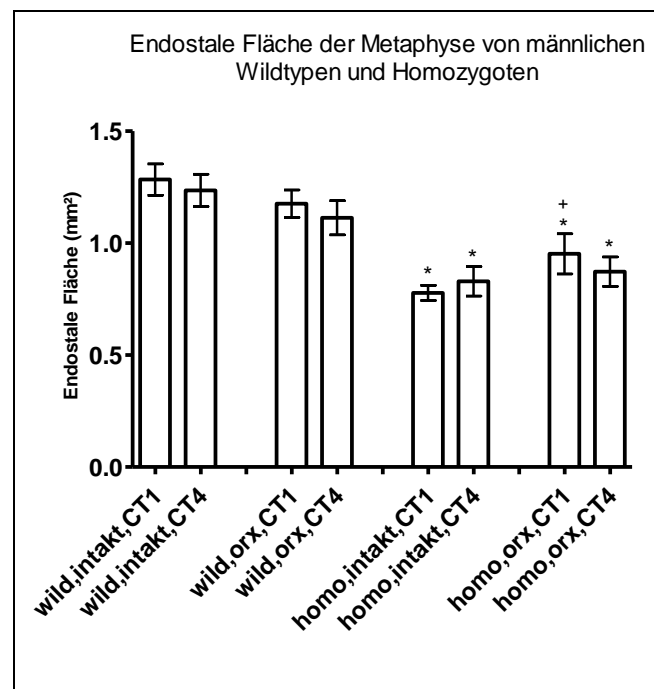


Abbildung 45: Endostale Fläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Metaphyse. **Legende:** * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1.

Die endostale Fläche ist bei den homozygot-Gruppen signifikant kleiner als bei den wild-Gruppen.

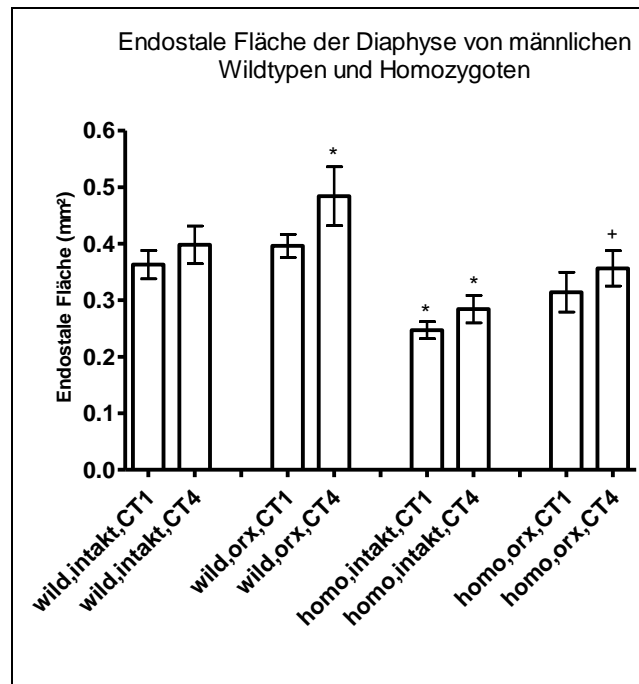


Abbildung 46: Endostale Fläche der Tibia der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere. Im zeitlichen Verlauf von CT1 (bereits 3 Monate orx) bis CT4 in der Diaphyse. Legende: * vs wild, intakt, CT1; + vs homo, intakt, CT1.

Auch in der Diaphyse ist eine signifikante Abnahme der EF in der homozygot-intakt-Gruppe zu messen. Keine signifikante Abnahme, aber dennoch eine niedrigere endostale Fläche sieht man in der homozygot-orx-Gruppe. Die einzige signifikante Zunahme der EF erkennt man in der wild-orx-CT4-Gruppe und in der homozygot-orx-CT4-Gruppe.

3.2.9. Die histologische Auswertung

Die Kortikalisdicke

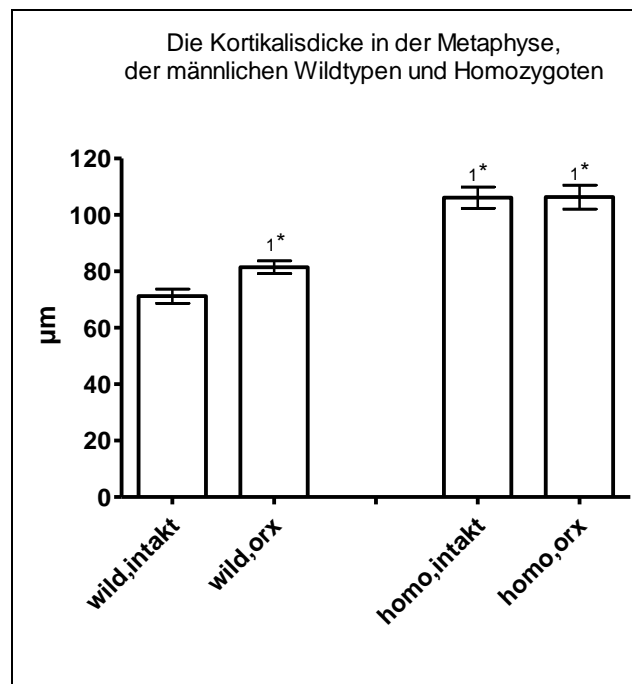


Abbildung 47: Histologische Auswertung der Kortikalisdicke der Metaphyse, der Tibia, der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt.

Eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke in der Metaphyse ist vor allem in den homozygot-Gruppen sichtbar. Ebenso ist eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke in der wild-orx-Gruppe zu sehen.

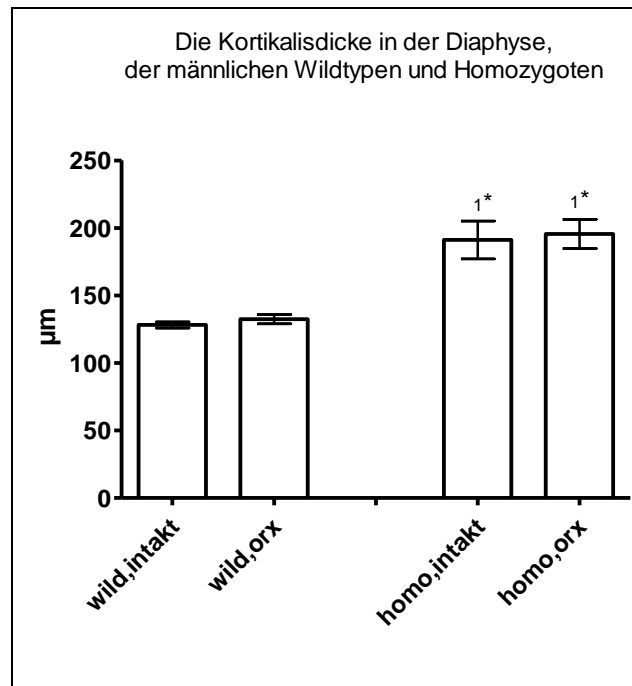


Abbildung 48: Histologische Auswertung der Kortikalisdicke der Diaphyse, der Tibia, der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt.

Auch in der Diaphyse ist die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke in beiden homozygot-Gruppen deutlich zu sehen.

Die Dicke der epiphysalen Fuge

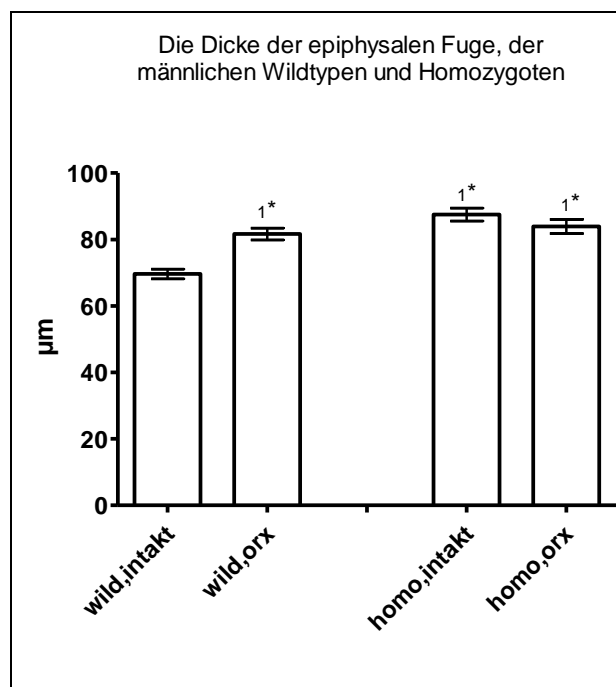


Abbildung 49: Histologische Auswertung der epiphysalen Fuge, der Tibia, der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt.

Bei der Messung der Dicke der epiphysalen Fuge zeigen alle Gruppen eine signifikante Zunahme der Epiphysendicke gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Dicke der hyalinen Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels

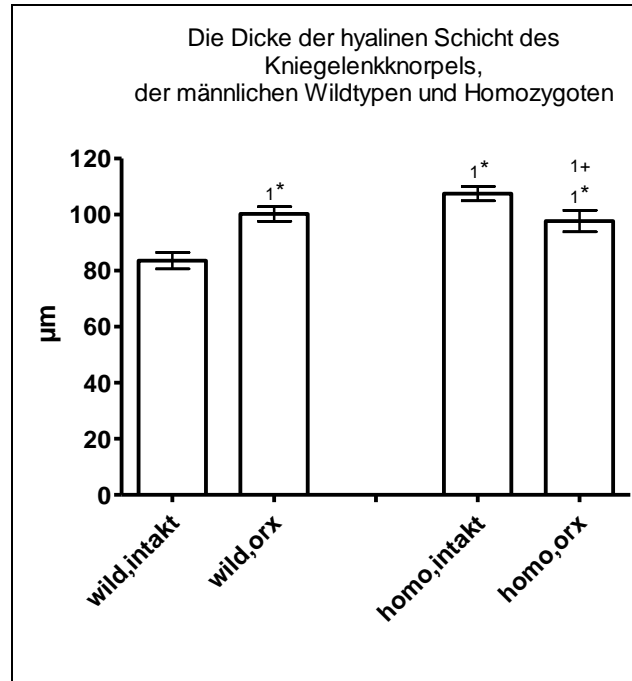


Abbildung 50: Histologische Auswertung der Dicke der hyalinen Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels, der männlichen Wildtypen und Homozygoten, intakte und orx Tiere, nach einem Jahr. Legende: 1* vs wild, intakt; 1+ vs homo, intakt.

Die hyaline Schicht des tibialen Kniegelenkknorpels ist in allen drei Gruppen signifikant höher als in der Wild-intakt-Gruppe. In der homozygot-orx-Gruppe ist die Dicke des tibialen Kniegelenkknorpels signifikant kleiner als in der homozygot-intakt-Gruppe.

3.3. Zusammenfassung relevanter Ergebnisse

3.3.1. Weibliche Tiere

Tabelle 2: Zusammenfassung relevanter Ergebnisse der weiblichen Tiere

Körpergewicht	alle Gruppen zeigen einen signifikanten Anstieg
paratibiale Fettdepot Bereich der Metaphyse	wild-intakt-CT1 zu CT4 und homo-intakt-CT1 zu CT4 signifikanter Anstieg
Muskelfläche im Bereich Metaphyse	signifikante Zunahme von homo-intakt-CT1 zu homo-intakt-CT4
Muskelfläche im Bereich Diaphyse	homo-intakt-CT1 signifikant kleiner als wild-intakt-CT1
Endostale Dichte der Metaphyse	signifikante Abnahme von wild-intakt-CT1 zu CT4 und homo-intakt-CT1 zu CT4 homo-intakt-CT1 signifikant größere endostale Dichte als wild-intakt-CT1
Kortikale Dichte der Metaphyse	homo-intakt-CT4 signifikant größere kortikale Dichte als wild-intakt-CT1
Kortikale Dichte der Diaphyse	homo-intakt-CT4 signifikant größere kortikale Dichte als wild-intakt-CT1, homo-intakt-CT4 signifikant größer als homo-intakt-CT1
Kortikale Fläche der Metaphyse	wild-intakt-CT4, homo-intakt-CT1 und CT4 signifikant kleinere kortikale Fläche als wild-intakt-CT1 homo-intakt-Gruppe keine Abnahme der kortikalen Fläche im zeitlichen Verlauf
Endostale Fläche der Metaphyse	homo-intakt-CT1 signifikant kleiner als wild-intakt-CT1
Endostale Fläche der Diaphyse	homo-intakt-CT1 signifikant kleiner als wild-intakt-CT1
Kortikalisdicke der Diaphyse	homo-intakt signifikant größere Kortikalisdicke als wild-intakt

3.3.2. Männliche Tiere

Tabelle 3: Zusammenfassung relevanter Ergebnisse der männlichen Tiere

Körpergewicht	Körpergewichte steigen signifikant vom CT1 zum CT4 an
paratibiale Fettdepot Bereich der Metaphyse	wild-intakt-CT4 und homo-intakt-CT4 signifikant größeres paratibiales Fettdepot als ihre CT1-Gruppe
Muskelfläche im Bereich Metaphyse	homo-intakt-CT1 und CT4 signifikant kleinere Muskelfläche als Wild-Gruppe
Endostale Dichte der Metaphyse	homo-intakt-CT1 signifikant größere endostale Dichte als wild-intakt-CT1 homo-intakt-CT4 signifikant kleinere endostale Dichte als homo-intakt-CT1
Kortikale Dichte der Metaphyse	homo-intakt-Gruppen signifikant größere kortikale Dichte als wild-intakt-Gruppe
Kortikale Dichte der Diaphyse	homo-intakt-Gruppen signifikant größere kortikale Dichte als wild-intakt-Gruppe
Kortikale Fläche der Metaphyse	Kortikale Fläche bleibt in Metaphyse und Diaphyse der homozygot-intakt-Gruppen nahezu unverändert
Endostale Fläche der Metaphyse	homo-intakt-Gruppen haben signifikant kleinere endostale Flächen als wild-intakt-Gruppen
Endostale Fläche der Diaphyse	homo-intakt-Gruppen haben signifikant kleinere endostale Flächen als wild-intakt-Gruppen
Kortikalisdicke der Metaphyse	homo-intakt-Gruppe hat signifikant größere Kortikalisdicke als wild-intakt-Gruppe
Kortikalisdicke der Diaphyse	homo-intakt-Gruppe hat signifikant größere Kortikalisdicke als wild-intakt-Gruppe

4. Diskussion

Die Aufgabe dieser Studie bestand darin, anhand einer CHD9-deletierten-Mauslinie phänotypische Merkmale mittels qCT und Histologie festzulegen. Um eine Analyse der Knochenparameter durchzuführen, eignet sich ein Nagetier, wie bspw. eine Maus, besonders gut, da die Knochenentwicklung des Nagers ein fortlaufender Prozess mit Produktion und Resorption der Knochensubstanz ist (*Seidlová-Wuttke et al. 2008*). In Zusammenarbeit mit der Abteilung Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen standen uns diese genveränderten Mäuse für diese Phänotypstudie zur Verfügung. Am Ende dieser Studie zeigte ein Großteil der homozygoten Tiere einen charakteristischen „Buckel“. Dieses Merkmal ist ein Ausdruck der knochenspezifischen Veränderung bei einer Deletion im CHD9-Gen. Der „Buckel“ spiegelt einen veränderten Knochenmetabolismus wider, welcher schon bei den intakten Tieren eintritt. Bei einer Ovariectomie oder Orchiectomie werden Knochenphänomene aufgrund des zusätzlich veränderten Hormonhaushaltes und den damit verbundenden spezifischen Knochenveränderungen häufig deutlicher sichtbar.

Die Genmutation befand sich im CHD9-Gen (‘chromodomain helicase DNA binding gene’). Durch komplexe Splicevorgänge wurde ein vorzeitiges STOPP-Codon eingebaut. Dieser Einbau führte zum Abbruch der Transkriptionsvorgänge. Nukleotidveränderungen in einem Gen können zu schwerwiegenden und unterschiedlichen Phänotypen führen, weil ein abnormes Protein die Funktion des interagierenden Partners beeinflussen und zerstören kann (*Batsukh et al. 2010*). Die Manipulation am Mausgen erfolgte durch ‚gene trap‘. Durch sich ständig weiterentwickelnde Wissenschaft und Technik wurde zu dieser Zeit die Methode des ‚gene trapings‘ genutzt und nicht die für solche Tiermodelle oft verwendete Methode der knock-out-Maus. Bei den knock-out-Mäusen findet die Veränderung auf Genebene statt. Dabei wird ein Gen direkt entfernt. Daraufhin entstehen in den folgenden Generationen Mäuse ohne das entsprechende Gen, sogenannte knock-out-Mäuse. In diesem Tiermodell wurde allerdings die Variante des ‚gene trapings‘ gewählt. (Siehe Kapitel 1.4)

Die Auswertung der Ergebnisse und die Beobachtung der Tiere zeigten, dass sich ein skelettaler Phänotyp bei den Mäusen mit einer CHD9-Genmutation entwickelt hat.

4.1. Die Körpergewichte, das paratibiale Fettdepot und die Muskelflächen

Bei der Gewichtsentwicklung kann man zusammenfassend sagen, dass die männlichen Tiere keine derart große Gewichtszunahme im Versuch vorzeigen wie die weiblichen Tiere. Bei den

männlichen Tieren sind zum Zeitpunkt der Obduktion stets die orx Tiere etwas leichter als die intakten Tiere. Die männlichen homozygoten Tiere haben schon zu Beginn ein minimal leichteres Körpergewicht als die Wildtypen.

Die weiblichen Tiere reagieren mit der Veränderung des Körpergewichts anders auf die Gonadektomie als die männlichen Tiere. Die weiblichen Mäuse zeigen eine enorme Gewichtszunahme nach Ovariectomie. Das durchschnittliche Obduktionsgewicht in der weiblichen wild-intakt-Gruppe lag bei 36,32 g, in der weiblichen wild-ovx-Gruppe bei 41,99 g. Die homozygoten Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf.

Dass durch die Gonadektomie, eine starke Gewichtsdybalance, vor allem bei den weiblichen Tieren auftritt, haben schon frühere Studien gezeigt. Der Östrogeneffekt verhindert die Entwicklung einer Obesitas bei Nagern, wie die Studie von *Dubuc 1985* und *Seidlová-Wuttke et al. 2008* gezeigt hat. Dass die Gewichtszunahme in dem hier durchgeführten Versuch allerdings überproportional stattfindet, ist vermutlich auf die CHD9-Genmutation zurückzuführen, was bisher jedoch noch nicht beschrieben wurde. Das CHD9 und das Protein CReMM, welches ein Bestandteil der CHD-Familie und somit auch des CHD9 ist, wird in mesenchymalen Progenitoren und Stammzellen exprimiert und dient als Regulator der Transkription. Das CReMM kann sich wahlweise mit gewebspezifischen Promotoren verbinden. Die „neutralen“ mesenchymalen Stammzellen können sich in verschiedene Reihen differenzieren. Dazu gehören die Zellreihen der Knorpel-, Knochen-, Muskel- und Fettzellen (*Shur et al. 2006 a*). Durch die Regulation der Transkription kann die Zellreihe, in welche sich die MSC differenzieren sollen, gelenkt werden.

Um das Fettverteilungsmuster besser darstellen zu können, wurde prozentual das paratibiale Fettdepot des Unterschenkels im metaphysären (bei 1,75 und 2,0 mm) und im diaphysären (bei 7,5 mm) Bereich bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Fettdepot auch bei den männlichen Tieren stark ansteigt. Vor allem in der männlichen wild-orx-CT4-Gruppe war ein signifikanter Anstieg des Fettdepots zu sehen (siehe Abb. 36). Sie verdreifachten ihren Fettanteil vom 1. bis zum 4. CT. In der Diaphyse, die anatomisch gesehen eine viel kleinere Fläche als die Metaphyse ist und demzufolge auch weniger Platz für ein Fettdepot liefert, ergab sich ebenfalls ein signifikanter Wert in der wild-orx-CT4-Gruppe (siehe Abb. 37). Die homozygoten männlichen Tiere haben im Alter von 12 Monaten alle einen signifikant erhöhten Fettanteil in der Metaphyse.

Bei den weiblichen Tieren, deren Körpergewicht eine deutliche Zunahme des Fettanteils vermuten ließe, zeigten die Ergebnisse mit denen der männlichen Tiere vergleichbare Werte.

Ebenfalls eine signifikante Zunahme des paratibialen Fettdepots auf Höhe der Metaphyse zeigte sich in der weiblichen wild-ovx-CT4-Gruppe (siehe Abb. 17). Aber auch die homozygot-ovx-CT4-Gruppe hatte einen ähnlich hohen Wert. Dieser enorme Anstieg des paratibialen Fettdepots spiegelt sich nicht bei den männlichen Mäusen wider. Im diaphysären Bereich der weiblichen Tiere gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 18).

Anhand der Körpergewichte wissen wir, dass die weiblichen ovx Tiere am schwersten und die männlichen orx Tiere stets leichter als ihre intakten Gruppen waren. Dennoch hat die Fettanalyse ergeben, dass die männlichen orx Tiere ebenso am paratibialen Fettdepot zunehmen wie die weiblichen Mäuse. Warum sind sie dann trotzdem leichter? Um das herauszufinden wurden die Muskelflächen in beiden Ebenen, Metaphyse und Diaphyse, in Quadratmillimeter berechnet. Die männlichen orx Tiere haben in beiden Ebenen eine kleinere Muskelfläche als die intakten Tiere. Den orchietomierten Tieren fehlt das Testosteron. Androgene spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung von Muskelmasse und der Intaktheit zum skelettalen Apparat. Mit steigendem Testosteronspiegel steigt auch die Muskelmasse. Durch den zu geringen Testosteronspiegel kann das Wachstum der Muskelmasse bei männlichen Tieren reduziert sein (*Lang 2011*). Die Orchietomie verursacht bei den Männchen einen Muskelflächenverlust.

Während bei den weiblichen Tieren die Muskelfläche in den Wildtypgruppen fast unverändert bleibt, steigt die Muskelfläche bei den beiden homozygoten Gruppen zum 4. CT signifikant an. Man kann somit sagen, dass durch den Verlust an anabol wirkendem Testosteron sich die Gonadektomie bei den männlichen Tieren hauptsächlich auf die Muskelmasse auswirkt, während sie bei den weiblichen Tieren hauptsächlich Auswirkungen auf das Körperfett hat. Der prozentuale Fettanteil ist bei beiden Geschlechtern ähnlich. Lediglich durch die unterschiedliche Ausprägung auf die Muskelfläche zeigen die Tiere die charakteristische Körpergewichtsverteilung.

4.2. Die ossären Flächen

Die ossären Flächen beinhalten die Querschnittfläche (QF), die kortikale Fläche (KF) und die endostale Fläche (EF) und dienen im Versuch der Einschätzung der Aufteilung der Knochenflächen. In der Abb. 21 ist eine schematische Zeichnung der einzelnen Flächen abgebildet. Die eindrucksvollsten Ergebnisse zeigten sich in der EF. Diese Fläche beschreibt den inneren Teil (Markkanal) des Querschnittes der Tibia. Vor dieser Studie wurden verschiedene Vermutungen angestellt inwieweit sich die genetische Veränderung des CHD9-Gens im Knochen

zeigen kann. Unter anderem vermuteten wir aufgrund der früheren Untersuchungen von Priv. Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke, dass sich die Substantia compacta durch die gesteigerte Osteoblastenfunktion und verminderte Osteoklastenfunktion vermehren könnte und sich damit der Markkanal verengen würde. Die Ergebnisse der EF in 3.1.8. und 3.2.8. bestätigen unsere Vermutungen. Mit dem Hintergrund der genetischen Veränderung und der damit verbundenen Stammzellendifferenzierung lässt sich dieser Zusammenhang erklären. Das CReMM ist ein neues mit der CHD-Familie verwandtes Protein mit ATPase-Aktivität. Es bindet an ATP-reichen Regionen von verschiedenen Promotoren. Mit dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (TGF β) und 17- β -Estradiol wird in einer frühen Phase der Chondroblasten- und Osteoblastendifferenzierung eingegriffen. TGF β stimuliert die Differenzierung zu Chondroblasten und Osteoblasten und inhibiert außerdem die Entwicklung der Myozyten und Adipozyten. Das 17- β -Estradiol inhibiert die Apoptose von Osteoblasten und stimuliert Transkriptionsfaktoren der Osteoblasten. Die Interaktion zwischen CReMM und den ATP-reichen Promotoren scheint ein dynamischer Prozess in Abhängigkeit der Regulation von TGF β und 17- β -Estradiol zu sein. Des Weiteren ist die Ausbildung von CReMM in osteogenen Stammzellen etwa 2,5-mal höher als in nichtosteogenen Stammzellen (*Shur et al. 2006 b*).

In der KF (3.1.7. und 3.2.7.), welche die Querschnittfläche der Tibia ohne Markraum beschreibt, ist auffällig, dass bei den männlichen homozygot-intakt-Gruppen vom CT1 zum CT4 kaum eine Abnahme der KF zu messen ist. Die weiblichen Tiere reagieren etwas anders als die männlichen Tiere. In der Metaphyse der weiblichen Tiere ist in allen Gruppen (Abb. 25) eine signifikante Abnahme der KF zu sehen. Der signifikante Unterschied zwischen der wild-intakt-CT1-Gruppe zur wild-intakt-CT4-Gruppe ist deutlich zu sehen. Auffällig ist die unveränderte KF in den homozygoten Gruppen. Man würde theoretisch mit einer physiologischen Abnahme rechnen, wie es in den wild-Gruppen deutlich zu sehen ist. Doch aufgrund der Homozygotie der Mäuse und der damit verbundenen genetischen Veränderung in den Zelltypen kommt es im zeitlichen Verlauf nicht zur Kortikalisabnahme. Die Osteoblasten werden vermehrt aktiviert, wodurch die KF der homozygoten Gruppen relativ unverändert bleibt und es nicht zum Abbau von Knochenmatrix kommt.

Die EF der homozygoten Tiere ist in allen Gruppen signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Die osteogenetische Proliferation und Differenzierung ist von lokalen und systemischen Faktoren abhängig. Hormone, wie bspw. Estrogene und Glukokortikoide, spielen in der Regulation der osteogenetischen Funktion eine entscheidende Rolle. Zusammen mit ‚Chromatinremodeler‘ (z.B. CHD9) bilden sie Komplexe, die in die Transkription und somit

in die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen eingreifen können (*Marom et al. 2006*).

In einer anderen Arbeit, in der Mäuse homozygot für das c-Fos-Protein waren (*Roschger et al. 2004*), bestand in der homozygoten Gruppe keine Osteoklastendifferenzierung und die Tiere entwickelten eine Osteopetrose, da bei gleichzeitiger Vermehrung der reifen Osteoblasten die endostale Resorption des Knochenmaterials fehlt. Dies führte zu einer Dysbalance im Knochenauf- und -abbau und es entwickelten sich Zeichen einer Osteosklerose. Als Osteosklerose wird die Verhärtung der Knochenmasse bezeichnet. Die Osteosklerose kann lokal oder auch generalisiert auftreten. Dabei nimmt die Belastbarkeit der Knochen ab. Wenn die Osteosklerose generalisiert auftritt, bezeichnet man dies als Osteopetrose oder auch als Marmor-Knochenkrankheit (*Kornak et al. 2003*). Das Ungleichgewicht zwischen der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität im Rahmen des ‚Remodeling‘ führt entweder zu einer Akkumulation von Knochenmaterial (Osteosklerose/Osteopetrose) oder zu einem Knochenverlust (Osteoporose) (*Lazner et al. 1999*). Skelette mit Osteopetrose haben verkürzte Röhrenknochen, desorganisierte Wachstumsfugen und eine Verstopfung der Markraumkanäle mit Knochen- und Knorpelmatrix. Ihnen fehlen die Osteoklastendifferenzierung und das damit verbundene Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenresorption (*Roschger et al. 2004*).

Die Mäuse in dieser Arbeit zeigten ebenfalls typische Merkmale der Osteopetrose. Die Längen der Röhrenknochen wurden nicht gemessen, aber die Auswertung und mikroskopische Betrachtung der Wachstumsfuge zeigten ein desorganisiertes Bild (Abb. 60 und 62). Die Verstopfung der Markraumkanäle wird durch die Flächenbestimmung der endostalen Fläche (EF) verdeutlicht. Die EF ist in der Metaphyse der homozygoten Gruppen signifikant kleiner. In der Diaphyse der männlichen Tiere zeigten die homozygot-intakt-Gruppen signifikant kleinere EF als die Wildtypen.

Im Vergleich der Ergebnisse der EF und der kortikalen Dichte (KD) in den Homozygotengruppen wird der Zusammenhang zwischen CHD9-Veränderung und Osteoklasten- und -blastenbeteiligung deutlich. Denn durch die Mutation im CHD9-Gen sind die Transkription und die damit verbundene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen gestört. Der genaue Fehler, welcher in der Transkription durch die Genmutation im CHD9-Gen entsteht, kann hier nicht beschrieben werden, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass sich vor allem in der Osteoblastendifferenzierung ein Ungleichgewicht einstellt.

4.3. Die Dichten

In den ersten Versuchen (2008) durch Frau Priv. Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke fiel eine erhöhte endostale Dichte (ED) (Spongiosadichte) der untersuchten Tiere auf. Dies stellt sich als ein charakteristisches Merkmal dieser Mauslinie dar. Die endostalen Dichten der einzelnen Gruppen zeigten auch in dieser Studie erhöhte Werte. Die männlichen wild-intakt-Gruppen hatten eine anfängliche endostale Dichte von ca. 200 mg/cm³ in der Metaphyse. Die homozygot-intakt-Gruppen starteten mit einer endostalen Dichte von ca. 230 mg/cm³. Dies zeigt schon, dass die homozygoten Tiere von Anfang an eine deutlich höhere endostale Dichte haben als die Kontrolltiere. Die CHD9-Genmutation beeinflusst die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, welche sich in Adipozyten, Osteozyten, Chondrozyten und Myozyten differenzieren können (*Liu et al. 2009*). Der hohe Ausgangswert der endostalen Dichte lässt vermuten, dass die homozygoten Tiere schon von Beginn an eine höhere Zahl an Osteozyten aufweisen. Im Laufe der Zeit (12 Monate) ist es physiologisch, dass die end-osteale Dichte im Rahmen des Alterungsprozesses abnimmt. Ebenso kann eine Dysbalance der Steroidhormone zu Erkrankungen der Knochen und zu Osteoporose führen (*Marom et al. 2006*).

Bei den männlichen wild-Gruppen und homozygot-Gruppen in der Metaphyse ist diese physiologische Abnahme der ED ebenfalls signifikant (siehe Abb. 38). Allerdings ist der Wert der endostalen Dichte bei den männlichen homozygot-intakt-Gruppen am Ende des Versuchs immer noch über 200 mg/cm³. Mit diesem Wert starteten die wild-intakt-Gruppen zum Zeitpunkt CT1 (mit ca. fünf Monaten). Die weiblichen wild- und homozygot-Gruppen zeigten ein ähnliches Bild der erhöhten ED-Werte in der Metaphyse (siehe Abb. 19). Die weiblichen wild-Gruppen zeigten einen Anfangswert von 183 mg/cm³. Die weiblichen homozygot-intakt-Gruppen haben eine um 23,5 mg/cm³ größere ED. Die homozygoten Männchen zeigten eine um 28,9 mg/cm³ größere ED als ihre Kontrollgruppe.

Bei den männlichen Tieren zeigten die homozygot-Gruppen signifikant höhere Werte der kortikalen Dichte als ihre Kontrollgruppe. Wenn man bedenkt, dass per Definition die Kortikalis bei einer Dichte von über 710 mg/cm³ beginnt, sind die homozygoten Tiere mit durchschnittlich 968 mg/cm³ sehr hoch angesiedelt (*Rauch und Schoenau 2008*). In der Diaphyse liegen die signifikanten Werte der homozygot-intakt-Gruppen bei mehr als 1100 cm/mg³. Auch bei den weiblichen Tieren sind signifikante Unterschiede zu sehen, allerdings nicht so deutlich, wie bei den Männchen. Die weiblichen Tiere haben im Mittel in allen Gruppen eine höhere KD als die männlichen Tiere.

Eine Genexpression ist geprägt von einer Kaskade voneinander abhängiger Faktoren, nur so kann sie fehlerfrei ablaufen (*Young et al. 2005*). Im CHD9-Gen wird durch die Vektoreinbringung und den vorzeitigen Transkriptionsstopp ebenfalls eine Kaskade voneinander abhängiger Faktoren unterbrochen und mündet in komplexe Veränderung. Das CHD9-Gen hat Einfluss auf die Regulation und Reifung der Osteozyten. Des Weiteren bindet CHD an gewebsspezifischen Promotoren auf Genen, die eine Rolle in der Funktion der osteogenetischen Zellen spielen (*Shur et al. 2006 a*). Die Koordination vom Chromatinumbau ist eine wichtige Voraussetzung für den Beginn der Knochenentwicklung (*Young et al. 2005*). Da auch bei dem hier besprochenen CHD9-Genedefekt das „Aufwickeln“ der DNA bzw. Chromatin gestört ist, kann man diese Aussage genauso auf das vorliegende Beispiel beziehen. Dies können mögliche Gründe für die kortikale Dichtevermehrung bei den homozygoten Mäusen sein. Ein weiterer Grund besteht darin, dass die Genveränderung mittels ‚gene trapping‘ anstelle des oft verwendeten Prinzips der knock-out-Maus durchgeführt wurde.

4.4. Die Knochenhistologie

Am Ende der Studie wurden die Tiere dekapitiert. Die Tibiae der Mäuse wurden aufgearbeitet und mikroskopisch vermessen. In der Auswertung der Tibiaknochen ist bei den Männchen in der Metaphyse eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke in der homozygot-intakt-Gruppe und homozygot-orx-Gruppe gemessen worden (Abb. 47). Ebenso gibt es in der Diaphyse signifikante Unterschiede zwischen den wild-Gruppen und den homozygot-Gruppen. Die weibliche homozygot-intakt-Gruppe zeigt einen signifikanten Anstieg der Kortikalisdicke im Bereich der Diaphyse (siehe Abb. 30). Die homozygot-ovx-Gruppe zeigt keinen signifikanten Anstieg, sondern einen Abfall der Diaphysendicke. In der Metaphyse der weiblichen Tiere gab es in der homozygot-ovx-Gruppe einen signifikanten Abfall der Diaphysendicke. In der Diaphyse, wo sich der Schluss des Markkanals am ehesten abzeichnet, ist eine deutlich verbreiterte Kortikalisdicke in der weiblichen homozygot-intakt-Gruppe zu messen. Es ist zu vermuten, dass das Gleichgewicht zwischen den Osteoklasten und Osteoblasten gestört ist. Die Knochenbildung ist bei den homozygoten Tieren vermehrt. Das CReMM ist in den endochondralen Ossifikationen nachweisbar. Der Nachweis im ausgereiften Knorpel und Knochen gelingt allerdings nicht mehr (*Shur et al. 2006 a*). Die ovx Tiere zeigen eine deutliche Abnahme der Kortikalisdicke, welche mit der mangelnden Östrogenexposition der ovx Tiere verbunden ist. In den ovx Tieren steigt die Aktivität von Osteoklast und –blast. Allerdings ist die Osteoklastenaktivität vermehrt, was dazu führt, dass mehr Knochen resorbiert statt repariert wird und dies schließlich zur Osteoporose führt (*Riggs et al. 2002; Seidlová-*

Wuttke et al. 2008). Über postmenopausalen Östrogenmangel wurde in vielen Arbeiten bereits geforscht. In dieser Arbeit soll dies nicht beschrieben werden.

Des Weiteren wurden in der histologischen Auswertung die Dicken der Epiphysenfuge oder auch Wachstumsfuge sowie die hyaline Knorpelschicht des tibialen Anteils des Kniegelenks gemessen. Bei diesen beiden Parametern fiel auf, wie unterschiedlich männliche und weibliche Tiere auf die CHD9-Genmutation reagieren. Vor allem in den mikroskopischen Bildern der Epiphysenfugen bot sich ein Bild der unstrukturierten Zellorganisation bei den homozygot-Gruppen (Abb. 60 und 62). Normalerweise ist die Epiphysenfuge durch ihre säulenförmig angeordneten Zellen charakterisiert. In unserem Versuch mit den CHD9-genveränderten Mäusen konnte man nur schwer eine Säulenform der hyalinen Knorpelzellen erkennen. Dies ist ein weiteres Merkmal der CHD9-Genveränderung, denn die klare Aufteilung der mesenchymalen Stammzellen ist gestört. Damit die Differenzierung der Zellen in die verschiedenen Zelltypen geregelt und geordnet ablaufen kann, sind auch andere molekulare Prozesse notwendig (Young et al. 2005). Es wird einmal mehr deutlich, wie wichtig das exakte Zusammenspiel von allen Regulatoren ist, damit das richtige Protein entstehen kann.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit soll den Zusammenhang zwischen der CHD9-Gendeletion bei Mäusen und dem Einfluss auf drei Organe (Knochen, Muskulatur und Fettgewebe) mit besonderem Focus auf die ossären Effekte darstellen. Dabei wurden anfangs 120 Mäuse in 12 verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden über 12 Monate beobachtet. Es wurde jeden Monat das Körpergewicht der Tiere bestimmt und die Tibiae mittels qCT vermessen bzw. gescannt und die dabei entstandenen Daten erfasst. Am Ende des Versuches wurden die Tiere dekapitiert und die Tibiae für die histologische Auswertung gewonnen. Die Erarbeitung der Unterschiede zwischen den intakten Wildtypen und den intakten Homozygoten stellte den Hauptteil dieser Arbeit dar. Deswegen wurde im Anschluss an den Ergebnisteil die wichtigsten signifikanten Unterschiede in diesen Gruppen noch einmal zusammenfassend dargestellt (Tabelle 2 und 3). Die Tibia ist östrogenreguliert, durch das Fehlen der Sexualhormone durch Kastration der Tiere, kommt es unter dem Östrogen- und Androgenmangel zu Nebeneffekten (Osteoporose, Fettzunahme), diese kastrationsbedingten Ergebnisse waren bei ovx/orx Wildtypen und ovx/orx Homozygoten qualitativ gleich. Die Ergebnisse der Knochen zeigten eine deutliche Dysbalance in ihrem Zusammenspiel von Knochenreperatur und Knochenresorption, was zum Schluss zu einer überschießenden Reaktion der Osteozytentätigkeit führt und das wiederum zu einer Verdickung der kortikalen Knochenschicht in der Tibia. Die endostalen Dichten (Abb. 19 und 38) zeigen in den Metaphysen die signifikanten Unterschiede der homozygot-Gruppen. Ebenso die kortikale Dichte (Abb. 20 und 21, 39 und 40), wo die signifikanten Unterschiede oft nur in den homozygot-intakt-Gruppen zu sehen sind. Man kann vermuten, dass sich diese Reaktionen auch in anderen Bereichen des Skelettes abspielen. Einige Tiere in dieser Studie bildeten gegen Ende des Versuches einen charakteristischen „Buckel“ aus. In der Abb. 5 ist ein Röntgenbild einer 18 Monate alten männlichen homozygot-orx-Maus dargestellt.

Diese Tatsache könnte darauf hinweisen, dass die Wirbelsäule ebenfalls eine Veränderung während des Alterungsprozesses durchläuft und man diese Veränderung durch die CHD9-Genmutation erklären kann. Wenn die kortikale Dichte zunimmt und es zur Knochenvermehrung kommt, dehnt sich der Knochen aus und fordert mehr Raum. Um die Relation zu beschreiben, wie viel Fläche die kortikale Knochenschicht im Verhältnis zum Markkanal beansprucht, wurden im Ergebnisteil verschiedene Flächen aufgezeigt. Die endostale Fläche (Abb. 27 und 28, 45 und 46) zeigt die deutlichste Veränderung. Man sieht die signifikante

Abnahme des Markkanalraumes. Des Weiteren traten im Fettgewebe ebenfalls starke Veränderungen auf. Einige der Mäuse hatten typische Zeichen einer Obesitas. Die Datenerfassung der Körpergewichte (Abb. 14 und 33) zeigt das starke „Übergewicht“ der Tiere. Sowohl Männchen als auch Weibchen waren von der Fettleibigkeit betroffen. Diese prominenten Merkmale zeigen, dass die CHD9-Veränderungen durchaus schwerwiegende Folgen auch für Patienten haben könnten.

Die hier vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass es durch ‚gene trapping‘ am CHD9-Gen zu phänotypischen und knochenspezifischen Auswirkungen kommt. Ein skelettaler Phänotyp mit dem charakteristischen Merkmal des „Buckels“ (Abb. 5), im Sinne einer Wirbelsäulenkyphose, konnte bei den homozygoten Mäusen identifiziert werden.

6. Methodischer Anhang

Tabelle 4: Erhaltungsfutterbestandteile in % (sniff®, V 1534-000)

Rohfett	3,3	Vitamin A, D3, E
Rohfaser	4,9	Cu ³⁺ , Cu(H)Sulfat, Pentahydrat
Rohasche	6,4	Genetisch veränderter Mais und Soja
Kalzium	1,0	Kartoffelproteine
Rohprotein	19	Zuckerrüben
Phosphor	0,7	
Natrium	0,24	

6.1. Herstellung der Knochenpräparate

Nach der Obduktion der Tiere wurden Tibiae, Fett und Blut für weitere Untersuchungen gewonnen. Die linke Tibia der Mäuse wurde frei präpariert und im Einbettkörbchen über 36 Stunden in 4 % neutraler gepufferter Formalinlösung fixiert.

Bei Raumtemperatur und in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Gewebe dehydriert, denn im mangelhaft entwässerten Gewebe entstehen sogenannte Lunkerstellen, die aus weißem Perlpolymerisat bestehen und das Schneiden der Präparate sowie die Schnittqualität negativ beeinträchtigen können. Als Intermedium wurde Xylol verwendet.

Die Immersion (Präinfiltration 1-3, Infiltration) erfolgte in drei Stufen.

Tabelle 5: Stufenschema der Knocheneinbettung

Stufe	Lösung	Konzentration	Zeit
Entwässerung 1	Ethanol	70 %	24 h
Entwässerung 2	Ethanol	80 %	24 h
Entwässerung 3	Ethanol	96 %	24 h
Entwässerung 4	Ethanol	96 %	24 h
Entwässerung 5	Ethanol	abs.	24 h
Entwässerung 6	Ethanol	abs.	24 h
Entwässerung 7	Ethanol	abs.	24 h
Intermedium 1	Xylol		24 h
Intermedium 2	Xylol		24 h
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit 9100 NEU (Basislsg. Stab.)	50 % / 50 %	24 h
Präinfiltration 2	Basis (entstab.)		Kühlschrank 24 h
Präinfiltration 3	Technovit 9100 NEU (entstab.) + Härter 1		Kühlschrank 24 h
Infiltration	Technovit 9100 NEU (entstab.) + Härter 1 + PMMA-Pulver		Kühlschrank 2-3 d

Verarbeitung der Polymerisate

Die Herstellung von Hartschnittpräparaten mit Hartschnittmikrotomen geschieht in der Regel mit Rotations-Tischmikrotomen. Dabei wurden 16 cm Hartmetallmesser mit D-Schliff und eine 30%ige Ethanol-Schneideflüssigkeit zum Schneiden der Technovit 9100 NEU Blöcke verwendet.

Die fertig geschnittenen Präparate wurden auf „Superfrost plus ultra“ Objektträger aufgezogen und mit einer 50%igen Ethanol-Strecklösung gestreckt. Anschließend wurde eine PVC-Folie (Kisolfolie) als Abdeckung des Präparates aufgelegt.

Die Objektträger wurden gestapelt und unter Druck (Schnittpresse) über Nacht bei 50° C getrocknet.

Um die Schnitte zu entplasten, wurde erneut eine Reihe von Flüssigkeiten benötigt, wobei jede einzelne bei Raumtemperatur verwendet wurde. Zuerst wurde 2-3-mal für etwa 20 Minuten Xylol verwendet, anschließend für 20 Minuten 2-Methoxyethylacetat, gefolgt von reinem Aceton für 2 mal 5 Minuten. Den Abschluss bildete destilliertes Wasser für weitere 2 mal 2 Minuten.

Nun sind die Schnitte bereit für die Goldner-Färbung.

Goldner-Färbung

Verwendet wurde eine Trichrom-Färbung nach Goldner. Die Objektträger wurden über eine Stunde in 2-Methoxyethylacetat gestellt, um überschüssiges Acrylat zu entfernen. Danach wurden die Präparate 2-mal für jeweils 20 Minuten in 96%igen Alkohol gegeben. Das eigentliche Färben begann mit dem Einsetzen der Objektträger in die mit der jeweiligen Chemikalie gefüllten Gefäße über eine definierte Zeitspanne in folgender Reihenfolge:

1. Weigert's Hämatoxylin (10 Minuten)
2. Bläuen in Leitungswasser (10 Minuten)
3. 2 g Ponceau de Xylidine + 1 g Säurefuchsin + 0,4 ml 1%ige Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (45 Minuten)
4. Spülen in 1%iger Essigsäure (1 Minute)
5. Kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser
6. 2 g Wolframatophosphorsäure + 1 g Orange G + 200 ml destilliertes Wasser (7 Minuten)
7. Spülen mit 1%iger Essigsäure (1 Minute)
8. 0,4 g Lichtgrün + 0,4 ml Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (15 Minuten)
9. Auswaschen mit 1%iger Essigsäure
10. Entwässern in 96%igem und 100%igem Ethanol, dann Xylol (jeweils 10 Minuten)

Mit einem Tropfen Eukitt wurde ein Deckglas über dem Präparat und Objektträger aufgeklebt.

6.2. Histologisches Bildmaterial

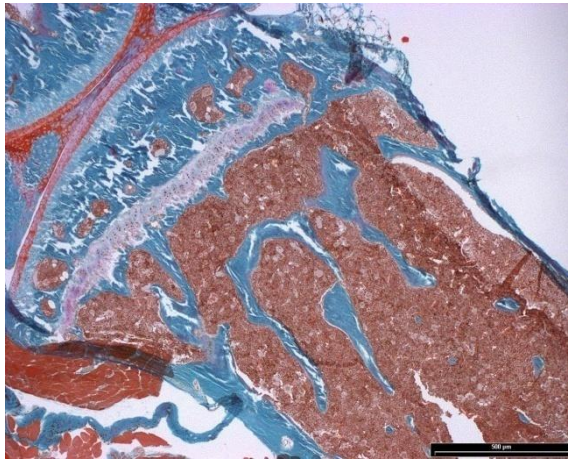


Abbildung 51: proximale Tibia einer männlichen, intakten Wildtyp-Maus

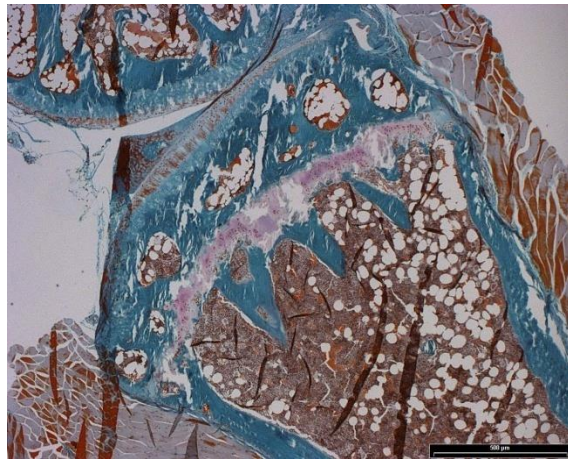


Abbildung 52: proximale Tibia einer männlichen, orx Wildtyp-Maus

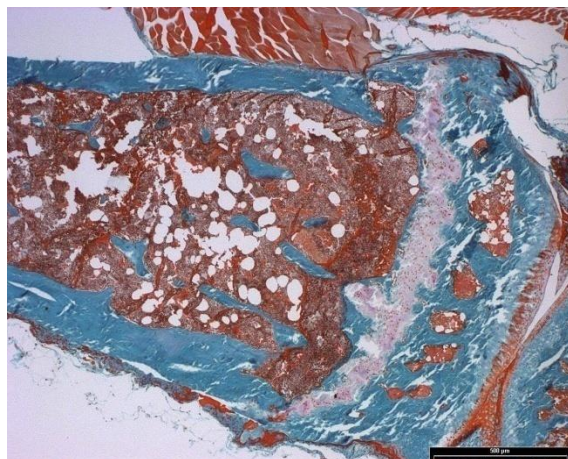


Abbildung 53: proximale Tibia einer männlichen, homozygoten, intakten Maus

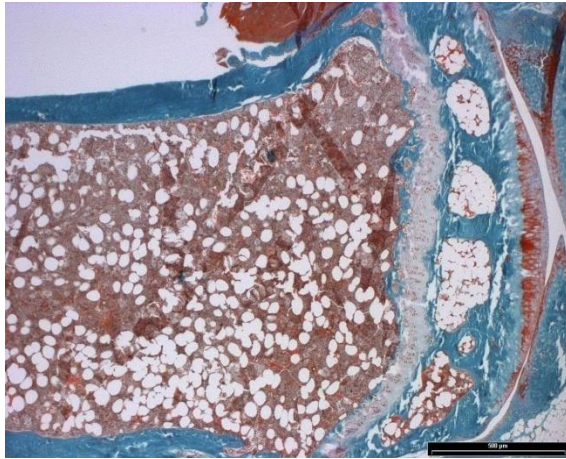


Abbildung 54: proximale Tibia einer männlichen, homozygoten, orx Maus

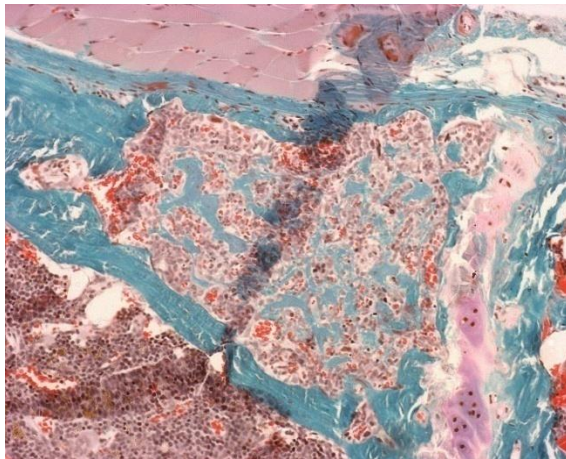


Abbildung 55: proximale Tibia einer weiblichen, wild, intakten Wildtyp-Maus

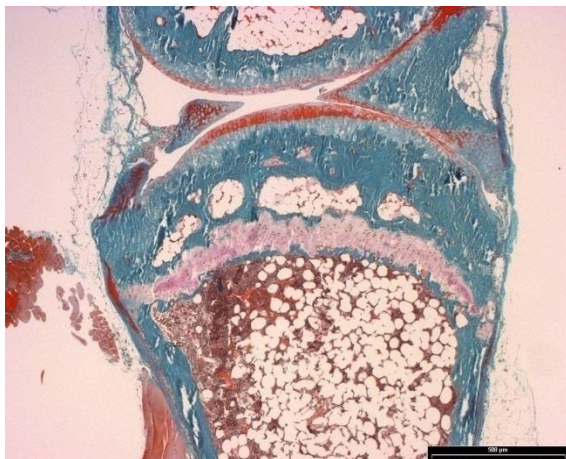


Abbildung 56: proximale Tibia einer weiblichen, ovx Wildtyp-Maus

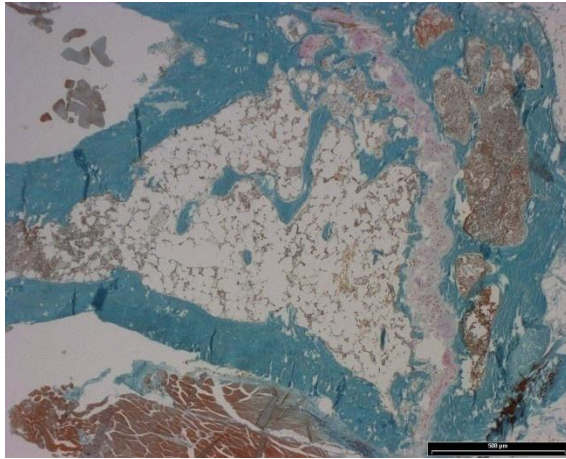


Abbildung 57: proximale Tibia einer weiblichen, homozygoten, intakten Maus

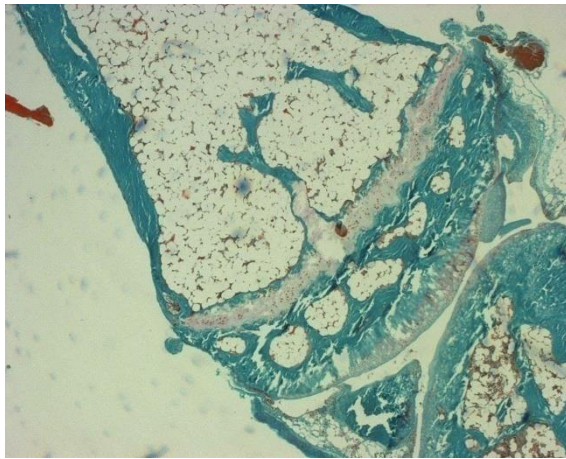


Abbildung 58: proximale Tibia einer weiblichen, homozygoten, ovx Maus

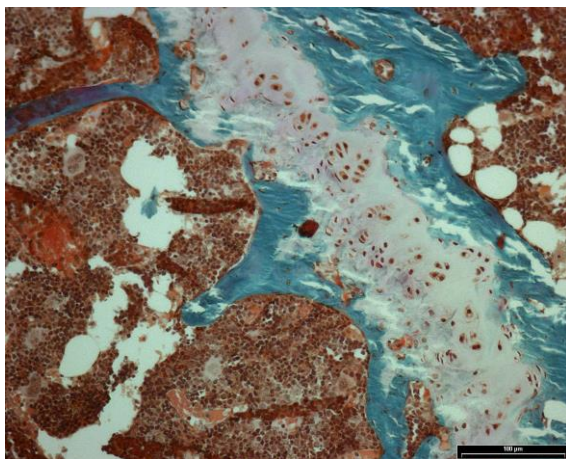


Abbildung 59: Epiphysenfuge einer männlichen, intakten Wildtyp-Maus

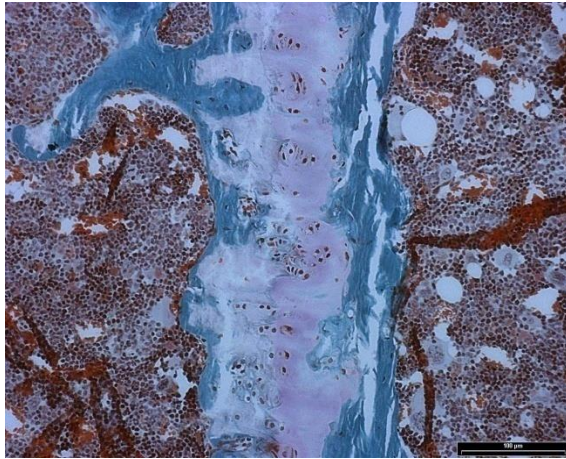


Abbildung 60: Epiphysenfuge einer männlichen, homozygoten, intakten Maus

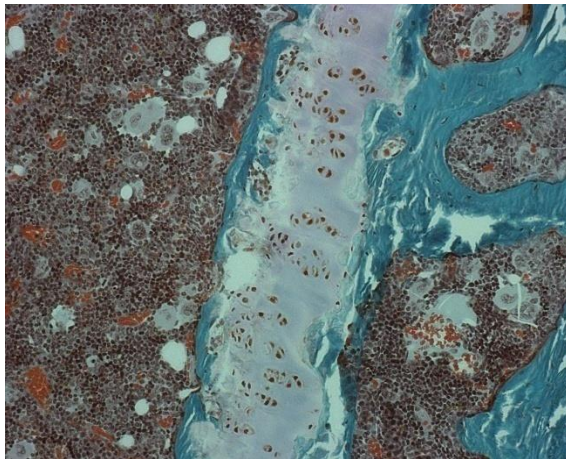


Abbildung 61: Epiphysenfuge einer weiblichen, intakten Wildtyp-Maus

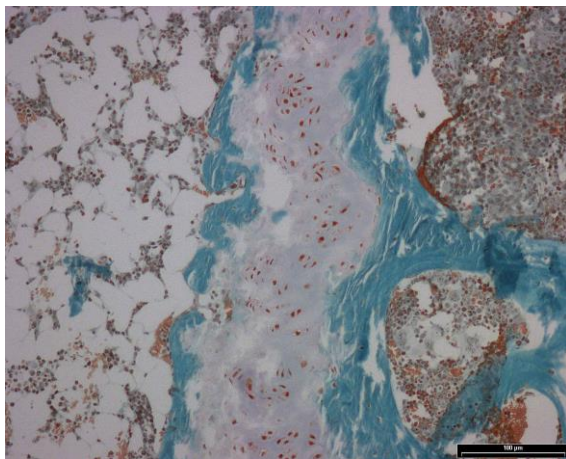


Abbildung 62: Epiphysenfuge einer weiblichen, homozygoten, intakten Maus

Literaturverzeichnis

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D: Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y 2007, Kapitel 12, Figur 6.

Batsukh T, Pieper L, Koszucka AM, Velsen N von, Hoyer-Fender S, Elbracht M, Bergman JE, Hoefsloot LH, Pauli S (2010): CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 19 (14), 2858–2866.

Bilezikian JP, Kurland ES, Rosen CJ (1999): Male Skeletal Health and Osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 10 (6), 244–250.

Clarke BL, Khosla S (2010): Female reproductive system and bone. *Arch Biochem Biophys* 503 (1), 118–128.

Delmas V, Stokes DG, Perry RP (1993): A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90 (6), 2414–2418.

Dubuc PU (1985): Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 180 (3), 468–473.

Elfring LK, Daniel C, Papoulas O, Deuring R, Sarte M, Moseley S, Beek SJ, Waldrip WR, Daubresse G, DePace A (1998): Genetic analysis of brahma: the Drosophila homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148 (1), 251–265.

Ferretti J L MP: Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for evaluating structural and mechanical properties of small bone. In: Yuehuei H. An und Robert A. Draughn (Hg.): Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. CRC Press, Boca Raton 2000, 385–406.

Flaus A, Martin DMA, Barton GJ, Owen-Hughes T (2006): Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* 34 (10), 2887–2905.

- Gehwolf R, Bauer H-C, Resch H (2011): Beschleunigte Sehnenheilung, eine neue Strategie durch Stammzelltherapie; MSN 4: 8–11, online verfügbar unter: <http://www.medicalsportsnetwork.de/archive/943049/Beschleunigte-Sehnenheilung.html> (abgerufen 03.02.2013 15:00 Uhr).
- Ho A, Beyreuther K (2001): Faszinierende Multitalente, Ruperto Carola 3, Universitätsklinikum Heidelberg, 28-34, online verfügbar unter: http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/ruca3_2001/multitalente.html (abgerufen 03.02.2013 15:00 Uhr).
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Spongiosa>: Knochenabbildung, (abgerufen 17.04.2011, 21:00 Uhr)
- <http://www.genetrap.org/tutorials/overview.html>: gene trap Methode (abgerufen 14.12.2013, 13 Uhr)
- Kornak U, Delling G, Mundlos S (2003): Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten; Dtsch Arztebl 100 (19), 1258–1268.
- Lang TF (2011): The bone-muscle relationship in men and women. J Osteoporos 2011, 702–735.
- Lazner F, Gowen M, Pavasovic D, Kola I (1999): Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. Hum Mol Genet 8 (10), 1839–1846.
- Lewis R, Dürr H, Hopfner K, Michaelis J (2008): Conformational changes of a Swi2/Snf2 ATPase during its mechano-chemical cycle. Nucleic Acids Res 36 (6), 1881–1890.
- Lippert H, Deller T: Lehrbuch Anatomie. [Lern-Tipp: nach neuer AO]. 6. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2003, 32–34.
- Liu Z, Zhuge Y, Velazquez OC (2009): Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem 106 (6), 984–991.
- Marfella CGA, Imbalzano AN (2007): The Chd family of chromatin remodelers. Mutat Res 618 (1-2), 30–40.
- Marom R;Shur I;Hager GL; Benayahu D (2006): Expression and regulation of CReMM, a chromodomain helicase-DNA-binding (CHD), in marrow stroma derived osteoprogenitors. In: J. Cell. Physiol. 207 (3), 628–635.

Murken J: Taschenlehrbuch Humangenetik. 96 Tabellen. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006, 3–116.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143–147.

Rauch F, Schoenau E (2008): Peripheral quantitative computed tomography of the proximal radius in young subjects--new reference data and interpretation of results. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8 (3), 217–226.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23 (3), 279–302.

Roschger P, Matsuo K, Misof BM, Tesch W, Jochum W, Wagner EF, Fratzl P, Klaushofer K (2004): Normal mineralization and nanostructure of sclerotic bone in mice overexpressing Fra-1. *Bone* 34 (5), 776–782.

Schuster EF, Stöger R (2002): CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases. *Mamm Genome* 13 (2), 117–119.

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jäger Y, Wuttke W (2008): Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers. *J Bone Miner Metab* 26 (4), 321–327.

Seidlová-Wuttke D, Nguyen BT, Wuttke W (2012): Long-term effects of ovariectomy on osteoporosis and obesity in estrogen-receptor- β -deleted mice. *Comp Med* 62 (1), 8–13.

Shur I; Benayahu D (2005): Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. In: *J. Mol. Biol.* 352 (3), S. 646–655.

Shur I, Socher R, Benayahu D (2006 a): In vivo association of CReMM/CHD9 with promoters in osteogenic cells. *J Cell Physiol* 207 (2), 374–378.

Shur I, Solomon R, Benayahu D (2006 b): Dynamic interactions of chromatin-related mesenchymal modulator, a chromodomain helicase-DNA-binding protein, with promoters in osteoprogenitors. *Stem Cells* 24 (5), 1288–1293.

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001): Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2 (10), 756-68.

Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, Johns SJ, King LA, Harper CA, Meng EC, Lee RE, Yee A, L'Italien L, Chuang P-T, Young SG, Skarnes WC, Babbitt PC, Ferrin TE (2003): BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 31 (1), 278–281.

Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998): The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13 (8), 1243–1250.

Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS (1997): Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94 (21), 11472–11477.

Young DW, Pratap J, Javed A, Weiner B, Ohkawa Y, van Wijnen A, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Imbalzano AN (2005): SWI/SNF chromatin remodeling complex is obligatory for BMP2-induced, Runx2-dependent skeletal gene expression that controls osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 94 (4), 720–730.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:.....	2
Abbildung 2:.....	4
Abbildung 3:.....	6
Abbildung 4:.....	6
Abbildung 5:.....	8
Abbildung 6:.....	11
Abbildung 7:.....	13
Abbildung 8:.....	14
Abbildung 9:.....	15
Abbildung 10:.....	15
Abbildung 11:.....	17
Abbildung 12:.....	17
Abbildung 13:.....	19
Abbildung 14:.....	21
Abbildung 15:.....	22
Abbildung 16:.....	23
Abbildung 17:.....	24
Abbildung 18:.....	25
Abbildung 19:.....	26
Abbildung 20:.....	27
Abbildung 21:.....	28
Abbildung 22:.....	29
Abbildung 23:.....	29
Abbildung 24:.....	30
Abbildung 25:.....	31
Abbildung 26:.....	32
Abbildung 27:.....	33
Abbildung 28:	33
Abbildung 29:.....	34
Abbildung 30:.....	35
Abbildung 31:.....	36
Abbildung 32:.....	37

Abbildung 33:.....	38
Abbildung 34:.....	39
Abbildung 35:.....	40
Abbildung 36:.....	41
Abbildung 37:.....	42
Abbildung 38:.....	43
Abbildung 39:.....	44
Abbildung 40:.....	45
Abbildung 41:.....	46
Abbildung 42:.....	47
Abbildung 43:.....	48
Abbildung 44:.....	49
Abbildung 45:.....	50
Abbildung 46:.....	51
Abbildung 47:.....	52
Abbildung 48:.....	53
Abbildung 49:.....	53
Abbildung 50:.....	54
Abbildung 51:.....	70
Abbildung 52:.....	70
Abbildung 53:.....	70
Abbildung 54:.....	71
Abbildung 55:.....	71
Abbildung 56:.....	71
Abbildung 57:.....	72
Abbildung 58:.....	72
Abbildung 59:	72
Abbildung 60:	73
Abbildung 61:	73
Abbildung 62:.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	13
Tabelle 2:	55
Tabelle 3:	56
Tabelle 4:	67
Tabelle 5:	68

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.- Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wuttke für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen. Ebenso möchte ich mich für die Bereitstellung der CHD9-Mäuse und die Erklärung des genetischen Hintergrundes der Mäuse bei Herrn Prof. Dr. med. Engel und Frau Dr. med. Pauli der Abteilung Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen bedanken. Für die persönliche und umfassende Betreuung möchte ich mich bei Frau Priv.- Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke bedanken. Ein weiterer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Endokrinologie für die Durchführung der Herstellung der Knochenpräparate und ihre Unterstützung in der Auswertung der histologischen Schnitte.