Universität Ulm
Zentrum für Chirurgie
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Struktur und biomechanische Eigenschaften von Ulna und Tibia nach mechanisch induziertem Knochenremodeling in Midkine-defizienten Mäusen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Marcus Christopher Pahl
geboren in Augsburg

Ulm 2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 12.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**

1. Einleitung **1**

1.1. Knochengewebe 1

1.2. Aufbau des Knochengewebes 1

1.2.1. Interzellularsubstanz 1

1.2.2. Knochenzellen 2

1.3. Knochenmodeling und Knochenremodeling 4

1.4. Regulation des Knochenremodelings 5

1.5. Mechanotransduktion und Mechanosensoren des Knochens 6

1.6. Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg 7

1.6.1. Komponenten des Signaltransduktionswegs 7

1.6.2. Bedeutung des Signalwegs im Knochenstoffwechsel 9

1.7. Die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren 12

1.7.1. Struktur und Expression 12

1.7.2. Funktionen 13

1.7.3. Einfluss auf den Knochenstoffwechsel 14

1.7.4. Rezeptoren des Heparin-bindenden Wachstumsfaktors Midkine 15

1.8. Ziel der Arbeit 17

2. Material und Methoden **18**

2.1. Arbeitsmaterialien 18

2.2. Geräte und Software 19

2.3. Versuchstiere und Haltung 20

2.4. Mechanische nicht-invasive in-vivo Belastung der Tibia und Ulna 21

2.4.1. Dynamische Vier-Punkt-Biegung der rechten Tibia 21

2.4.2. Druckbelastung der linken Tibia 22

2.4.3. Dynamische axiale Kompression der rechten Ulna 23

2.4.4. Stimulationsmaschine und Kalibrierung 24

2.4.5. Narkose 27

2.4.6. Versuchsablauf und Stimulationsprotokoll 27

2.4.7. Mechanische in-vivo Belastung der Tibiae und Ulnae 29

2.5. Präparation von Tibia und Ulna 33

2.6. Micro-Computertomographie von Tibia und Ulna 34
2.7. µCT-Auswertung 36
2.7.1. Wahl der Region of Interest 37
2.7.2. Auswertung der µCT-Bilder der Tibiae und Ulnae 39
2.8. Biomechanische Auswertung 46
2.8.1. Einbettung von Tibia und Ulna 46
2.8.2. Drei-Punkt-Biegung von Tibia und Ulna 47
2.9. Statistische Auswertung 52
3. Ergebnisse **53**
3.1. µCT-Ergebnisse 53
3.1.1. Dynamische Vier-Punkt-Biegung der Tibia 53
3.1.2. Druckbelastung der Tibia 65
3.1.3. Dynamische axiale Kompression der Ulna 76
3.2. Ergebnisse der biomechanischen Testung 99
4. Diskussion **102**
4.1. Ergebnisse der µCT-Auswertung 102
4.1.1. Ergebnisse der dynamischen Vier-Punkt-Biegung der Tibia 102
4.1.2. Ergebnisse der Druckbelastung der Tibia 107
4.1.3. Ergebnisse der dynamischen axialen Kompression der Ulna 110
4.2. Ergebnisse der biomechanischen Testung mittels Drei-Punkt-Biegung 116
4.3. Vergleich der beiden nicht-invasiven Belastungsmodelle 120
4.4. Einfluss von Midkine auf die mechanisch induzierte Knochenantwort 122
4.4.1. Midkine und Pleiotrophin im Mausmodell 122
4.4.2. Die Rolle von Pleiotrophin und Midkine im Knochenstoffwechsel 122
4.5. Einfluss von Midkine auf den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg 127
4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick 131
5. Zusammenfassung **133**
6. Literaturverzeichnis **135**
Danksagung **154**
Lebenslauf **155**

Abkürzungsverzeichnis

Alk	*anaplastic lymphoma kinase*
Alpl	Alkalische Phosphatase
Apc	*adenomatous polyposis coli*
ATP	Adenosintriphosphat
bmp	*Bitmap*
Bmp	*bone morphogenetic protein*
Bmp2	*bone morphogenetic protein 2*
BMU	*basic multicellular unit*
Bsp	*bone sialoprotein*
Cebpα	*CCAAT/enhancer binding protein α*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Col1	*collagen type I*
Col1a1	*collagen type I alpha 1*
CTa	*CT Analyser*
Cxn43	Connexin 43
Dkk	Dickkopf
Dlx5	*distal less homeobox 5*
Dsh	*dishevelled*
E	Elastizitätsmodul
Fgf	*fibroblast growth factor*
FTM	Flächenträgheitsmoment
g	Gramm
Gsk3	*glycogen synthase kinase 3*
Gsk3β	*glycogen synthase kinase 3*β
HARP	*heparin affin regulatory peptide*
HB-GAM	*heparin-binding growth-associated molecule*
HBNF	*heparin binding neurotrophic factor*
Hif1a	*hypoxia-inducible factor 1α*
Hz	Hertz
I	Flächenträgheitsmoment

Igf	*insulin-like growth factor*
KD	Kortikalisdicke
KO	Knockout
kV	Kilovolt
Lef	*lymphoid enhancer binding factor*
Lef1	*lymphoid enhancer binding factor 1*
Lrp5/6	*low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*
Max	Maximum
M-Csf	*macrophage-colony stimulating factor*
Mdk -/-	*Midkine*-defizient
Mdk +/+	*Midkine*-positiv
Mdk	Midkine
MES	*minimum effective strains*
mGKV	mineralisiertes Geflechtknochenvolumen
Min	Minimum
mKoV	mineralisiertes Kortikalisvolumen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Msx2	*msh homeobox homolog 2*
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Oc	Osteokalzin
Opg	Osteoprotegerin
Osf1	*osteoblast-specific factor 1*
Osx	Osterix
Pdgf	*platelet derived growth factor*
Pparγ	*peroxisome proliferator activated receptor γ*
PTH	Parathormon
Ptn	Pleiotrophin
Ptprζ	Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ ζ

Rank	*receptor activator of nuclear factor κB*
Rankl	*receptor activator of nuclear factor κB-ligand*
Rare	*retinoic acid responsive element*
ROI	*Region of Interest*
Runx2	*runt-related transcription factor 2*
Seg	Segment
Sfrp	*secreted frizzled-related protein*
Sfrp1	*secreted frizzled-related protein 1*
SOST	kodierendes Gen für das Protein Sclerostin
Sox5/6/9	*sry-type HMG box 5/6/9*
StAb	Standardabweichung
Tcf	*T-cell factor*
Tgfβ	*transforming growth factor* β
TRAP	Tartrat-resistente azide Phosphatase
VG	*VGStudioMax 1.0*
Wisp2	*Wnt1 inducible signaling pathway protein 2*
Wnt	Zusammensetzung aus *wingless* und *integration 1*
WT	Wildtyp
Wt1	das Produkt des *Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1*
µA	Microampere
µCT	Micro-Computertomogramm

1. Einleitung

1.1. Knochengewebe

Das Knochengewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben und ist ein dynamisches sowie metabolisch aktives Gewebe (Robling, Castillo et al. 2006). Nach Abschluss der Skelettausbildung und des Wachstums befindet sich das Knochengewebe im ständigen Umbau (*remodeling*) (Frost 1969). Pro Jahr werden ca. zehn Prozent des gesamten menschlichen Skeletts umgebaut. Dabei findet der meiste Umbau in der *Substantia spongiosa* und ein kleinerer Teil in der *Substantia compacta* statt (Alliston and Derynck 2002). Die Knochen haben viele verschiedene Aufgaben und Funktionen im menschlichen Körper. Sie bilden zusammen mit den Muskeln und Gelenken den Bewegungsapparat und schützen das zentrale Nervensystem (Gehirn und Rückenmark) sowie Sinnes- und Thoraxorgane. Als Stoffwechselorgan sind sie zusammen mit den Nieren und dem Darm an der Regulation des Kalziumstoffwechsels beteiligt, sie dienen verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen als Speicher und sie bieten in den Räumen zwischen den Trabekeln der *Substantia spongiosa* Platz für das Knochenmark und damit für die Hämatopoese (Harada and Rodan 2003; Cohen 2006).

1.2. Aufbau des Knochengewebes

Das Knochengewebe ist aus Interzellularsubstanz (auch Knochenmatrix oder Extrazelluläre Matrix genannt) und speziellen Zellen aufgebaut und entspricht damit dem prinzipiellen Aufbau von anderen Binde- und Stützgeweben. Es unterscheidet sich von diesen durch die mineralisierte und damit sehr harte Interzellularsubstanz. Die Skelettknochen gehören mit den Zähnen und den Otolithen zu den einzigen mineralisierten Geweben des menschlichen Körpers (Kawasaki, Buchanan et al. 2009).

1.2.1. Interzellularsubstanz

Die Interzellularsubstanz besteht zu ca. 35 Prozent aus organischem und zu ca. 65 Prozent aus anorganischem Material. Das organische Material ist vor allem für die Zugfestigkeit der Knochen verantwortlich und besteht zu ca. 90 Prozent aus Kollagen Typ I und zu ca.

10 Prozent aus nicht-kollagenen Proteinen. Das anorganische Material ist vor allem für die Druckfestigkeit der Knochen verantwortlich und besteht zu ca. 95 Prozent aus Kalziumphosphat, das in Form von Hydroxylapatitkristallen vorliegt und den Kollagenfibrillen angelagert ist (Buckwalter and Cooper 1987).

1.2.2. Knochenzellen

Im Knochen kommen verschiedene Zelltypen vor. Zu den wichtigsten Zellen gehören zum einen die Osteoblasten, die Osteozyten und die Lining-Zellen (*bone lining cells*), die von mesenchymalen Stammzellen abstammen und zum anderen die Osteoklasten, die von hämatopoetischen Stammzellen abstammen.

- **Osteoblasten**

Die Osteoblasten bauen Knochengewebe auf (Knochenformation). Dazu synthetisieren und sezernieren sie die Bestandteile der unmineralisierten Extrazellulären Matrix wie Kollagen, Osteokalzin (Oc), Osteopontin und Osteonektin sowie para- und autokrine Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor* β (Tgfβ), *bone morphogenetic protein* (Bmp), *platelet derived growth factor* (Pdgf) und *insulin-like growth factor* (Igf) und zudem steuern sie die anschließende Mineralisation des neugebildeten Osteoids (unmineralisierte Knochenmatrix).

Die Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark ab, die sich auch zu Chondrozyten, Adipozyten, Myoblasten und Fibroblasten entwickeln können (Pittenger, Mackay et al. 1999). Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen über Präosteoblasten zu Osteoblasten wird durch verschiedene Signale angeregt und bestimmt (Bielby, Jones et al. 2007; Huang, Yang et al. 2007). Dabei lassen sich die einzelnen Entwicklungsstadien anhand der Expression von Markergenen wie *collagen type I* (*Col1*), *bone sialoprotein* (*Bsp*), *Oc*, *Alkalische Phosphatase* (*Alpl*) und *E11* bestimmen.

Der Transkriptionsfaktor *runt-related transcription factor 2* (Runx2) ist für die frühe Entwicklung mesenchymaler Stammzellen zu Präosteoblasten von Bedeutung (Zou, Zou et al. 2006). Für die weitere Entwicklung ist der Transkriptionsfaktor Osterix (Osx) entscheidend, der nach Runx2 aktiv ist (Nakashima and de Crombrugghe 2003). Zudem können Zytokine wie *fibroblast growth factor* (Fgf) (Jacob, Smith et al. 2006) und *bone*

morphogenetic protein 2 (Bmp2) auf die Osteoblastogenese durch Induktion von Runx2 und Osx Einfluss nehmen (Nakashima, Zhou et al. 2002; Phimphilai, Zhao et al. 2006). Im weiteren Verlauf der osteoblastären Differenzierung wird β-Catenin benötigt. Vorläuferzellen, die kein β-Catenin exprimieren, sind in ihrer osteoblastären Differenzierung geblockt und entwickeln sich stattdessen zu Chondrozyten (Hill, Spater et al. 2005; Rodda and McMahon 2006).

- **Osteozyten**

Die Osteozyten sind terminal differenzierte Osteoblasten, die sich durch die Synthese der Extrazellulären Matrix in den *Lacunae osseae* der Knochen eingemauert haben und machen mit ca. 90 bis 95 Prozent den größten Anteil aller Knochenzellen aus (Parfitt 1977). Sie sind über lange zytoplasmatische Ausläufer, die sich in den ca. 100 bis 200 nm dicken *Canaliculi osseae* befinden, über *gap junctions,* die vor allem aus Connexin 43 (Cxn43) bestehen (Plotkin, Manolagas et al. 2002) miteinander und mit anderen Knochenzellen verbunden (Kamioka, Honjo et al. 2001).

- **Bone lining cells**

Bone lining cells (auch Knochensaumzellen oder *Lining*-Zellen genannt) liegen den inneren (endostalen) und äußeren (periostalen) Knochenoberflächen an und machen dort den größten Anteil der Knochenzellen aus. Mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen stehen sie mit Osteoblasten und tiefer im Knochen liegenden Osteozyten in Verbindung.

- **Osteoklasten**

Die mehrkernigen Osteoklasten stammen von mononukleären hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und der Milz ab (Scheven, Visser et al. 1986) und bauen Knochengewebe ab (Knochenresorption) (Chambers 1985).

Dazu heften sich die Osteoklasten mit Hilfe von β3-Integrin (McHugh, Hodivala-Dilke et al. 2000) am Knochen an und bilden einen nach außen abgeschlossenen subosteoklastischen Raum, die *Howship-Lakune*, in der die Knochenresorption stattfindet. Dabei werden als Erstes Protonen (H^+-Ionen) durch ATP-abhängige Protonenpumpen in den subosteoklastischen Raum sezerniert, um ein saures Milieu (pH-Wert von ca. 4 bis 5) zu schaffen, wodurch das Knochengewebe entmineralisiert wird. Anschließend werden die

organischen Bestandteile der Extrazellulären Matrix durch Hydrolasen wie Kathepsin K und Matrix-Metalloproteinasen abgebaut. Nach der Resorptionstätigkeit gehen die Osteoklasten per Apoptose zu Grunde. Östrogene können über Tgfβ die Apoptose von Osteoklasten induzieren und verhindern damit einen Verlust von Knochenmasse (Hughes, Dai et al. 1996).

Für die Entwicklung und Regulation der Aktivität von Osteoklasten sind *macrophage-colony stimulating factor* (M-Csf) und *receptor activator of nuclear factor κB-ligand* (Rankl) bzw. Osteoblasten und/oder Stromazellen entscheidend (Lacey, Timms et al. 1998; Jimi, Akiyama et al. 1999). Die Osteoklasten exprimieren das Rezeptormolekül *receptor activator of nuclear factor κB* (Rank), welches mit Rankl, das von Osteoblasten und Stromazellen exprimiert wird, interagieren kann. Die Interaktion von Rank mit Rankl kann durch Osteoprotegerin (Opg), das von Osteoblasten produziert wird, gehemmt werden. Opg ist ein löslicher Rezeptor, der nach Bindung an Rankl die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung inhibieren kann.

1.3. Knochenmodeling und Knochenremodeling

Während der Skelettausbildung überwiegt das Knochen*modeling* (Frost 1990). Dabei kommt es nach **A**ktivierung von Osteoklasten zur Knochen**r**esorption (**A → R**) oder nach **A**ktivierung von Osteoblasten zur Knochen**f**ormation (**A → F**). Die Knochenresorption und die Knochenformation finden dabei unabhängig voneinander und an verschiedenen Stellen statt (Robling, Castillo et al. 2006). Nach Abschluss des Wachstums überwiegt das Knochen*remodeling* (Frost 1990) bei dem Knochenresorption und Knochenformation miteinander gekoppelt sind (Parfitt 2000; Andersen, Sondergaard et al. 2009). Nach der **A**ktivierung von Knochenzellen kommt es zur **R**esorption und anschließend zur **F**ormation (**A → R → F**) von Knochengewebe (Frost 1969).

Das Knochen*remodeling* hat im wesentlichen drei Aufgaben: es dient der Anpassung des Skeletts an mechanische Belastungen, der Reparatur von Mikroschäden und dem Erhalt der Kalziumhomöostase (Burr 2002). Die am Knochen*remodeling* beteiligten Zellen sind in *basic multicellular units* (BMUs) organisiert (Frost 1969). In der *Substantia compacta* des kortikalen Knochens formen die BMUs einen parallel zur Knochenachse orientierten Tunnel (Hert, Fiala et al. 1994). An dessen Spitze befinden sich Osteoklasten gefolgt von

mononukleären Zellen und Osteoblasten sowie Bindegewebe, Blutgefäße und Nervenfasern. An der Knochenoberfläche der *Substantia spongiosa* graben die BMUs hingegen eine Art Lakune, die anschließend mit neuem Knochengewebe aufgefüllt wird (Parfitt 1994). Das Knochen*remodeling* läuft in fünf Phasen ab: Ruhephase, Aktivierungsphase, Resorptionsphase, Umkehrphase und Formationsphase (Parfitt 1984). Die Resorption von Knochengewebe dauert insgesamt ca. drei bis vier Wochen und die anschließende Formation von Knochengewebe dauert insgesamt ca. drei bis vier Monate (McCauley and Nohutcu 2002) (Abbildung 1).

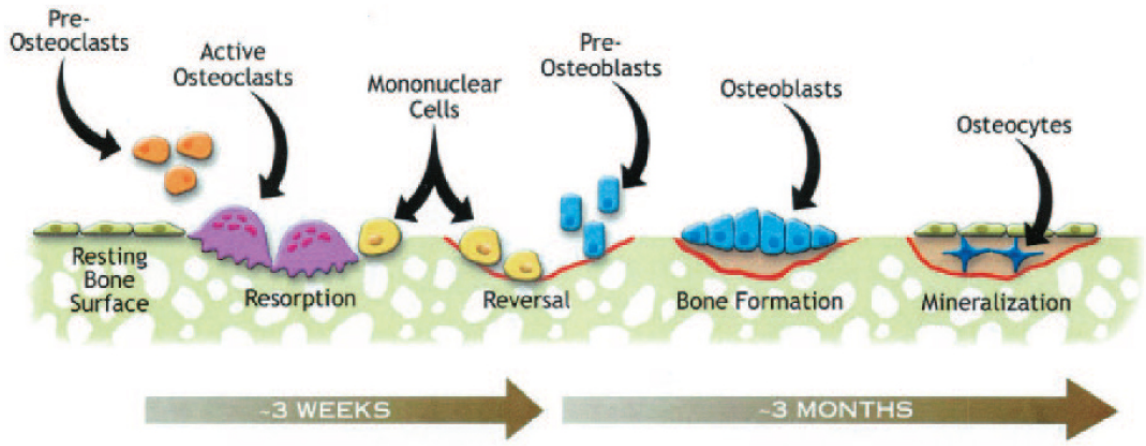


Abbildung 1: Schema des Knochen*remodelings* nach McCauley *et al.* (McCauley and Nohutcu 2002)
Während der Aktivierungsphase werden Präosteoklasten rekrutiert und aktiviert. Es folgt die Resorptionsphase in der Knochengewebe durch die reifen Osteoklasten abgebaut wird. In der Umkehrphase wird die Knochenoberfläche vorübergehend mit einer Schicht von mononukleären Zellen bedeckt und Präosteoblasten werden rekrutiert. In der anschließenden Formationsphase wird unmineralisierte Knochenmatrix gebildet, die im weiteren Verlauf mineralisiert. Die eingemauerten Osteoblasten wandeln sich schließlich zu Osteozyten um.

1.4. Regulation des Knochenremodelings

Das Knochen*remodeling* ist ein physiologischer Vorgang bei dem Knochenresorption und Knochenformation im Gleichgewicht miteinander stehen. Dabei wird genauso viel Knochengewebe abgebaut wie anschließend wieder aufgebaut wird. Bei einem Ungleichgewicht kommt es zu pathologischen Veränderungen im Knochen: wenn die Knochenresorption höher ist als die Knochenformation kommt es zu einem Verlust von

Knochenmasse wie bei der Osteoporose (Eriksen, Mosekilde et al. 1985; Shoback 2007). Umgekehrt führt eine Knochenformation, die höher ist als die Knochenresorption, zu einer Zunahme der Knochenmasse wie bei der Osteopetrose (Little, Carulli et al. 2002). Es bedarf somit einer strengen Regulation des Knochen*remodelings,* um das sensible Gleichgewicht von Knochenabbau und Knochenaufbau zu erhalten.

So wird das Knochen*remodeling* durch systemische Hormone und Wachstumsfaktoren über die Modulation der Replikation undifferenzierter Zellen sowie über die Beeinflussung der Rekrutierung und Funktion differenzierter Zellen reguliert (Centrella, Casinghino et al. 1995; Raisz 1996; Boonen, Aerssens et al. 1997; Delany and Canalis 1998; Ducy, Schinke et al. 2000). Dabei spielt auch das Rank-Rankl-Opg-Signalsystem, welches die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten modulieren kann, eine wichtige Rolle. Das Verhältnis von Opg zu Rankl wird durch Hormone und Zytokine bestimmt. Dazu gehören Glukokortikoide, Interleukin 1, Parathormon (PTH), Prostaglandin E2 und Vitamin-D-Hormon, die das Opg/Rankl-Verhältnis verringern und somit zu Knochenabbau führen. Im Gegensatz dazu erhöhen Tgfβ und Östrogene das Verhältnis von Opg zu Rankl, was zu Knochenaufbau bzw. Knochenerhalt führt (Wright, McCarthy et al. 2009). Desweiteren stellt die mechanische Belastung der Knochen einen wichtigen Faktor für die Regulation der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten dar.

1.5. Mechanotransduktion und Mechanosensoren des Knochens

Die Grundform und die Entwicklung der Knochen sind genetisch festgelegt. Allerdings wird die weitere Knochenarchitektur durch Anpassungsvorgänge bestimmt, die für die mechanische Umwelt sensibel sind (Forwood and Turner 1995). Dabei wird die Umwandlung einer biophysikalischen Kraft in ein biochemisches bzw. zelluläres Signal als Mechanotransduktion bezeichnet (Duncan and Turner 1995; Huang, Kamm et al. 2004). Bereits 1892 postulierte Julius Wolff, dass die Form und Struktur der Knochen durch die von außen wirkende mechanische Belastung festgelegt wird (Wolff 1892). Frost beschreibt in seiner Mechanostat-Theorie eine dynamische Beziehung zwischen der Knochenarchitektur und der mechanischen Belastung. Die Knochen haben somit ein Leben lang die Möglichkeit sich durch Auf- und Abbauprozesse (*modeling* und *remodeling*) den aktuell herrschenden mechanischen Belastungen anzupassen (Frost

1987; Duncan and Turner 1995; Turner 1998; Burr, Robling et al. 2002; Ehrlich, Noble et al. 2002; Bonewald 2006).

So führt eine reduzierte mechanische Beanspruchung durch Schwerelosigkeit in der Raumfahrt zu vermehrtem Knochenabbau mit einer Reduktion des Knochenmineralgehalts (Cann and Adachi 1983; Rambaut and Goode 1985; Vico, Chappard et al. 1987) und eine mechanische Beanspruchung, die über der physiologischen Belastung liegt zu Knochenaufbau mit einer Zunahme der Knochenmasse (Bassey and Ramsdale 1994).

Bei der Mechanotransduktion führt eine auf den Knochen einwirkende Kraft zu einer Zunahme des interstitiellen Flüssigkeitsflusses (*interstitial fluid flow*) und somit zu einer Scherspannung, die aufgrund ihrer Lokalisation im Knochen vor allem von Osteozyten registriert werden kann. Zudem kommt es zu einer Deformation der Zellmembran bzw. Zellmatrix, die vor allem von Osteoblasten registriert werden kann (Forwood and Turner 1995; Harter, Hruska et al. 1995; Klein-Nulend, van der Plas et al. 1995; Burger and Klein-Nulend 1999; Bonewald 2006). Die Osteozyten und Osteoblasten dienen somit als Mechanosensoren des Knochens, die über Rezeptoren die mechanische Belastung direkt bzw. indirekt detektieren und über verschiedene Signaltransduktionswege in ein zelluläres Signal übersetzen, wodurch die Expression verschiedener Gene, die am Knochenstoffwechsel beteiligt sind, moduliert werden kann (Pavalko, Norvell et al. 2003; Schriefer, Warden et al. 2005; Liedert, Kaspar et al. 2006; Imai, Heino et al. 2009).

1.6. Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg

1.6.1. Komponenten des Signaltransduktionswegs

Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg (Wnt: Zusammensetzung aus *wingless* und *integration 1*) oder auch kanonischer Wnt-Signaltransduktionsweg genannt, ist an der Mechanotransduktion der Knochen beteiligt und spielt bei der embryonalen Knochenentwicklung sowie bei der Regulation der Knochenmasse eine wichtige Rolle (Westendorf, Kahler et al. 2004; Krishnan, Bryant et al. 2006). Eine Aktivierung des Signalwegs erfolgt über die Bindung von Wnt-Molekülen - eine Familie sezernierter Glykoproteine (Cadigan and Nusse 1997) - an Rezeptoren der *frizzled*-Familie und die Co-

Rezeptoren *low density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (Lrp5/6), was über die Stabilisierung von intrazellulärem β-Catenin und dessen Translokation in den Zellkern zu einer Modulation der Expression Wnt-abhängiger Gene führt (Akiyama 2000; Logan and Nusse 2004).

In der Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird β-Catenin intrazellulär durch einen Multiproteinkomplex, der aus *adenomatous polyposis coli* (Apc), Axin und *glycogen synthase kinase 3*β (Gsk3β) besteht, phosphoryliert und anschließend ubiquitinyliert, wodurch es dem Proteasom zur Degradation zugeführt wird (Ikeda, Kishida et al. 1998; Behrens 2000). Durch die Anwesenheit und Bindung eines Wnt-Liganden wird *dishevelled* (Dsh) aktiviert, was zu einem Zerfall bzw. zu einer Hemmung des Multiproteinkomplexes führt (Seto and Bellen 2004). Somit wird β-Catenin nicht phosphoryliert, ubiquitinyliert und durch das Proteasom degradiert, sondern kann im Zytoplasma der Zelle akkumulieren und in den Zellkern translozieren. Im Zellkern führt β-Catenin schließlich über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der *T-cell factor*- (Tcf) und *lymphoid enhancer binding factor*-Familie (Lef) zu einer Modulation der Transkription verschiedener Gene (Johnson, Harnish et al. 2004; Chen and Alman 2009). Dabei sind die von dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg regulierten Gene vor allem an Vorgängen der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt (Westendorf, Kahler et al. 2004).

Neben den aktivierenden Wnt-Liganden existieren verschiedene Signalmoleküle, die durch ihre Interaktion die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalwegs beeinflussen. So wird die Interaktion der Wnt-Moleküle mit den *frizzled*-Rezeptoren durch Mitglieder der *secreted frizzled-related protein*-Familie (Sfrp) und die Interaktion mit den Co-Rezeptoren Lrp5/6 durch Sclerostin und Mitglieder der Dickkopf-Familie (Dkk) gehemmt (Krishnan, Bryant et al. 2006) (Abbildung 2).

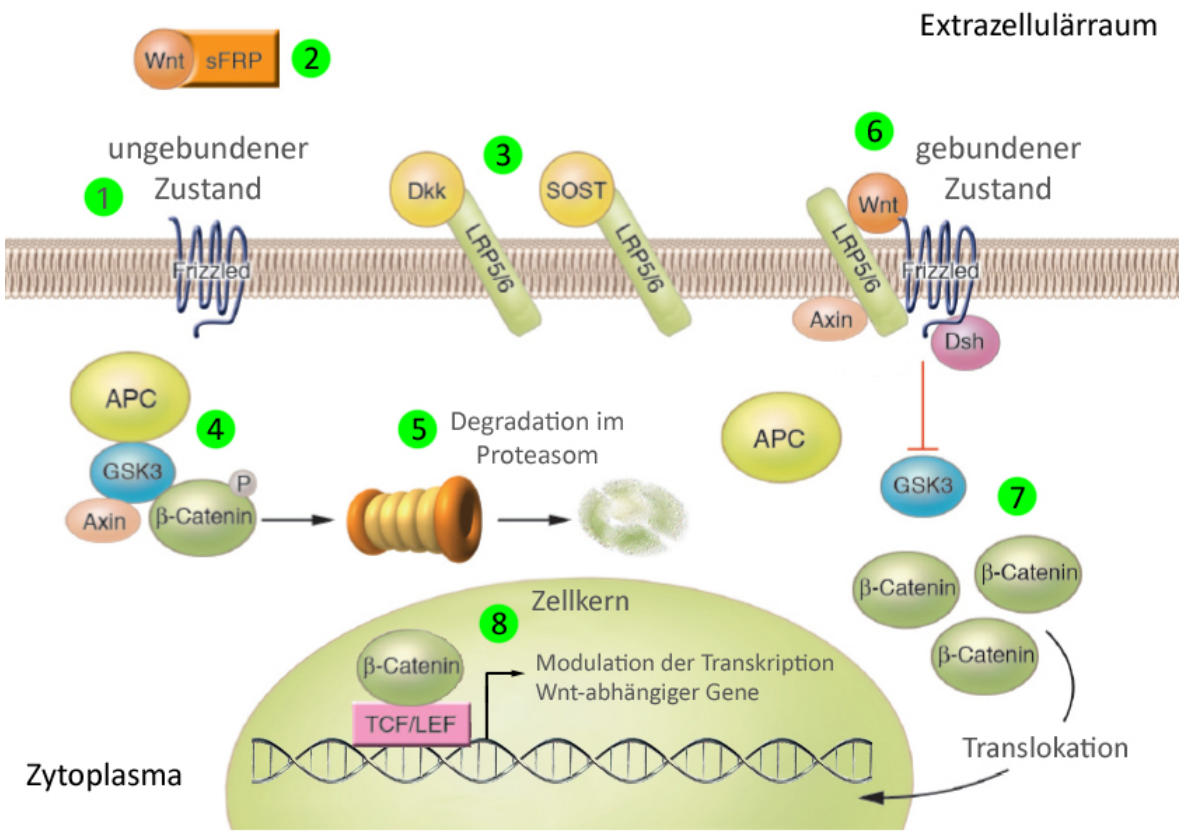


Abbildung 2: Schema des Wnt/β-Catenin-Signalwegs nach Krishnan *et al.* (Krishnan, Bryant et al. 2006)
In der Abwesenheit eines Wnt-Liganden (ungebundener Zustand, **1**) oder durch die Inhibition eines Wnt-Liganden durch sFRP (**2**) oder durch die Bindung von Dkk oder SOST an LRP5/6 (**3**) wird β-Catenin intrazellulär durch einen Multiproteinkomplex aus APC, Axin und GSK3 (**4**) phosphoryliert und im Proteasom (**5**) degradiert. Durch die Bindung eines passenden Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled und die Co-Rezeptoren LRP5/6 (gebundener Zustand, **6**) wird Dsh aktiviert, was zu einer Inhibition von GSK3 bzw. des Multiproteinkomplexes führt und somit zu einer intrazellulären Akkumulation von nicht-phosphoryliertem β-Catenin (**7**). Das unphosphorylierte β-Catenin kann in den Zellkern translozieren und zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der TCF-/LEF-Familie die Transkription Wnt-abhängiger Gene modulieren (**8**). Abkürzungen: Wnt: Zusammensetzung aus *wingless* und *integration 1*, sFRP: *secreted frizzled-related protein*, Dkk: Dickkopf, APC: *adenomatous polyposis coli*, GSK3: *glycogen synthase kinase 3*, LRP5/6: *low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*, Dsh: *dishevelled*, TCF/LEF: *T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor,* SOST: kodierendes Gen für das Protein Sclerostin

1.6.2. Bedeutung des Signalwegs im Knochenstoffwechsel

Die Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs für die Knochenmasse und den Knochenstoffwechsel zeigte sich durch die Entdeckung einer *loss-of-function*-Mutation des humanen Lrp5-Rezeptors bei Trägern des autosomal-rezessiv vererbten

Osteoporose-Pseudoglioma-Syndroms, das durch eine verringerte Knochendichte und eine erhöhte Fragilität der Knochen charakterisiert ist (Gong, Slee et al. 2001). Im Gegensatz dazu führte eine *gain-of-function*-Mutation in einer Untereinheit des humanen Lrp5-Rezeptors zu einem Phänotyp mit erhöhter Knochendichte (Little, Carulli et al. 2002). Zudem führte eine G171V-Mutation des Lrp5-Rezeptors zu einer erhöhten Knochenantwort auf mechanische Belastung und zu einer verstärkten Transkription von Opg (Johnson 2004). Desweiteren bestätigten Untersuchungen an Mausmodellen die Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs für den Knochenstoffwechsel (Kato, Patel et al. 2002; Babij, Zhao et al. 2003).

Bisher wurde allerdings nicht abschließend geklärt welche der bekannten Wnt-Signalmoleküle an der Knochenentwicklung und dem Knochen*remodeling* beteiligt sind und welche Funktionen sie dabei genau übernehmen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Wnt7b von Osteoblasten exprimiert und während der Osteoblastogenese induziert wird, so dass vermutet wird, dass Wnt7b als autokrines Signalprotein für die Osteoblastendifferenzierung benötigt wird (Hu, Hilton et al. 2005; Li, Zhang et al. 2005). Bei der Untersuchung eines *Wnt10b*-defizienten Mausmodells konnte ein Phänotyp mit reduzierter trabekulärer Knochenmasse und verminderter Knochenmineraldichte gezeigt werden (Bennett, Longo et al. 2005). Zudem wurde gezeigt, dass Wnt10b die Entwicklung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten durch Suppression der adipogenen Transkriptionsfaktoren *CCAAT/enhancer binding protein α* (Cebpα) und *peroxisome proliferator activated receptor γ* (Pparγ) hemmt und die Entwicklung mesenchymaler Vorläuferzellen zu osteochondrogenen Vorläuferzellen durch Induktion der osteoblastogenen Transkriptionsfaktoren Runx2, *distal less homeobox 5* (Dlx5) und Osx fördert (Ross, Hemati et al. 2000; Bennett, Longo et al. 2005).

Für die weitere Differenzierung der osteochondrogenen Vorläuferzellen zu Osteoblasten ist neben Runx2 die Anwesenheit von β-Catenin notwendig, das über den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg induziert werden kann. So waren Osteoblastenvorläuferzellen, die kein β-Catenin exprimierten, in ihrer Differenzierung geblockt und entwickelten sich stattdessen zu Chondrozyten (Hill, Spater et al. 2005). Desweiteren führte eine Inaktivierung von β-Catenin in mesenchymalen Vorläuferzellen *in-vitro* unter Zellkulturbedingungen, die eigentlich zu einer osteoblastären Differenzierung führen, zu einer Differenzierung zu Chondrozyten (Day, Guo et al. 2005) (Abbildung 3).

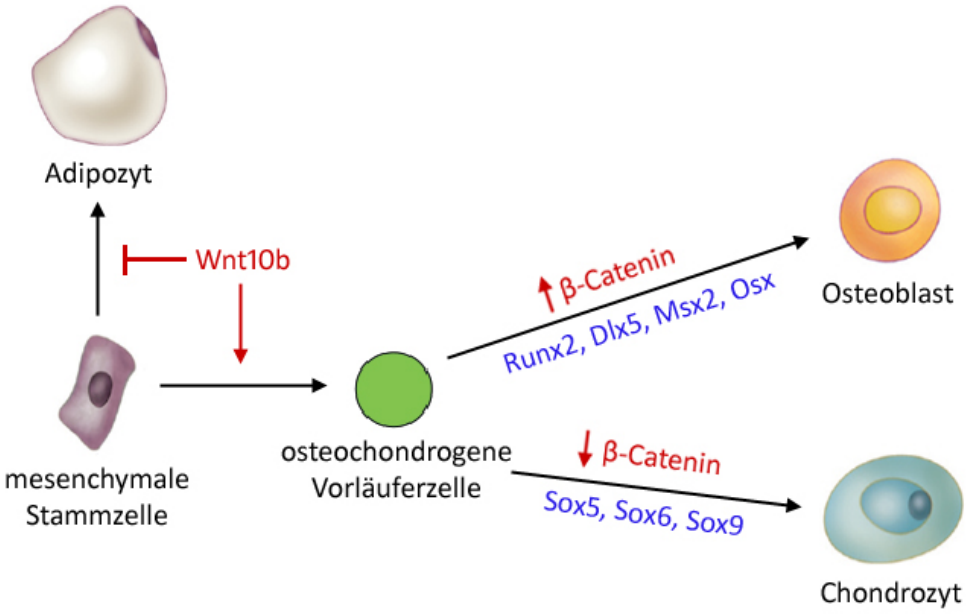


Abbildung 3: Schema der Differenzierungsmöglichkeiten einer mesenchymalen Stammzelle nach Glass *et al.* (Glass and Karsenty 2007) und Krishnan *et al.* (Krishnan, Bryant et al. 2006)

Eine mesenchymale Stammzelle hat die Möglichkeit sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten sowie zu Myoblasten und Fibroblasten (nicht gezeigt) zu differenzieren. Dabei hat der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg einen Einfluss auf die osteoblastäre Differenzierung. Wnt10b hemmt die Differenzierung zu Adipozyten und fördert die Differenzierung zu osteochondrogenen Vorläuferzellen. Im weiteren Verlauf ist die Aktivität des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit hohen β-Catenin-Spiegeln zusammen mit Runx2, Dlx5, Msx2 und Osx für die Entwicklung zu Osteoblasten wichtig. Abkürzungen: Wnt: Zusammensetzung aus *wingless* und *integration1*, Runx2: *runt-related transcription factor 2*, Dlx5: *distal less homeobox 5*, Msx2: *msh homeobox homolog 2*, Osx: Osterix, Sox5/6/9: s*ry-type HMG box 5/6/9*

Neben der wichtigen Rolle des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs in der Regulation der Knochenentwicklung und des Knochenstoffwechsels scheint auch eine Beteiligung an der Regulation der Mechanotransduktion zu existieren. So führte die Applikation mechanischer Belastungen *in-vivo* und *in-vitro* zu einer verstärkten Expression Wnt-abhängiger Gene wie *Wnt10b*, *secreted frizzled-related protein 1* (*Sfrp1*), *Wnt1 inducible signaling pathway protein 2* (*Wisp2*) und *Cxn43* und zu einer erhöhten Sensitivität der Knochenzellen auf mechanische Reize (Robinson, Chatterjee-Kishore et al. 2006). Zudem wurde bei *Lrp5*-defizienten Mäusen eine fehlende Knochenformation nach mechanischer Belastung beobachtet (Sawakami, Robling et al. 2006) und nach mechanischer Stimulation von osteoblastären Zellen konnte eine erhöhte β-Catenin Konzentration im Zellkern gezeigt werden (Armstrong, Muzylak et al. 2007). Dabei wurden bereits mehrere

Zielgene wie *Runx2* (Kahler and Westendorf 2003; Gaur, Lengner et al. 2005; Dong, Soung do et al. 2006), *Rankl* (Spencer, Utting et al. 2006) und *Cebpα* sowie *Pparγ* (Kang, Bennett et al. 2007) identifiziert, die durch den Wnt-Signalweg moduliert werden können und im Zusammenhang mit dem mechanisch induzierten Knochen*remodeling* stehen.

1.7. Die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren

1.7.1. Struktur und Expression

Midkine (Mdk) ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der 1988 erstmals bei Untersuchungen der Differenzierung von embryonalen Teratokarzinomzellen als Produkt eines durch Retinolsäure induzierbaren Gens beschrieben wurde (Kadomatsu, Tomomura et al. 1988; Kaname, Kuwano et al. 1993). Mdk bildet zusammen mit Pleiotrophin (Ptn), das 1989 aus dem sich entwickelnden Gehirn von Ratten nach der Geburt isoliert wurde (Rauvala 1989), eine hochkonservierte Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren. Die beiden Wachstumsfaktoren besitzen untereinander eine 45-prozentige Sequenzhomologie der am Aufbau beteiligten Aminosäuren und unterscheiden sich strukturell von anderen Gruppen von Wachstumsfaktoren (Tsutsui, Uehara et al. 1991; Muramatsu 1993). Das humane Midkine-Gen befindet sich auf Chromosom 11 (Kaname, Kuwano et al. 1993) und das der Maus auf Chromosom 2 (Simon-Chazottes, Matsubara et al. 1992). Die Sequenz des humanen und murinen Midkine ist hochkonserviert und zeigt eine 87-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuren (Tsutsui, Uehara et al. 1991). In der Promotorregion des *Mdk*-Gens befindet sich ein *retinoic acid responsive element* (Rare) (Matsubara, Take et al. 1994), eine Bindungsstelle für Wt1 (das Produkt des *Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1*) (Adachi, Matsubara et al. 1996) und für den *hypoxia-inducible factor 1α* (Hif1a) (Reynolds, Mucenski et al. 2004). Das humane Pleiotrophin-Gen befindet sich hingegen auf Chromosom 7 und das der Maus auf Chromosom 6 (Li, Hoffman et al. 1992). Die Expression von Mdk ist während der mittleren Gestationsperiode der Embryonalentwicklung am stärksten ausgeprägt (Kadomatsu and Muramatsu 2004). Mdk ist ab dem siebten Tag der Embryogenese von Mäusen detektierbar. An Tag 11 bis 13 nimmt die Mdk-Expression ab und an Tag 15 ist Mdk nur noch in den Nieren detektierbar

(daher kommt der Name: Midkine ist eine Zusammensetzung aus *midgestation* und *kidney*) (Kadomatsu, Huang et al. 1990; Mitsiadis, Salmivirta et al. 1995). Die Expression von Ptn, das auch als *heparin-binding growth-associated molecule* (HB-GAM), *osteoblast-specific factor 1* (Osf1) (Tezuka, Takeshita et al. 1990), *heparin affin regulatory peptide* (HARP) (Bernard-Pierrot, Heroult et al. 1999) und *heparin binding neurotrophic factor* (HBNF) (Kovesdi, Fairhurst et al. 1990) bekannt ist, ist hingegen etwas später - zum Zeitpunkt der Geburt - am stärksten ausgeprägt (Kadomatsu and Muramatsu 2004). In adulten Geweben ist die Expression der beiden Wachstumsfaktoren allerdings begrenzt (Muramatsu 2002; Kadomatsu and Muramatsu 2004).

1.7.2. Funktionen

Mdk und Ptn haben eine Vielzahl von Funktionen. Sie stimulieren die Migration von embryonalen Neuronen und Osteoblasten (Imai, Kaksonen et al. 1998; Qi, Ikematsu et al. 2001) und fördern das Neuritenwachstum von embryonalen Neuronen (Rauvala 1989; Muramatsu 1993). Zudem spielen beide Wachstumsfaktoren in der Tumorbiologie eine wichtige Rolle. So konnte sowohl für Mdk als auch für Ptn eine maligne Transformation von NIH/3T3-Zellen *in-vitro* gezeigt werden (Chauhan, Li et al. 1993; Kadomatsu, Hagihara et al. 1997). Dabei ist Ptn an der Kontrolle des Wachstums von Tumorzellen sowie an der Metastasierung und Angiogenese von Tumoren beteiligt (Perez-Pinera, Chang et al. 2007) und wird in einer Vielzahl maligner Tumore wie dem humanen Mammakarzinom (Fang, Hartmann et al. 1992), Prostatakarzinom (Vacherot, Caruelle et al. 1999) und Kolonkarzinom (Souttou, Juhl et al. 1998) exprimiert. Ebenso wurde eine verstärkte Expression von Mdk in einer Vielzahl humaner Tumore wie dem Ösophagus-, Magen-, Kolon, Mamma-, Schilddrüsen-, Lungen-, Prostata-, Harnblasenkarzinom und dem hepatozellulären Karzinom nachgewiesen. Dabei korreliert eine hohe Expression von Ptn mit einer eher guten Prognose (Nakagawara, Milbrandt et al. 1995) und eine hohe Expression von Mdk mit einer schlechteren Prognose (Tsutsui, Kadomatsu et al. 1993; Aridome, Tsutsui et al. 1995; Muramatsu 2002; Shimada, Nabeya et al. 2003). Die Entwicklung von Mdk-Inhibitoren könnte eine Möglichkeit darstellen zur Tumortherapie beizutragen (Muramatsu 2010).

1.7.3. Einfluss auf den Knochenstoffwechsel

Auch in Bezug auf den Knochenstoffwechsel konnte ein Einfluss der beiden Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden.

Ptn wird postnatal vor allem im Knochen und Gehirn von Mäusen exprimiert. Ebenso zeigten murine osteoblastäre MC3T3-E1-Zellen eine starke Expression von Ptn (Tezuka, Takeshita et al. 1990; Tare, Oreffo et al. 2002). Ptn stimuliert zudem die Migration, Differenzierung und Matrixsynthese von Osteoblasten und eine lokale Schädigung von Knochengewebe führte zu einer verstärkten Expression in Osteozyten (Imai, Kaksonen et al. 1998; Tare, Oreffo et al. 2002; Yang, Tare et al. 2003). Eine Ptn-Überexpression im Mausmodell führte zu einem Knochenphänotyp mit erhöhter Knochenmineraldichte und der Verlust von Knochenmasse durch Östrogenmangel nach Ovariektomie führte bei den transgenen Mäusen zu einer Knochenmasse, die der von nicht-ovariektomierten Wildtyp-Kontroll-Mäusen entsprach (Masuda, Tsujimura et al. 1997; Tare, Oreffo et al. 2002). Desweiteren zeigte die Untersuchung der Langzeiteffekte einer Ptn-Überexpression im Mausmodell, dass sich ein in der Knochenentwicklung anfänglich fortgeschrittenes Knochenwachstum später ausgleichte und die Knochen im Alter porös und brüchig waren. Zudem zeigte sich bei den transgenen Mäusen eine beeinträchtigte Frakturheilung sowie eine verzögerte Kallusbildung und ein verzögertes Knochen*remodeling* (Li, Bunn et al. 2005).

Eine mechanische Stimulation der Tibia von weiblichen Mäusen des Stammes *C57BL/6J* mittels Vier-Punkt-Biegung führte zu einer verstärkten Ptn-Expression (Xing, Baylink et al. 2005). Allerdings konnten bei der Untersuchung eines *Ptn*-defizienten Mausmodells keine signifikanten Unterschiede nach mechanischer *in-vivo* Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren nachgewiesen werden. Daher wurde vermutet, dass Ptn keine Schlüsselrolle bei dem mechanisch induzierten Knochen*remodeling in-vivo* spielt bzw. bei Fehlen von Ptn die Funktion von anderen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Mdk, übernommen wird (Kesavan and Mohan 2008).

Schließlich konnte auch ein Einfluss von Mdk auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden. So wurde eine Mdk-Expression in verschiedenen Geweben wie Femur, Calvaria, Leber, Niere und Gehirn von adulten Mäusen sowie in humanen Osteoblasten,

Osteozyten und Osteoklasten gezeigt (Neunaber 2009). Zudem wurde gezeigt, dass Mdk während der Frakturheilung exprimiert wird und die Chondrogenese fördert (Ohta, Muramatsu et al. 1999). Bei *in-vitro* Untersuchungen zur Differenzierung primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien zeigte sich im Verlauf eine Zunahme der Mdk-Expression und eine Zugabe von Mdk führte zu einer verringerten Expression von c-Fos und dem Proliferationsmarker H4 (Zöllner 2008). In weiteren Zellkulturversuchen zeigten *Mdk*-defiziente Osteoblasten eine erhöhte Aktivität der Alpl und einen erhöhten Mineralisationsgrad (Neunaber 2009). Bei der Untersuchung eines *Mdk*-defizienten Mausmodells zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen, eine erhöhte *mineralizing surface* und *bone formation rate* und im Alter von 18 Monaten zudem eine erhöhte Osteoblastenzahl und Osteoblastenoberfläche (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010). Diese Ergebnisse weisen auf einen negativen Einfluss von Mdk auf das Knochen*remodeling* und die trabekuläre Knochenmasse hin.

Die Rolle von Mdk bei dem mechanisch induzierten Knochen*remodeling in-vivo* wurde bisher allerdings noch nicht untersucht.

1.7.4. Rezeptoren des Heparin-bindenden Wachstumsfaktors Midkine

Der Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ ζ (Ptprζ) ist eine Komponente des Mdk-Rezeptors und wird stark im zentralen Nervensystem exprimiert. Ptprζ ist ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan mit einer intrazellulären Tyrosinphosphatase-Domäne. Es ist der Mdk-Rezeptor, der für die Migration von embryonalen Neuronen und Osteoblasten-ähnlichen Zellen verantwortlich ist (Maeda, Ichihara-Tanaka et al. 1999; Qi, Ikematsu et al. 2001). Mdk bindet zudem an Mitglieder der Lrp-Familie (Muramatsu, Zou et al. 2000) und an $\alpha_4\beta_1$- und $\alpha_6\beta_1$-Integrin (Muramatsu, Zou et al. 2004). Es wird vermutet, dass nach Bindung von Mdk an den Rezeptorkomplex, bestehend aus Ptprζ, Integrinen und Lrp, eine src-Kinase, die sich sonst in einem inaktiven Zustand befindet, aktiviert wird und dadurch die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung weiterer Signalmoleküle zunimmt (Abbildung 4). Als Substrate von Ptprζ wurden CIT1/Cat-1 (Kawachi, Fujikawa et al. 2001) und β-Catenin (Meng, Rodriguez-Pena et al. 2000) identifiziert. Somit könnte über die Beeinflussung der intrazellulären β-Catenin-Spiegel

eine Modulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs erfolgen und so ein Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel bestehen.

Desweiteren konnte eine Bindung von Mdk an Mitglieder der Syndecan-Familie (Kojima, Katsumi et al. 1996; Nakanishi, Kadomatsu et al. 1997), *anaplastic lymphoma kinase* (Alk) (Stoica, Kuo et al. 2002), Neuroglycan C (Ichihara-Tanaka, Oohira et al. 2006) und Nucleolin (Take, Tsutsui et al. 1994) nachgewiesen werden.

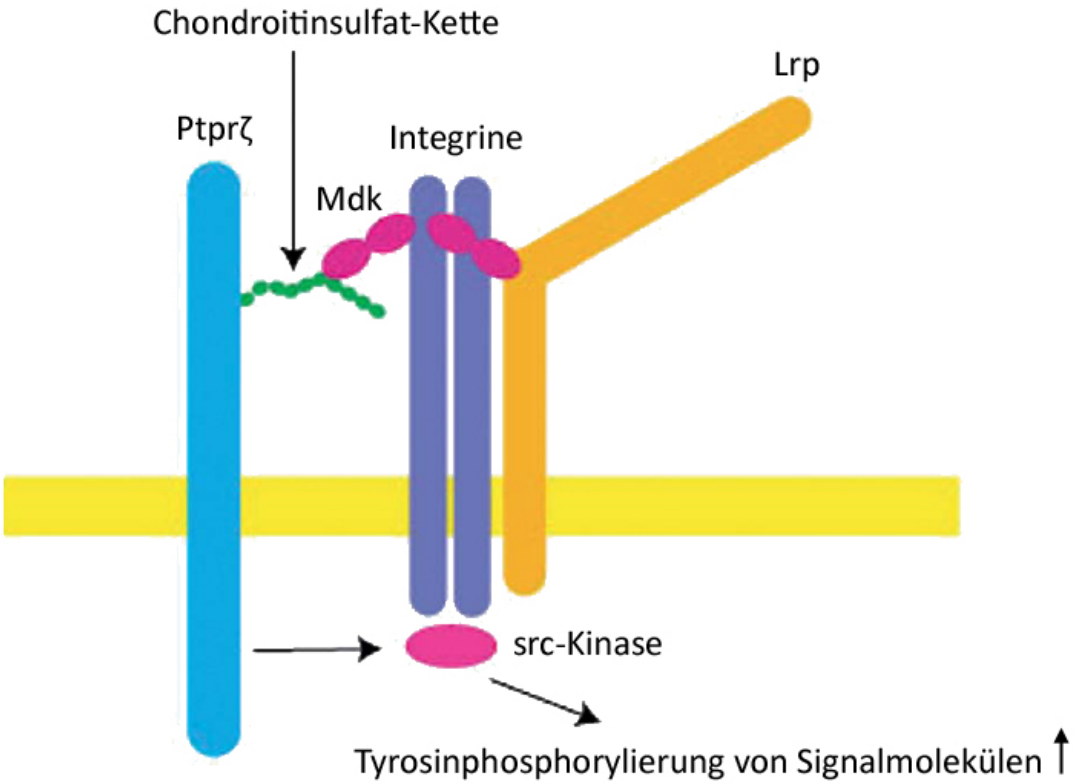


Abbildung 4: Schema der möglichen Interaktion von Mdk und Ptprζ nach Muramatsu (Muramatsu 2010)

Mdk bindet als Dimer an Komponenten des Rezeptorkomplexes aus Ptprζ, Integrinen und Lrp bestehend und fördert dessen Formation. Durch die Bindung eines Mdk-Dimers an die Chondroitinsulfat-Kette von Ptprζ und die Integrine nähert sich die zytoplasmatische Tyrosinphosphatase-Domäne von Ptprζ der zytoplasmatischen Domäne der Integrine an. Dadurch wird eine src-Kinase aktiviert und die Tyrosinphosphorylierung weiterer Signalmoleküle nimmt zu. Abkürzungen: Mdk: Midkine, Ptprζ: Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ ζ, Lrp: *low density lipoprotein receptor-related protein*

1.8. Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass die mechanische Belastung über die Aktivierung verschiedener Signalmoleküle und Signaltransduktionswege einen Einfluss auf das Knochen*remodeling* hat. Dabei sind allerdings weder die beteiligten Signalstoffe bzw. Wachstumsfaktoren noch die beteiligten Signaltransduktionswege, die einen Einfluss auf die Mechanotransduktion und das Knochen*remodeling* haben, vollständig aufgeklärt worden. Zudem ist nicht genau bekannt welche Rolle der Wachstumsfaktor Mdk und der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg bei dem mechanisch induzierten Knochen*remodeling in-vivo* spielen.

Um den Einfluss von Mdk auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo* zu untersuchen, wurden die jeweils rechten Tibiae und Ulnae von *Mdk*-defizienten Mäusen und von *Mdk*-positiven Mäusen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Anschließend wurden die mechanisch induzierten Veränderungen in beiden Mausgruppen durch die Analyse von Micro-Computertomogramm-Bildern und der biomechanischen Eigenschaften bestimmt und innerhalb der beiden Mausgruppen (rechte stimulierte Seite und linke nicht-stimulierte Seite) sowie zwischen den beiden Genotypen miteinander verglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat der Wachstumsfaktor Mdk auf die kortikale Knochenstruktur (Kortikalisdicke, mineralisiertes Kortikalisvolumen, mineralisiertes Geflechtknochen-volumen), das Flächenträgheitsmoment und die biomechanischen Eigenschaften der Tibia
   - ohne und zusammen mit einer mechanischen *in-vivo* Stimulation mittels einer dynamischen Vier-Punkt-Biegung?
   - ohne und zusammen mit einer mechanischen *in-vivo* Stimulation mittels einer Druckbelastung (*sham loading*)?
2. Welchen Einfluss hat der Wachstumsfaktor Mdk auf die kortikale Knochenstruktur (Kortikalisdicke, *Tissue Area*, *Bone Area*, *Marrow Area*, mineralisiertes Kortikalisvolumen), das Flächenträgheitsmoment und die biomechanischen Eigenschaften der Ulna ohne und zusammen mit einer mechanischen *in-vivo* Stimulation mittels einer dynamischen axialen Kompression?

2. Material und Methoden

2.1. Arbeitsmaterialien

Tabelle 1: Arbeitsmaterialien

Abkürzungen: NaCl: Natriumchlorid

Bezeichnung	**Hersteller/Vertrieb**	**Ort**
Alizarin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, Deutschland
Aluminiumhülsen	Werkstatt der Universitätsklinik Ulm	Ulm, Deutschland
Augengel (Vidisic®)	Dr. Mann Pharma GmbH	Berlin, Deutschland
Blaulichtlampe	Exakt	Hamburg, Deutschland
Calcein	Synopharm GmbH	Barsbüttel, Deutschland
Ethanol	Hausapotheke	Universität Ulm
Kleber (I-Cem® Self Adhesive)	Heraeus Kulzer GmbH	Hanau, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott Biotechnology GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Krokodilsklemmen	Werkstatt der Universitätsklinik Ulm	Ulm, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun AG	Melsungen, Deutschland

2.2. Geräte und Software

Tabelle 2: Geräte

Abkürzungen: µCT: Micro-Computertomogramm

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Inhalationsanästhesie-Arbeitsplatz	verschiedene Komponenten	Foehr Medical Instruments GmbH	Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Kraftmessdose	50 N	A.S.T.	Dresden, Deutschland
Materialprüfmaschine	Z010	Zwick GmbH & Co KG	Ulm, Deutschland
Stimulationsmaschine		Werkstatt der Universitätsklinik Ulm	Ulm, Deutschland
µCT-Gerät	Fan Beam µ-Scope	STRATEC Medizintechnik GmbH	Pforzheim, Deutschland

Tabelle 3: Software

Bezeichnung	Version	Hersteller/Vertrieb	Ort
CT Analyser	1.10.1.3, 64-bit	SkyScan	Kontich, Belgien
DataViewer	1.4.3	SkyScan	Kontich, Belgien
PASW Statistics 18	18.0.0 für Windows	SPSS GmbH	München, Deutschland
VGStudioMax	1.0 (build 129)	Volume Graphics GmbH	Heidelberg, Deutschland

2.3. Versuchstiere und Haltung

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 28 weibliche Versuchstiere im Alter von 51 bis 54 Wochen des Stammes *C57BL/6* mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 28 Gramm eingesetzt (Tabelle 4). Davon waren 15 Mäuse *Mdk*-positiv (*Mdk +/+*, WT-Maus) und 13 Mäuse *Mdk*-defizient (*Mdk -/-*, KO-Maus). Die *Mdk*-defizienten Mäuse wurden von Prof. Muramatsu *et al.* (Departement of Biochemistry, Nagoya University School of Medicine) generiert (Nakamura, Kadomatsu et al. 1998) und uns für unsere Studie freundlicherweise von Prof. Amling (Zentrum für Biomechanik und Skelettbiologie, Hamburg-Eppendorf) überlassen.

Die Mäuse wurden in klimatisierten und fensterlosen Räumen des Tierforschungszentrums der Universität Ulm in mit Weichholzspänen bedeckten Käfigen (je drei bis fünf Mäuse pro Käfig) nach Genotyp getrennt gehalten. Die Tiere unterlagen einem normalen Tag-Nacht-Rhythmus und erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Registernummer 851).

Tabelle 4: Überblick über die Anzahl und Verteilung der Versuchstiere

Abkürzungen: µCT: Micro-Computertomogramm, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient

	Genotyp	**Anzahl der Versuchstiere**
Biomechanik	*Mdk +/+*	8
	Mdk -/-	6
µCT	*Mdk +/+*	7
	Mdk -/-	7
Summe	*Mdk +/+*	15
	Mdk -/-	13
Tiere insgesamt	*Mdk +/+* und *Mdk -/-*	28

2.4. Mechanische nicht-invasive in-vivo Belastung der Tibia und Ulna

Um den *in-vivo* Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* und die mechanisch induzierten Veränderungen der kortikalen Knochenstruktur, des Flächenträgheitsmoments (FTM) und der biomechanischen Eigenschaften von Tibia und Ulna zu untersuchen, wurde die jeweils rechte Tibia einer Maus mittels dynamischer Vier-Punkt-Biegung und die jeweils rechte Ulna einer Maus mittels dynamischer axialer Kompression mechanisch *in-vivo* belastet. Die jeweils nicht-belasteten linken Tibiae und Ulnae jeder Maus dienten als interne Kontrollen zu den mechanisch belasteten Knochen. Zusätzlich wurde bei zwei *Mdk*-positiven und bei zwei *Mdk*-defizienten Mäusen die jeweils linke Tibia auf Druck belastet (*sham loading*), um die Effekte des Drucks der Auflageflächen bei der mechanischen Stimulation - der auch bei der Vier-Punkt-Biegung besteht - zu untersuchen und zu charakterisieren.

2.4.1. Dynamische Vier-Punkt-Biegung der rechten Tibia

Für die mechanische *in-vivo* Stimulation der Tibia wurde eine Vier-Punkt-Biegung durchgeführt (Abbildung 5). Das Modell der Vier-Punkt-Biegung wurde 1991 von Turner *et al.* als erstes nicht-invasives *in-vivo* Belastungsmodell zur Untersuchung des belastungsinduzierten Knochen*remodelings* an Rattentibiae entwickelt (Turner, Akhter et al. 1991). Dieses Belastungsmodell wurde - zum Teil modifiziert - in zahlreichen weiteren Studien an Ratten und später auch an Mäusen angewendet (Raab-Cullen, Akhter et al. 1994; Turner, Forwood et al. 1994; Forwood and Turner 1995; Akhter, Cullen et al. 1998; Pedersen, Akhter et al. 1999; Cullen, Smith et al. 2001; Hagino, Okano et al. 2001; Kesavan, Mohan et al. 2005; Lau, Kapur et al. 2006; Robinson, Chatterjee-Kishore et al. 2006; Kuruvilla, Fox et al. 2008). Durch den Versuchsaufbau kommt es zu einer Kompression an der *lateralen* und zu einer Zugdehnung an der *medialen* Knochenoberfläche der Tibia.

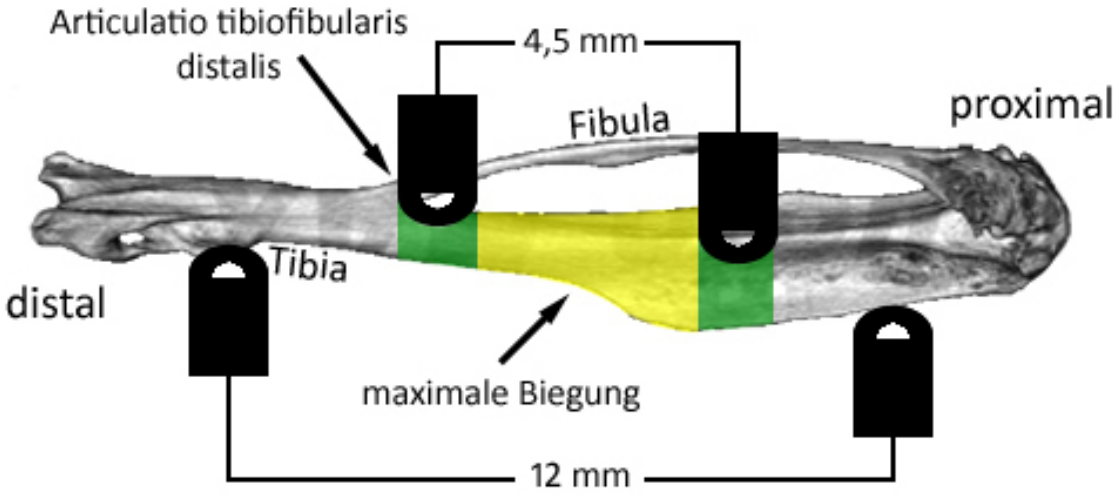


Abbildung 5: Schematische Darstellung der dynamischen Vier-Punkt-Biegung der Tibia nach Akhter *et al.* (Akhter, Cullen et al. 1998)

Die Tibia befindet sich bei der Vier-Punkt-Biegung auf zwei fest montierten unteren Auflageflächen, die 12 mm voneinander entfernt sind. Über zwei in der horizontalen Ebene bewegliche obere Auflageflächen, die 4,5 mm voneinander entfernt sind, erfolgt die Kraftübertragung und Belastung durch die Muskulatur und das Weichteilgewebe hindurch auf die *laterale* Knochenoberfläche der Tibia. Dabei entsteht zwischen den beiden oberen (inneren) Auflageflächen eine Region mit maximaler Biegung (gelb dargestellt). An der *lateralen* Knochenoberfläche kommt es zu einer Kompression und an der *medialen* Knochenoberfläche kommt es zu einer Zugdehnung.

2.4.2. Druckbelastung der linken Tibia

Bereits Turner *et al.* (Turner, Akhter et al. 1991), die das Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia entwickelt haben, untersuchten neben der Knochenantwort auf die mechanische Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung auch die Knochenantwort, die nach einer Druckbelastung (*sham loading*) der Tibia auftritt. In der vorliegenden Studie wurde dazu die jeweils linke Tibia von zwei WT-Mäusen und zwei KO-Mäusen auf Druck belastet (Abbildung 6). Dieser Versuchsaufbau diente der Untersuchung der Effekte, die durch den Druck der Auflageflächen, der ebenso bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia auftritt, verursacht werden.

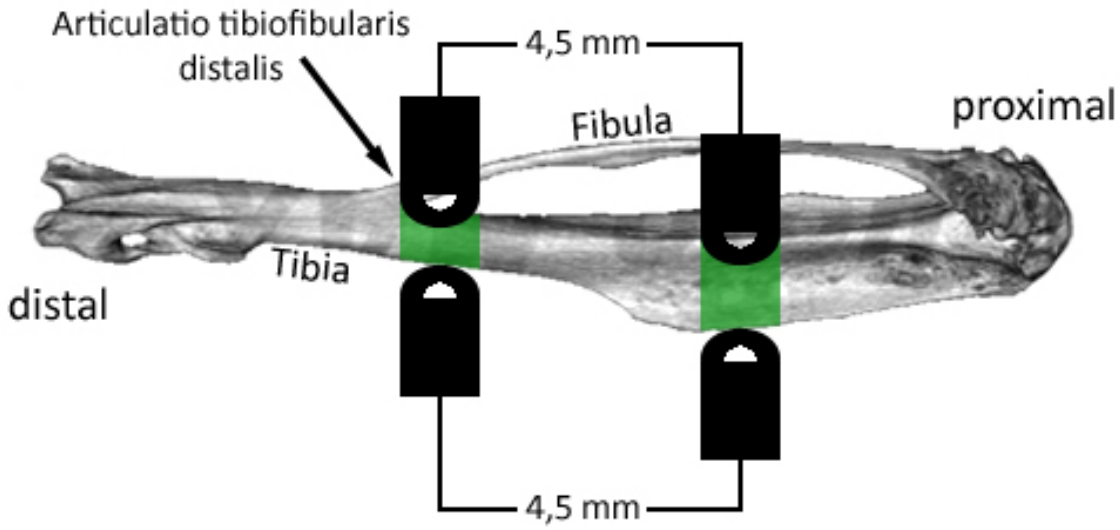


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Druckbelastung (*sham loading*) der Tibia nach Akhter *et al.* (Akhter, Cullen et al. 1998)

Die Tibia befindet sich bei der Druckbelastung auf zwei fest montierten unteren Auflageflächen, die ebenso wie die beiden in der horizontalen Ebene beweglichen oberen Auflageflächen 4,5 mm voneinander entfernt sind. Die Kraftübertragung und Belastung erfolgt durch das Weichteilgewebe und die Muskulatur hindurch auf die *laterale* Knochenoberfläche. Bei der Druckbelastung der Tibia entsteht im Gegensatz zu der Vier-Punkt-Biegung vor allem eine Druckbelastung durch die Auflageflächen (grün dargestellt).

2.4.3. Dynamische axiale Kompression der rechten Ulna

Für die mechanische Stimulation der Ulna wurde eine dynamische axiale Kompression durchgeführt. Das Modell der axialen Kompression der Ulna zur Untersuchung des mechanisch induzierten Knochen*remodelings in-vivo* wurde 1994 von Torrance *et al.* entwickelt (Torrance, Mosley et al. 1994). Dieses Modell wurde - zum Teil modifiziert - in zahlreichen weiteren Studien an Ratten (Mosley, March et al. 1997; Mosley and Lanyon 1998; Robling, Duijvelaar et al. 2001; Robling, Hinant et al. 2002) und an Mäusen (Lee, Maxwell et al. 2002; Robling and Turner 2002; Lee, Jessop et al. 2004; Alam, Warden et al. 2005; Warden, Hurst et al. 2005; Sawakami, Robling et al. 2006) angewendet. Durch den Versuchsaufbau kommt es zu einer Verstärkung der natürlichen *medio-lateralen* Krümmung der Ulna mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugdehnung an der *lateralen* Knochenoberfläche (Lee, Maxwell et al. 2002; Warden and Turner 2004; Alam, Warden et al. 2005) (Abbildung 7).

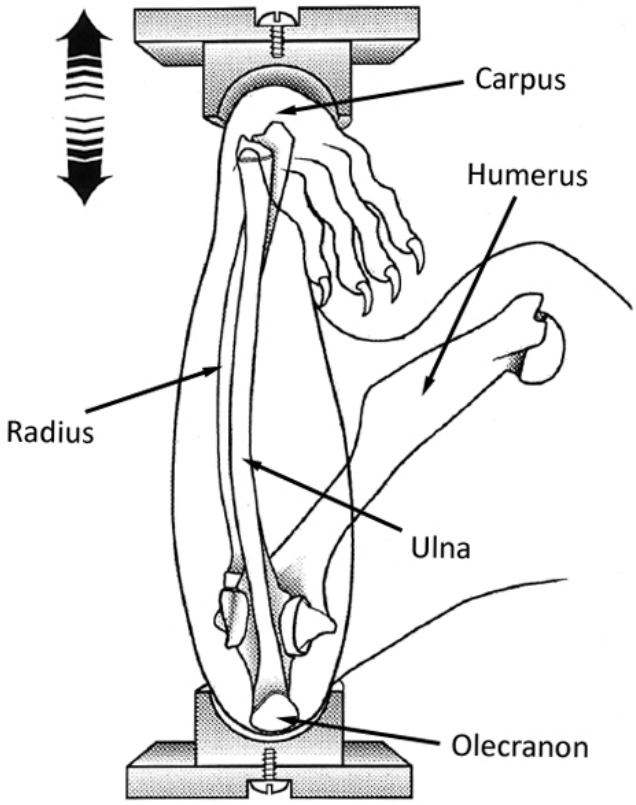


Abbildung 7: Schematische Darstellung der dynamischen axialen Kompression der Ulna nach Robling *et al.* (Robling, Hinant et al. 2002)

Die Ulna wird mit dem Olecranon der Ulna des flektierten Ellenbogengelenks und mit flektiertem Carpus senkrecht zwischen zwei Zylindern positioniert. Dabei ist der obere Zylinder in der horizontalen Ebene beweglich und führt zu einer axialen Kompression der Ulna entlang der Knochenachse. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der natürlichen *medio-lateralen* Kurvatur der Ulna mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugdehnung an der *lateralen* Knochenoberfläche.

2.4.4. Stimulationsmaschine und Kalibrierung

Die nicht-invasive Vier-Punkt-Biegung der Tibia, die nicht-invasive Druckbelastung der Tibia und die nicht-invasive axiale Kompression der Ulna erfolgten mit Hilfe einer Stimulationsmaschine (Abbildung 8), die am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm nach dem Vorbild von Akhter *et al.* für die Tibia (Akhter, Cullen et al. 1998) und Lee *et al.* für die Ulna (Lee, Maxwell et al. 2002) konstruiert und gebaut wurde. Dabei ist es durch den Wechsel der Komponenten zur Belastung der Tibia und Ulna sowie der zur Stimulation verwendeten Gewichte möglich, die Tibia und Ulna einer Maus direkt nacheinander mechanisch zu stimulieren.

Für ein ausreichendes Knochen*remodeling* durch mechanische Stimulation ist eine Belastung von ca. 1000 bis 3000 µstrain (1000 µstrain entsprechen einer Längenänderung von 0,1 Prozent) nötig (Turner and Pavalko 1998; Burr, Robling et al. 2002; LaMothe, Hamilton et al. 2005). Um die dazu notwendige Kraft festzustellen, erfolgte zunächst eine Kalibrierung der Stimulationsmaschine (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden an fünf weiblichen *Mdk*-defizienten und an sechs *Mdk*-positiven Mäusen *ex-vivo* Dehnungsmessungen mit Hilfe von Dehnungsmessstreifen, die zentral an der *medialen* Knochenoberfläche der Tibia bzw. Ulna befestigt wurden, durchgeführt. Die Tibiae und Ulnae wurden dabei wie im späteren *in-vivo* Versuch in der Stimulationsmaschine positioniert und mit Kräften von 0,5 bis 5,5 Newton (N) belastet. Die dabei auftretenden Belastungen wurden mit den Dehnungsmessstreifen gemessen. Es wurde eine Belastung von ca. 2000 µstrain angestrebt, da es bei dieser Belastung vor allem zu einer Formation von Lamellenknochen kommt (Akhter, Cullen et al. 2002; Lee, Maxwell et al. 2002).

Das Resultat der Kalibrierung ergab, dass eine Kraft von 5 N zur mechanischen Stimulation der Tibia und von 2,5 N zur mechanischen Stimulation der Ulna notwendig ist, um eine Belastung von ca. 2000 µstrain an der periostalen Knochenoberfläche der Tibia bzw. Ulna zu erreichen.

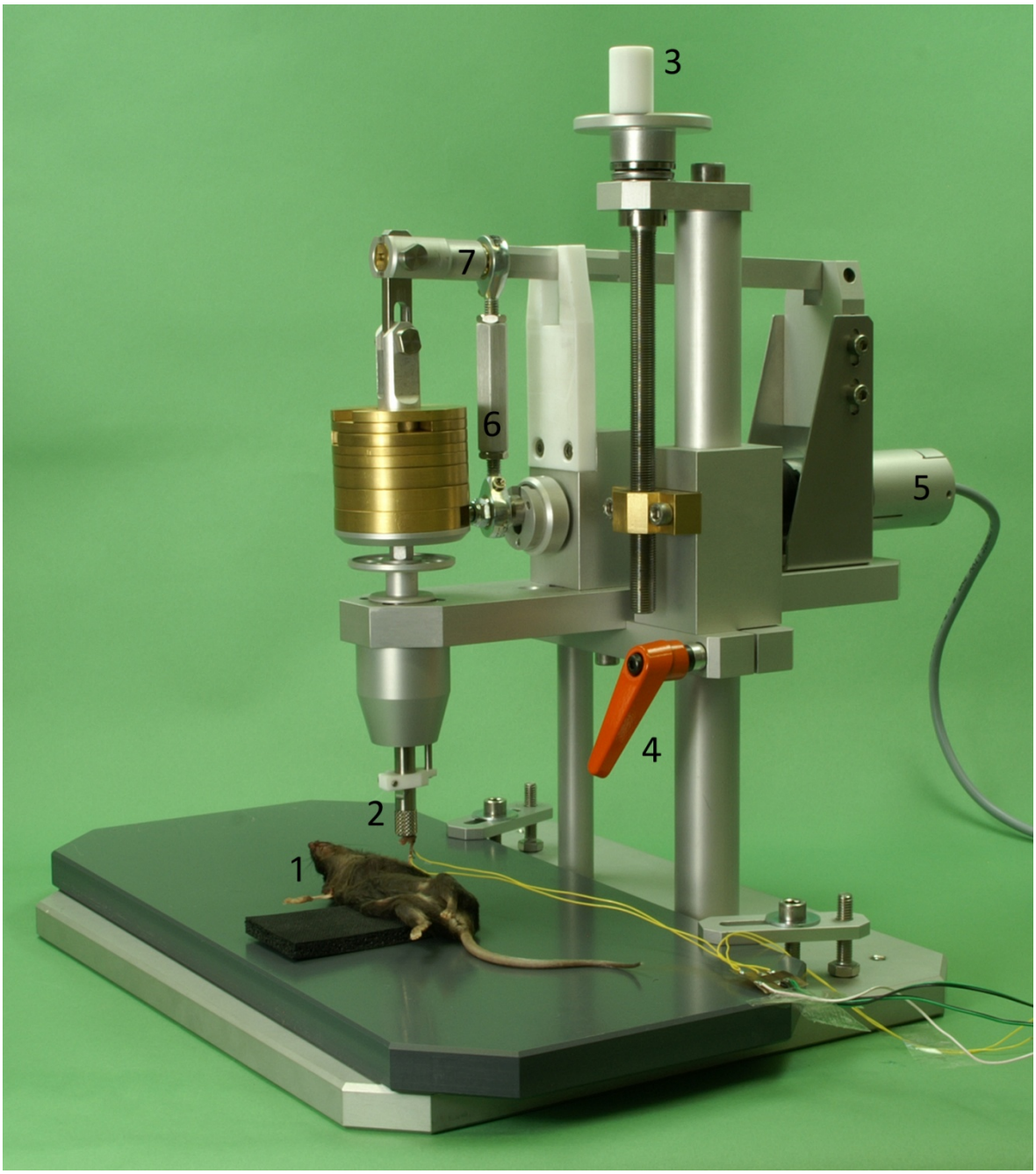


Abbildung 8: Stimulationsmaschine mit einer Maus während der *ex-vivo* Kalibrierung

Für die mechanische Stimulation werden die Mäuse manuell korrekt auf der Grundplatte (**1**) positioniert. Anschließend wird der Stimulations-Stempel (**2**) über eine Kurbel (**3**) bis zum Kontakt mit der Maus abgesenkt und über einen Hebel (**4**) gesichert. Die Rotation des Elektromotors (**5**) wird über eine senkrechte Achse (**6**) auf den Gewichtarm (**7**) übertragen. Die Gewichte werden dadurch angehoben und fallen anschließend nach unten und führen so zu einer mechanischen Belastung der Mausknochen. Die Frequenz des Elektromotors und damit die Belastungsfrequenz kann über einen Frequenzmodulator (nicht abgebildet) eingestellt werden. Ebenso lassen sich die Gewichte auswechseln, um verschieden große Belastungen applizieren zu können.

2.4.5. Narkose

Um den Mäusen während der Stimulation keine Schmerzen zuzufügen und eine Ruhigstellung für die korrekte Positionierung in der Stimulationsmaschine zu ermöglichen, wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Forene®, Abbott Biotechnology GmbH, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert.

Die Applikation erfolgte mit Hilfe eines Inhalationsanästhesie-Arbeitsplatzes für kleine Labortiere (Foehr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland). Das Isofluran wurde zunächst in einem Gasmisch-Element mit Sauerstoff gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in einem Isofluran-Verdampfer in Gasform gebracht. Das fertige Isofluran-Sauerstoff-Gasgemisch wurde über einen Drei-Wege-Hahn entweder zu einer angeschlossenen Inhalationsanästhesie-Kammer oder zu einer Inhalationsanästhesie-Gesichtsmaske mit zwischengeschaltetem Atemluftbefeuchter geleitet. Sowohl die Anästhesie-Kammer als auch die Anästhesie-Maske standen mit dem Raum-Abluft-System in Verbindung, um das Exhalat und die überschüssige Gasmenge aus dem Raum zu entfernen.

Die Mäuse erhielten initial eine Isofluran-Sauerstoff-Gasmischung mit 5 bis 6 Prozent Isofluran in der nach außen abgeschlossenen und abgedunkelten Inhalationsanästhesie-Kammer. Anschließend wurde die Narkose über die Inhalationsanästhesie-Gesichtsmaske mit reduzierter Isoflurankonzentration von 1,5 bis 2 Prozent bis zum Ende der Stimulation fortgeführt. Um ein Austrocknen der Korneae während der Narkosedauer von ca. zehn Minuten zu vermeiden, erhielten die Mäuse in beide Augen je einen Tropfen Augengel (Vidisic®, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland). Vor Beginn der mechanischen Stimulation wurde die Narkosetiefe über den Reflexstatus (Zwischenzehen-, Lid- und Schwanzreflex) überprüft.

2.4.6. Versuchsablauf und Stimulationsprotokoll

Die mechanische Stimulation der Mäuse erstreckte sich über einen Zeitraum von 16 Tagen (Abbildung 9). An den Tagen 1 bis 5 sowie an den Tagen 8 bis 12 erfolgte täglich zur gleichen Zeit eine mechanische Stimulation der rechten Ulna und direkt im Anschluss der rechten Tibia einer Maus. Zudem erfolgte bei jeweils zwei Tieren aus den beiden Gruppen

eine Druckbelastung (*sham loading*) der linken Tibia. Direkt nach den einzelnen Stimulationen wurden die Mäuse gewogen und die körperliche Integrität der Tiere - vor allem im Hinblick auf Frakturen - untersucht. Zudem erhielten die Tiere 0,5 ml einer isotonischen Natriumchlorid-Lösung (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) als subkutane Injektion, um einen möglichen Flüssigkeitsverlust durch die bzw. während der Narkose auszugleichen. Um den Versuchstieren eine sanfte Narkoseausleitung zu bereiten wurden sie für die Dauer bis zum vollständigen Aufwachen einzeln in gepolsterte und beheizte Käfige gesetzt. Zwischen den einzelnen Stimulationen konnten sich die Tiere frei im normalen Käfig bewegen.

An Tag 3 wurde den Tieren nach der mechanischen Stimulation und gegen Ende der Narkose in der Aufwachphase 0,1 ml Calceingrün intraperitoneal injiziert und analog dazu an Tag 12 0,15 ml Alizarinrot (Tabelle 5). Die Injektion der beiden Fluoreszenzfarbstoffe diente der histomorphometrischen Auswertung von Knochenschliffen der Tibiae und Ulnae von 24 weiteren Versuchstieren (Vogele 2010).

An den Tagen 6 und 7 sowie an den Tagen 13 bis 15 erfolgte keine mechanische Stimulation. An Tag 16 wurden die Tiere in einer mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) gefluteten Kammer getötet.

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16
S	S	S	S	S	X	X	S	S	S	S	S	X	X	X	†

Abbildung 9: Stimulationsprotokoll

An den Tagen 1 bis 5 und 8 bis 12 wurde die jeweils rechte Tibia mittels Vier-Punkt-Biegung und die jeweils rechte Ulna mittels axialer Kompression mechanisch stimuliert. Zudem erfolgte an den Stimulationstagen (S) bei jeweils zwei Mäusen aus den beiden Gruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) an der jeweils linken Tibia eine Druckbelastung (*sham loading*). An den Tagen 6 und 7 sowie an den Tagen 13 bis 15 erfolgte keine mechanische Stimulation (X). An Tag 3 erfolgte die Injektion von Calceingrün (grün dargestellt) und an Tag 12 erfolgte die Injektion von Alizarinrot (rot dargestellt). An Tag 16 wurden die Tiere getötet. Abkürzungen/Symbole: *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, S: Stimulation, X: keine Stimulation, Kreuz: Tötung der Tiere

Tabelle 5: Zusammensetzung und Darreichung der Fluoreszenzfarbstoffe Calceingrün und Alizarinrot

Abkürzungen: ml: Milliliter, g: Gramm

Farbstoff	**Calceingrün**	**Alizarinrot**
Dosis	0,1 ml pro Maus	0,15 ml pro Maus
Applikationsform	intraperitoneal	intraperitoneal
Zeitpunkt	Tag 3, Aufwachphase	Tag 12, Aufwachphase
Zusammensetzung	1. 0,22 g Natriumchlorid 2. 0,5 g Natriumbikarbonat 3. 0,25 g Calcein (Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland) 4. 25 ml destilliertes Wasser	1. 0,45 g Natriumchlorid 2. 1,0 g Natriumbikarbonat 3. 0,5 g Alizarin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) 4. 50 ml destilliertes Wasser

2.4.7. Mechanische in-vivo Belastung der Tibiae und Ulnae

- **Dynamische Vier-Punkt-Biegung der rechten Tibia**

In unserer Studie erfolgte an der jeweils rechten Tibia der weiblichen *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 51 bis 54 Wochen eine dynamische Vier-Punkt-Biegung zur mechanischen *in-vivo* Stimulation (Abbildung 10). Die jeweils linke Tibia wurde mechanisch nicht belastet und diente als interne Kontrolle zu den mechanisch belasteten Tibiae.

Für die mechanische Stimulation wurde der rechte Unterschenkel der narkotisierten Maus, die sich in Bauchlage befand, waagerecht mit der *medialen* Fläche der Tibia auf zwei mit Silikon überzogenen fest montierten unteren Auflageflächen, die 12 mm voneinander entfernt waren, positioniert. Mit Hilfe von zwei ebenfalls mit Silikon überzogenen oberen Auflageflächen im Abstand von 4,5 mm wurde durch die Muskulatur und das Weichteilgewebe hindurch auf die *laterale* Fläche der Tibia gedrückt. Über die beiden oberen, gegenüber den unteren Auflageflächen zentrierten Auflageflächen, erfolgte eine dynamische Belastung der Tibia. Durch diesen Versuchsaufbau kam es zu einer maximalen Biegung im zentralen Bereich zwischen den beiden oberen

Auflageflächen mit einer Kompression an der *lateralen* und einer Zugdehnung an der *medialen* Knochenoberfläche der Tibia.

Die Stimulation erfolgte mit einer Kraft von 5 N, was zu einer Belastung von ca. 2000 µstrain an der *medialen* Knochenoberfläche der Tibia führte. Die Stimulation erfolgte mit einer Frequenz von 2 Hz über einen Zeitraum von einer Minute, so dass insgesamt 120 Zyklen appliziert wurden. Die Positionierung, das Halten und die Lagekontrolle der Tibia erfolgten manuell durch den Untersucher. Dabei wurde die Tibia für die Dauer der mechanischen Stimulation zentriert auf den beiden unteren Auflageflächen gehalten. Es wurde eine Positionierung der unteren Auflageflächen *distal* des Kniegelenks und *distal* der *Articulatio tibiofibularis distalis* sowie eine Positionierung der beiden oberen Auflageflächen *proximal* der *Articulatio tibiofibularis distalis* angestrebt (Abbildung 5). Bei der mechanischen Stimulation war es wichtig die korrekte Positionierung während der gesamten Stimulationsdauer beizubehalten, um ein Abrutschen der Tibia und damit das Risiko einer Fehlbelastung der Fibula mit folgender Fraktur zu verhindern.

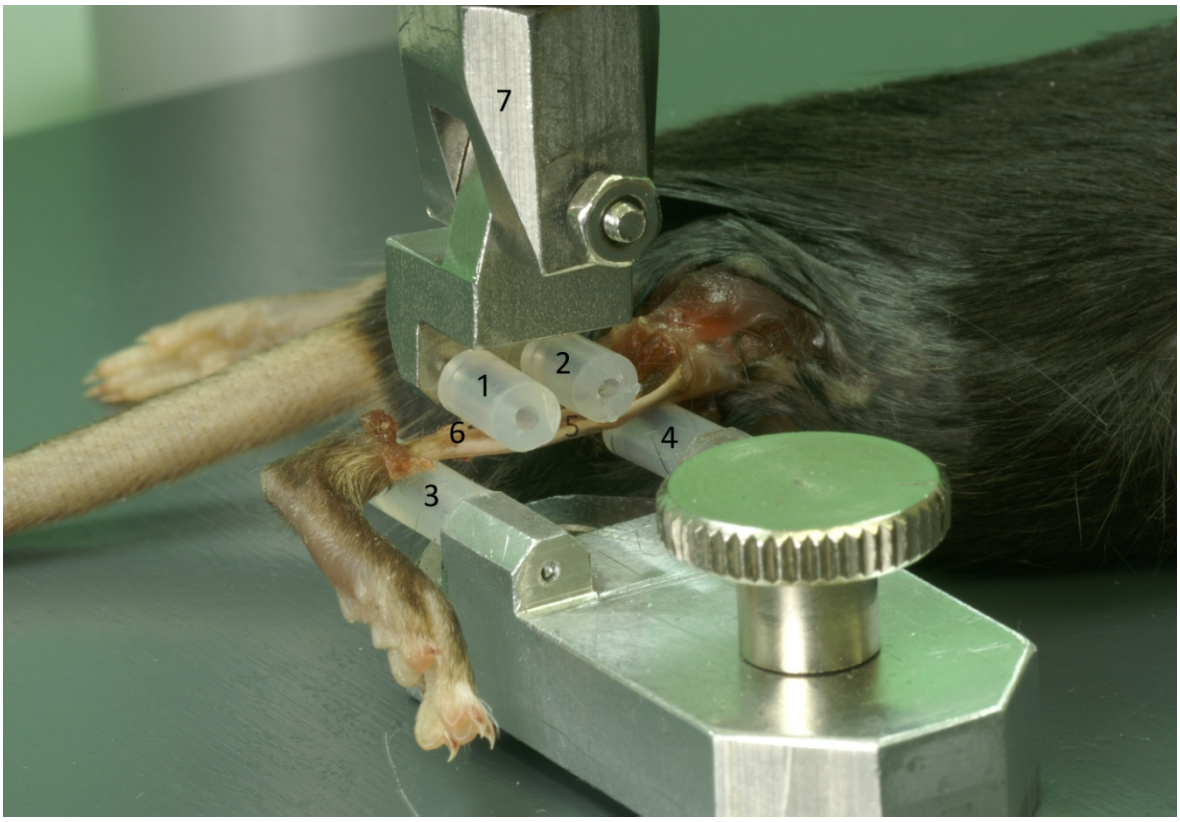


Abbildung 10: Dynamische Vier-Punkt-Biegung der rechten Tibia bei der *ex-vivo* Kalibrierung

Die beiden beweglichen oberen und mit Silikon gepolsterten Auflageflächen (**1**) und (**2**) waren 4,5 mm voneinander entfernt und gegenüber den beiden unteren fest montierten und ebenfalls mit Silikon gepolsterten Auflageflächen (**3**) und (**4**), die 12 mm voneinander entfernt waren, zentriert positioniert. Die oberen Auflageflächen drückten durch die Muskulatur und das Weichteilgewebe (auf dieser Abbildung von der *ex-vivo* Kalibrierung der Stimulationsmaschine nicht zu sehen) hindurch auf die *laterale* Fläche der Tibia (**5**). Die beiden oberen Auflageflächen (**1**) und (**2**) wurden *proximal* der *Articulatio tibiofibularis distalis* (**6**) positioniert. Die Kraftübertragung erfolgte mit Hilfe des Stimulations-Stempels (**7**) über die beiden oberen Auflageflächen.

- **Druckbelastung der linken Tibia**

In unserer Studie erfolgte bei zwei WT-Mäusen und bei zwei KO-Mäusen eine Druckbelastung (*sham loading*) der linken Tibia (Abbildung 6). Diese Tibiae dienten nicht als interne Kontrollen zu den rechten mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten Tibiae sondern zur Untersuchung der Knochenantwort, die durch den Druck der Auflageflächen, der ebenso bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia auftritt, verursacht wird.

Dazu wurde - analog zur Stimulation der rechten Tibia - der linke Unterschenkel der narkotisierten Maus in Bauchlage mit der *medialen* Tibiafläche waagerecht auf zwei mit Silikon überzogenen fest montierten Auflageflächen, die 4,5 mm voneinander entfernt

waren, positioniert. Mit Hilfe von zwei mit Silikon überzogenen beweglichen oberen Auflageflächen, die ebenfalls 4,5 mm voneinander entfernt waren, wurde durch die Muskulatur und das Weichteilgewebe hindurch auf die *laterale* Tibiafläche gedrückt. Durch diesen Versuchsaufbau wurde im Kontaktbereich der Auflageflächen Druck auf die Tibia ausgeübt. Die Tibiae wurden wie bei der Vier-Punkt-Biegung mit einer Kraft von 5 N belastet und es wurden insgesamt 120 Zyklen mit einer Frequenz von 2 Hz über einen Zeitraum von einer Minute appliziert.

- **Dynamische axiale Kompression der rechten Ulna**

In unserer Studie wurde die jeweils rechte Ulna der weiblichen *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 51 bis 54 Wochen mittels dynamischer axialer Kompression mechanisch stimuliert. Die jeweils linke Ulna wurde mechanisch nicht belastet und diente als interne Kontrolle zu den mechanisch belasteten Ulnae.

Für die mechanische *in-vivo* Stimulation wurde die rechte Ulna der narkotisierten Maus, die sich in Rückenlage befand, senkrecht zwischen zwei becherförmigen und mit Silikon gepolsterten Zylindern fixiert. In dem unteren fest montierten Zylinder wurde das Olecranon der Ulna bei flektiertem Ellenbogengelenk positioniert und in dem beweglichen oberen Zylinder der flektierte Carpus. Die dynamische axiale Kompression entlang der Knochenachse der Ulna mit einer Kraft von 2,5 N führte zu einer Belastung von ca. 2000 µstrain an der *medialen* Knochenoberfläche. Durch die axiale Kompression kam es zu einer Verstärkung der natürlichen *medio-lateralen* Krümmung der Ulna mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugdehnung an der *lateralen* Knochenoberfläche. Es wurde analog zu der Stimulation der Tibia mit einer Frequenz von 2 Hz über einen Zeitraum von einer Minute stimuliert, so dass insgesamt 120 Zyklen appliziert wurden (Abbildung 11).

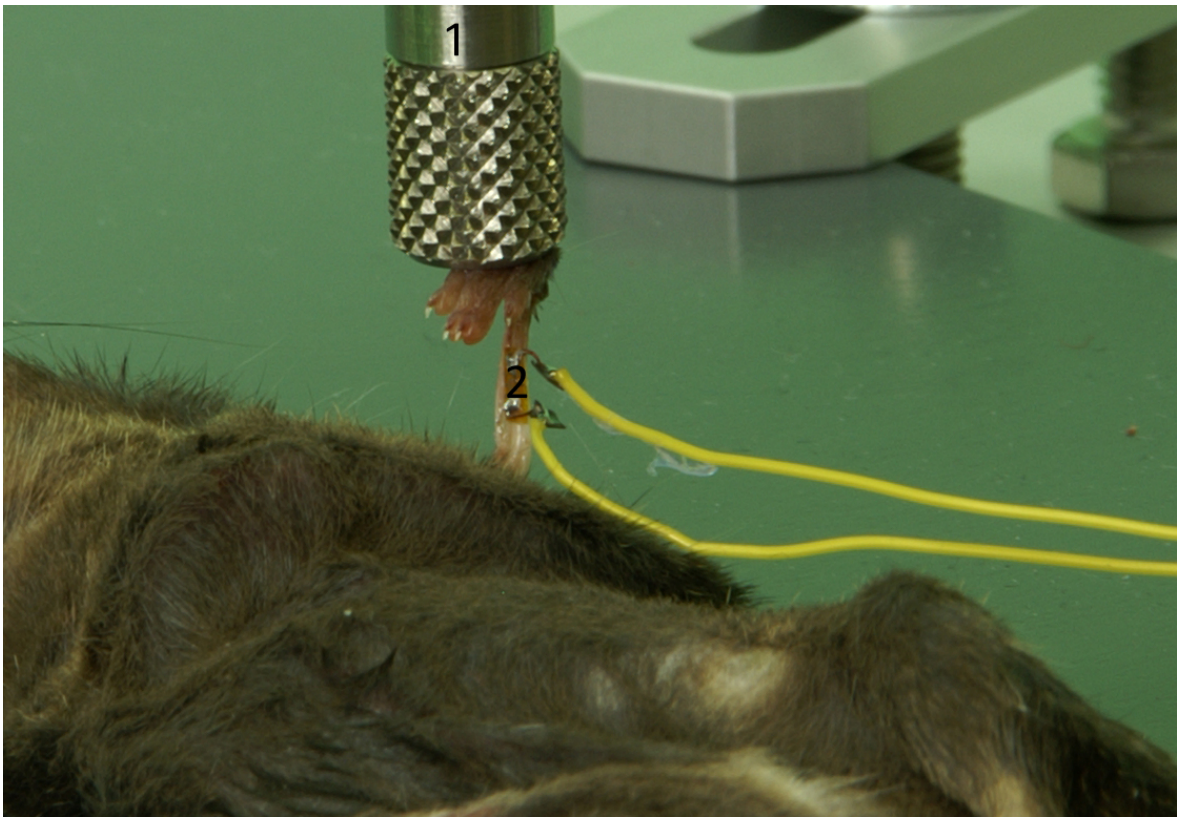


Abbildung 11: Dynamische axiale Kompression der rechten Ulna bei der *ex-vivo* Kalibrierung

Die Maus wurde in Rückenlage auf der Grundplatte der Stimulationsmaschine positioniert und die Ulna (**2**) wurde senkrecht mit flektiertem Carpus und flektiertem Ellenbogengelenk zwischen zwei Zylinder fixiert. Über den oberen Zylinder (**1**) erfolgte die Kraftübertragung über den Carpus auf die Ulna. Es wurde mit einer Kraft von 2,5 N stimuliert. Dadurch kam es zu einer Kompression der Ulna entlang der Knochenachse. In der Abbildung von der *ex-vivo* Kalibrierung fehlt das Weichteilgewebe und die Muskulatur.

2.5. Präparation von Tibia und Ulna

Nach dem Töten der Mäuse an Tag 16 wurden die Knochen freipräpariert. Dazu wurde zunächst die Muskulatur mit den Faszien der Vorder- und Hinterbeine durch Entfernung des Fells und des subkutanen Fettgewebes dargestellt. Die Vorderbeine wurden mit einer kräftigen Schere im Bereich des Humerus und die Hinterbeine im Bereich des Femur abgetrennt. Anschließend wurden die Muskelsehnen an der Tibia *distal*, im Bereich des Sprunggelenks, und an der Ulna *distal*, im Bereich des Handgelenks, durchtrennt. Dadurch konnte die Muskulatur unter Schonung des *Periosts* stumpf abgelöst werden. Die Tibia wurde *proximal* im Kniegelenk und *distal* im Sprunggelenk exartikuliert und zum Teil zusammen mit der Fibula belassen. Die Ulna wurde *proximal* im Ellenbogengelenk und *distal* im Handgelenk exartikuliert und zusammen mit dem Radius belassen. Anschließend

wurden die Tibiae und Ulnae unter Schonung des *Periosts* von den restlichen Sehnen, Bändern und Gelenkkapseln mit Hilfe von Präparierschere, Skalpell und Kompressen befreit (Abbildung 12).

Nach der Präparation wurden von den Knochen entweder Micro-Computertomogramm-Bilder (µCT-Bilder) aufgenommen oder die Knochen wurden für die biomechanische Testung in Aluminiumhülsen eingebettet.

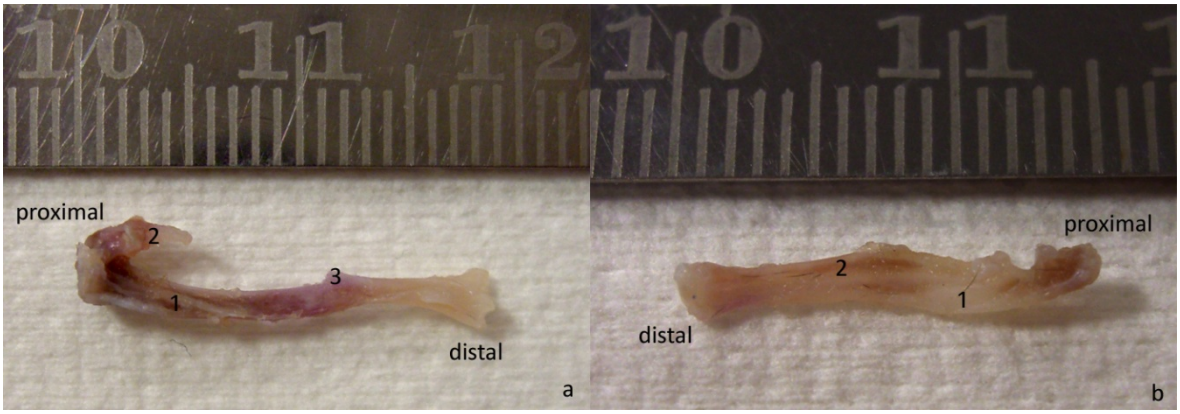


Abbildung 12: Tibia und Ulna nach der Präparation

a: Freipräparierte und exartikulierte Tibia (**1**) mit partiell erhaltener Fibula (**2**) und *Articulatio tibiofibularis distalis* (**3**) **b**: Freipräparierte und exartikulierte Ulna (**1**) mit ossär verbundenem Radius (**2**)

2.6. Micro-Computertomographie von Tibia und Ulna

Für die Erstellung der µCT-Scans der Tibiae und Ulnae wurde das µCT-Gerät STRATEC Fan Beam µ-Scope (STRATEC Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Deutschland) verwendet. Die µCT-Scans der Knochenpräparate erfolgten mit einer Spannung von 40 kV und einer Stromstärke von 140 µA. Die Auflösung in x- und y-Richtung betrug 30 µm und in z-Richtung (Schichtabstand) 60 µm (Abbildung 13). Es wurden jeweils alle vier Knochen einer Maus (linke und rechte Tibia sowie linke und rechte Ulna) in einem Plastikbehälter positioniert und zusammen gescannt. Nach dem Scan wurden die Bilderserien, ca. 300 bmp-Dateien pro Maus, in einzelnen Datenordnern abgespeichert.

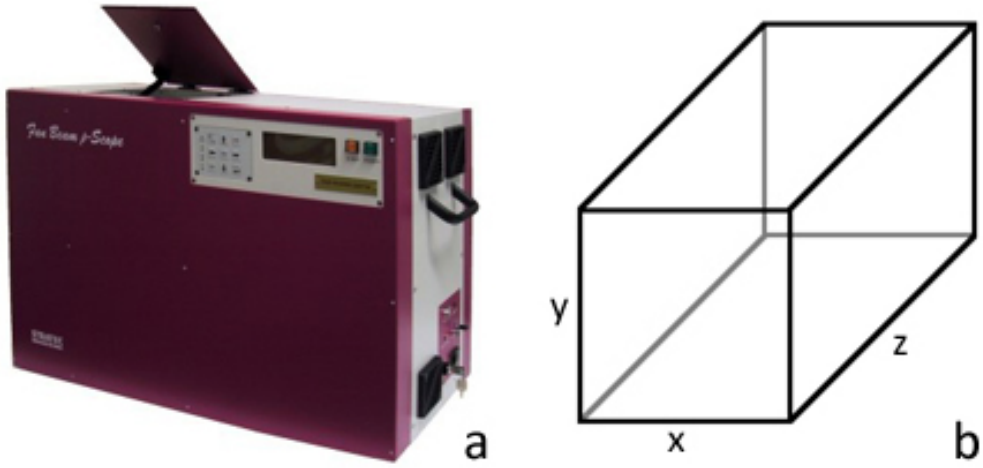


Abbildung 13: Micro-Computertomogramm-Gerät STRATEC Fan Beam µ-Scope und Schema des Voxels

a: STRATEC Fan Beam µ-Scope der Firma STRATEC Medizintechnik.

b: Voxel mit Kantenlänge x = 30 µm, y = 30 µm und z = 60 µm.

2.7. µCT-Auswertung

Für die Auswertung der µCT-Schnittbilder der Tibiae und Ulnae wurden die Software-Programme *DataViewer* Version 1.4.3 (SkyScan, Kontich, Belgien), *CT Analyser* Version 1.10.1.3, 64-bit (SkyScan, Kontich, Belgien) und *VGStudioMax 1.0* (build 129) (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Als Erstes wurden die bmp-Bilderserien der vier zusammen gescannten Knochen (Abbildung 14a) von je einer Maus mit der Software *CT Analyser* geladen, um die einzelnen Knochen voneinander zu trennen und in jeweils einer eigenen bmp-Bilderserie (Abbildungen 14b-e) zu speichern. Anschließend wurden die Bilderserien der einzelnen Knochen mit der Software *DataViewer* geladen, um die Tibiae und Ulnae möglichst gleichmäßig entlang der drei Raumachsen (x-, y- und z-Achse) auszurichten. Dies diente der Vermeidung einer verkippten bzw. unterschiedlichen Lage der Knochen im Raum.

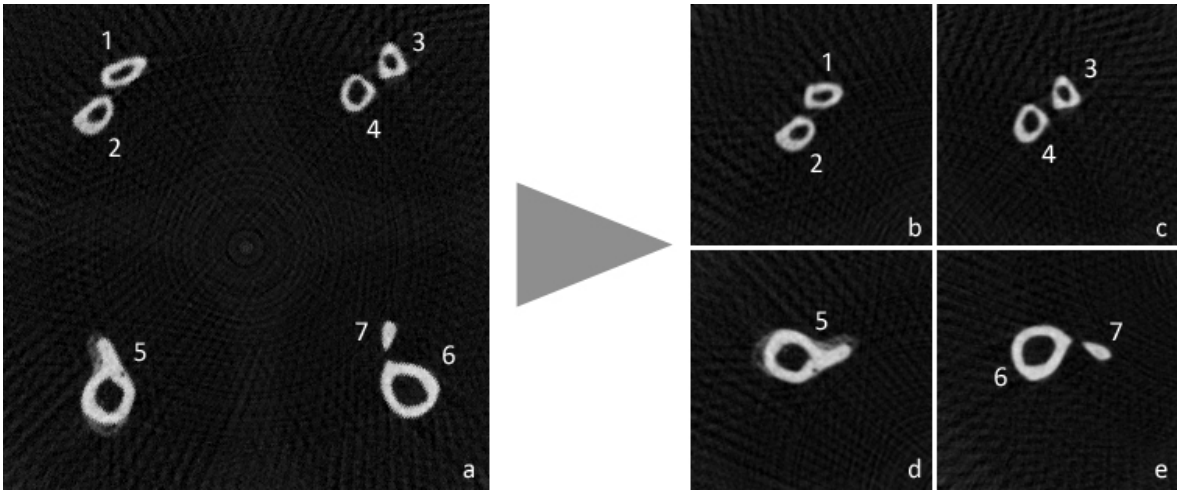


Abbildung 14: Gesamter µCT-Scan sowie anschließende Trennung und Rotation der einzelnen Knochen

a: Gesamtscan von rechter Ulna (**1**), rechtem Radius (**2**), linker Ulna (**3**), linkem Radius (**4**), rechter Tibia mit periostalem Geflechtknochen (**5**), linker Tibia (**6**) und linker Fibula (**7**). **b**: ausgeschnittene und rotierte rechte Ulna (**1**) aus **a**. **c**: ausgeschnittene und rotierte linke Ulna (**3**) aus **a**. **d**: ausgeschnittene und rotierte rechte Tibia (**5**) aus **a**. **e**: ausgeschnittene und rotierte linke Tibia (**6**) aus **a**.

Abkürzungen: µCT: Micro-Computertomogramm

2.7.1. Wahl der Region of Interest

- **Tibia**

Für die Wahl des zu untersuchenden Knochensegments, der *Region of Interest* (*ROI*), wurden zunächst Diagramme erstellt, welche die grobe Verteilung des durch die mechanische *in-vivo* Stimulation gebildeten mineralisierten Geflechtknochens an der periostalen Knochenoberfläche darstellten (Abbildung 15).

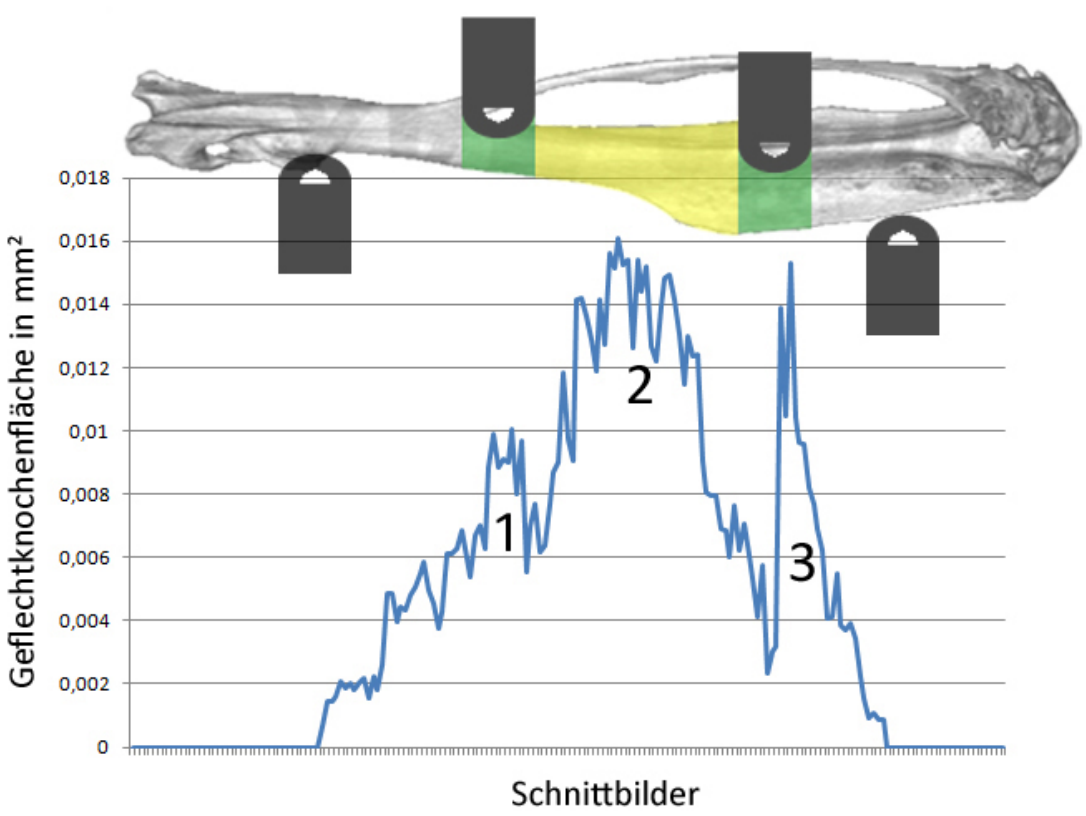


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Verteilung des gebildeten mineralisierten Geflechtknochens an der periostalen Knochenoberfläche einer rechten Maustibia

Schematische und graphische Darstellung des durch die Vier-Punkt-Biegung gebildeten mineralisierten Geflechtknochens in mm^2 pro Schnittbild an einer rechten Maustibia. Der erste Anstieg (**1**) im Diagramm ist den *distalen* Auflageflächen zuzuordnen, der zweite Anstieg (**2**) dem Bereich der maximalen Biegung und der dritte Anstieg (**3**) den *proximalen* Auflageflächen.

Anhand dieser Diagramme wurde eine für alle Tibiae einheitliche *ROI* von ca. 2 mm (36 Schnittbilder) festgelegt. Die *ROI* befand sich ca. 0,72 mm *proximal* der *Articulatio tibiofibularis distalis* und somit im Bereich der maximalen Biegung zwischen den beiden oberen Auflageflächen (Abbildung 16).

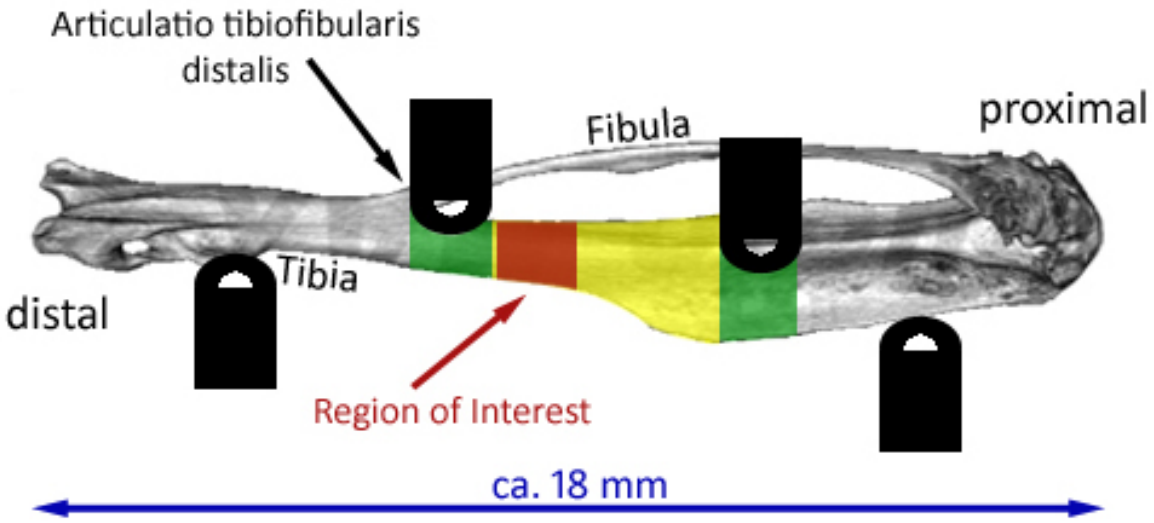


Abbildung 16: Schematische Darstellung der *Region of Interest* an der Tibia

Die *Region of Interest* (ca. 2 mm) befindet sich im Bereich der maximalen Biegung ca. 0,72 mm *proximal* der *Articulatio tibiofibularis distalis*.

- **Ulna**

Die Wahl der *ROI* der Ulna orientierte sich an den Daten von Lee *et al.* (Lee, Maxwell et al. 2002). Lee *et al.* haben einen Bereich - ausgehend vom Mittelpunkt der Ulnadiaphyse (*midshaft*) - drei Millimeter nach *proximal* und vier Millimeter nach *distal* entlang der Knochenachse untersucht. Nach diesem Vorbild wurde in unserer Studie ein Bereich von ca. 7,5 mm Länge - entspricht ca. 126 Schnittbildern pro Mausknochen - für die Auswertung festgelegt. Die gesamte *ROI* beginnt ca. 2 mm *distal* des Radiusköpfchens (im Bereich des Humeroradialgelenks) und wurde für die Analyse in sieben Segmente (Segment I bis VII) unterteilt (Abbildung 17).

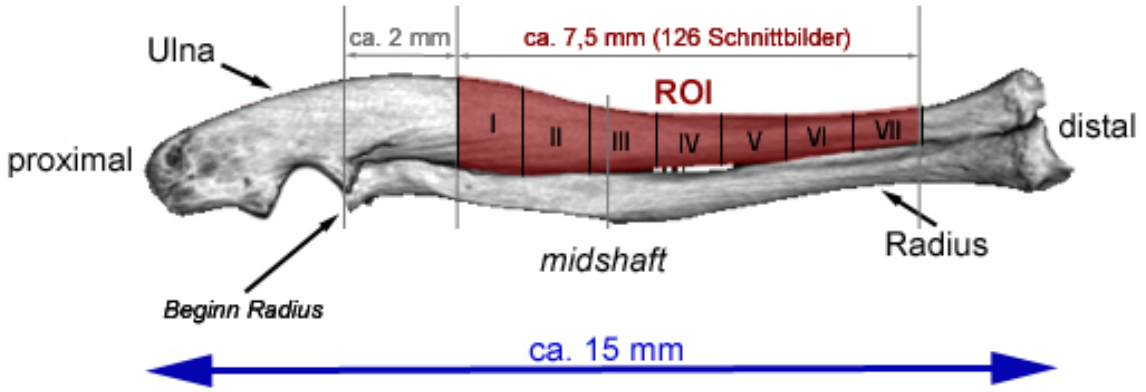


Abbildung 17: Schematische Darstellung der *Region of Interest* an der Ulna

Die *Region of Interest* (*ROI*) von ca. 7,5 mm Länge (126 Schnittbilder) beginnt ca. 2 mm *distal* des Radiusköpfchens und erstreckt sich bis ca. 4 mm *distal* des *midshaft*s der Ulna. Die *Region of Interest* wurde für die Charakterisierung der Ulna in sieben Segmente (Segment I bis VII) unterteilt.

Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*

2.7.2. Auswertung der µCT-Bilder der Tibiae und Ulnae

An der Tibia wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Parameter im Bereich der *ROI* und an der Ulna die in Tabelle 7 aufgelisteten Parameter in den einzelnen Segmenten der *ROI* bestimmt.

An der Tibia wurde die Kortikalisdicke *medial* und *lateral* bestimmt, da die Vier-Punkt-Biegung der Tibia zu einer Kompression an der *lateralen* und zu einer Zugbeanspruchung an der *medialen* Knochenoberfläche führte. Somit wurde in diesen Bereichen mit der höchsten mechanischen Belastung und mit der stärksten mechanisch induzierten Knochenformation gerechnet. Zudem wurde der Mittelwert der *medial* und *lateral* bestimmten Kortikalisdicke berechnet.

Bei der axialen Kompression der Ulna kommt es zu einer Verstärkung der natürlichen *medio-lateralen* Krümmung mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugbeanspruchung an der *lateralen* Knochenoberfläche. Daher wurde die stärkste Knochenformation an der *medialen* und *lateralen* Knochenoberfläche erwartet. Zudem wurde die Kortikalisdicke *anterior* und *posterior* bestimmt. Dadurch kann die Struktur und Morphologie der Ulnae innerhalb der beiden Gruppen (mechanisch stimulierte Seite und mechanisch nicht-stimulierte Seite) sowie zwischen den beiden Gruppen verglichen und charakterisiert werden.

Ergänzend zu der Kortikalisdicke wurde bei den Tibiae und Ulnae das mineralisierte Kortikalisvolumen und bei den Ulnae zusätzlich die Knochengesamtfläche (*Tissue Area* = Kortikalisfläche + Markraumfläche) und die Kortikalisfläche (*Bone Area*) in den Segmenten III bis VII der *ROI* bestimmt. Zudem wurde bei den Ulnae die Markraumfläche (*Marrow Area*) als Differenz der *Tissue Area* und der *Bone Area* berechnet. Auch anhand dieser Parameter lässt sich die kortikale Knochenstruktur innerhalb der beiden Genotypen (mechanisch belastete und mechanisch nicht-belastete Knochen) sowie zwischen den beiden Gruppen charakterisieren und untersuchen.

Desweiteren wurde das FTM im Bereich der *ROI* der Tibia bzw. Ulna bestimmt. Das FTM oder auch Flächenmoment 2. Grades genannt gibt die Widerstandsfähigkeit eines ebenen Querschnitts eines Körpers gegenüber einer Biegung an. Das FTM ist dabei nur von der Geometrie des Querschnitts - nicht aber von den Materialeigenschaften des Körpers - abhängig. Je größer das FTM ist, desto widerstandsfähiger ist der Körper gegenüber einer Biegebelastung. Da das FTM immer bezüglich einer Achse berechnet wird, ist neben der Angabe der Höhe des FTM auch die Angabe der Achse, auf die sich das FTM bezieht, nötig. Dazu wird in der Regel ein lokales Koordinatensystem definiert, welches seinen Ursprung im Schwerpunkt des zu untersuchenden Querschnitts hat (Schwerpunktkoordinatensystem). Je nach Ausrichtung des Koordinatensystems (Lage der Achsen) ergeben sich beliebig viele verschiedene FTMs bezüglich der beiden Achsen des Koordinatensystems. Bei einer bestimmten Ausrichtung der Achsen des Koordinatensystems nimmt das FTM der einen Achse genau das Maximum und das FTM der anderen Achse genau das Minimum an. Diese beiden FTMs (Maximum und Minimum) werden auch als Hauptträgheitsmomente bezeichnet und wurden in der vorliegenden Studie bestimmt. Anhand der bestimmten FTMs kann man also auf die Widerstandsfähigkeit der Knochen gegenüber einer Biegebelastung schließen.

Sowohl bei den mittels Vier-Punkt-Biegung als auch bei den mittels Druckbelastung (*sham loading*) stimulierten Tibiae wurde zusätzlich das Volumen des an der periostalen Knochenoberfläche gebildeten mineralisierten Geflechtknochens (mineralisiertes Geflechtknochenvolumen) bestimmt. Der mineralisierte Geflechtknochen wurde bei der Bestimmung des FTM allerdings nicht berücksichtigt, da er aufgrund seiner schwachen Materialeigenschaften (Pedersen, Akhter et al. 1999) nicht wesentlich zur Biegesteifigkeit der Knochen beitragen kann.

Tabelle 6: Parameter der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Maustibiae

Abkürzungen: VG: *VGStudioMax 1.0,* CTa: *CT Analyser, ROI*: *Region of Interest*

Parameter	**Einheit**	**Bereich**	**Software**
Kortikalisdicke *medial*	mm	*ROI*	VG
Kortikalisdicke *lateral*	mm	*ROI*	VG
Kortikalisdicke gesamt	mm	*ROI*	VG
Flächenträgheitsmoment Maximum	mm^4	*ROI*	CTa
Flächenträgheitsmoment Minimum	mm^4	*ROI*	CTa
mineralisiertes Kortikalisvolumen	mm^3	*ROI*	VG
mineralisiertes Geflechtknochenvolumen	mm^3	*ROI*	VG

Tabelle 7: Parameter der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Mausulnae

Abkürzungen: VG: *VGStudioMax 1.0,* CTa: *CT Analyser*, I bis VII: Segment I bis VII der *Region of Interest*

Parameter	**Einheit**	**Bereich**	**Software**
Kortikalisdicke *anterior*	mm	I bis VII	VG
Kortikalisdicke *posterior*	mm	I bis VII	VG
Kortikalisdicke *medial*	mm	I bis VII	VG
Kortikalisdicke *lateral*	mm	I bis VII	VG
Kortikalisdicke gesamt	mm	I bis VII	VG
Flächenträgheitsmoment Maximum	mm^4	I bis VII	CTa
Flächenträgheitsmoment Minimum	mm^4	I bis VII	CTa
Tissue Area	mm^2	III bis VII	CTa
Bone Area	mm^2	III bis VII	CTa
Marrow Area	mm^2	III bis VII	CTa
mineralisiertes Kortikalisvolumen	mm^3	I bis VII	VG

- **Auswertung mit VGStudioMax**

Für die Auswertung der µCT-Schnittbilder wurde die Bilderserie der rotierten und selektierten Schnittbilder der *ROI* einer Tibia zunächst in *VGStudioMax 1.0* geladen. Dann erfolgte als Erstes die Segmentierung der Tibia. Dazu wurde die Kortikalis zusammen mit der Spongiosa und dem Markraum manuell mit dem Lassowerkzeug auf den einzelnen Schnittbildern umfahren und markiert, um die Tibia von der Fibula und den Hintergrundpixeln zu trennen. Bei den rechten mittels Vier-Punkt-Biegung und bei den linken mittels Druckbelastung stimulierten Tibiae wurde die Kortikalis zudem zusammen mit dem an der periostalen Knochenoberfläche gebildeten Geflechtknochen markiert und getrennt. Anschließend wurde die Kortikalis vom Markraum und ggf. vorhandenem Geflechtknochen getrennt. Dies erfolgte anhand der Grauwerte der einzelnen Pixel der Schnittbilder und unter Sichtkontrolle. Zunächst wurde der maximale Grauwert, der dem hellsten Bildpunkt bzw. dem Knochengewebe mit der höchsten Dichte entspricht, mit Hilfe des Eigenschaften-Fensters der Bilderserie abgefragt. Anhand dieses Grauwerts wurde ein Bildpixel in dem mittleren Schnittbild der Bilderserie aufgesucht, der ca. 30 Grauwerte unter dem maximalen Grauwert lag. Dieser Grauwert bzw. Bildpunkt wurde mit dem 3D-Zauberstab mit einer eingestellten Toleranz von 30 markiert. Nun wurde unter Sichtkontrolle auf allen Schnittbildern der Serie geprüft, ob tatsächlich die gesamte Kortikalis markiert wurde und ggf. wurden einzelne Bereiche der Auswahl hinzugefügt oder von dieser entfernt.

Nach der Extraktion der Kortikalis wurde das mineralisierte Kortikalisvolumen der *ROI* bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Schnittbilder, die nur noch die Kortikalis enthielten, aufgerufen und eine 25-Prozent-Schwelle (*threshold*) (Morgan, Mason et al. 2009) für die dunklen Grauwerte angewendet. Der Schwellenwert legte dabei fest ab welchem Grauwert der Computer bzw. die Software einen Bildpunkt als Objekt wertet. Bildpunkte mit einem geringeren Grauwert als dem Schwellengrauwert wurden als Umgebung (Hintergrund) bzw. nicht-mineralisiertes Gewebe gewertet und gingen in die Auswertung nicht mit ein. Dadurch erfolgte eine weitere Differenzierung der Bildpunkte, die nicht der Darstellung von mineralisiertem Knochengewebe dienten von Bildpunkten, die mineralisiertes Knochengewebe dargestellt haben. Nach Anwendung der 25-Prozent-Schwelle für die dunklen Grauwerte wurde das mineralisierte Kortikalisvolumen über das Eigenschaften-Fenster ausgegeben.

Bei den mittels Vier-Punkt-Biegung und bei den mittels Druckbelastung stimulierten Tibiae wurde zusätzlich das mineralisierte Geflechtknochenvolumen bestimmt. Dazu wurde in der Serie mit dem Markraum und dem periostalen Geflechtknochen der Markraum auf allen Bildern manuell markiert und entfernt. Anschließend wurde der exakt gleiche Grauwert - wie bei der Bestimmung des mineralisierten Kortikalisvolumens - für die 25-Prozent-Schwelle angewendet, um die Auswahl auf Bildpunkte zu beschränken, die mineralisierten Geflechtknochen darstellten. Anschließend wurde das Volumen des mineralisierten Geflechtknochens über das Eigenschaften-Fenster ausgegeben.

Zuletzt wurde auf jeweils jedem zweiten Schnittbild der *ROI* die Kortikalisdicke *medial* und *lateral* mit Hilfe des Längenmesswerkzeugs bestimmt. Die Messlinien wurden so gewählt, dass sie senkrecht zu einer am äußeren Kortikalisrand gedachten Tangente verliefen bzw. einer vom Mittelpunkt des Querschnitts radial fliehenden Linie folgten (Beispiel einer Tibiaauswertung siehe Abbildung 18).

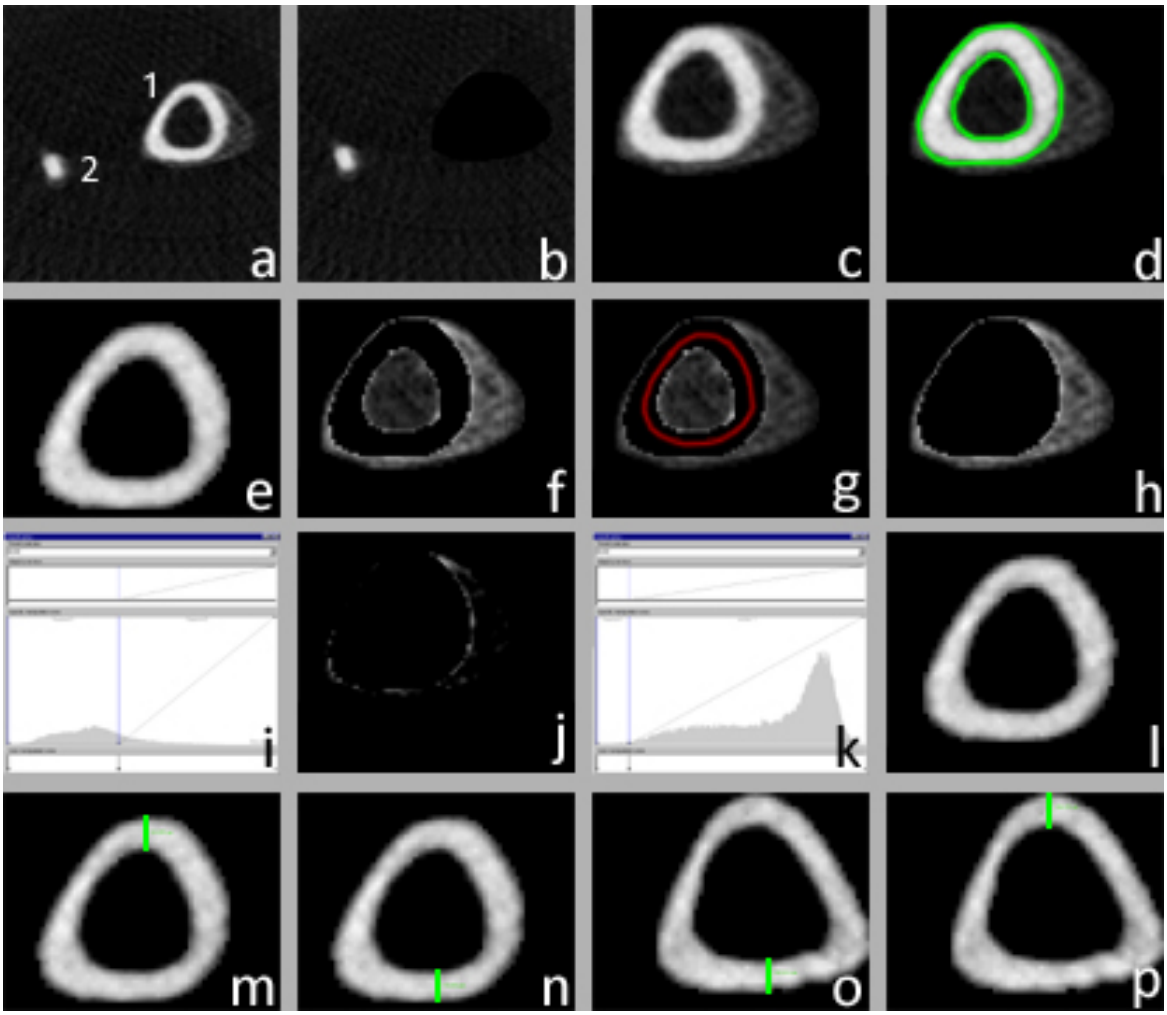


Abbildung 18: Beispiel einer Auswertung der µCT-Schnittbilder einer rechten Tibia mit *VGStudioMax 1.0*

In Bild **a** ist der Querschnitt einer rechten Maustibia (**1**) und dazugehöriger Fibula (**2**) dargestellt. In **b** wurde die Kortikalis der Tibia zusammen mit dem Markraum und dem periostalen Geflechtknochen extrahiert. In **c** ist die extrahierte Kortikalis zusammen mit dem Markraum und dem periostalen Geflechtknochen dargestellt. In **d** wurde die Kortikalis mit dem Zauberstab-Werkzeug markiert. In **e** ist die extrahierte Kortikalis dargestellt und in **f** der verbliebene Markraum sowie der periostale Geflechtknochen. In **g** wurde der Markraum markiert und in **h** entfernt. In **i** ist das Histogramm mit der Verteilung der Grauwerte des Geflechtknochens dargestellt und in **j** die, nach Anwenden der 25-Prozent-Schwelle verbliebenen Pixel, die den mineralisierten Geflechtknochen darstellten. In **k** ist das Histogramm mit der Verteilung der Grauwerte der Kortikalis dargestellt und in **l** die, nach Anwenden der 25-Prozent-Schwelle verbliebenen Pixel, die das mineralisierte Kortikalisgewebe darstellten. In **m**-**p** sind jeweils zwei aufeinanderfolgende Kortikalisquerschnitte dargestellt an denen die Kortikalisdicke jeweils *medial* und *lateral* gemessen wurde. Abkürzungen: µCT: Micro-Computertomogramm

Analog zu der µCT-Auswertung der Tibia erfolgte die Bestimmung des mineralisierten Kortikalisvolumens und der Kortikalisdicke *anterior*, *posterior*, *medial* und *lateral* auf

jedem zweiten Schnittbild in den einzelnen Segmenten der *ROI* der Ulna. Nach der mechanischen Stimulation der Ulna kam es allerdings weder an der periostalen noch an der endostalen Knochenoberfläche zu einer Formation von Geflechtknochen. Daher wurde bei der Auswertung der Ulna mit *VGStudioMax 1.0* neben der Kortikalisdicke nur das mineralisierte Kortikalisvolumen und kein mineralisiertes Geflechtknochenvolumen bestimmt.

- **Auswertung mit CT Analyser**

Nach der Auswertung der µCT-Schnittbilder mit *VGStudioMax 1.0* wurden die Bilderserien der einzelnen Knochen in der Software *CT Analyser* geladen, um die weiteren Parameter an den Tibiae und Ulnae zu bestimmen.

Dazu wurden zunächst das erste und letzte Bild der Bilderserie, die in die Auswertung eingehen sollte, festgelegt. Anschließend wurde auch in der Software *CT Analyser* die Kortikalis der Tibiae und Ulnae segmentiert und - analog zu der Auswertung mit *VGStudioMax 1.0* - der Schwellen-Grauwert bestimmt und im Histogramm angewendet, um zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Gewebe bzw. Hintergrundpixeln zu differenzieren.

Anschließend wurde für die Tibiae und Ulnae das Maximum und Minimum des FTM und für die Ulnae zusätzlich die *Tissue Area* und *Bone Area* von der Software berechnet. Diese Daten wurden manuell in einer Textdatei abgelegt und gespeichert.

2.8. Biomechanische Auswertung

2.8.1. Einbettung von Tibia und Ulna

Die Tibiae und Ulnae der Mäuse wurden für die biomechanische Testung mittels nicht-destruktiver Drei-Punkt-Biegung in Aluminiumhülsen mit 8 mm Durchmesser und einer Vertiefung in der Mitte (Werkstatt der Universitätsklinik Ulm, Ulm, Deutschland) eingebettet. Dazu wurden die freipräparierten Knochen, die während der Lagerungszeit in isotonischer Natriumchlorid-Lösung aufbewahrt wurden, um eine Dehydrierung zu vermeiden, mit Hilfe von Krokodilsklemmen in einem Halterungsapparat (Werkstatt der Universitätsklinik Ulm, Ulm, Deutschland) senkrecht über den Aluminiumhülsen - Vertiefung nach oben zeigend - positioniert. Anschließend wurde I-Cem® Adhesive Kleber (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland), der unter Luftabschluss und Blaulicht polymerisiert, aufgetragen. Bei der Polymerisation des I-Cem® Klebers entsteht praktisch keine Wärme, die den Knochen schädigt oder dehydriert. Zur Aushärtung wurden die Knochen für zwei Minuten in eine Blaulichtlampe (Exakt, Hamburg, Deutschland) gestellt (Abbildung 19). Anschließend wurden die Knochen wieder in den Plastikbehältern mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung aufbewahrt.

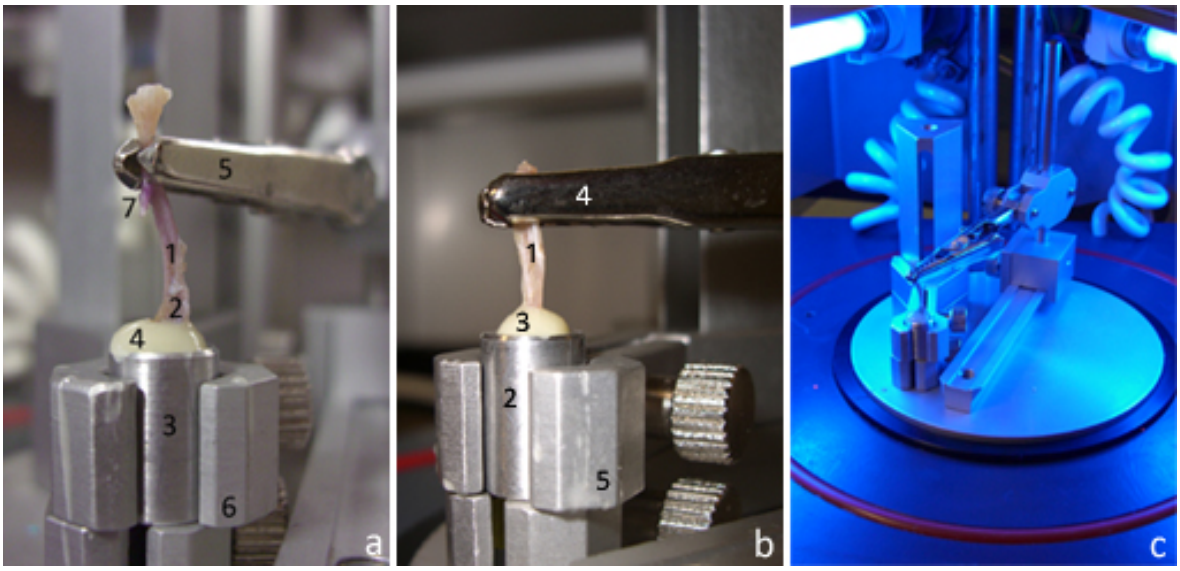


Abbildung 19: Einbettung von Tibia und Ulna für die Drei-Punkt-Biegung

a: Die Tibia (**1**) wurde mit dem *proximalen* Ende (**2**) in einer Aluminiumhülse (**3**) mit Hilfe von I-Cem®-Kleber (**4**) eingebettet. Bis zum Aushärten des Klebers wurde die Tibia für die korrekte Positionierung mit einer Krokodilsklemme (**5**) gehalten und die Aluminiumhülse in einer Haltevorrichtung (**6**) fixiert. Die Fibula (**7**) wurde nahe der *Articulatio tibiofibularis distalis* abgetrennt. **b**: Die Ulna (**1**) wurde mit dem *distalen* Ende in einer Aluminiumhülse (**2**) mit Hilfe von I-Cem®-Kleber (**3**) eingebettet. Bis zum Aushärten des Klebers wurde die Ulna für die korrekte Positionierung mit einer Krokodilsklemme (**4**) gehalten und die Aluminiumhülse in einer Haltevorrichtung (**5**) fixiert. **c**: Abbildung von der Einbettung während der Aushärtung des I-Cem®-Klebers mit eingeschalteter Blaulicht-Polymerisations-Lampe.

2.8.2. Drei-Punkt-Biegung von Tibia und Ulna

Die Biegesteifigkeit ist das Produkt aus Elastizitätsmodul (E) und Flächenträgheitsmoment (I) für Körper mit homogenem Querschnitt und homogenen Materialeigenschaften. Sie gibt die Widerstandsfähigkeit eines Körpers gegenüber einer Verformung durch eine Biegebelastung an. Dabei hängt die Biegesteifigkeit sowohl von den Materialeigenschaften als auch von der Geometrie des belasteten Körpers ab. Um die Biegesteifigkeit E*I (Nmm^2) der Tibiae und Ulnae der Mäuse und damit die biomechanischen Eigenschaften der Knochen zu ermitteln, wurde eine nicht-destruktive Drei-Punkt-Biegung durchgeführt. Anschließend wurde die Biegesteifigkeit der mechanisch belasteten rechten Tibiae und Ulnae mit der Biegesteifigkeit der mechanisch nicht-belasteten linken Tibiae und Ulnae verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich der Biegesteifigkeiten der Knochen zwischen den beiden Genotypen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*),

um den Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die biomechanischen Eigenschaften zu untersuchen.

- **Versuchsaufbau**

Die Drei-Punkt-Biegung erfolgte an der Materialprüfmaschine Z010 der Firma Zwick (Zwick GmbH & Co KG, Ulm, Deutschland) mit einer Kraftmessdose 50 N (A.S.T., Dresden, Deutschland) (Abbildung 20). Die Materialprüfmaschine wird einmal im Jahr durch Mitarbeiter der Firma Zwick überprüft und kalibriert.

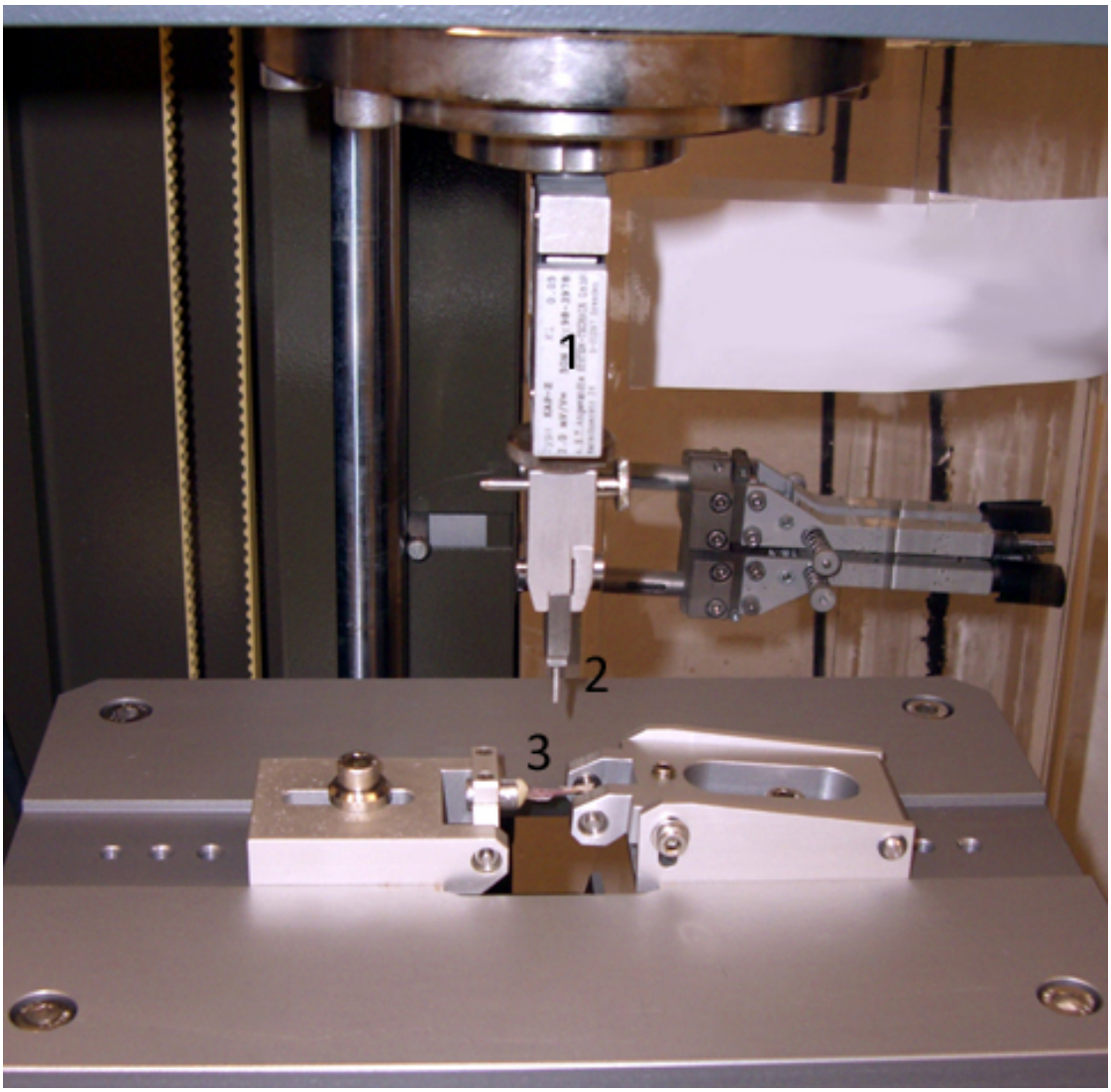


Abbildung 20: Materialprüfmaschine Zwick Z010 mit Kraftmessdose

Materialprüfmaschine Zwick Z010 mit Kraftmessdose (**1**), Druckstempel (**2**) und Drei-Punkt-Biegeeinrichtung mit Halterung für die Mausknochen (**3**). Auf der Abbildung befindet sich eine eingespannte Tibia, die mit der Aluminiumhülse links in der Halterung mit zwei Inbusschrauben fest montiert ist. Das freie Knochenende liegt der Achse rechts auf.

Für die Drei-Punkt-Biegung wurden die in die Aluminiumhülsen eingebetteten Knochen aus den Plastikbehältern mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung genommen und mit den Aluminiumhülsen links in der Halterung der Materialprüfmaschine mit Hilfe von zwei Inbusschrauben fest montiert. Das freie Knochenende lag rechts auf der Achse der Haltevorrichtung auf. Dabei lag die Tibia mit der *antero-lateralen* Tibiafläche des *distalen* Endes der Achse auf und die Ulna mit dem *Processus coronoideus* bzw. der *Incisura trochlearis* des *proximalen* Endes. Über den rechten Teil der Halterung konnte die Höhe der Achse mit einer Inbusschraube eingestellt werden, um die Knochen waagerecht auf den beiden Stützen zu positionieren. Durch den Einsatz von Abstandhaltern wurde eine Stützweite l bei der Tibia von 25 mm und bei der Ulna von 20 mm eingestellt. Da der Druckstempel nicht immer ganz genau auf den Mittelpunkt der Knochendiaphyse der Tibia bzw. Ulna drückte, handelte es sich um eine asymmetrische Drei-Punkt-Biegung. Daher musste der Hebelarm a (von der linken Stütze bis zum Druckstempel) für die Berechnung der Biegesteifigkeit vor jeder Messung mit einem Millimeterlineal gemessen werden.

Bei der Messung senkte sich der Druckstempel mit einer Geschwindigkeit von 2mm/Minute auf den Knochen bis eine eingestellte Vorlast von 0,05 N erreicht wurde. Anschließend begann die erste Messung. Dabei senkte sich der Druckstempel bis zum Erreichen der eingestellten Maximalkraft von 2 N - sowohl bei der Tibia als auch bei der Ulna - weiter mit einer Geschwindigkeit von 2mm/Minute ab. Während der Drei-Punkt-Biegung wurde von der Materialprüfmaschine kontinuierlich ein Kraft-Weg-Diagramm mit der aktuellen Biegung bzw. der Strecke der Auslenkung des Knochens (Weg) und der dazu notwendigen Kraft aufgezeichnet.

Bei jedem Knochen wurden drei Zyklen (zwei Vorbelastungen und eine Hauptmessung) durchgeführt und aufgezeichnet. Der jeweils letzte Zyklus einer Messserie (Hauptmessung) wurde zur Bestimmung der Biegesteifigkeit verwendet (Abbildung 21).

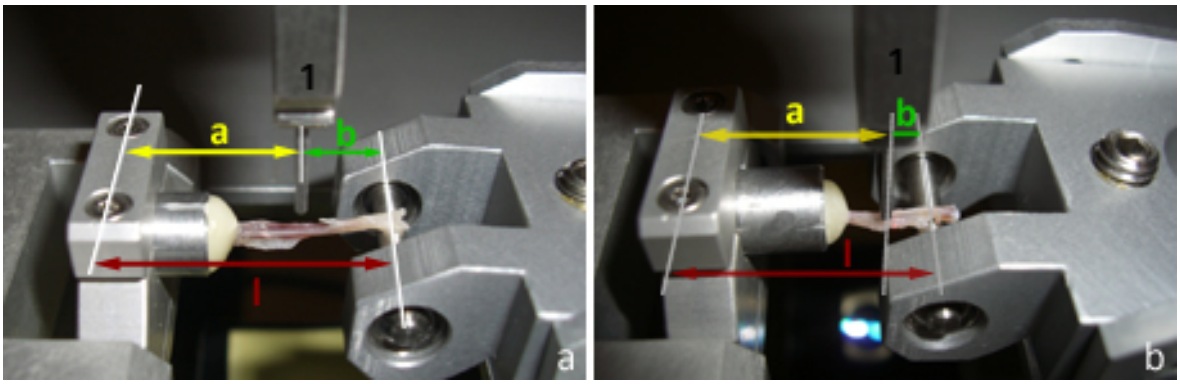


Abbildung 21: Drei-Punkt-Biegung von Tibia und Ulna

a: Drei-Punkt-Biegung der Tibia. Der Druckstempel (**1**) senkte sich auf die Tibia bis zum Erreichen der Vorlast von 0,05 N ab. Anschließend kam es durch weiteres Absinken des Druckstempels mit einer Geschwindigkeit von 2mm/Minute bis zum Erreichen der eingestellten Maximalkraft von 2 N zu einer Biegebelastung der Tibia. Dabei erfolgte die Aufzeichnung eines Kraft-Weg-Diagramms. Die eingestellte Stützweite **l** betrug 25 mm. Der Hebelarm **a** wurde bei jeder Messung manuell gemessen und der Hebelarm **b** konnte mit Hilfe der Stützweite und des gemessenen Hebelarms **a** berechnet werden. Die Tibia wurde mit dem *proximalen* Ende eingebettet und links in der Halterung fest montiert. Rechts lag die Tibia mit dem *distalen* Ende und der *antero-lateralen* Fläche der Stütze auf, so dass die Fibula nach oben zeigte. **b**: Die Drei-Punkt-Biegung der Ulna erfolgte analog zur der Drei-Punkt-Biegung der Tibia. Nach Erreichen der Vorlast von 0,05 N senkte sich der Druckstempel (**1**) mit einer Geschwindigkeit von 2mm/Minute bis zum Erreichen der Maximalkraft von 2 N weiter ab. Dabei wurde ebenso ein Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet. Bei der Drei-Punkt-Biegung der Ulna betrug die Stützweite **l** 20 mm. Die Ulna wurde mit dem *distalen* Ende eingebettet und links in der Halterung fest montiert. Rechts lag die Ulna mit nach unten gerichteter *Incisura trochlearis* der Stütze auf.

- **Auswertung**

Mit Hilfe des aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramms wurde die Steifigkeit *k* als Steigung der Kraft-Weg-Kurve ermittelt (Abbildung 22), um die Biegesteifigkeit (E*I) mit Hilfe der Formel für eine asymmetrische Drei-Punkt-Biegung, bei der der Hebelarm berücksichtigt wird, zu berechnen:

$$\mathrm{E} * \mathrm{I} = k * \frac{a^2 * b^2}{3l} [Nmm^2]$$

Tabelle 8: Variablen der Formel zur Berechnung der Biegesteifigkeit (E*I) in Nmm²

Abkürzungen: E: Elastizitätsmodul, I: Flächenträgheitsmoment

Variable	Parameter	Quelle des Werts
k $[\frac{N}{mm}]$	Steifigkeit	Kraft-Weg-Diagramm
a $[mm]$	Hebelarm a	Messung: Strecke von der linken Stütze bis zum Druckstempel
b $[mm]$	Hebelarm b	Differenz der Stützweite l und des Hebelarms a
l $[mm]$	Stützweite	Festgelegt: bei der Tibia 25 mm und bei der Ulna 20 mm

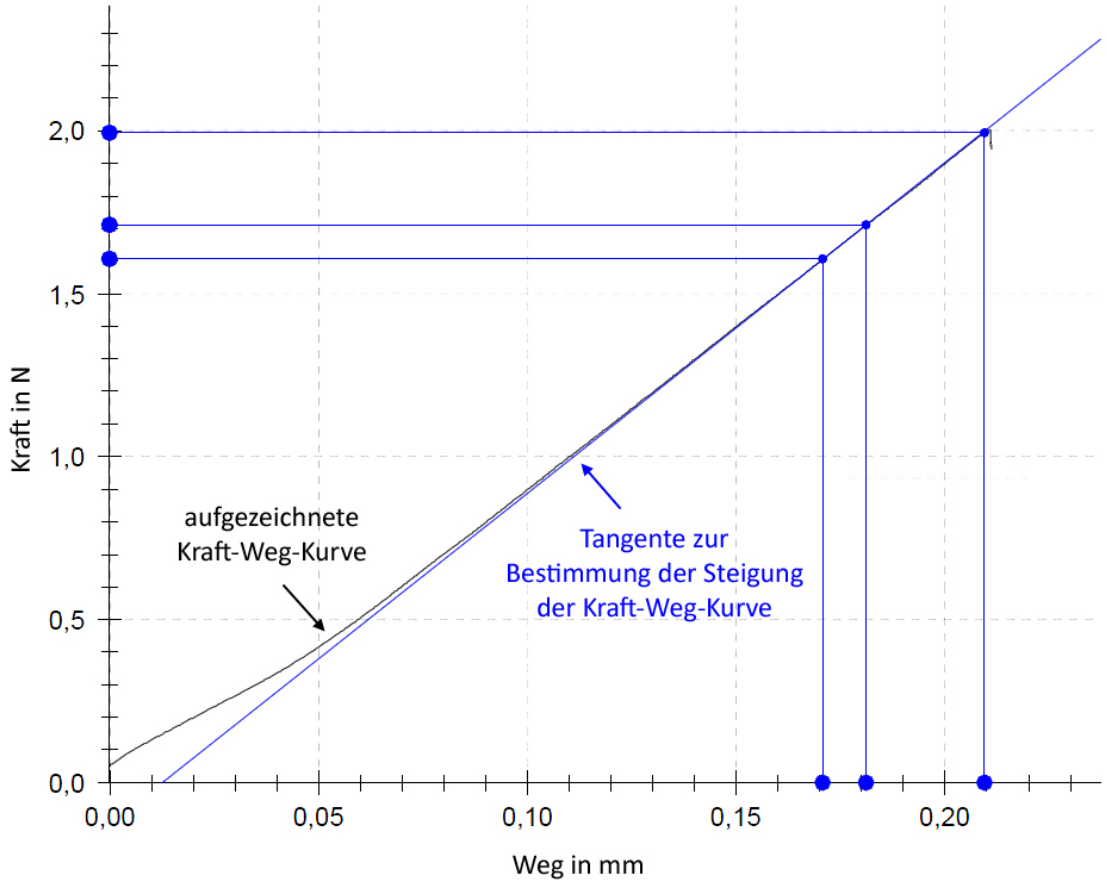


Abbildung 22: Beispiel eines aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramms

Auf der x-Achse ist der Weg bzw. die Auslenkung des Knochens durch den absinkenden Druckstempel in Millimeter (mm) und auf der y-Achse ist die, für die Auslenkung, notwendige Kraft in Newton (N) dargestellt. Die schwarze Kurve stellt die von der Materialprüfmaschine aufgezeichnete Kraft-Weg-Kurve dar. In blau ist die manuell an die Kraft-Weg-Kurve angelegte Tangente zur Bestimmung der Steifigkeit *k* als Steigung der Kraft-Weg-Kurve dargestellt.

2.9. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde das Programm *PASW Statistics 18* Version 18.0.0 für Windows (SPSS GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurden alle Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Für die Parameter, die eine Normalverteilung zeigten, wurde der *t-Test für gepaarte Stichproben* für den Vergleich der mechanisch belasteten Knochen mit den mechanisch nicht-belasteten Knochen innerhalb der beiden Gruppen (*Mdk +/+* Kontrolle gegen *Mdk +/+* Stimuliert und *Mdk -/-* Kontrolle gegen *Mdk -/-* Stimuliert) und der *t-Test für unabhängige Stichproben* für den Vergleich der mechanisch belasteten Knochen und der mechanisch nicht-belasteten Knochen zwischen den beiden Mausgruppen (*Mdk +/+* Kontrolle gegen *Mdk -/-* Kontrolle und *Mdk +/+* Stimuliert gegen *Mdk -/-* Stimuliert) verwendet.

Für die Parameter, die keine Normalverteilung zeigten, wurde - analog zu der Analyse der Parameter mit Normalverteilung - der *Wilcoxon-Test mit zugeordneten Paaren* für den Vergleich der mechanisch belasteten mit den mechanisch nicht-belasteten Knochen innerhalb der beiden Gruppen (*Mdk +/+* Kontrolle gegen *Mdk +/+* Stimuliert und *Mdk -/-* Kontrolle gegen *Mdk -/-* Stimuliert) und der *Mann-Whitney-U-Test für 2 Stichproben* für den Vergleich der mechanisch belasteten Knochen und der mechanisch nicht-belasteten Knochen zwischen den beiden Gruppen (*Mdk +/+* Kontrolle gegen *Mdk -/-* Kontrolle und *Mdk +/+* Stimuliert gegen *Mdk -/-* Stimuliert) verwendet.

Bei allen durchgeführten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0{,}05$ verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. µCT-Ergebnisse

3.1.1. Dynamische Vier-Punkt-Biegung der Tibia

Um den Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Kortikalisdicke, das FTM, das mineralisierte Kortikalisvolumen und auf die periostale Formation von Geflechtknochen an der Tibia im Bereich der *ROI* zu analysieren, wurden die Werte der stimulierten rechten Tibiae (Stimuliert) mit denen der nicht-stimulierten linken Tibiae (Kontrolle) innerhalb der beiden Mausgruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) miteinander verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den beiden Genotypen, um den Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die kortikale Knochenstruktur und auf die mechanisch induzierte Knochenantwort *in-vivo* zu untersuchen.

- **Kortikalisdicke**

Bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia kam es zu einer Zugdehnung an der *medialen* und zu einer Kompression an der *lateralen* Knochenoberfläche. Daher wurde für die Analyse der Kortikalisdicke im Bereich der *ROI* auf jeweils jedem zweiten Schnittbild die Kortikalisdicke *medial* und *lateral* bestimmt. Es zeigte sich bei der *medial* (Zugseite) und *lateral* (Druckseite) gemessenen Kortikalisdicke sowie bei dem Mittelwert der *medial* und *lateral* bestimmten Kortikalisdicke in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite (Tabelle 9). Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 23, 24 und 25).

Tabelle 9: Kortikalisdicke der Maustibiae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	0,191	0,022	5	0,213	0,018	5
KD *lateral* (mm)	0,142	0,016	5	0,176	0,012	5
KD gesamt (mm)	0,166	0,018	5	0,194	0,015	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	0,186	0,024	5	0,223	0,025	5
KD *lateral* (mm)	0,140	0,014	5	0,162	0,008	5
KD gesamt (mm)	0,163	0,018	5	0,192	0,015	5

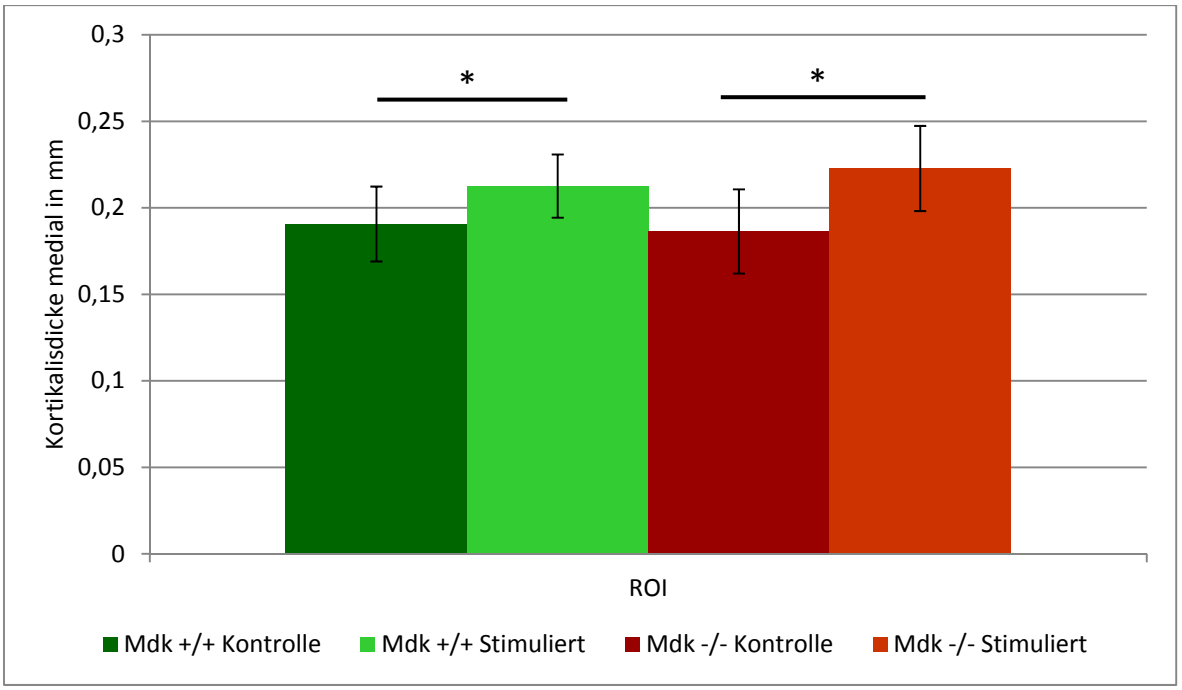


Abbildung 23: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *medial* der Maustibiae

Dargestellt ist die *medial* gemessene Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke im Bereich der *Region of Interest* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Mausgruppen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

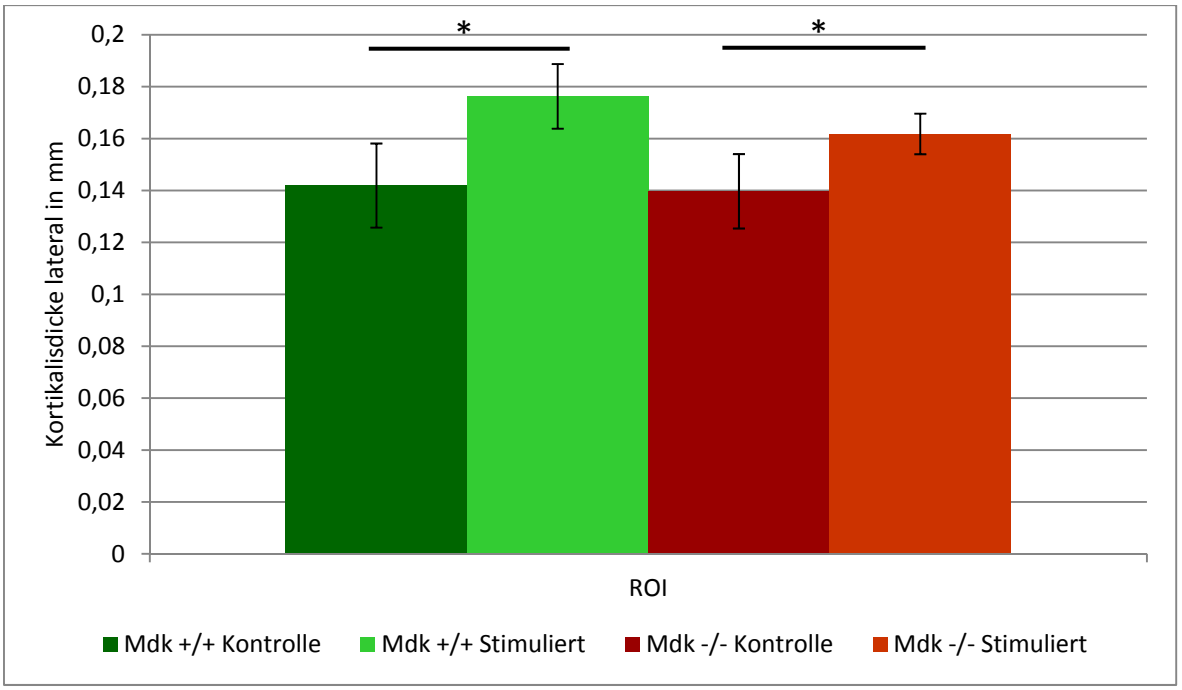


Abbildung 24: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *lateral* der Maustibiae

Dargestellt ist die *lateral* gemessene Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke im Bereich der *Region of Interest* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Mausgruppen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

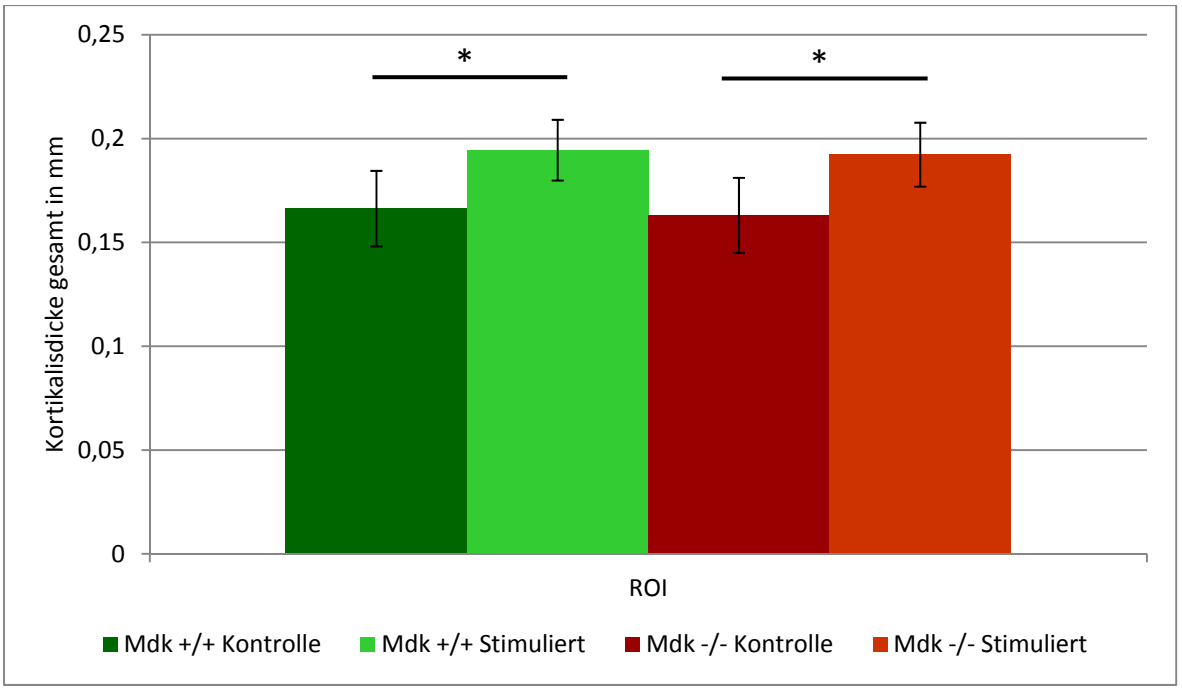


Abbildung 25: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke gesamt der Maustibiae

Dargestellt ist der Mittelwert der *medial* und *lateral* gemessenen Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke im Bereich der *Region of Interest* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Mausgruppen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

- **Flächenträgheitsmoment**

Das FTM spiegelt die Widerstandsfähigkeit eines ebenen Querschnitts eines Körpers gegenüber einer Biegebelastung wieder. Dabei ist das FTM nur von der Geometrie des Querschnitts und nicht von den Materialeigenschaften des Körpers abhängig. Das Maximum des FTM zeigte in der Gruppe der WT-Tiere eine signifikante Zunahme und in der Gruppe der KO-Tiere eine tendenzielle Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei dem Maximum des FTM keine signifikanten Unterschiede. Das Minimum des FTM zeigte in beiden Gruppen eine tendenzielle Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei dem Minimum des FTM wiederum keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 10 sowie Abbildungen 26 und 27).

Tabelle 10: Maximum und Minimum des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Abkürzungen: FTM: Flächenträgheitsmoment, Max: Maximum, Min: Minimum, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	0,098	0,012	5	0,112	0,006	5
FTM Min (mm^4)	0,077	0,006	5	0,083	0,006	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	0,093	0,024	5	0,108	0,018	5
FTM Min (mm^4)	0,068	0,017	5	0,075	0,014	5

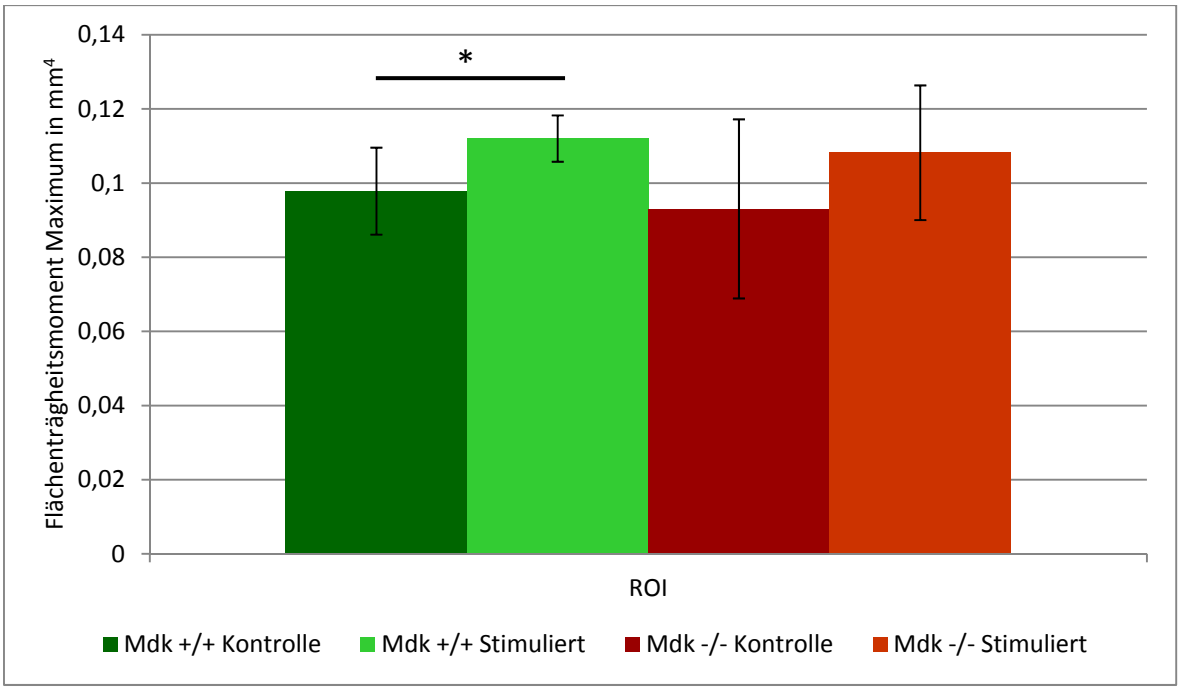


Abbildung 26: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Maximums des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Dargestellt ist das Maximum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Im Vergleich zu der Kontrollseite zeigte sich eine signifikante Zunahme des Maximums des Flächenträgheitsmoments im Bereich der *Region of Interest* in der Gruppe der *Midkine*-positiven Tiere und eine tendenzielle Zunahme in der Gruppe der *Midkine*-defizienten Tiere nach der mechanischen Stimulation. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

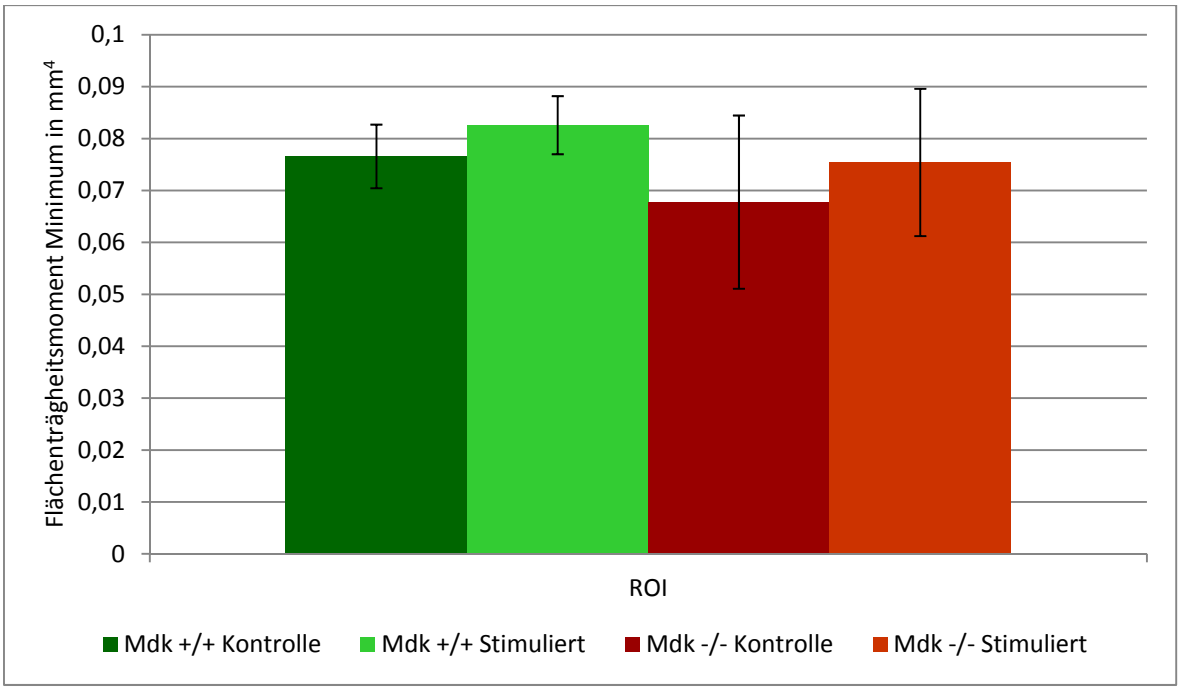


Abbildung 27: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Minimums des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Dargestellt ist das Minimum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine tendenzielle Zunahme des Minimums des Flächenträgheitsmoments im Bereich der *Region of Interest* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Mausgruppen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

- **Mineralisiertes Kortikalisvolumen**

Die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke spiegelte sich auch in einer tendenziellen Zunahme des mineralisierten Kortikalisvolumens nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Gruppen wieder (siehe Tabelle 11). Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei dem mineralisierten Kortikalisvolumen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 28).

Tabelle 11: Mineralisiertes Kortikalisvolumen der Maustibiae

Abkürzungen: mKoV: mineralisiertes Kortikalisvolumen, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	1,505	0,060	5	1,602	0,098	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	1,459	0,143	5	1,574	0,183	5

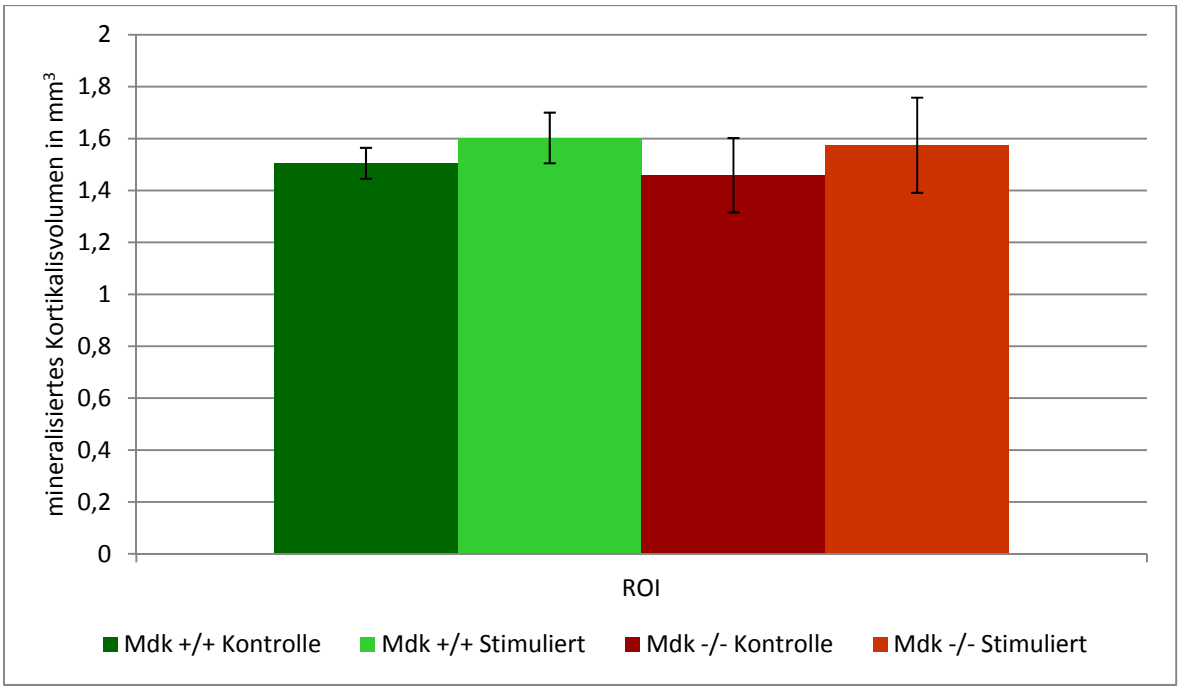


Abbildung 28: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des mineralisierten Kortikalisvolumens der Maustibiae

Dargestellt ist das mineralisierte Kortikalisvolumen in mm^3 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine tendenzielle Zunahme des mineralisierten Kortikalisvolumens im Bereich der *Region of Interest* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Gruppen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

- **Mineralisiertes Geflechtknochenvolumen**

Durch die Vier-Punkt-Biegung hat sich bei den mechanisch stimulierten rechten Tibiae - im Gegensatz zu den kontralateralen nicht-stimulierten Tibiae - Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche gebildet (siehe Tabelle 12).

Dabei zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse eine tendenziell stärkere Formation von mineralisiertem Geflechtknochen im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildung 29).

Tabelle 12: Mineralisiertes Geflechtknochenvolumen der Maustibiae

Abkürzungen: mGKV: mineralisiertes Geflechtknochenvolumen, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mGKV (mm^3)	-	-	5	0,154	0,096	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mGKV (mm^3)	-	-	5	0,227	0,100	5

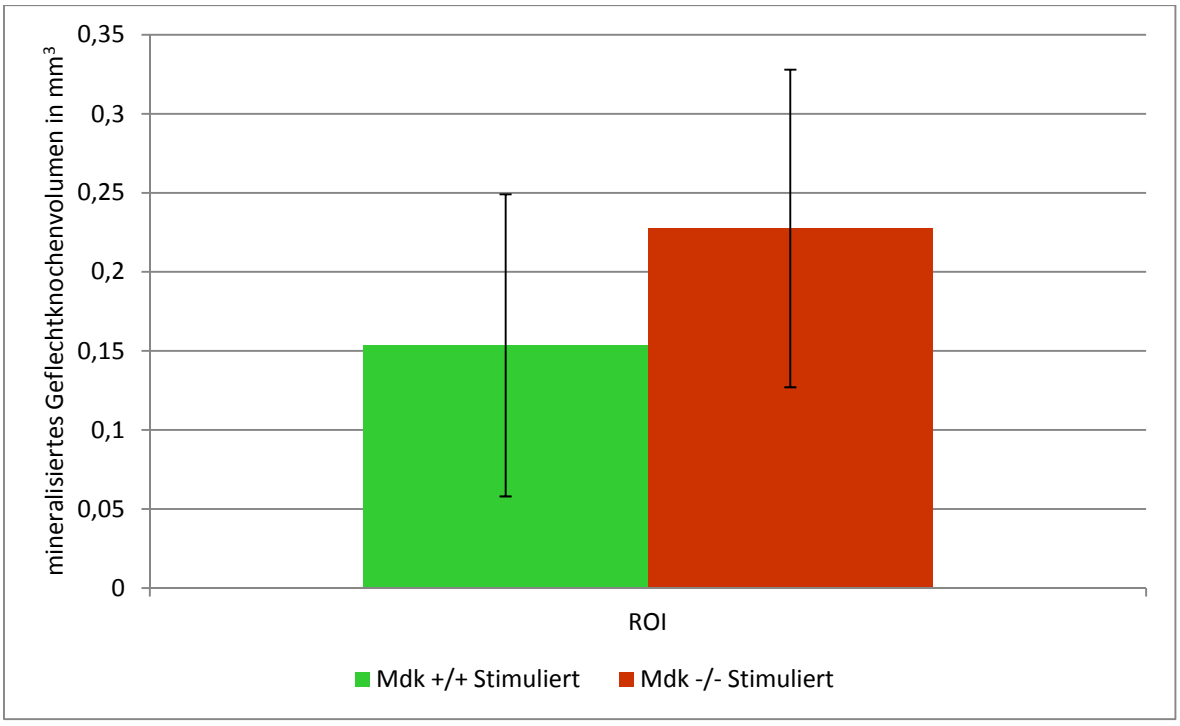


Abbildung 29: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des mineralisierten Geflechtknochenvolumens der Maustibiae

Dargestellt ist das mineralisierte Geflechtknochenvolumen in mm^3 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Die *Midkine*-defizienten Mäuse zeigten nach mechanischer Stimulation eine tendenziell stärkere Bildung von mineralisiertem Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche der Tibia im Vergleich zu den *Midkine*-positiven Mäusen. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

3.1.2. Druckbelastung der Tibia

In unserer Studie haben wir die linke Tibia von zwei *Mdk*-positiven und von zwei *Mdk*-defizienten Mäusen einer Druckbelastung (*sham loading*) ausgesetzt. Durch diesen Versuchsaufbau wurde der Einfluss des Drucks der Auflageflächen an der periostalen Knochenoberfläche bei der mechanischen Stimulation auf die resultierende Knochenantwort untersucht. Diese auf Druck belasteten linken Tibiae (Druck) dienten somit nicht als Kontrollen zu den mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten rechten Tibiae.

- **Kortikalisdicke**

Bei der Kortikalisdicke zeigten sich weder bei der *medial* und *lateral* gemessenen noch bei dem Mittelwert der *medial* und *lateral* bestimmten Kortikalisdicke - sowohl bei dem Vergleich der auf Druck belasteten Tibiae (Druck) mit den nicht-stimulierten Tibiae (Kontrolle) als auch bei dem Vergleich der auf Druck belasteten Tibiae (Druck) mit den mechanisch mittels Vier-Punkt-Biegung stimulierten Tibiae (Stimuliert) - signifikante Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen (siehe Tabelle 13). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildungen 30, 31 und 32). Die signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Stimulationsseite innerhalb der beiden Gruppen wurden bereits bei den Ergebnissen der Vier-Punkt-Biegung der Tibia beschrieben (siehe Abbildungen 23, 24 und 25).

Tabelle 13: Kortikalisdicke der Maustibiae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Druck**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	0,191	0,022	5	0,186	0,028	2	0,213	0,018	5
KD *lateral* (mm)	0,142	0,016	5	0,156	0,011	2	0,176	0,012	5
KD gesamt (mm)	0,166	0,018	5	0,171	0,019	2	0,194	0,015	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Druck**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	0,186	0,024	5	0,193	0,008	2	0,223	0,025	5
KD *lateral* (mm)	0,140	0,014	5	0,163	0,013	2	0,162	0,008	5
KD gesamt (mm)	0,163	0,018	5	0,178	0,010	2	0,192	0,015	5

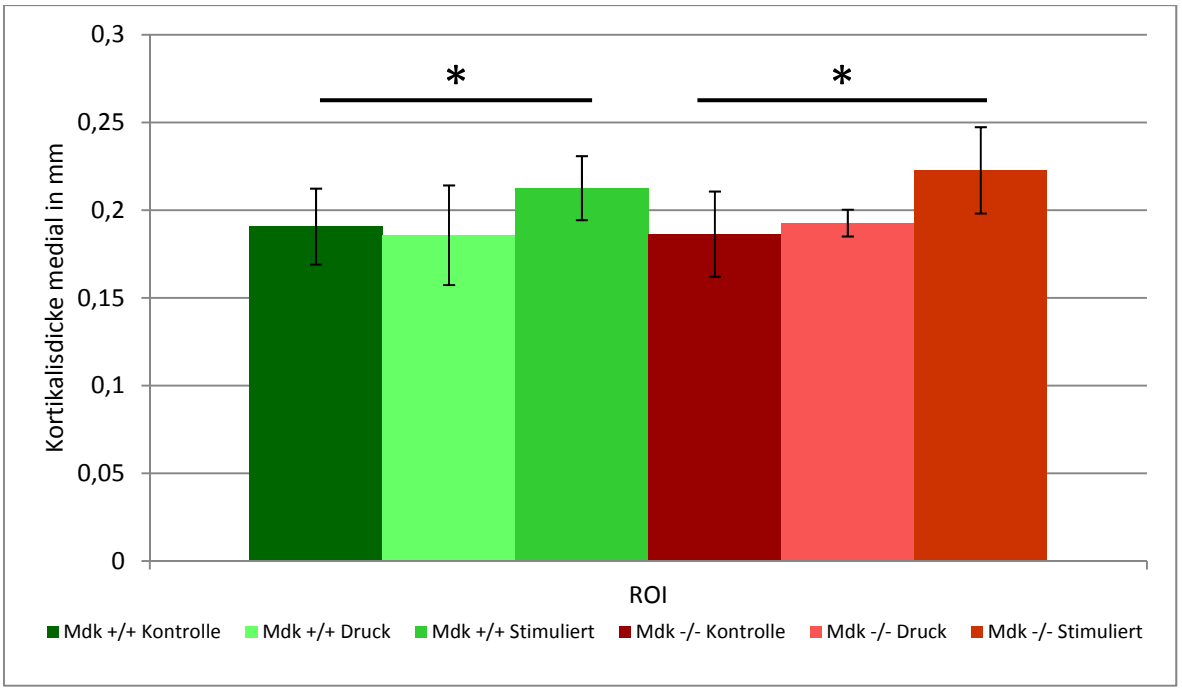


Abbildung 30: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *medial* der Maustibiae

Dargestellt ist die *medial* gemessene Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Druckseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke *medial* nach der Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Seite innerhalb der beiden Gruppen wurde bereits beschrieben (siehe Abbildung 23). Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0{,}05$

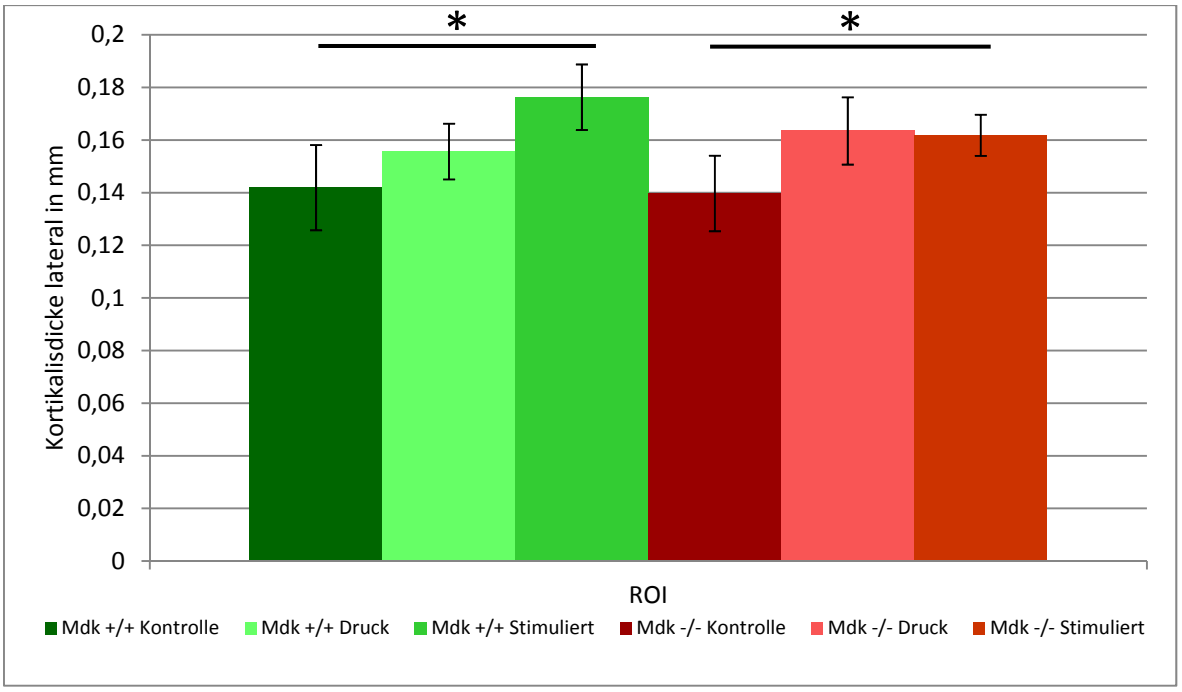


Abbildung 31: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *lateral* der Maustibiae

Dargestellt ist die *lateral* gemessene Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Druckseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke *lateral* nach der Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Seite innerhalb der beiden Gruppen wurde bereits beschrieben (siehe Abbildung 24). Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

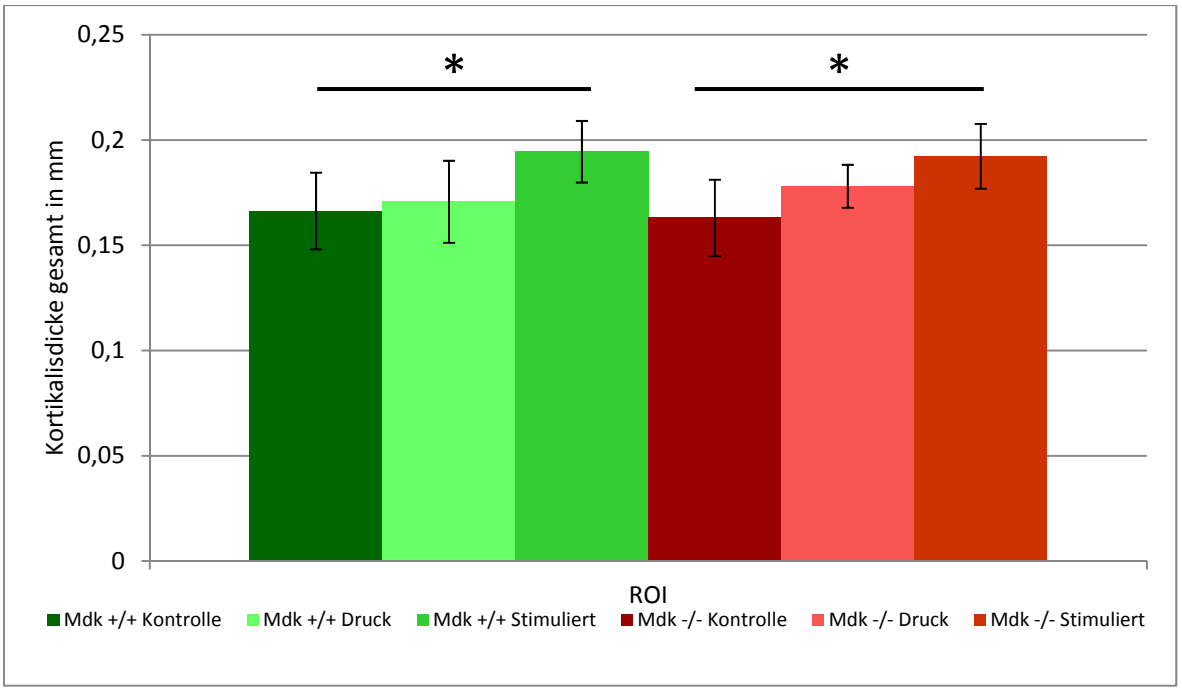


Abbildung 32: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke gesamt der Maustibiae

Dargestellt ist der Mittelwert der *medial* und *lateral* gemessenen Kortikalisdicke in mm im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Druckseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke gesamt nach der Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Seite innerhalb der beiden Gruppen wurde bereits beschrieben (siehe Abbildung 25). Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0{,}05$

- **Flächenträgheitsmoment**

Bei dem Maximum und Minimum des FTM zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den auf Druck belasteten Tibiae (Druck) und den nicht-belasteten (Kontrolle) bzw. den mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten (Stimuliert) Tibiae in beiden Gruppen (siehe Tabelle 14). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildungen 33 und 34). Die signifikante Zunahme des Maximums des FTM nach mechanischer Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der nicht-belasteten Kontrollseite in der Gruppe der WT-Mäuse wurde bereits bei den Ergebnissen der Vier-Punkt-Biegung der Tibia beschrieben (siehe Abbildung 26).

Tabelle 14: Maximum und Minimum des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Abkürzungen: FTM: Flächenträgheitsmoment, Max: Maximum, Min: Minimum, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Druck**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	0,098	0,012	5	0,098	0,022	2	0,112	0,006	5
FTM Min (mm^4)	0,077	0,006	5	0,069	0,007	2	0,083	0,006	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Druck**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	0,093	0,024	5	0,105	0,016	2	0,108	0,018	5
FTM Min (mm^4)	0,068	0,017	5	0,076	0,011	2	0,075	0,014	5

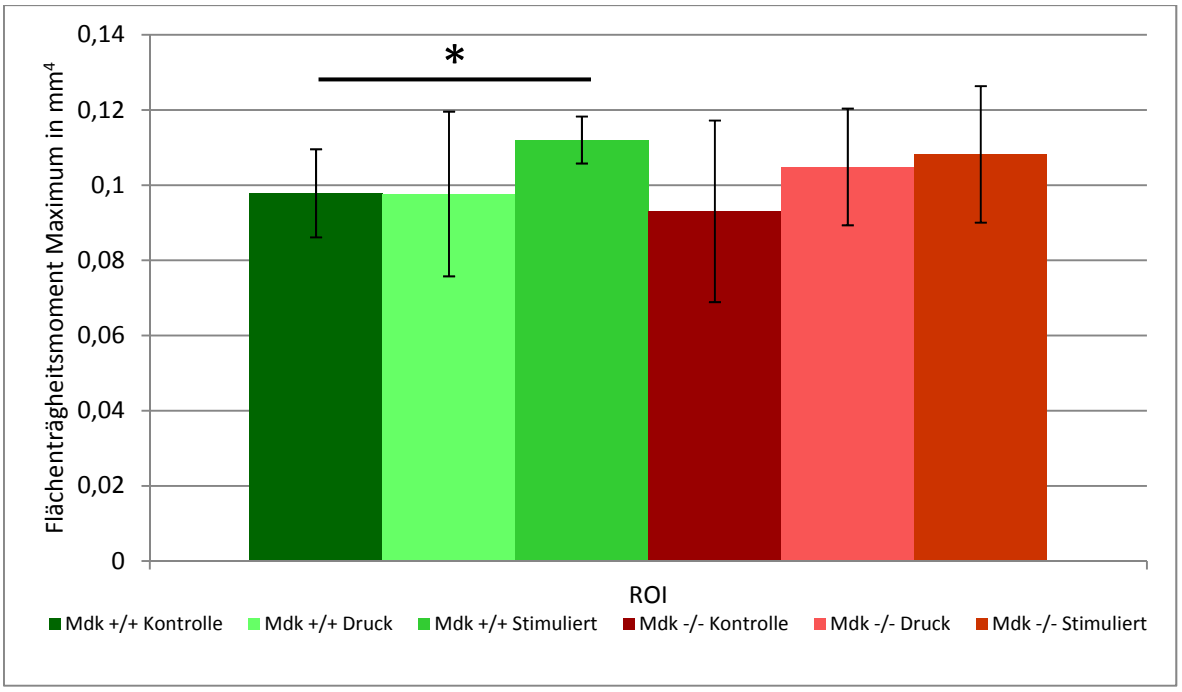


Abbildung 33: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Maximums des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Dargestellt ist das Maximum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Druckseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die signifikante Zunahme des Maximums des Flächenträgheitsmoments nach Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Seite in der Gruppe der *Midkine*-positiven Mäuse wurde bereits beschrieben (siehe Abbildung 26). Abkürzungen/Symbole: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

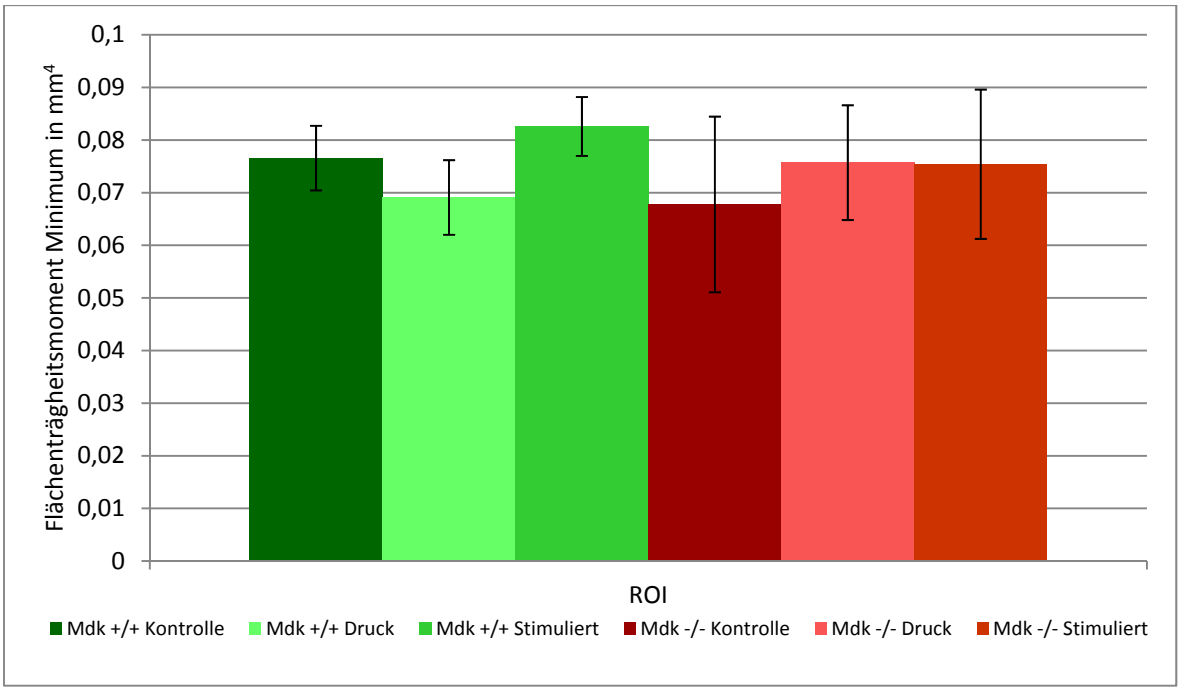


Abbildung 34: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Minimums des Flächenträgheitsmoments der Maustibiae

Dargestellt ist das Minimum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Druckseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite sowie zwischen der Kontroll- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

- **Mineralisiertes Kortikalisvolumen**

Bei dem mineralisierten Kortikalisvolumen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den auf Druck belasteten Tibiae (Druck) und den nicht-belasteten (Kontrolle) bzw. den mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten (Stimuliert) Tibiae in beiden Gruppen (siehe Tabelle 15). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 35).

Tabelle 15: Mineralisiertes Kortikalisvolumen der Maustibiae

Abkürzungen: mKoV: mineralisiertes Kortikalisvolumen, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Druck**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	1,505	0,060	5	1,468	0,113	2	1,602	0,098	5

	***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Druck**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	1,459	0,143	5	1,515	0,058	2	1,574	0,183	5

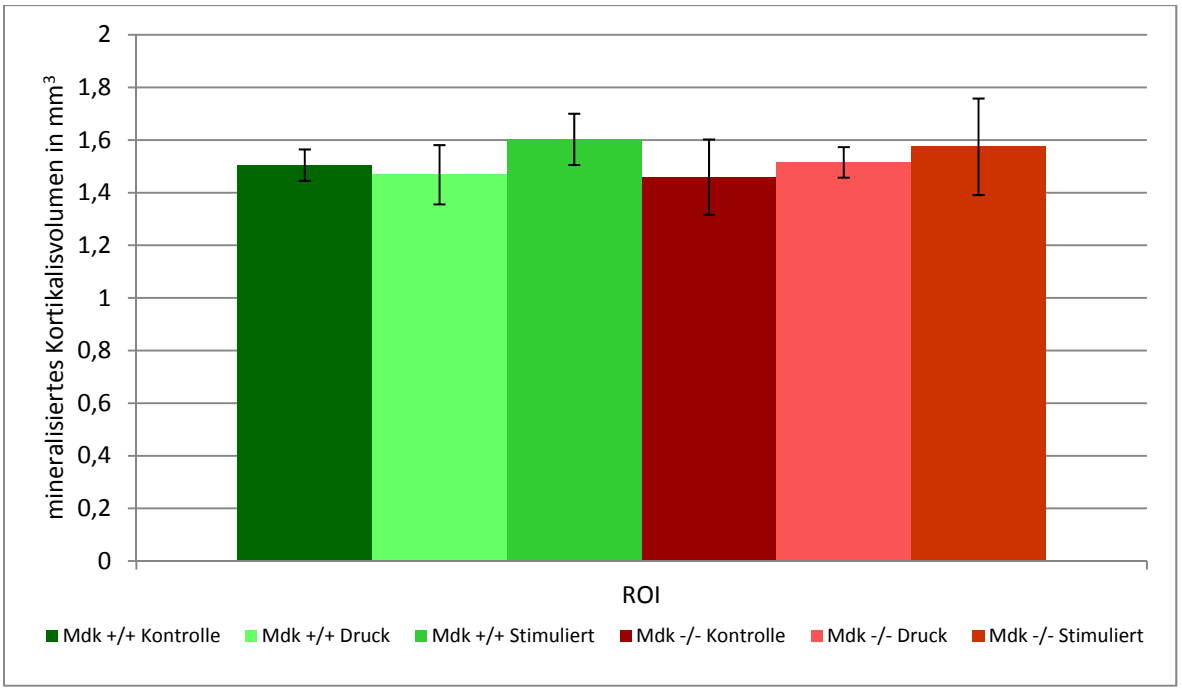


Abbildung 35: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des mineralisierten Kortikalisvolumens der Maustibiae

Dargestellt ist das mineralisierte Kortikalisvolumen in mm^3 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle), der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Druck- und Kontrollseite bzw. zwischen der Druck- und Stimulationsseite sowie zwischen der Kontroll- und Stimulationsseite in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

- **Mineralisiertes Geflechtknochenvolumen**

Bei den auf Druck belasteten linken Tibiae (Druck) hat sich wie bei den mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten rechten Tibiae (Stimuliert) und im Gegensatz zu den nicht-belasteten linken Tibiae (Kontrolle) Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche gebildet (siehe Tabelle 16). Dabei zeigte sich in beiden Mausgruppen eine tendenziell stärkere Bildung von mineralisiertem Geflechtknochen nach der Vier-Punkt-Biegung im Vergleich zu der Druckbelastung. Zudem zeigte sich bei den *Mdk*-defizienten Mäusen sowohl nach der Vier-Punkt-Biegung als auch nach der Druckbelastung der Tibiae eine tendenziell stärkere Formation von mineralisiertem Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildung 36).

Tabelle 16: Mineralisiertes Geflechtknochenvolumen der Maustibiae

Abkürzungen: mGKV: mineralisiertes Geflechtknochenvolumen, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

	***Mdk +/+* Druck**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mGKV (mm^3)	0,107	0,035	2	0,154	0,096	5

	***Mdk -/-* Druck**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mGKV (mm^3)	0,197	0,059	2	0,227	0,100	5

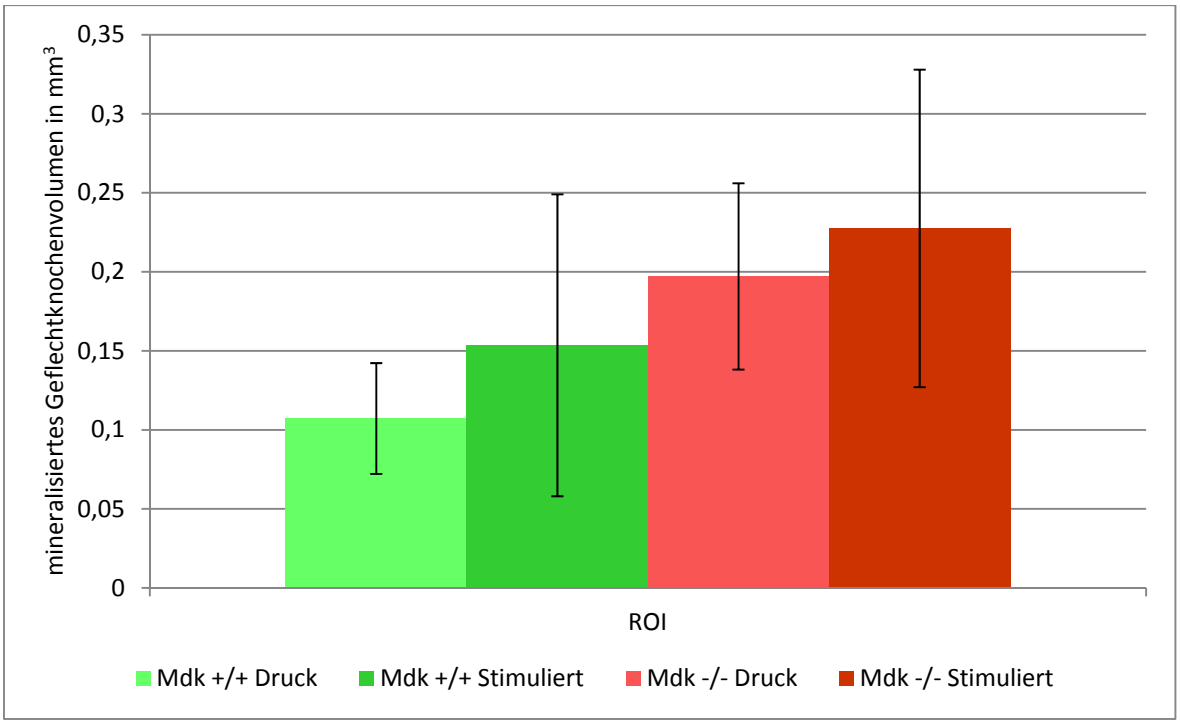


Abbildung 36: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des mineralisierten Geflechtknochenvolumens der Maustibiae

Dargestellt ist das mineralisierte Geflechtknochenvolumen in mm^3 im Bereich der untersuchten *Region of Interest* (*ROI*). Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der auf Druck belasteten linken (Druck) und der mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigte sich eine tendenziell stärkere Bildung von mineralisiertem Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche nach der Vier-Punkt-Biegung (Stimuliert) im Vergleich zu der Druckbelastung (Druck) in beiden Gruppen. Zudem zeigte sich bei den *Midkine*-defizienten Mäusen sowohl nach der Vier-Punkt-Biegung als auch nach der Druckbelastung eine tendenziell stärkere Formation von mineralisiertem Geflechtknochen im Vergleich zu den *Midkine*-positiven Mäusen. Abkürzungen: ROI: *Region of Interest*, Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

3.1.3. Dynamische axiale Kompression der Ulna

Um den Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Kortikalisdicke, das FTM, die Knochengesamtfläche (*Tissue Area* = Kortikalisfläche + Markraumfläche), die Kortikalisfläche (*Bone Area*), die Markraumfläche (*Marrow Area*) und das mineralisierte Kortikalisvolumen an der Ulna in den untersuchten Segmenten der *ROI* zu analysieren, wurden die Werte der stimulierten rechten Ulnae (Stimuliert) mit denen der nicht-stimulierten linken Ulnae (Kontrolle) innerhalb der beiden Mausgruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) miteinander verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den beiden Genotypen, um den Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die kortikale Knochenstruktur und auf die mechanisch induzierte Knochenantwort *in-vivo* zu untersuchen.

- **Kortikalisdicke**

Bei der axialen Kompression der Ulna kam es zu einer Verstärkung der natürlichen *medio-lateralen* Kurvatur der Ulna mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugdehnung an der *lateralen* Knochenoberfläche. Die *anterior* (siehe Tabelle 17), *posterior* (siehe Tabelle 18), *medial* (siehe Tabelle 19) und *lateral* (siehe Tabelle 20) gemessene Kortikalisdicke auf jedem zweiten Schnittbild der Segmente I bis VII der *ROI* sowie der Mittelwert der Summe der gemessenen Kortikalisdicken (siehe Tabelle 21) hat in beiden Gruppen nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite insgesamt tendenziell zugenommen. Dabei zeigte sich in einzelnen Segmenten der *ROI* zum Teil auch eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zudem zeigte sich eine insgesamt tendenziell stärkere Zunahme der Kortikalisdicke in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildungen 37 bis 41).

Tabelle 17: Kortikalisdicke *anterior* der Mausulnae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *anterior* (mm)	I	0,376	0,059	7	0,371	0,083	7
KD *anterior* (mm)	II	0,257	0,039	7	0,267	0,037	7
KD *anterior* (mm)	III	0,211	0,031	7	0,227	0,022	7
KD *anterior* (mm)	IV	0,203	0,022	7	0,197	0,019	7
KD *anterior* (mm)	V	0,192	0,027	7	0,202	0,016	7
KD *anterior* (mm)	VI	0,193	0,016	6	0,217	0,009	6
KD *anterior* (mm)	VII	0,182	0,013	6	0,209	0,013	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *anterior* (mm)	I	0,307	0,024	6	0,348	0,037	6
KD *anterior* (mm)	II	0,220	0,028	6	0,264	0,042	6
KD *anterior* (mm)	III	0,219	0,022	6	0,222	0,037	6
KD *anterior* (mm)	IV	0,218	0,038	6	0,230	0,049	6
KD *anterior* (mm)	V	0,215	0,040	6	0,241	0,036	6
KD *anterior* (mm)	VI	0,215	0,016	5	0,273	0,062	5
KD *anterior* (mm)	VII	0,190	0,033	5	0,227	0,017	5

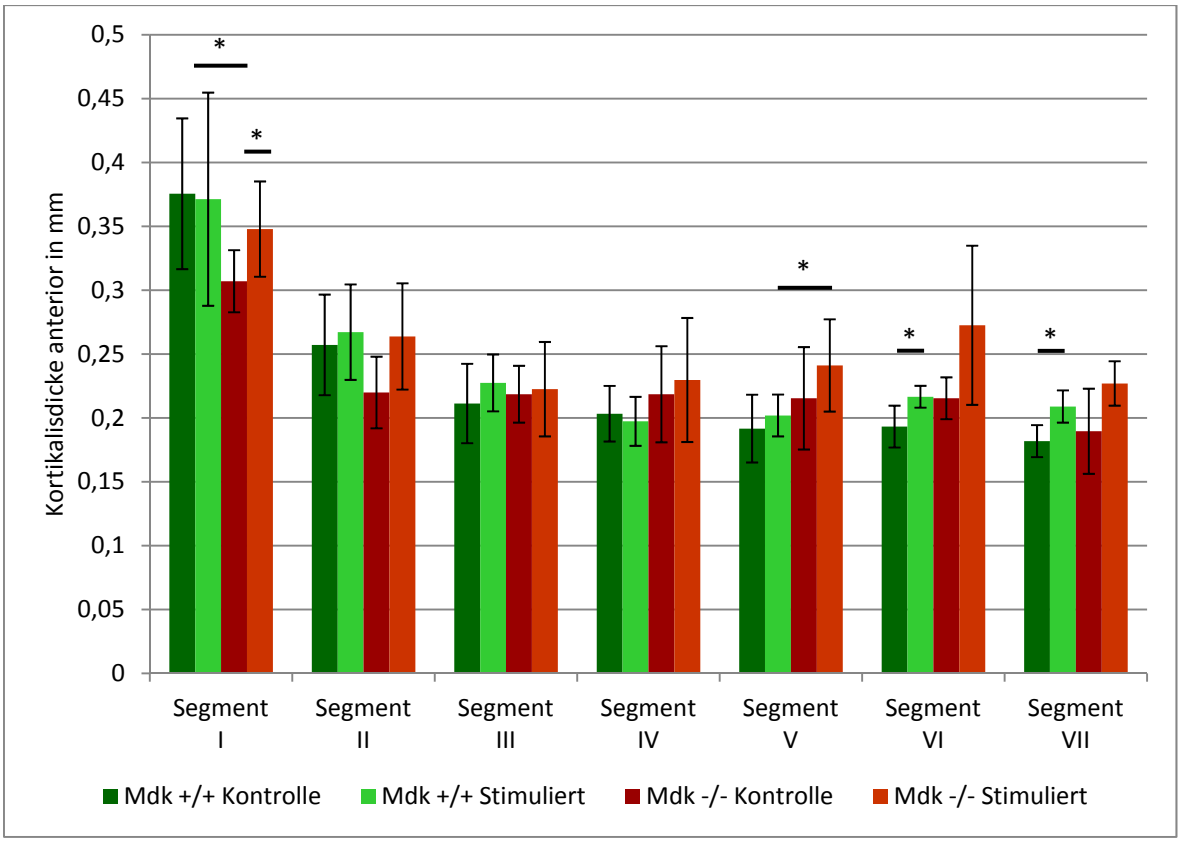


Abbildung 37: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *anterior* der Mausulnae

Dargestellt ist die *anterior* gemessene Kortikalisdicke in mm in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite im Segment I bei den *Midkine*-defizienten Mäusen und in den Segmenten VI und VII bei den *Midkine*-positiven Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-stimulierten Ulnae im Segment I und zwischen den mechanisch stimulierten Ulnae im Segment V.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

Tabelle 18: Kortikalisdicke *posterior* der Mausulnae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *posterior* (mm)	I	0,581	0,071	7	0,589	0,051	7
KD *posterior* (mm)	II	0,396	0,045	7	0,421	0,038	7
KD *posterior* (mm)	III	0,286	0,026	7	0,311	0,018	7
KD *posterior* (mm)	IV	0,266	0,030	7	0,278	0,045	7
KD *posterior* (mm)	V	0,260	0,022	7	0,261	0,027	7
KD *posterior* (mm)	VI	0,194	0,024	6	0,220	0,013	6
KD *posterior* (mm)	VII	0,201	0,023	6	0,247	0,026	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *posterior* (mm)	I	0,465	0,044	6	0,526	0,052	6
KD *posterior* (mm)	II	0,356	0,027	6	0,391	0,039	6
KD *posterior* (mm)	III	0,263	0,029	6	0,283	0,016	6
KD *posterior* (mm)	IV	0,244	0,022	6	0,255	0,020	6
KD *posterior* (mm)	V	0,230	0,017	6	0,247	0,021	6
KD *posterior* (mm)	VI	0,174	0,023	5	0,219	0,030	5
KD *posterior* (mm)	VII	0,205	0,016	5	0,238	0,021	5

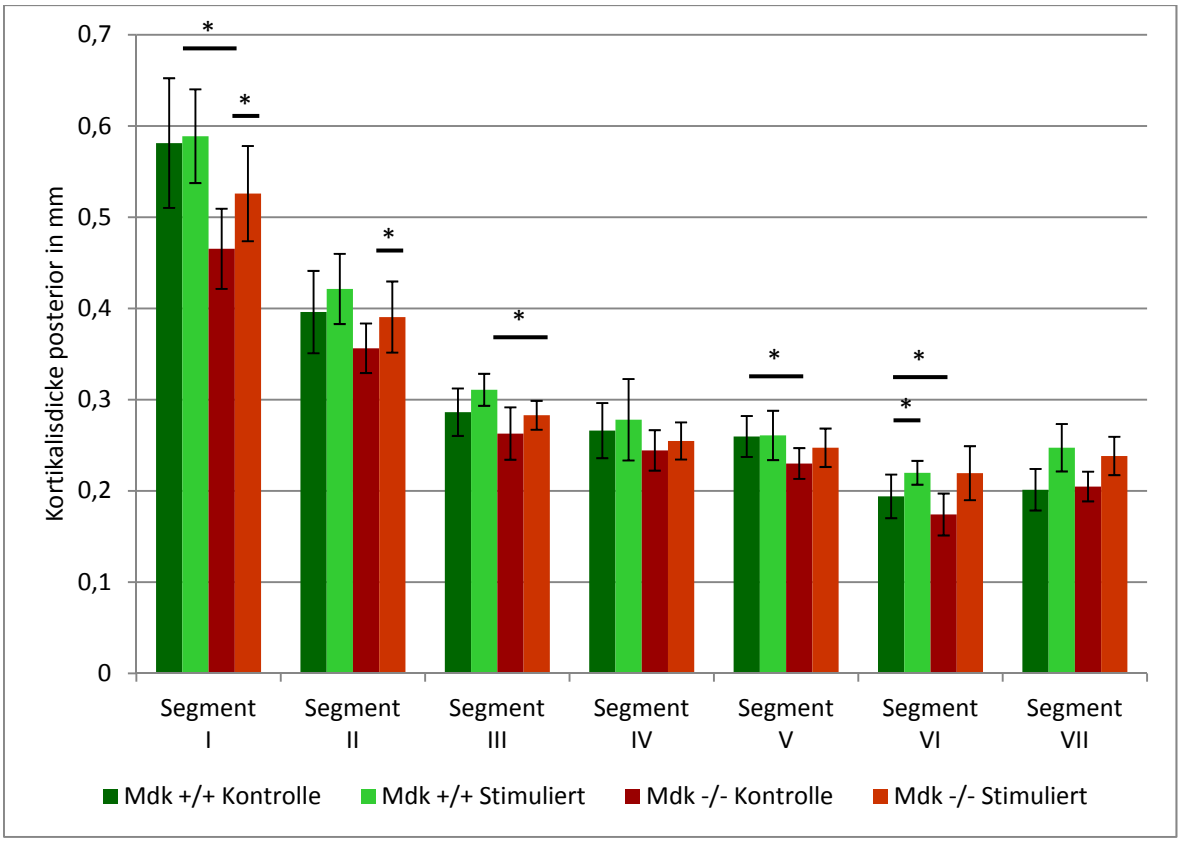


Abbildung 38: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *posterior* der Mausulnae

Dargestellt ist die *posterior* gemessene Kortikalisdicke in mm in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten I und II bei den *Midkine*-defizienten Mäusen und in dem Segment VI bei den *Midkine*-positiven Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-stimulierten Ulnae in den Segmenten I, V und VI sowie zwischen den mechanisch stimulierten Ulnae in dem Segment III. Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

Tabelle 19: Kortikalisdicke *medial* der Mausulnae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	I	0,187	0,022	7	0,193	0,019	7
KD *medial* (mm)	II	0,178	0,018	7	0,188	0,011	7
KD *medial* (mm)	III	0,164	0,018	7	0,179	0,010	7
KD *medial* (mm)	IV	0,186	0,027	7	0,191	0,022	7
KD *medial* (mm)	V	0,205	0,026	7	0,199	0,019	7
KD *medial* (mm)	VI	0,175	0,018	6	0,216	0,013	6
KD *medial* (mm)	VII	0,167	0,023	6	0,209	0,025	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *medial* (mm)	I	0,189	0,015	6	0,201	0,010	6
KD *medial* (mm)	II	0,176	0,020	6	0,193	0,017	6
KD *medial* (mm)	III	0,155	0,014	6	0,168	0,009	6
KD *medial* (mm)	IV	0,167	0,022	6	0,182	0,025	6
KD *medial* (mm)	V	0,188	0,028	6	0,206	0,029	6
KD *medial* (mm)	VI	0,194	0,024	5	0,232	0,020	5
KD *medial* (mm)	VII	0,165	0,022	5	0,203	0,029	5

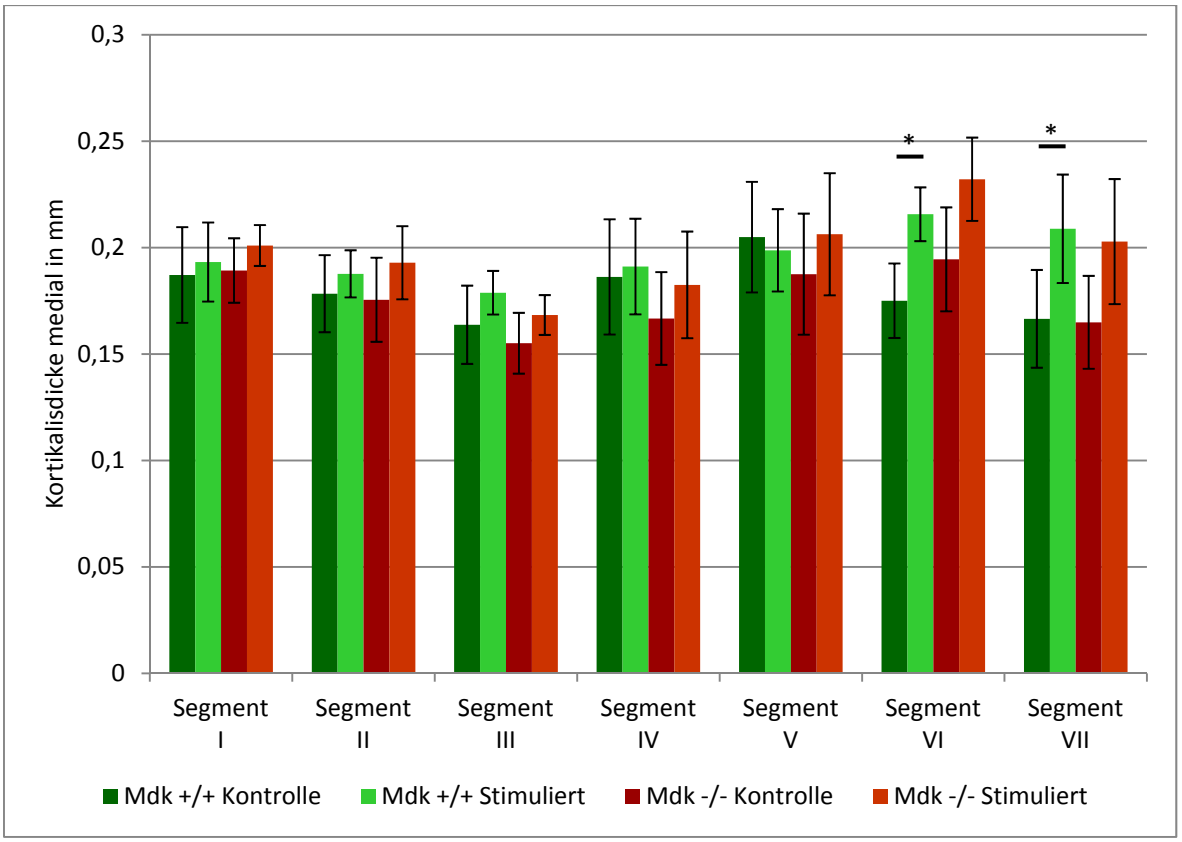


Abbildung 39: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *medial* der Mausulnae

Dargestellt ist die *medial* gemessene Kortikalisdicke in mm in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten VI und VII bei den *Midkine*-positiven Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

Tabelle 20: Kortikalisdicke *lateral* der Mausulnae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *lateral* (mm)	I	0,113	0,014	7	0,112	0,008	7
KD *lateral* (mm)	II	0,127	0,008	7	0,142	0,010	7
KD *lateral* (mm)	III	0,142	0,019	7	0,155	0,007	7
KD *lateral* (mm)	IV	0,148	0,019	7	0,160	0,012	7
KD *lateral* (mm)	V	0,158	0,027	7	0,178	0,013	7
KD *lateral* (mm)	VI	0,171	0,029	6	0,222	0,030	6
KD *lateral* (mm)	VII	0,171	0,038	6	0,215	0,035	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD *lateral* (mm)	I	0,107	0,012	6	0,117	0,013	6
KD *lateral* (mm)	II	0,125	0,009	6	0,144	0,023	6
KD *lateral* (mm)	III	0,132	0,013	6	0,160	0,017	6
KD *lateral* (mm)	IV	0,135	0,014	6	0,155	0,014	6
KD *lateral* (mm)	V	0,150	0,016	6	0,188	0,025	6
KD *lateral* (mm)	VI	0,177	0,014	5	0,217	0,026	5
KD *lateral* (mm)	VII	0,171	0,024	5	0,211	0,035	5

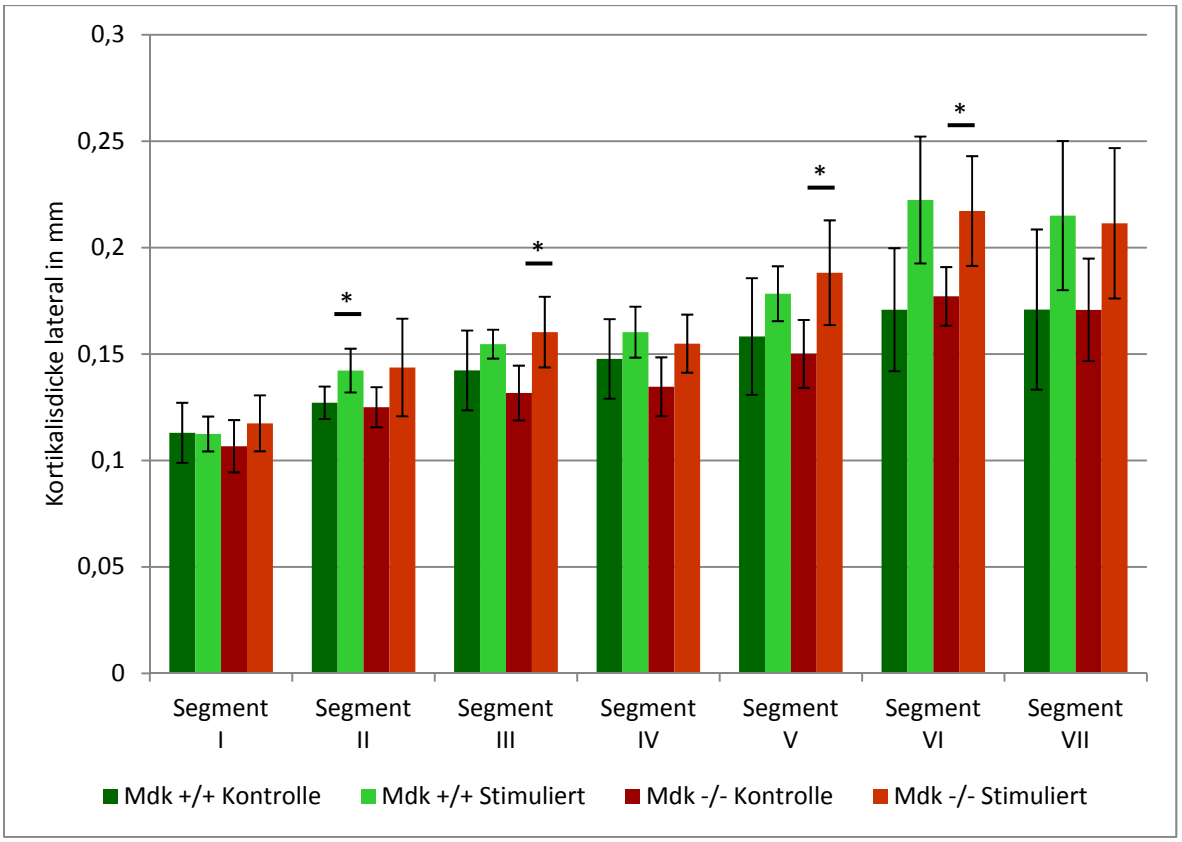


Abbildung 40: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke *lateral* der Mausulnae

Dargestellt ist die *lateral* gemessene Kortikalisdicke in mm in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in dem Segment II bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in den Segmenten III, V und VI bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0{,}05$

Tabelle 21: Kortikalisdicke gesamt der Mausulnae

Abkürzungen: KD: Kortikalisdicke, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD gesamt (mm)	I	0,314	0,032	7	0,316	0,028	7
KD gesamt (mm)	II	0,240	0,021	7	0,255	0,015	7
KD gesamt (mm)	III	0,201	0,018	7	0,218	0,007	7
KD gesamt (mm)	IV	0,201	0,019	7	0,207	0,018	7
KD gesamt (mm)	V	0,204	0,022	7	0,210	0,010	7
KD gesamt (mm)	VI	0,183	0,012	6	0,219	0,010	6
KD gesamt (mm)	VII	0,180	0,018	6	0,224	0,018	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
KD gesamt (mm)	I	0,267	0,010	6	0,298	0,018	6
KD gesamt (mm)	II	0,219	0,015	6	0,248	0,018	6
KD gesamt (mm)	III	0,192	0,010	6	0,209	0,009	6
KD gesamt (mm)	IV	0,191	0,018	6	0,205	0,020	6
KD gesamt (mm)	V	0,196	0,017	6	0,221	0,015	6
KD gesamt (mm)	VI	0,190	0,012	5	0,235	0,030	5
KD gesamt (mm)	VII	0,182	0,019	5	0,220	0,023	5

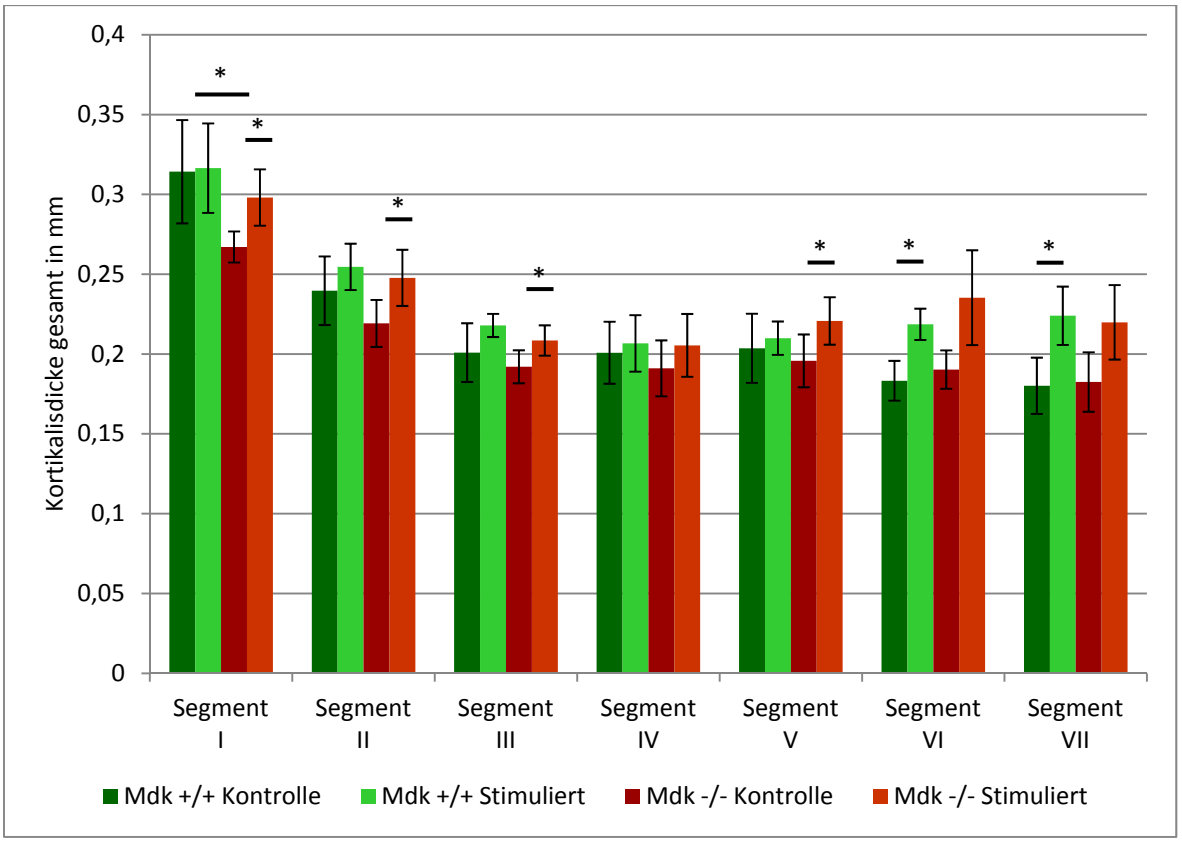


Abbildung 41: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der Kortikalisdicke gesamt der Mausulnae

Dargestellt ist der Mittelwert der *anterior*, *posterior*, *medial* und *lateral* gemessenen Kortikalisdicke in mm in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten I, II, III und V bei den *Midkine*-defizienten Mäusen und in den Segmenten VI und VII bei den *Midkine*-positiven Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-stimulierten Ulnae im Segment I.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0{,}05$

- **Flächenträgheitsmoment**

Das Maximum und Minimum des FTM zeigte in den Segmenten I bis VII der *ROI* insgesamt eine tendenzielle Zunahme nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu den nicht-belasteten Ulnae innerhalb der beiden Gruppen (siehe Tabelle 22 und 23).

Das Maximum des FTM zeigte in dem Segment V bei den WT-Mäusen und in dem Segment VII bei den KO-Mäusen eine signifikante Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Die *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten in dem am weitesten *distal* gelegenen Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme des Maximums des FTM nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen. Das Minimum des FTM zeigte in den Segmenten III und VI bei den WT-Tieren und im Segment VII bei den KO-Tieren eine signifikante Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei dem Minimum des FTM keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 42 und 43).

Tabelle 22: Maximum des Flächenträgheitsmoments der Mausulnae

Abkürzungen: FTM: Flächenträgheitsmoment, Max: Maximum, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	I	0,037	0,008	7	0,040	0,009	7
FTM Max (mm^4)	II	0,026	0,006	7	0,027	0,008	7
FTM Max (mm^4)	III	0,012	0,003	7	0,014	0,004	7
FTM Max (mm^4)	IV	0,010	0,003	7	0,011	0,003	7
FTM Max (mm^4)	V	0,006	0,002	7	0,007	0,002	7
FTM Max (mm^4)	VI	0,004	0,000	6	0,005	0,001	6
FTM Max (mm^4)	VII	0,004	0,000	6	0,004	0,001	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Max (mm^4)	I	0,030	0,009	6	0,036	0,011	6
FTM Max (mm^4)	II	0,021	0,006	6	0,022	0,006	6
FTM Max (mm^4)	III	0,011	0,003	6	0,012	0,004	6
FTM Max (mm^4)	IV	0,009	0,002	6	0,010	0,003	6
FTM Max (mm^4)	V	0,006	0,001	6	0,007	0,002	6
FTM Max (mm^4)	VI	0,005	0,001	5	0,005	0,001	5
FTM Max (mm^4)	VII	0,004	0,001	5	0,006	0,001	5

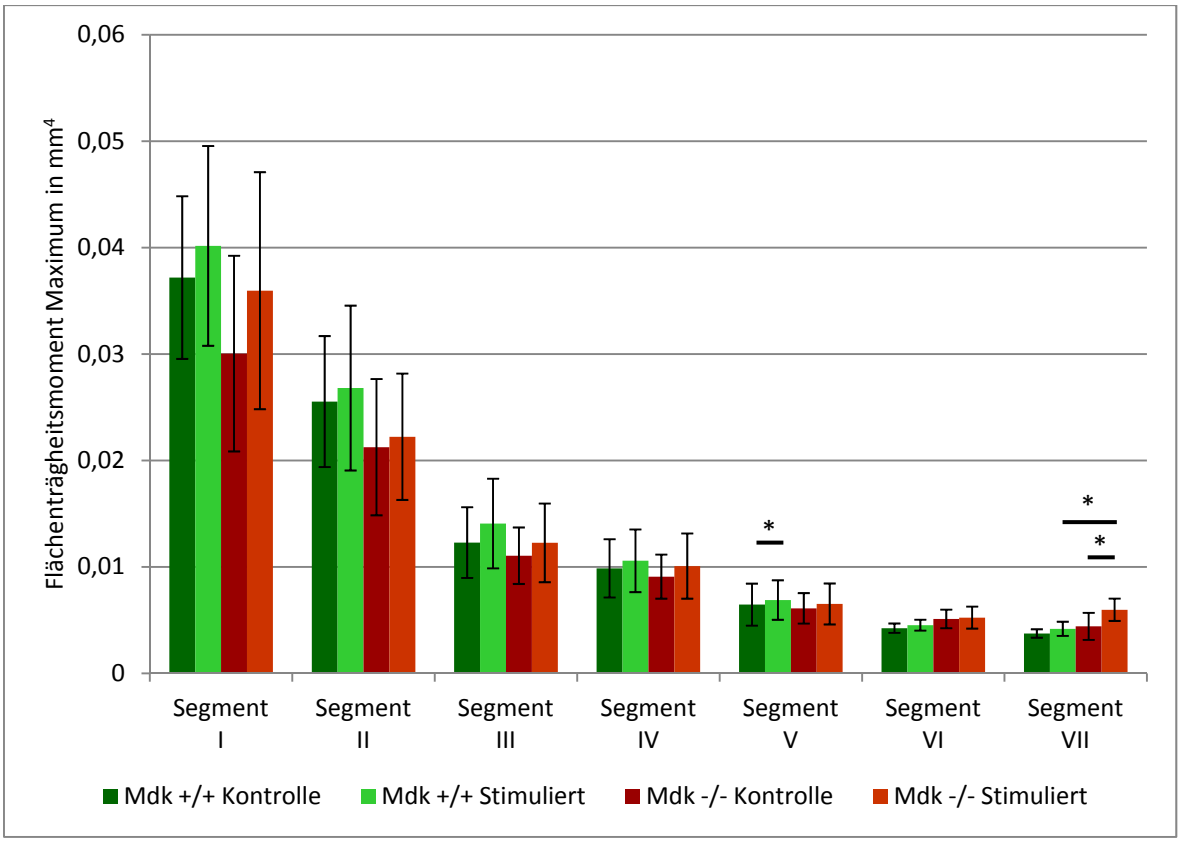


Abbildung 42: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Maximums des Flächenträgheitsmoments der Mausulnae

Dargestellt ist das Maximum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Maximums des Flächenträgheitsmoments nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in dem Segment V bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in dem Segment VII bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten die *Midkine*-defizienten Mäuse im Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme des Maximums des Flächenträgheitsmoments nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Midkine*-positiven Mäusen.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

Tabelle 23: Minimum des Flächenträgheitsmoments der Mausulnae

Abkürzungen: FTM: Flächenträgheitsmoment, Min: Minimum, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Min (mm^4)	I	0,006	0,001	7	0,007	0,001	7
FTM Min (mm^4)	II	0,006	0,001	7	0,006	0,001	7
FTM Min (mm^4)	III	0,005	0,002	7	0,006	0,001	7
FTM Min (mm^4)	IV	0,005	0,001	7	0,005	0,001	7
FTM Min (mm^4)	V	0,004	0,001	7	0,005	0,001	7
FTM Min (mm^4)	VI	0,003	0,000	6	0,004	0,000	6
FTM Min (mm^4)	VII	0,003	0,001	6	0,003	0,001	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
FTM Min (mm^4)	I	0,006	0,001	6	0,007	0,001	6
FTM Min (mm^4)	II	0,007	0,001	6	0,007	0,001	6
FTM Min (mm^4)	III	0,006	0,002	6	0,006	0,002	6
FTM Min (mm^4)	IV	0,005	0,002	6	0,006	0,001	6
FTM Min (mm^4)	V	0,005	0,001	6	0,005	0,001	6
FTM Min (mm^4)	VI	0,004	0,001	5	0,004	0,001	5
FTM Min (mm^4)	VII	0,003	0,001	5	0,004	0,001	5

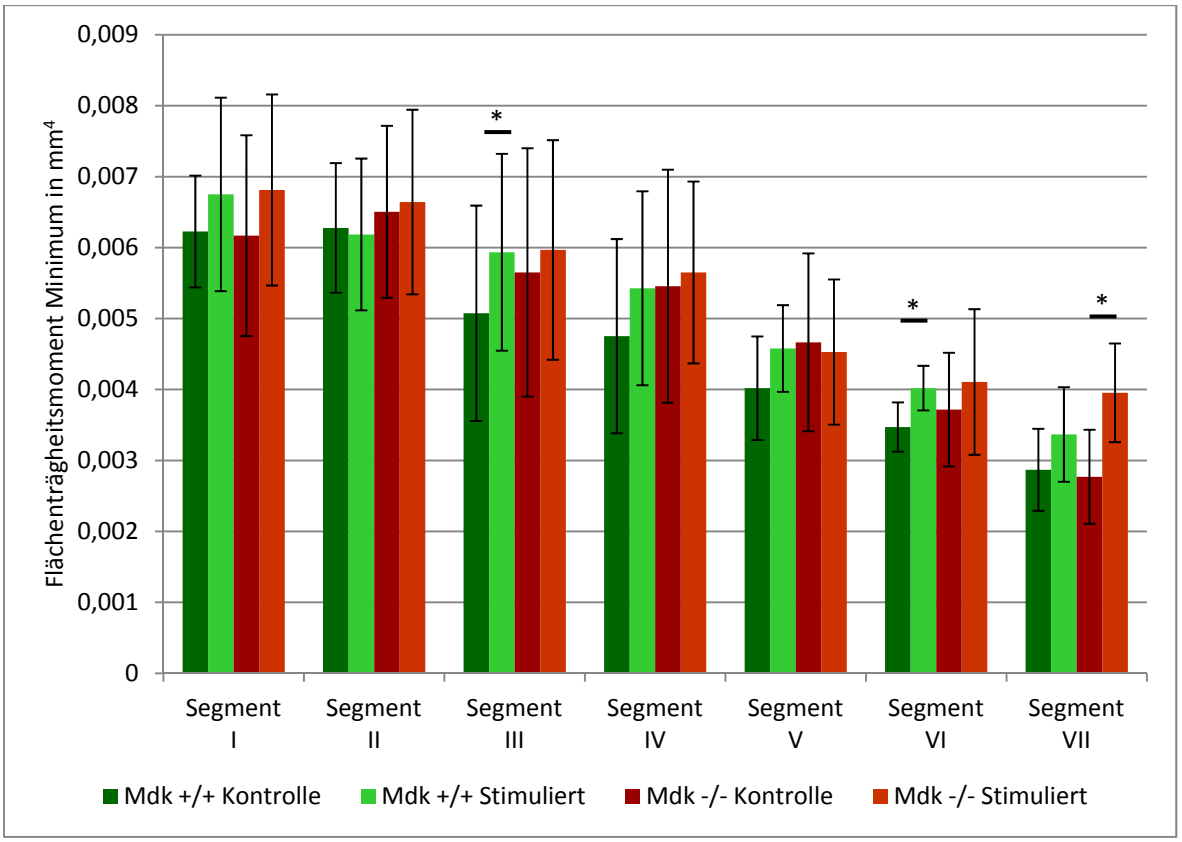


Abbildung 43: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des Minimums des Flächenträgheitsmoments der Mausulnae

Dargestellt ist das Minimum des Flächenträgheitsmoments in mm^4 in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Minimums des Flächenträgheitsmoments nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten III und VI bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in dem Segment VII bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

- **Tissue Area**

Die Knochengesamtfläche *Tissue Area* (= Kortikalisfläche + Markraumfläche) zeigte in den untersuchten Segmenten der *ROI* insgesamt eine tendenzielle Zunahme nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu den nicht-belasteten Ulnae in beiden Gruppen (siehe Tabelle 24). Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme in den Segmenten III und V bei den WT-Mäusen und im Segment VII bei den KO-Mäusen nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Die *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten in dem am weitesten *distal* gelegenen Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme der *Tissue Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildung 44).

Tabelle 24: *Tissue Area* der Mausulnae

Abkürzungen: Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Tissue Area (mm^2)	III	0,411	0,046	7	0,439	0,050	7
Tissue Area (mm^2)	IV	0,388	0,034	7	0,407	0,053	7
Tissue Area (mm^2)	V	0,265	0,032	7	0,284	0,031	7
Tissue Area (mm^2)	VI	0,232	0,014	6	0,243	0,012	6
Tissue Area (mm^2)	VII	0,217	0,018	6	0,228	0,014	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Tissue Area (mm^2)	III	0,401	0,047	6	0,409	0,049	6
Tissue Area (mm^2)	IV	0,370	0,042	6	0,378	0,054	6
Tissue Area (mm^2)	V	0,273	0,033	6	0,273	0,040	6
Tissue Area (mm^2)	VI	0,245	0,024	5	0,255	0,023	5
Tissue Area (mm^2)	VII	0,224	0,031	5	0,263	0,025	5

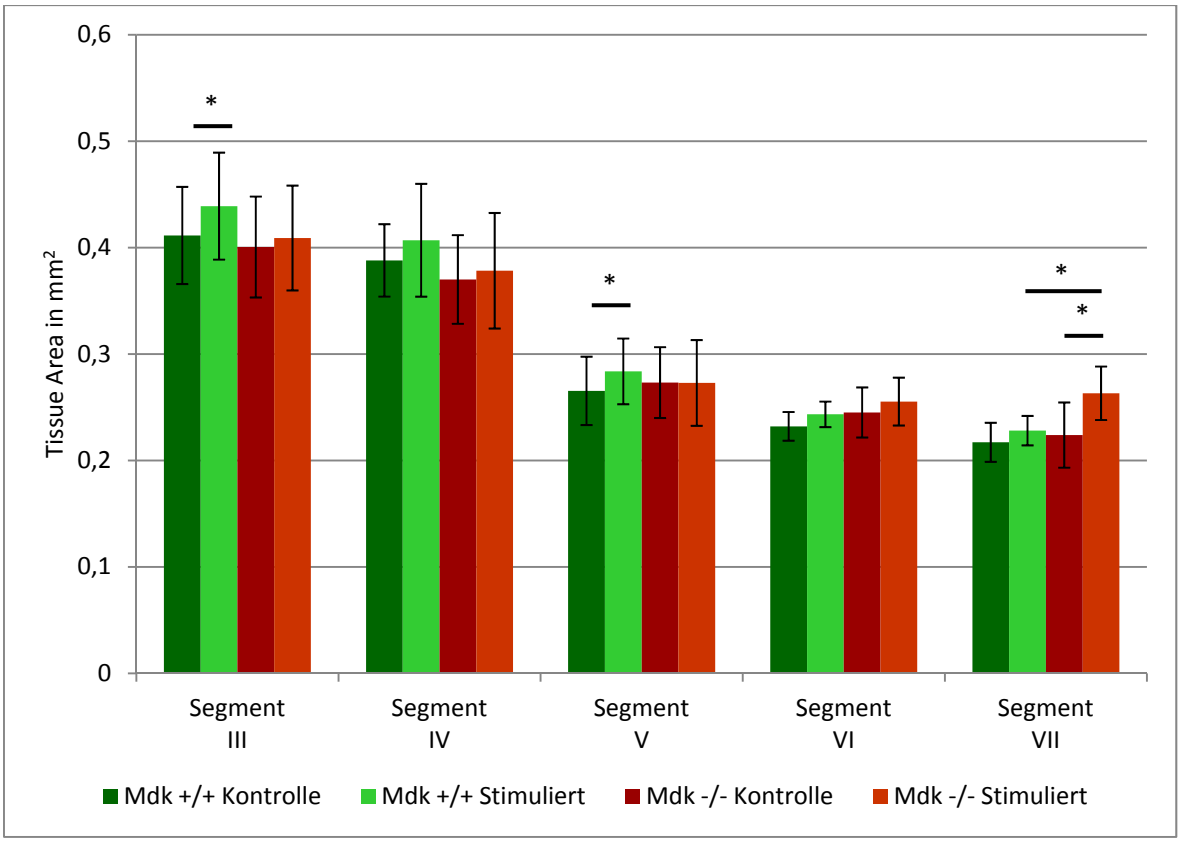


Abbildung 44: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der *Tissue Area* der Mausulnae

Dargestellt ist die Knochengesamtfläche *Tissue Area* (= Kortikalisfläche + Markraumfläche) in mm^2 in den untersuchten Segmenten III bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der *Tissue Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten III und V bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in dem Segment VII bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten die *Midkine*-defizienten Mäuse im Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme der *Tissue Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Midkine*-positiven Mäusen.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

- **Bone Area**

Die Kortikalisfläche *Bone Area* zeigte in den untersuchten Segmenten der *ROI* insgesamt eine tendenzielle Zunahme nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu den nicht-belasteten Ulnae in beiden Gruppen (siehe Tabelle 25). Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme in den Segmenten III, IV und V bei den WT-Mäusen und in den Segmenten III, IV, V und VII bei den KO-Mäusen nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Die *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten in dem am weitesten *distal* gelegenen Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme der *Bone Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildung 45).

Tabelle 25: *Bone Area* der Mausulnae

Abkürzungen: Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Bone Area (mm^2)	III	0,284	0,018	7	0,311	0,022	7
Bone Area (mm^2)	IV	0,272	0,020	7	0,286	0,018	7
Bone Area (mm^2)	V	0,242	0,017	7	0,255	0,014	7
Bone Area (mm^2)	VI	0,217	0,009	6	0,230	0,011	6
Bone Area (mm^2)	VII	0,201	0,016	6	0,215	0,019	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Bone Area (mm^2)	III	0,278	0,033	6	0,296	0,039	6
Bone Area (mm^2)	IV	0,268	0,028	6	0,284	0,035	6
Bone Area (mm^2)	V	0,239	0,025	6	0,251	0,030	6
Bone Area (mm^2)	VI	0,228	0,019	5	0,238	0,023	5
Bone Area (mm^2)	VII	0,205	0,025	5	0,244	0,022	5

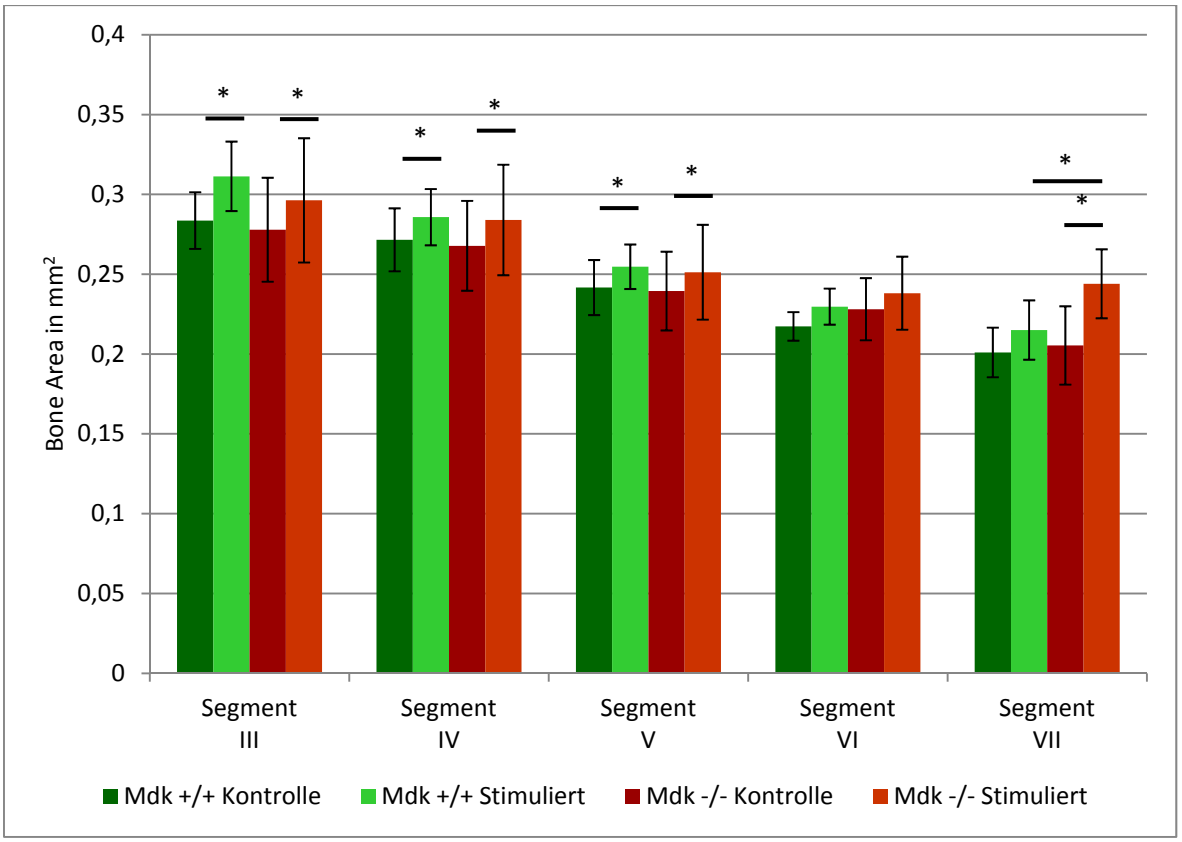


Abbildung 45: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der *Bone Area* der Mausulnae

Dargestellt ist die Kortikalisfläche *Bone Area* in mm^2 in den untersuchten Segmenten III bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der *Bone Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten III, IV und V bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in den Segmenten III, IV, V und VII bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten die *Midkine*-defizienten Mäuse im Segment VII eine signifikant stärkere Zunahme der *Bone Area* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Midkine*-positiven Mäusen. Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

- **Marrow Area**

Die Markraumfläche *Marrow Area*, die als Differenz der *Tissue Area* und *Bone Area* berechnet wurde, zeigte insgesamt keine signifikanten Veränderungen nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Gruppen (siehe Tabelle 26). Ebenso zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings zeigte die *Marrow Area* bei den *Mdk*-defizienten Mäusen - im Gegensatz zu den *Mdk*-positiven Mäusen - in den Segmenten III, IV und V eine tendenzielle Abnahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite (siehe Abbildung 46).

Tabelle 26: *Marrow Area* der Mausulnae

Abkürzungen: Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Marrow Area (mm^2)	III	0,128	0,030	7	0,128	0,036	7
Marrow Area (mm^2)	IV	0,116	0,019	7	0,121	0,037	7
Marrow Area (mm^2)	V	0,024	0,017	7	0,029	0,018	7
Marrow Area (mm^2)	VI	0,015	0,007	6	0,014	0,004	6
Marrow Area (mm^2)	VII	0,016	0,006	6	0,013	0,005	6

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Marrow Area (mm^2)	III	0,123	0,020	6	0,113	0,012	6
Marrow Area (mm^2)	IV	0,102	0,022	6	0,094	0,022	6
Marrow Area (mm^2)	V	0,034	0,014	6	0,022	0,013	6
Marrow Area (mm^2)	VI	0,017	0,007	5	0,017	0,005	5
Marrow Area (mm^2)	VII	0,018	0,007	5	0,019	0,005	5

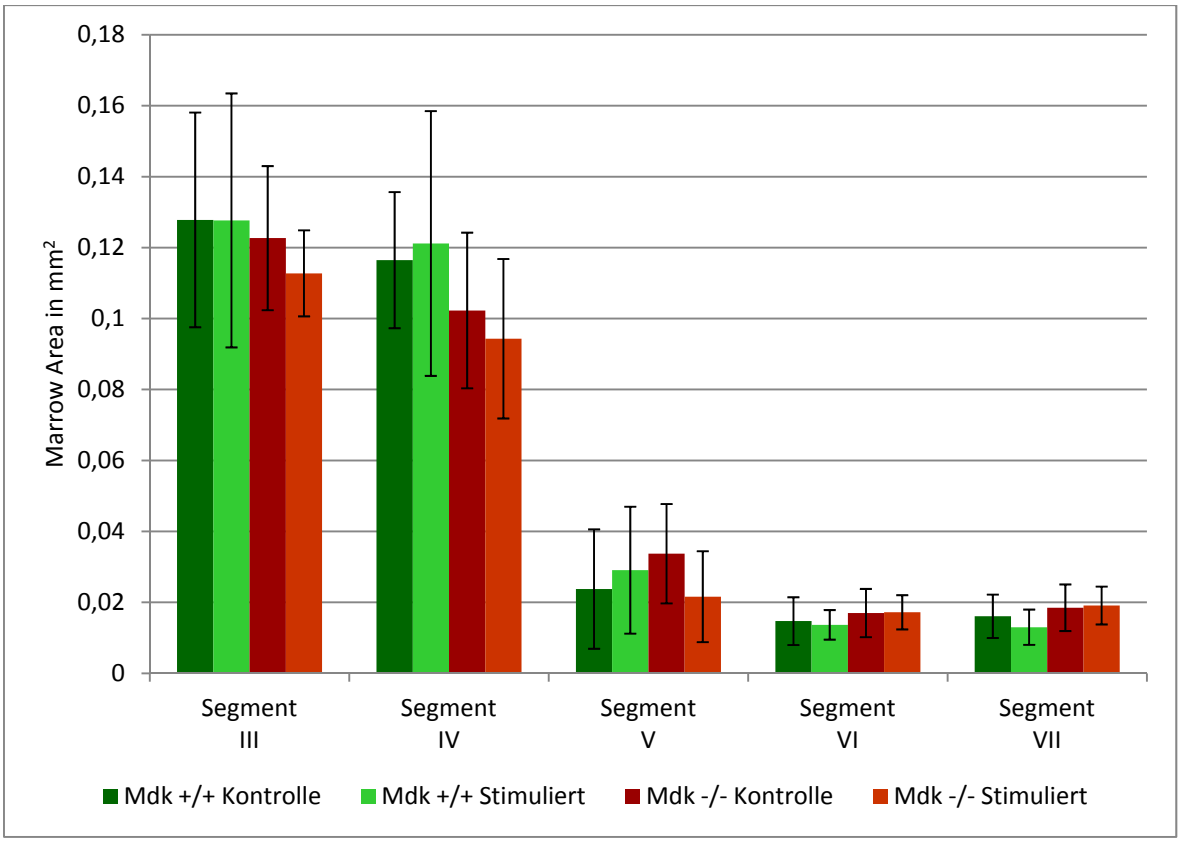


Abbildung 46: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung der *Marrow Area* der Mausulnae

Dargestellt ist die Markraumfläche *Marrow Area* in mm^2 in den untersuchten Segmenten III bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der *Marrow Area* in den einzelnen Segmenten der mechanisch stimulierten und der mechanisch nicht-stimulierten Ulnae in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der beiden Gruppen.

Abkürzungen: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

- **Mineralisiertes Kortikalisvolumen**

Das mineralisierte Kortikalisvolumen zeigte in den untersuchten Segmenten der *ROI* insgesamt eine tendenzielle Zunahme nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu den nicht-belasteten Ulnae in beiden Gruppen (siehe Tabelle 27). Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten I, II, III, IV, V und VI bei den WT-Mäusen und in den Segmenten I, II, III, IV und V bei den KO-Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 47).

Tabelle 27: Mineralisiertes Kortikalisvolumen der Mausulnae

Abkürzungen: mKoV: mineralisiertes Kortikalisvolumen, Seg: Segment, *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	I	0,414	0,030	7	0,451	0,045	8
mKoV (mm^3)	II	0,374	0,026	7	0,398	0,032	8
mKoV (mm^3)	III	0,313	0,019	7	0,335	0,023	8
mKoV (mm^3)	IV	0,287	0,022	7	0,298	0,016	8
mKoV (mm^3)	V	0,265	0,016	7	0,276	0,013	8
mKoV (mm^3)	VI	0,243	0,007	6	0,257	0,016	7
mKoV (mm^3)	VII	0,222	0,015	5	0,240	0,031	7

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Seg**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
mKoV (mm^3)	I	0,385	0,057	6	0,426	0,053	6
mKoV (mm^3)	II	0,346	0,043	6	0,380	0,046	6
mKoV (mm^3)	III	0,298	0,033	6	0,322	0,035	6
mKoV (mm^3)	IV	0,280	0,033	6	0,296	0,034	6
mKoV (mm^3)	V	0,264	0,026	6	0,279	0,029	6
mKoV (mm^3)	VI	0,252	0,025	5	0,263	0,022	5
mKoV (mm^3)	VII	0,225	0,031	5	0,265	0,027	5

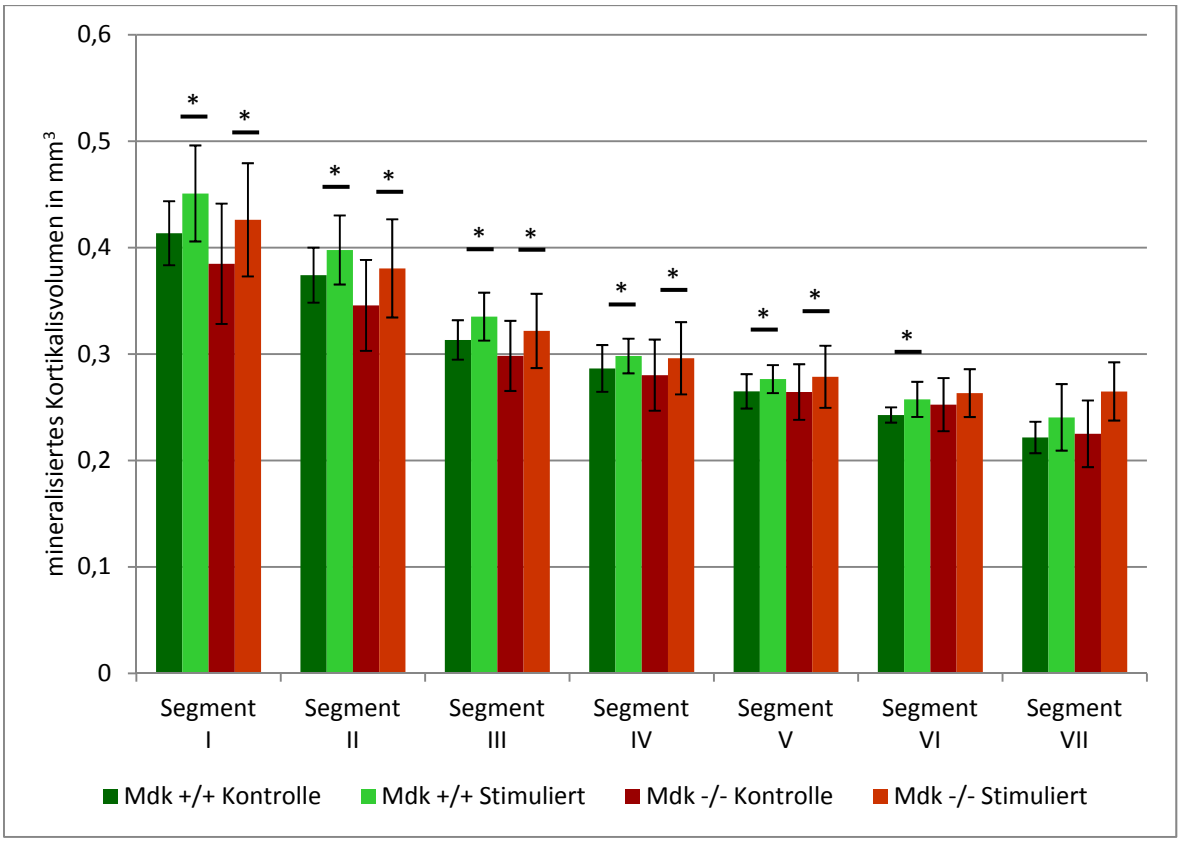


Abbildung 47: Diagramm der Micro-Computertomogramm-Auswertung des mineralisierten Kortikalisvolumens der Mausulnae

Dargestellt ist das mineralisierte Kortikalisvolumen in mm^3 in den untersuchten Segmenten I bis VII der *Region of Interest*. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des mineralisierten Kortikalisvolumens nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in den Segmenten I, II, III, IV, V und VI bei den *Midkine*-positiven Mäusen und in den Segmenten I, II, III, IV und V bei den *Midkine*-defizienten Mäusen. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Abkürzungen/Symbole: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient, * bedeutet $p \leq 0,05$

3.2. Ergebnisse der biomechanischen Testung

In der vorliegenden Studie wurde eine Drei-Punkt-Biegung zur Ermittlung der Biegesteifigkeiten der Tibiae und Ulnae durchgeführt. Durch den Vergleich der Biegesteifigkeit der mechanisch stimulierten Knochen (die Tibia mittels Vier-Punkt-Biegung und die Ulna mittels axialer Kompression) mit der Biegesteifigkeit der mechanisch nicht-stimulierten Knochen, wurde der Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Biegesteifigkeit der Tibia und Ulna in beiden Gruppen untersucht. Zudem erfolgte ein Vergleich der Biegesteifigkeiten der untersuchten Knochen der *Mdk*-positiven und der *Mdk*-defizienten Mäuse, um den Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die Biegesteifigkeit und die mechanisch induzierte Knochenantwort *in-vivo* zu untersuchen.

Die ermittelte Biegesteifigkeit der Tibiae und Ulnae zeigte in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu den nicht-belasteten Knochen (siehe Tabelle 28). Bei den Tibiae zeigte sich in der Gruppe der *Mdk*-positiven Mäuse eine tendenzielle Abnahme der Biegesteifigkeit und in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten sich praktisch keine Veränderungen der Biegesteifigkeit nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Bei den Ulnae zeigte sich in der Gruppe der *Mdk*-positiven Mäuse eine tendenzielle Zunahme der Biegesteifigkeit und in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten sich praktisch keine Veränderungen der Biegesteifigkeit nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Bei dem Vergleich der beiden Mausgruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) zeigten sich weder bei den Biegesteifigkeiten der Tibiae noch bei den Biegesteifigkeiten der Ulnae signifikante Unterschiede (siehe Abbildungen 48 und 49).

Tabelle 28: Biegesteifigkeiten der Maustibiae und Mausulnae

Abkürzungen: *Mdk +/+*: *Midkine*-positiv, *Mdk -/-*: *Midkine*-defizient, MW: Mittelwert, StAb: Standardabweichung, n: Anzahl Knochen

		***Mdk +/+* Kontrolle**			***Mdk +/+* Stimuliert**		
Parameter	**Knochen**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Biegesteifigkeit (Nmm^2)	Tibia	2386,001	472,146	8	2062,031	300,081	8
Biegesteifigkeit (Nmm^2)	Ulna	610,157	163,122	8	748,155	269,951	8

		***Mdk -/-* Kontrolle**			***Mdk -/-* Stimuliert**		
Parameter	**Knochen**	**MW**	**StAb**	**n**	**MW**	**StAb**	**n**
Biegesteifigkeit (Nmm^2)	Tibia	2427,655	521,220	6	2468,279	681,754	6
Biegesteifigkeit (Nmm^2)	Ulna	685,017	149,021	6	666,836	120,518	6

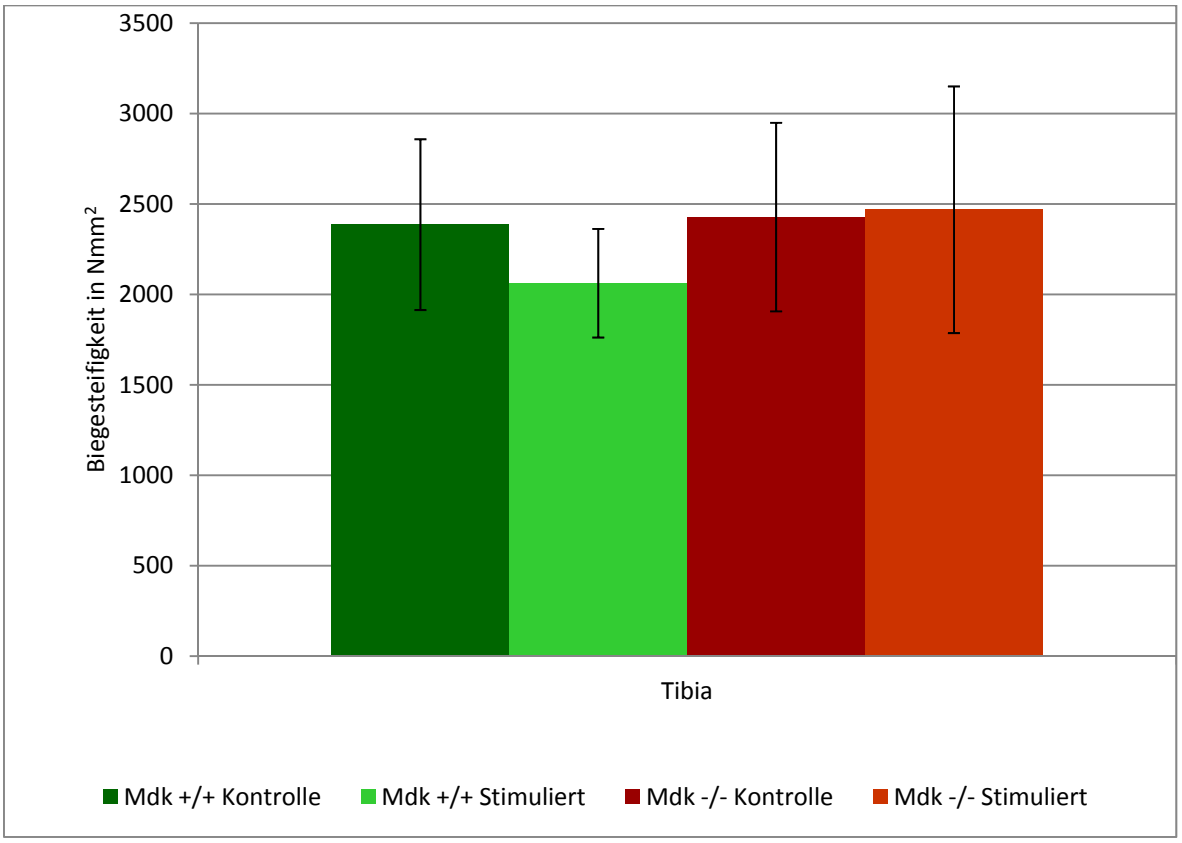


Abbildung 48: Diagramm der biomechanischen Auswertung der Biegesteifigkeit der Maustibiae

Dargestellt ist die Biegesteifigkeit in Nmm^2 der untersuchten Tibiae. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Tibiae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der Biegesteifigkeit der mechanisch stimulierten und der mechanisch nicht-stimulierten Tibiae in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich bei dem Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Abkürzungen: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

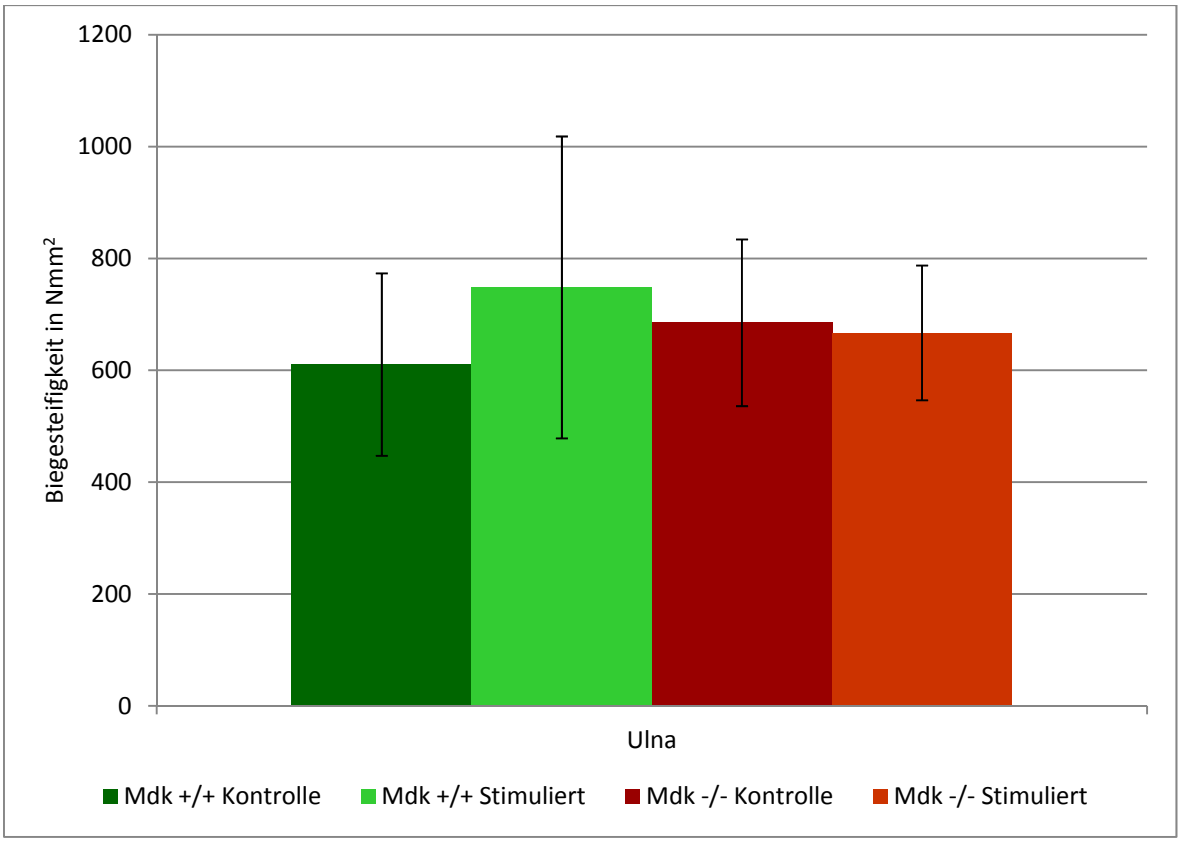


Abbildung 49: Diagramm der biomechanischen Auswertung der Biegesteifigkeit der Mausulnae

Dargestellt ist die Biegesteifigkeit in Nmm^2 der untersuchten Ulnae. Für die *Midkine*-positiven (*Mdk +/+*) und für die *Midkine*-defizienten (*Mdk -/-*) Mäuse ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der nicht-belasteten linken (Kontrolle) und der mechanisch belasteten rechten (Stimuliert) Ulnae abgebildet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der Biegesteifigkeit der mechanisch stimulierten und der mechanisch nicht-stimulierten Ulnae in beiden Gruppen. Ebenso zeigten sich bei dem Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Abkürzungen: Mdk +/+: *Midkine*-positiv, Mdk -/-: *Midkine*-defizient

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse der µCT-Auswertung

4.1.1. Ergebnisse der dynamischen Vier-Punkt-Biegung der Tibia

In unserer Studie haben wir die rechte Tibia von weiblichen *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäusen im Alter von ca. 13 Monaten mit einer Kraft von 5,0 N mittels dynamischer Vier-Punkt-Biegung belastet. Dies führte sowohl bei den *Mdk*-positiven als auch bei den *Mdk*-defizienten Tieren zu einer Belastung von ca. 2000 µstrain an der *medialen* periostalen Knochenoberfläche (Ergebnisse der *ex-vivo* Kalibrierung der Stimulationsmaschine, Daten nicht gezeigt). Bei den *ex-vivo* Kalibrierungsversuchen der Tibia zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen den applizierten Kräften von 0,5 bis 5,5 N und den auftretenden Belastungen in beiden Mausgruppen. Zudem zeigten sich bei der Applikation der Kräfte keine signifikanten Unterschiede der auftretenden Belastungen zwischen den beiden Genotypen (Liedert, Mattausch et al. 2011). In unserer Studie konnten wir zudem zeigen, dass bei allen bestimmten Parametern zur Charakterisierung der kortikalen Knochenmasse bzw. -fläche zwischen den *Mdk*-positiven und den *Mdk*-defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede an den mechanisch nicht-stimulierten Tibiae bestanden. Daraus lässt sich schließen, dass Unterschiede der mechanisch induzierten Knochenantwort zwischen den beiden Genotypen auf die *Mdk*-Defizienz zurückzuführen sind und nicht auf Unterschiede der kortikalen Knochenstruktur und/oder unterschiedlich hohe Belastungen bei der mechanischen Stimulation.

Zudem haben wir in unserer Studie an den Tibiae eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke *medial* und *lateral* - also an der Zug- und Druckseite - sowie eine signifikante Zunahme des Mittelwerts der *medial* und *lateral* bestimmten Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite in beiden Versuchsgruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) beobachtet (siehe Abbildungen 23, 24 und 25). Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede. In der WT-Gruppe hat die Kortikalisdicke insgesamt durchschnittlich um ca. 17 Prozent und in der KO-Gruppe um ca. 18 Prozent zugenommen. Das mineralisierte Kortikalisvolumen zeigte ebenfalls eine tendenzielle Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich

zu der Kontrollseite. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich wiederum keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 28). Das mineralisierte Kortikalisvolumen hat bei den WT-Tieren durchschnittlich um ca. 7 Prozent und bei den KO-Tieren um ca. 8 Prozent zugenommen.

Desweiteren konnten wir in der vorliegenden Studie eine Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche der Tibia nach mechanischer *in-vivo* Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung beobachten (siehe Abbildung 29). Dabei zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse eine tendenziell stärkere Zunahme des mineralisierten Geflechtknochenvolumens nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen. Damit zeigte sich die Tendenz, dass Mdk einen negativen Einfluss auf die mechanisch induzierte Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche haben könnte.

Bei der histomorphometrischen Auswertung von Knochenschliffen der Tibia zeigte sich ebenso eine starke Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche und ein signifikanter Anstieg der *mineralizing surface*, *mineral apposition rate* und *bone formation rate* an der endokortikalen Knochenoberfläche der Tibia nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Vogele 2010).

Bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia entsteht im Bereich zwischen den beiden inneren Auflageflächen eine Region mit maximaler Biegung. Dabei kommt es durch die mechanische Belastung sowohl an der periostalen als auch an der endokortikalen Knochenoberfläche zu einer Dehnung (Turner, Akhter et al. 1991). Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass an der periostalen Knochenoberfläche eine höhere Dehnung auftritt als an der endokortikalen Knochenoberfläche (Turner, Akhter et al. 1991; Akhter, Cullen et al. 1998; Pedersen, Akhter et al. 1999; Cullen, Smith et al. 2000). Akhter *et al.* berechneten, dass durch die mechanische Stimulation der Tibia von Mäusen mit einer Kraft von 9,3 N an der periostalen Knochenoberfläche eine Belastung von ca. 4000 - 5000 µstrain und an der endokortikalen Knochenoberfläche von ca. 2500 - 3000 µstrain auftritt (Akhter, Cullen et al. 1998). Dabei konnte - wie in unserer Studie - gezeigt werden, dass eine lineare Beziehung zwischen der Größe der applizierten Kraft und der auftretenden Belastung, bei ansonsten konstanten Belastungsbedingungen, besteht (Akhter, Raab et al. 1992; Forwood, Bennett et al. 1998). Die Größe der applizierten Kraft

spielt eine Rolle, da eine Belastung im Bereich von ca. 1000 - 2000 µstrain nötig ist, um ein signifikantes Knochen*remodeling* zu initiieren, wie durch Untersuchungen an Truthahn (Rubin and Lanyon 1985), Hund (Burr, Schaffler et al. 1989), Schwein (Goodship, Lanyon et al. 1979) und Ratte (Turner, Akhter et al. 1991; Akhter, Raab et al. 1992; Raab-Cullen, Akhter et al. 1994; Raab-Cullen, Akhter et al. 1994) gezeigt werden konnte. Die irreguläre Form und Struktur der Tibia sowie die Richtung der applizierten Kraft führt zu weiteren regionalen Unterschieden in der Größe der auftretenden Belastung. Bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia kommt es zu einer Kompression an der *lateralen* und zu einer Zugbeanspruchung an der *medialen* Knochenoberfläche. Dabei nimmt die Größe der Belastung mit zunehmender Entfernung von der neutralen Biegeachse zu (Turner, Akhter et al. 1991; Akhter, Raab et al. 1992; Cullen, Smith et al. 2000).

Die Größe der lokal auftretenden Belastung bestimmt - wie auch von Frost in der Mechanostat-Theorie beschrieben - die Art und Stärke der Knochenantwort (Frost 1987; Forwood and Turner 1995). Turner *et al.* beobachteten bei hohen Belastungen vor allem die Bildung von Geflechtknochen, wohingegen sich bei geringeren Belastungen vor allem Lamellenknochen bildete (Turner, Akhter et al. 1991). Turner *et al.* haben in ihrer Studie an Ratten gezeigt, dass die Applikation von 40 N und mehr an der periostalen Knochenoberfläche vor allem zu einer Bildung von Geflechtknochen führte, wohingegen es an der endokortikalen Knochenoberfläche ausschließlich zur Bildung von Lamellenknochen kam (Turner, Forwood et al. 1994).

Turner *et al.* haben die Regulation der Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche als ein „Alles-oder-Nichts“-Prinzip beschrieben. Dabei ist die Bildung von Geflechtknochen entweder abwesend oder zeigt nach Überschreiten eines Schwellenwertes der applizierten Kraft eine maximale Bildung. Die Bildung von Lamellenknochen an der endokortikalen Knochenoberfläche zeigte hingegen nach Überschreiten eines Schwellenwertes eine lineare Beziehung zwischen der Größe der Kraft und der Menge des gebildeten Knochens. Turner *et al.* vermuteten, dass die Knochenformation hier einem negativen Rückkopplungsmechanismus (*negative feedback regulation system*) folgt. Dabei nimmt die Formation von Lamellenknochen ab, sobald die Widerstandsfähigkeit des Knochens - durch den neu gebildeten Lamellenknochen - ausreicht, um die applizierte Belastung zu kompensieren (Turner, Forwood et al. 1994). Ebenso konnten Forwood *et al.* zeigen, dass es nach Überschreiten eines Schwellenwertes

der applizierten Kraft zu einer Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche kommt (Forwood, Bennett et al. 1998). Pedersen *et al.* (Pedersen, Akhter et al. 1999) zeigten im Gegensatz zu Turner *et al.* (Turner, Forwood et al. 1994) und Forwood *et al.* (Forwood, Bennett et al. 1998) bei ihren Untersuchungen an C3H/HeJ-Mäusen sowohl an der endostalen als auch an der periostalen Knochenoberfläche eine lineare Beziehung zwischen der Größe der applizierten Kraft und der resultierenden Knochenantwort.

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass die Knochenantwort auf eine mechanische Stimulation stark von der Größe der auftretenden Belastung abhängt. Turner *et al.* vermuteten, dass sich die Zellpopulationen an der periostalen und endokortikalen Knochenoberfläche in ihrem Antwortverhalten auf mechanische Belastungen unterscheiden. Periostale Knochenzellen bildeten bei gleicher Belastung deutlich weniger Lamellenknochen als endokortikale Knochenzellen (Turner, Forwood et al. 1994). Ebenso beobachteten Jones *et al.*, dass periostale Osteoblasten bereits auf physiologische Belastungen und Osteoblasten des *Havers-Systems* erst auf unphysiologisch hohe Belastungen reagierten (Jones, Nolte et al. 1991). Analog dazu konnten Midura *et al.* eine höhere Empfindlichkeit von periostalen Osteoblasten auf PTH im Vergleich zu endostalen Osteoblasten zeigen (Midura, Su et al. 2003).

Diese Unterschiede sind aus biomechanischer Sicht plausibel, da eine Zunahme von Lamellenknochen an der periostalen Knochenoberfläche zu einer stärkeren Zunahme des FTM und somit zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Knochens gegenüber einer Biegebelastung führt als eine gleich große Zunahme von Lamellenknochen an der endostalen Knochenoberfläche. Daher ist eine geringere Bildung von Lamellenknochen durch die periostalen Zellpopulationen - im Vergleich zu den endostalen Zellpopulationen - ausreichend, um ähnliche Effekte bezüglich der Erhöhung des FTM und damit der Widerstandsfähigkeit der Knochen gegenüber einer Biegebelastung möglichst ressourcenschonend zu erreichen (Turner, Forwood et al. 1994).

In unserer Studie spiegelte sich die signifikante Zunahme der Kortikalisdicke und die tendenzielle Zunahme des mineralisierten Kortikalisvolumens sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den KO-Tieren in einer tendenziellen Zunahme des Maximums und Minimums des FTM nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite wieder. Bei dem Maximum des FTM war die Zunahme in der Gruppe der WT-Tiere

signifikant. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 26 und 27). Das Minimum des FTM hat bei den WT-Tieren durchschnittlich um ca. 8 Prozent und bei den KO-Tieren um ca. 11 Prozent zugenommen. Das Maximum des FTM hat bei den WT-Tieren durchschnittlich um ca. 14 Prozent und bei den KO-Tieren um ca. 16 Prozent zugenommen.

Pedersen *et al.* haben in ihrer Studie eine signifikante Zunahme des FTM nach mechanischer Belastung der Tibia von Mäusen beobachtet (Pedersen, Akhter et al. 1999). In unserer Studie kam es hingegen insgesamt nur zu einer tendenziellen Zunahme nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Dies könnte auf die geringe applizierte Kraft von 5 N und auf den kurzen Stimulationszeitraum von zwei Wochen zurückgeführt werden. Schließlich haben Pedersen *et al.* in ihrer Studie die Tibiae der untersuchten Mäuse mit Kräften von 8, 9,4 und 11,1 N über einen Zeitraum von drei Wochen stimuliert (Pedersen, Akhter et al. 1999). Zudem könnte die Ausrichtung des Schwerpunktkoordinatensystems und damit die Lage der Achsen zur Bestimmung der FTMs in unserer Studie für die insgesamt lediglich tendenzielle Zunahme der FTMs nach mechanischer Stimulation verantwortlich sein. So könnten die Hauptträgheitsmomente in unserer Studie nicht so ausgerichtet gewesen sein, dass sich die beobachtete signifikante Zunahme der Kortikalisdicke sowohl *medial* als auch *lateral* in einer signifikanten Zunahme des Maximums oder Minimums des FTM hätte zeigen können. Daher sollte in künftigen Studien eine anatomische Ausrichtung des Koordinatensystems bzw. der Achsen zur Bestimmung der FTMs und demnach eine Berechnung der FTMs entlang der anatomischen Achsen erfolgen, um den beobachteten mechanisch induzierten Knochenzuwachs auch in einer Zunahme des FTM nachzuweisen.

4.1.2. Ergebnisse der Druckbelastung der Tibia

Bereits Turner *et al.*, die das Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia entwickelt haben, untersuchten neben der Knochenantwort auf eine mechanische Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung auch die Effekte einer Druckbelastung der Tibia (*sham loading*) (Turner, Akhter et al. 1991). Dieser Versuchsaufbau diente der Untersuchung des Einflusses des Drucks der Auflageflächen an der periostalen Knochenoberfläche bei der Stimulation auf die mechanisch induzierte Knochenantwort. Damit lässt sich untersuchen welchen Einfluss der Druck der Auflageflächen bei der mechanischen Stimulation auf die Knochenantwort hat.

In unserer Studie zeigte sich, dass auch die Druckbelastung der linken Tibia von jeweils zwei Tieren der beiden Gruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) zu einer Knochenantwort führte. Dabei zeigte die Kortikalisdicke nach Druckbelastung - im Gegensatz zu der Vier-Punkt-Biegung - keine signifikante Zunahme in beiden Gruppen. Ebenso bestanden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 30, 31 und 32). Das mineralisierte Kortikalisvolumen zeigte nach Druckbelastung - analog zu der Kortikalisdicke - nur geringe Veränderungen und die Werte lagen sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den KO-Tieren unter den Werten nach der Vier-Punkt-Biegung (siehe Abbildung 35). Das Maximum des FTM zeigte nur bei den KO-Tieren eine tendenzielle Zunahme nach der Druckbelastung. Diese Zunahme war aber geringer als die Zunahme nach der Vier-Punkt-Biegung. Bei den WT-Tieren zeigten sich praktisch keine Veränderungen des Maximums des FTM nach der Druckbelastung. Das Minimum des FTM zeigte bei den WT-Tieren nach der Druckbelastung eine tendenzielle Abnahme und bei den KO-Tieren eine tendenzielle Zunahme auf Werte, die denen der Vier-Punkt-Biegung entsprachen (siehe Abbildungen 33 und 34).

Zudem konnten wir - analog zu der mechanischen Stimulation mittels Vier-Punkt-Biegung - auch nach der Druckbelastung (*sham loading*) eine Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche beobachten. Dabei zeigte sich bei den auf Druck belasteten Tibiae eine tendenziell geringere Bildung von mineralisiertem Geflechtknochen im Vergleich zu den mittels Vier-Punkt-Biegung stimulierten Tibiae. Zudem zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse sowohl nach der Druckbelastung als auch nach der Vier-Punkt-Biegung eine tendenziell stärkere Formation von mineralisiertem Geflechtknochen im

Vergleich zu den *Mdk*-positiven Tieren (siehe Abbildung 36). Damit zeigte sich wieder die Tendenz, dass Mdk einen negativen Einfluss auf die mechanisch induzierte Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche haben könnte.

Bei der histomorphometrischen Analyse zeigte sich nach der Druckbelastung in beiden Gruppen eine tendenzielle Zunahme der *bone formation rate* an der endokortikalen Knochenoberfläche. Diese Zunahme war allerdings geringer als die beobachtete Zunahme der *bone formation rate* nach der Vier-Punkt-Biegung. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede (Vogele 2010).

Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie beobachteten Turner *et al.* bei ihren Untersuchungen sowohl bei den auf Druck belasteten Tibiae als auch bei den mittels Vier-Punkt-Biegung stimulierten Tibiae eine Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche. Dabei war die Menge des neu gebildeten Geflechtknochens bei den auf Druck belasteten Tibiae geringer als bei den mittels Vier-Punkt-Biegung belasteten Tibiae. Zudem beobachteten Turner *et al.* bei den auf Druck belasteten Tibiae eine geringe Bildung von Lamellenknochen an der endokortikalen Knochenoberfläche. Turner *et al.* hatten ursprünglich vermutet, dass sich Knochen nur als Antwort auf eine Biegebelastung bildet. Daher gingen sie davon aus, dass auch bei der Druckbelastung geringe Biegebelastungen auftreten und/oder Mikroverletzungen (*microcracks*), die durch den Druck der Auflageflächen verursacht sein könnten, zu einer Knochenformation führen (Turner, Akhter et al. 1991). Burr *et al.* zeigten, dass die Bildung von Geflechtknochen nicht bzw. nicht nur als eine „pathologische“ Reaktion auf Verletzungen des Knochengewebes auftritt, sondern auch eine physiologische Antwort auf hohe Biegebelastungen darstellt (Burr, Schaffler et al. 1989). Forwood *et al.* zeigten, dass es sowohl durch die Vier-Punkt-Biegung als auch durch das *sham loading* zu einer Dehnung an der periostalen Knochenoberfläche kommt. Sie belasteten die Tibiae von Ratten mit einer Kraft von 10 bis 60 N *in-vivo*. Dabei konnten sie bei der Vier-Punkt-Biegung mit Hilfe von Dehnungsmessstreifen eine Belastung von 420 - 2664 µstrain und bei der Druckbelastung eine deutlich geringere Belastung von 67 - 350 µstrain an der periostalen Knochenoberfläche messen (Forwood, Bennett et al. 1998).

Um Verletzungen als Ursache der Knochenantwort auszuschließen wurden die belasteten Tibiae in einigen der durchgeführten Studien auf Verletzungen hin untersucht. Dabei konnten aber selbst in Versuchsgruppen, die sehr hohen Belastungen ausgesetzt waren,

keine Verletzungen nachgewiesen werden (Turner, Akhter et al. 1991; Turner, Forwood et al. 1994; Akhter, Cullen et al. 1998; Pedersen, Akhter et al. 1999).

Auch in weiteren Studien zeigte sich eine Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche als Knochenantwort auf das *sham loading* der Tibiae von Ratten oder Mäusen. Dabei war die Menge des gebildeten Geflechtknochens geringer als nach einer Vier-Punkt-Biegung. An der endokortikalen Knochenoberfläche zeigte sich durch das *sham loading* - im Gegensatz zu der mechanischen Belastung mittels Vier-Punkt-Biegung - keine Formation von Lamellenknochen (Turner, Forwood et al. 1994; Akhter, Cullen et al. 1998; Forwood, Bennett et al. 1998; Pedersen, Akhter et al. 1999; Akhter, Cullen et al. 2002).

Diese Ergebnisse zeigen, dass allein durch den Druck der Auflageflächen bei der mechanischen Stimulation der Tibia eine Knochenantwort verursacht wird. Daraus lässt sich schließen, dass jede beobachtete Knochenantwort bei der Untersuchung des mechanisch induzierten Knochen*remodelings* mit Hilfe des Modells der Vier-Punkt-Biegung der Tibia durch die Form der Kraftübertragung (die Auflageflächen drücken direkt auf die periostale Knochenoberfläche) beeinflusst wird. Dieser Einfluss ist gerade bei der Untersuchung von Mäuseknochen, die nur etwa halb so groß sind wie die von Ratten, zu berücksichtigen. Schließlich ist der Bereich der maximalen Biegung zwischen den beiden inneren Auflageflächen (bei Ratten ca. 8,5 mm und bei Mäusen ca. 4,5 mm) bei Mäusen sehr klein und daher praktisch immer von der Knochenantwort auf den Druck der Auflageflächen überlagert bzw. gestört (Akhter, Raab et al. 1992; Akhter, Cullen et al. 1998).

4.1.3. Ergebnisse der dynamischen axialen Kompression der Ulna

In unserer Studie haben wir die rechte Ulna von weiblichen *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäusen im Alter von ca. 13 Monaten mit einer Kraft von 2,5 N mittels dynamischer axialer Kompression belastet. Dies führte sowohl bei den *Mdk*-positiven als auch bei den *Mdk*-defizienten Tieren zu einer Belastung von ca. 2000 µstrain an der *medialen* periostalen Knochenoberfläche (Ergebnisse der *ex-vivo* Kalibrierung der Stimulationsmaschine, Daten nicht gezeigt). Bei den *ex-vivo* Kalibrierungsversuchen der Ulna zeigte sich dabei - analog zu den *ex-vivo* Kalibrierungsversuchen der Tibia - eine lineare Beziehung zwischen den applizierten Kräften und den auftretenden Belastungen in beiden Mausgruppen. Zudem zeigten sich bei der Applikation der Kräfte - analog zu der mechanischen Stimulation der Tibia - keine signifikanten Unterschiede der auftretenden Belastungen zwischen den beiden Genotypen (Liedert, Mattausch et al. 2011). In unserer Studie konnten wir zudem zeigen, dass prinzipiell bei allen bestimmten Parametern zur Charakterisierung der kortikalen Knochenmasse bzw. -fläche zwischen den *Mdk*-positiven und den *Mdk*-defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede an den mechanisch nicht-stimulierten Ulnae bestanden. Daraus lässt sich schließen, dass Unterschiede der mechanisch induzierten Knochenantwort zwischen den beiden Genotypen auf die *Mdk*-Defizienz zurückzuführen sind und nicht auf Unterschiede der kortikalen Knochenstruktur und/oder unterschiedlich hohe Belastungen bei der mechanischen Stimulation.

Nach der mechanischen Stimulation der Ulna mittels axialer Kompression und einer Kraft von 2,5 N konnten wir - im Gegensatz zu der Vier-Punkt-Biegung der Tibia - weder an der periostalen noch an der endokortikalen Knochenoberfläche eine Formation von Geflechtknochen beobachten. Ebenso zeigte sich bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen keine Bildung von Geflechtknochen nach der mechanischen Stimulation der Ulna (Vogele 2010). Allerdings konnten Lee *et al.,* die das Modell der axialen Kompression zur mechanischen Stimulation der Ulna erstmals an Mäusen angewendet haben, durch die Applikation größerer Kräfte eine Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche der Ulna nachweisen. So haben Lee *et al.* die Ulna von Mäusen mittels axialer Kompression entweder mit einer Kraft von 3,0 N oder mit einer Kraft von 4,3 N mechanisch stimuliert, was zu einer Belastung von ca. 2000 bzw. 3000 µstrain führte. In der Gruppe der mit 3,0 N belasteten Tiere zeigte sich

bei Lee *et al.* eine Zunahme der Bildung von Lamellenknochen an der periostalen Knochenoberfläche, wohingegen sich an der endokortikalen Knochenoberfläche keine signifikanten Veränderungen nach mechanischer Stimulation zeigten. In der Gruppe der mit 4,3 N belasteten Tiere zeigte sich an der periostalen Knochenoberfläche eine Bildung von Lamellenknochen und Geflechtknochen und an der endokortikalen Knochenoberfläche eine signifikante Zunahme der Bildung von Lamellenknochen. Lee *et al.* führten diese Unterschiede der mechanisch induzierten Knochenantwort auf eine an der periostalen Knochenoberfläche - im Vergleich zu der endokortikalen Knochenoberfläche - höhere auftretende Belastung zurück. Damit zeigten Lee *et al.*, dass die axiale Kompression der Ulna zu einer osteoanabolen Antwort in Abhängigkeit von der Größe der applizierten Kraft führt (Lee, Maxwell et al. 2002).

In unserer Studie konnten wir insgesamt eine tendenzielle Zunahme der Kortikalisdicke nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite beobachten. Die Unterschiede waren zum Teil signifikant (siehe Abbildungen 37, 38, 39, 40 und 41). In den Segmenten I bis VII der *ROI* zeigte sich durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme der *anterior* bestimmten Kortikalisdicke bei den WT-Tieren von ca. 6 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 14 Prozent, *posterior* zeigte sich bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 8 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 12 Prozent, *medial* zeigte sich bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 9 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 12 Prozent und *lateral* zeigte sich bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 14 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 19 Prozent.

Somit zeigte sich bei den WT-Tieren *medial* und *lateral* die tendenziell größte Zunahme der Kortikalisdicke und bei den KO-Tieren *anterior* und *lateral*. Durch die axiale Kompression der Ulna kommt es aufgrund der natürlichen Kurvatur der Ulna, welche im Bereich des *midshafts* (Mittelpunkt der Ulnadiaphyse) am größten ist, zu einer Verstärkung der *medio-lateralen* Krümmung mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugbeanspruchung an der *lateralen* Knochenoberfläche. Dabei nimmt die Größe der auftretenden Belastung mit zunehmender Entfernung von der neutralen Biegeachse zu (Torrance, Mosley et al. 1994; Lee, Maxwell et al. 2002; Robling, Hinant et al. 2002). Da die stärkste mechanisch induzierte Knochenformation an den Stellen mit der höchsten Belastung auftritt (Akhter, Raab et al. 1992; Torrance, Mosley et al. 1994; Lee, Maxwell et

al. 2002), wurde *medial* und *lateral* eine starke Knochenformation erwartet. So zeigten Robling *et al. medial* und *lateral* die höchste belastungsinduzierte Knochenformation bei der Untersuchung des mechanisch induzierten Knochen*remodelings* an Mäusen (Robling and Turner 2002).

In unserer Studie stimmt die tendenziell stärkste Zunahme der Kortikalisdicke als Antwort auf mechanische Stimulation an der *lateralen* Knochenoberfläche in beiden Mausgruppen mit den bisher bekannten und erwarteten Ergebnissen überein. Bei der histomorphometrischen Auswertung zeigten sich bei den untersuchten Parametern (*mineralizing surface*, *mineral apposition rate* und *bone formation rate*) nach mechanischer Stimulation endokortikal höhere Werte als periostal. Eigentlich wurde eine stärkere Reaktion an der periostalen Knochenoberfläche erwartet, da in anderen Studien eine stärkere Reaktion am *Periost* der Ulna gezeigt wurde (Lee, Maxwell et al. 2002). Da sowohl bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen als auch in der vorliegenden Studie Abweichungen von der erwarteten Knochenantwort beobachtet wurden, ist eine weitergehende Charakterisierung der Belastungsverteilung bei dem Modell der axialen Kompression der Ulna nötig, um die resultierende Knochenantwort besser zu verstehen.

Bei der von *anterior*, *posterior*, *medial* und *lateral* gemittelten gesamten Kortikalisdicke zeigte sich durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme der Kortikalisdicke bei den WT-Tieren von ca. 9 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 14 Prozent (siehe Abbildung 41). Damit hat die Kortikalisdicke bei den KO-Tieren insgesamt tendenziell stärker zugenommen als bei den WT-Tieren. Ebenso zeigte das mineralisierte Kortikalisvolumen in den Segmenten I bis VII bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 6 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 9 Prozent (siehe Abbildung 47). Die *Bone Area* zeigte bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 7 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 8 Prozent nach mechanischer Stimulation (siehe Abbildung 45). Das Maximum des FTM hat in den Segmenten I bis VII bei den WT-Tieren durchschnittlich um ca. 9 Prozent tendenziell zugenommen und bei den KO-Tieren um ca. 13 Prozent (siehe Abbildung 42). Das Minimum des FTM zeigte hingegen in den Segmenten I bis VII bei den WT-Tieren durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 12 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 10 Prozent (siehe Abbildung 43).

Die Ausrichtung des Schwerpunktkoordinatensystems und damit die Lage der Achsen zur Bestimmung der FTMs könnte - analog zu der Bestimmung der FTMs bei der Tibia - in unserer Studie für die insgesamt lediglich tendenzielle Zunahme der FTMs nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite verantwortlich sein. So könnten die Hauptträgheitsmomente in unserer Studie nicht so ausgerichtet gewesen sein, dass sich der mechanisch induzierte Knochenzuwachs auch in einer deutlichen Zunahme des Maximums oder Minimums des FTM hätte zeigen können. Daher sollte in künftigen Studien eine anatomische Ausrichtung des Koordinatensystems bzw. der Achsen zur Bestimmung der FTMs und demnach eine Berechnung der FTMs entlang der anatomischen Achsen erfolgen, um den beobachteten mechanisch induzierten Knochenzuwachs auch in einer Zunahme des FTM nachzuweisen.

Bei der histomorphometrischen Auswertung zeigte sich sowohl an der endokortikalen als auch an der periostalen Knochenoberfläche der Ulna eine signifikante Zunahme der *mineralizing surface*, *mineral apposition rate* und *bone formation rate* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Zudem konnte eine signifikant stärkere Zunahme der *mineral apposition rate* an der endokortikalen Knochenoberfläche und eine signifikant stärkere Zunahme der *mineralizing surface*, *mineral apposition rate und bone formation rate* an der periostalen Knochenoberfläche bei den mechanisch belasteten Ulnae der *Mdk*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den mechanisch belasteten Ulnae der *Mdk*-positiven Mäusen gezeigt werden (Vogele 2010).

Die *Marrow Area* zeigte in unserer Studie bei den WT-Tieren insgesamt praktisch keine Veränderungen nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite. Bei den KO-Tieren zeigte sich hingegen eine tendenzielle Abnahme der *Marrow Area* von insgesamt ca. 9 Prozent (siehe Abbildung 46). Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die kortikale Knochenmasse bei den KO-Mäusen durch die mechanische Stimulation tendenziell stärker zugenommen hat als bei den WT-Mäusen. Dies spiegelte sich in der tendenziell stärkeren Zunahme der Kortikalisdicke, der *Bone Area* und des mineralisierten Kortikalisvolumens bei den KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren wieder. Die *Tissue Area* zeigte bei den WT-Tieren eine tendenzielle Zunahme von ca. 6 Prozent und bei den KO-Tieren von ca. 5 Prozent (siehe Abbildung 44). Somit zeigte die *Tissue Area* bei beiden Mausgenotypen eine tendenziell gleich große Zunahme nach mechanischer Stimulation. Dies könnte durch die bei den KO-Tieren tendenziell stärkere Zunahme der

Kortikalisdicke, *Bone Area* und des mineralisierten Kortikalisvolumens zusammen mit einer tendenziellen Abnahme der *Marrow Area* im Vergleich zu den WT-Tieren erklärbar sein.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich weiter schließen, dass die tendenzielle Zunahme der kortikalen Knochenmasse nach mechanischer Stimulation vor allem aus einer Zunahme der Knochenmasse an der endokortikalen Knochenoberfläche resultierte. So zeigte sich auch bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen, dass die ermittelten Werte der bestimmten Parameter (*mineralizing surface*, *mineral apposition rate* und *bone formation rate*) an der endokortikalen Knochenoberfläche - wenn auch entgegen der Erwartungen - größer waren als an der periostalen Knochenoberfläche (Vogele 2010).

Diese Ergebnisse zeigen zusammen mit den bei der histomorphometrischen Auswertung von Knochenschliffen beobachteten Veränderungen die Tendenz, dass die mechanische Stimulation der Ulna mittels axialer Kompression zu einer Zunahme der kortikalen Knochenmasse führte und dass Mdk dabei einen negativen Einfluss auf die mechanisch induzierte Knochenantwort haben könnte.

In unserer Studie konnten wir zudem eine tendenziell stärkere Zunahme der untersuchten Parameter in den *distalen* Segmenten beobachten. Die Kortikalisdicke zeigte bei den WT-Tieren im Segment I durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 1 Prozent, im Segment II von ca. 6 Prozent, im Segment III von ca. 8 Prozent, im Segment IV von ca. 3 Prozent, im Segment V von ca. 3 Prozent, im Segment VI von ca. 19 Prozent und im Segment VII von ca. 24 Prozent. Bei den KO-Tieren zeigte sich im Segment I durchschnittlich eine tendenzielle Zunahme von ca. 12 Prozent, im Segment II von ca. 13 Prozent, im Segment III von ca. 9 Prozent, im Segment IV von ca. 8 Prozent, im Segment V von ca. 13 Prozent, im Segment VI von ca. 24 Prozent und im Segment VII von ca. 20 Prozent.

Die tendenzielle Zunahme der Kortikalisdicke, *Bone Area* und des mineralisierten Kortikalisvolumens spiegelte sich auch in einer tendenziellen Zunahme des Maximums und Minimums des FTM wieder (siehe Abbildungen 42 und 43). Dabei zeigte sich eine tendenziell stärkere Zunahme des FTM in den *distalen* Segmenten. Das Maximum des FTM hat bei den WT-Tieren im Segment VII tendenziell um ca. 11 Prozent und bei den KO-Tieren tendenziell um ca. 35 Prozent zugenommen. Das Minimum des FTM hat bei den WT-Tieren im Segment VII tendenziell um ca. 17 Prozent und bei den KO-Tieren

tendenziell um ca. 43 Prozent zugenommen. Somit zeigte sich eine tendenziell stärkere Zunahme des Minimums des FTM im Vergleich zu dem Maximum des FTM. Ebenso konnten Robling *et al.* eine stärkere Zunahme des Minimums des FTM im Vergleich zu dem Maximum des FTM beobachten (Robling, Hinant et al. 2002).

Somit zeigte sich in unserer Studie - analog zu der histomorphometrischen Auswertung und zu anderen Studien - die stärkste mechanisch induzierte Knochenantwort sowohl an der periostalen als auch an der endokortikalen Knochenoberfläche in den *distalen* Segmenten bzw. Knochenschliffen (Mosley and Lanyon 1998; Lee, Maxwell et al. 2002; Vogele 2010).

Eine Erklärung dafür ist, dass die Knochen *distal* - im Vergleich zu den *proximalen* Abschnitten - dünner und damit weniger steif sind. Dadurch kommt es bei der Applikation einer Kraft zu einer höheren mechanischen Belastung in den *distalen* Bereichen. Dies führt wiederum zu einer stärkeren osteoanabolen Knochenantwort, um die kortikale Knochenmasse sowie das FTM und somit die Widerstandsfähigkeit der Knochen gegenüber einer Biegebelastung zu erhöhen. So haben auch Pedersen *et al.* beschrieben, dass Knochen hypertrophiert, um das FTM zu erhöhen und somit die Deformation der Knochen durch eine mechanische Biegebelastung zu minimieren (Pedersen, Akhter et al. 1999).

4.2. Ergebnisse der biomechanischen Testung mittels Drei-Punkt-Biegung

In der vorliegenden Studie haben wir eine nicht-destruktive Drei-Punkt-Biegung zur Ermittlung der Biegesteifigkeiten der mechanisch stimulierten und mechanisch nicht-stimulierten Tibiae und Ulnae von weiblichen *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäusen im Alter von ca. 13 Monaten durchgeführt. Die mechanische Stimulation der jeweils rechten Tibia mittels Vier-Punkt-Biegung und der jeweils rechten Ulna mittels axialer Kompression einer Maus führte insgesamt zu einer tendenziellen bzw. zum Teil signifikanten Zunahme der kortikalen Knochenmasse (Kortikalisdicke, mineralisiertes Kortikalisvolumen und *Bone Area*) und des FTM. Daher wurde auch eine Zunahme der Biegesteifigkeit der untersuchten Knochen nach der mechanischen Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite erwartet.

In unserer Studie konnten wir allerdings keine signifikanten Veränderungen der Biegesteifigkeiten nach der mechanischen Stimulation der Tibiae und Ulnae beobachten. In der Gruppe der WT-Tiere zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Biegesteifigkeit der Ulnae nach mechanischer Stimulation mittels axialer Kompression. In der Gruppe der KO-Mäuse zeigten sich bei den Tibiae und Ulnae praktisch keine Veränderungen nach mechanischer Stimulation und in der Gruppe der WT-Mäuse zeigte sich sogar eine tendenzielle Abnahme der Biegesteifigkeit der Tibiae nach mechanischer Stimulation. Zudem zeigten sich bei dem Vergleich der beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 48 und 49). Da sowohl in der Gruppe der WT-Mäuse als auch in der Gruppe der KO-Mäuse differierende Ergebnisse beobachtet wurden, konnte auch kein Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort in Bezug auf die Biegesteifigkeiten der Tibiae und Ulnae beobachtet werden.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Robling *et al.* nach mechanischer Langzeitstimulation der Ulna von Ratten mittels axialer Kompression eine zum Teil signifikante Zunahme der Steifigkeit, der Maximalkraft bis zur Fraktur und der benötigten Energie bis zur Fraktur beobachten. Dabei stimulierten Robling *et al.* die jeweils rechte Ulna über einen Zeitraum von 16 Wochen an jeweils drei Tagen pro Woche. Die anschließende biomechanische Testung erfolgte mit einer Miniatur-Materialprüfmaschine

bei der die Ulna - ähnlich wie bei der Stimulation mittels axialer Kompression - bis zur Fraktur komprimiert wurde (Robling, Hinant et al. 2002).

Es sind mehrere Erklärungen für die in unserer Studie beobachtete unzureichende Repräsentation der mechanischen Stimulation der Tibiae und Ulnae in einer Zunahme der Biegesteifigkeit möglich.

Zum einen könnte die Richtung der Kraft bei der Stimulation und bei der anschließenden biomechanischen Testung mittels Drei-Punkt-Biegung eine Rolle gespielt haben. Bei dem Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia erfolgte die Applikation der Kraft durch das Weichteilgewebe hindurch auf die *laterale* Knochenoberfläche. Dabei kam es zu einer Kompression an der *lateralen* und zu einer Zugdehnung an der *medialen* Knochenoberfläche (Kuruvilla, Fox et al. 2008). Die Richtung der Kraft war dabei somit von *lateral* nach *medial* gerichtet. Bei der biomechanischen Testung der Tibia mittels Drei-Punkt-Biegung hatte der Druckstempel allerdings zur *postero-medialen* Knochenoberfläche Kontakt, so dass die Richtung der Kraft von *postero-medial* nach *antero-lateral* gerichtet war. Somit haben sich die Richtung der Kraft sowie die Lage der neutralen Biegeachse bei der mechanischen Stimulation und der anschließenden biomechanischen Testung unterschieden. Analog dazu gab es auch bei der Analyse der Ulna Differenzen bzgl. der Richtung der Kraft sowie der Lage der neutralen Biegeachse bei der mechanischen Stimulation und der anschließenden biomechanischen Testung mittels Drei-Punkt-Biegung. Bei der axialen Kompression der Ulna erfolgte die Kraftübertragung über den flektierten Carpus entlang der Knochenachse, so dass es zu einer Verstärkung der natürlichen Kurvatur der Ulna mit einer Kompression an der *medialen* und einer Zugdehnung an der *lateralen* Knochenoberfläche kam (Robling, Hinant et al. 2002). Die biomechanische Testung erfolgte allerdings - wie bei der Tibia - mittels Drei-Punkt-Biegung. Dabei hatte der Druckstempel zur *posterioren* Knochenoberfläche Kontakt, so dass die Richtung der Kraft von *posterior* nach *anterior* gerichtet war und nicht - wie bei der mechanischen Stimulation - entlang der Knochenachse der Ulna.

McAteer *et al.* zeigten bei der Untersuchung der osteoanabolen Effekte einer intermittierenden Gabe von PTH im Vergleich zu einer mechanischen Stimulation der Ulna von Mäusen, dass die mechanische Stimulation - trotz einer insgesamt geringeren Zunahme der Knochenmasse, Knochenmineraldichte und des Maximums des FTM im Vergleich zu der Zunahme der Knochenmasse nach einer intermittierenden Gabe von PTH

- zu einer etwa gleich großen Zunahme der biomechanischen Eigenschaften führte. Sie schlossen daraus, dass die Zunahme der Knochenformation durch die intermittierende Gabe von PTH zu einer mehr unspezifisch verteilten und generalisierten Knochenformation führte und die mechanische Stimulation hingegen zu einer mehr lokal verteilten Knochenformation in den Bereichen mit der höchsten auftretenden Belastung und somit an den für die Zunahme der biomechanischen Eigenschaften am meisten relevanten Stellen (McAteer, Niziolek et al. 2010).

So könnte es in unserer Studie nach der mechanischen Stimulation der Tibia mittels Vier-Punkt-Biegung und der Ulna mittels axialer Kompression zu einer Knochenformation in Bereichen der Knochen gekommen sein, die für die anschließende biomechanische Testung mittels Drei-Punkt-Biegung keine oder keine große Relevanz hatten und somit auch nicht zu einer Erhöhung der Biegesteifigkeit bei der Testung mittels Drei-Punkt-Biegung beitragen konnten. Schließlich wurde in der vorliegenden Studie unter anderem eine insgesamt tendenzielle Zunahme der bestimmten FTMs in einzelnen Segmenten der *ROI* nach mechanischer Stimulation im Vergleich zu der Kontrollseite beobachtet, was auf eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Knochen gegenüber einer Biegebelastung schließen lässt. Allerdings kann bei einer Drei-Punkt-Biegung immer nur der gesamte Knochen und nicht einzelne Knochensegmente untersucht werden. Dadurch können mechanisch induzierte Veränderungen, die nur in einzelnen Segmenten auftreten, nicht detektiert werden.

Robling *et al.* und McAteer *et al.* konnten in ihren Studien schließlich eine Zunahme der biomechanischen Eigenschaften nach mechanischer Stimulation nachweisen. Dabei erfolgte allerdings in beiden Studien sowohl die mechanische Stimulation als auch die anschließende biomechanische Testung der Ulnae von Ratten bzw. Mäusen als axiale Kompression (Robling, Hinant et al. 2002; McAteer, Niziolek et al. 2010).

Der insgesamt kurze Stimulationszeitraum von nur zwei Wochen könnte eine weitere Ursache und Erklärung für die fehlende Repräsentation der mechanischen Stimulation in einer Zunahme der Biegesteifigkeiten der Tibiae und Ulnae sein. So haben Robling *et al.* in ihrer Studie die Ulna von Ratten über einen Zeitraum von 16 Wochen stimuliert und McAteer *et al.* die Ulna von Mäusen über einen Zeitraum von sechs Wochen. In beiden Studien kam es nach der mechanischen Stimulation zu einer Zunahme der biomechanischen Eigenschaften. Allerdings konnten bereits McAteer *et al.* eine - im

Vergleich zu Robling *et al.* - geringere Zunahme der biomechanischen Eigenschaften beobachten. Sie führten diesen Unterschied auf eine geringere Belastung und einen kürzeren Belastungszeitraum zurück (Robling, Hinant et al. 2002; McAteer, Niziolek et al. 2010).

Aufgrund der genannten Faktoren könnte es in unserer Studie zu einer nur unzureichenden Repräsentation der mechanischen Stimulation in einer Zunahme der biomechanischen Eigenschaften gekommen sein. Daher sind weitere Studien nötig, um den Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort bzgl. der biomechanischen Eigenschaften der Knochen zu untersuchen. Dabei sollte in weiteren Studien unter Berücksichtigung der genannten Faktoren - analog zu anderen Studien (Robling, Hinant et al. 2002; McAteer, Niziolek et al. 2010) - neben der Bestimmung der Biegesteifigkeit, die Erfassung der Maximalkraft bis zur Fraktur der Knochen, die Lokalisation des Frakturpunktes sowie die nötige Energie bis zur Fraktur der Knochen erfolgen, um die Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften genauer zu charakterisieren und um sie mit anderen Studien vergleichbar zu machen.

4.3. Vergleich der beiden nicht-invasiven Belastungsmodelle

In der vorliegenden Studie wurden zwei nicht-invasive Belastungsmodelle zur mechanischen *in-vivo* Stimulation der Tibia und Ulna von Mäusen verwendet.

Dabei zeigte sich die Bildung von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche bei dem Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia als nachteilig. Die Formation von Geflechtknochen war nicht nur das Resultat der Biegebelastung, sondern auch das Resultat des Drucks der Auflageflächen an der periostalen Knochenoberfläche bei der mechanischen Stimulation. Dies zeigte sich sowohl in unserer Studie als auch bei der histomorphometrischen Auswertung (Vogele 2010) und ebenso in zahlreichen anderen Studien durch die Untersuchung der Effekte einer Druckbelastung der Tibia (*sham loading*) (Turner, Akhter et al. 1991; Torrance, Mosley et al. 1994; Turner, Forwood et al. 1994; Akhter, Cullen et al. 1998; Akhter, Cullen et al. 2002). Turner *et al.* haben die Bildung von Geflechtknochen zudem als einen ungenauen und unpräzisen Prozess beschrieben, der die Knochenadaption auf eine mechanische Belastung nur ungenügend repräsentiert (Turner, Forwood et al. 1994). Dabei ist es gerade bei der Untersuchung von Mäuseknochen - aufgrund der geringen Größe - schwierig, eine Region in dem Bereich der maximalen Biegung zu finden, die frei von störenden Überlagerungen der Knochenantwort durch die Druckbelastung der Auflageflächen ist (Akhter, Cullen et al. 1998). Desweiteren sollte der durch den Druck der Auflageflächen beeinflusste Bereich nicht unterschätzt werden, da durch das Muskel- und Weichteilgewebe hindurch stimuliert wird, so dass sich der Druck über einen größeren Bereich am Knochen verteilt (Akhter, Raab et al. 1992).

Bei der axialen Kompression der Ulna entsteht im Gegensatz zu der Vier-Punkt-Biegung der Tibia durch die Kraftübertragung über den flektierten Carpus kein direkter Druck am *Periost* in der zu untersuchenden Region bzw. in dem Bereich der maximalen Biegung. Zudem liegt der zu untersuchende Bereich von der Region der Kraftübertragung weit genug entfernt, so dass dort keine störenden Druckphänomene auftreten (Torrance, Mosley et al. 1994).

Die unphysiologische Art und Richtung der applizierten Kraft stellt bei dem Modell der Vier-Punkt-Biegung zur mechanischen Stimulation der Tibia einen weiteren Nachteil dar. So kann ein Teil der mechanisch induzierten Knochenantwort auf diese unphysiologische

mechanische Belastung zurückgeführt werden. Bei dem Modell der axialen Kompression der Ulna stellt die Belastung hingegen eine Form dar, die weitgehend der physiologischen Belastung der Tiere entspricht (Mosley, March et al. 1997; Abraham, Cohen et al. 2006).
Somit scheint das Modell der dynamischen axialen Kompression der Ulna für die Untersuchung des mechanisch induzierten Knochen*remodelings* an Mäusen insgesamt besser geeignet zu sein als das Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia. Es sind allerdings weitere *in-vivo* Studien nötig, welche die genaue Belastungsverteilung bei dem Modell der axialen Kompression der Ulna untersuchen, um die adaptiven Prozesse der Knochen auf die mechanische Belastung noch besser zu charakterisieren und zu verstehen.

4.4. Einfluss von Midkine auf die mechanisch induzierte Knochenantwort

4.4.1. Midkine und Pleiotrophin im Mausmodell

Nakamura *et al.* zeigten, dass die *Mdk*-Defizienz im Mausmodell zu keinen starken Abweichungen bei der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung von Gehirn, Lunge, Herz, Magen, Niere, Hoden bzw. Ovar sowie zu keinen Veränderungen des Reproduktionsverhaltens führte. Allerdings beobachteten Nakamura *et al.* ein verstärktes Angstverhalten und verringertes Erinnerungsvermögen der *Mdk*-defizienten Tiere. Sie führten diese Verhaltensveränderung auf eine verzögerte Entwicklung des Hippocampus zurück (Nakamura, Kadomatsu et al. 1998). Zou *et al.* zeigten, dass *Mdk*- oder *Ptn*-defiziente Mäuse ein leicht verringertes Hörvermögen aufwiesen, wohingegen die kombinierte Defizienz von *Mdk* und *Ptn* zu einer schweren Beeinträchtigung des Hörvermögens führte (Zou, Muramatsu et al. 2006). Ähnlich wie bei dem Hörvermögen zeigten weibliche Mäuse mit einer kombinierten Defizienz von *Mdk* und *Ptn* eine Infertilität, wohingegen Mäuse mit einer *Mdk*- oder *Ptn*-Defizienz ihre Fertilität behielten. Desweiteren zeigten sowohl männliche als auch weibliche Mäuse mit einer kombinierten Defizienz von *Mdk* und *Ptn* eine verringerte spontane Aktivität bzw. Mobilität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Nakamura, Kadomatsu et al. 1998; Amet, Lauri et al. 2001; Muramatsu, Zou et al. 2006).

4.4.2. Die Rolle von Pleiotrophin und Midkine im Knochenstoffwechsel

- **Pleiotrophin**

Aufgrund der Beteiligung und des Einflusses von Ptn auf die Knochenentwicklung und die Knochenmasse sowie auf die am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen (siehe Einleitung 1.7.3.) (Tezuka, Takeshita et al. 1990; Masuda, Tsujimura et al. 1997; Imai, Kaksonen et al. 1998; Tare, Oreffo et al. 2002; Yang, Tare et al. 2003; Li, Bunn et al. 2005) vermuteten Lehmann *et al.*, dass Ptn einen Einfluss auf die Regulation der Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten haben könnte und ein wichtiger physiologischer Regulator der enchondralen Ossifikation und der Knochenformation sein könnte (Imai, Kaksonen et al. 1998; Lehmann, Schinke et al. 2004; Li, Bunn et al. 2005). So untersuchten

Lehmann *et al.* den Knochenphänotyp *Ptn*-defizienter Mäuse. Dabei konnten sie allerdings keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Größe, das Gewicht und die Knochenentwicklung des Skeletts bei den *Ptn*-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren beobachten. Somit schien Ptn - entgegen der Erwartungen - keinen oder keinen starken Einfluss auf die Entwicklung des Skeletts zu haben. Lehmann *et al.* zeigten ebenso, dass die Organisation und Dicke der Wachstumsplatten, das trabekuläre und kortikale Knochen*remodeling* und die biomechanischen Eigenschaften durch die Abwesenheit des Wachstumsfaktors Ptn nicht verändert waren. Bei der histomorphometrischen Untersuchung des *Ptn*-defizienten Mausmodells zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Morphologie und Zahl der Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (Lehmann, Schinke et al. 2004). Um eine Erklärung für den fehlenden Phänotyp *Ptn*-defizienter Mäuse zu finden, führten Lehmann *et al.* eine Affymetrix-Genchipanalyse an zur Differenzierung angeregten primären Osteoblasten *ex-vivo* durch. Dabei zeigte sich neben der Expression bekannter osteoblastärer Differenzierungsmarker wie Runx2, *collagen type I alpha 1* (Col1a1), Bsp und Oc eine zunehmende Expression von Mdk und keine nennenswert erhöhte Expression von Ptn. Daraus schlossen Lehmann *et al.*, dass eher Mdk und nicht Ptn ein physiologischer Regulator der Knochenformation sein könnte (Lehmann, Schinke et al. 2004).

Im Gegensatz zu den von Lehmann *et al.* veröffentlichten Ergebnissen stehen die Ergebnisse von Imai *et al.*, die ebenso ein *Ptn*-defizientes Mausmodell in Bezug auf knochenphysiologische Aspekte untersucht haben. Imai *et al.* konnten - analog zu Lehmann *et al.* - eine zunächst normale Knochenentwicklung der *Ptn*-defizienten Mäuse beobachten. Allerdings zeigte sich im Alter von zwei Monaten bei den *Ptn*-defizienten Mäusen eine signifikante Wachstumsverzögerung der langen Röhrenknochen, nicht aber der Wirbelkörper, sowie eine signifikant geringere Knochendichte und signifikant geringere biomechanische Eigenschaften im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Desweiteren zeigten die *Ptn*-defizienten Tiere keinen Verlust der Knochenmasse durch Immobilisation. Ebenso konnten Imai *et al.* bei *in-vitro* Versuchen eine signifikante Zunahme der Ptn-Expression von Osteozyten durch mechanische Stimulation zeigen. Aufgrund der Ergebnisse ihrer Untersuchungen vermuteten Imai *et al.*, dass Ptn ein von den Osteozyten stammender Faktor ist, der an der Regulation des mechanisch induzierten Knochen*remodeling*s beteiligt ist (Imai, Heino et al. 2009).

Eine Ursache und Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen eines *Ptn*-defizienten Mausmodells von Lehmann *et al.* (Lehmann, Schinke et al. 2004) und Imai *et al.* (Imai, Heino et al. 2009) könnte die bei Lehmann *et al.* durchgeführte Rückkreuzung der *Ptn*-Defizienz in einen *129S2/SV*-Mausstamm sein (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010).

Desweiteren wurde die Rolle von Ptn auch in Bezug auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* untersucht. Xing *et al.* untersuchten mittels Vier-Punkt-Biegung der jeweils rechten Tibia von weiblichen Mäusen des Stammes *C57BL/6J* die Gene und Signaltransduktionswege, die bei dem mechanisch induzierten Knochen*remodeling* eine Rolle spielen könnten. Dabei konnten sie zeigen, dass sich die Ptn-Expression bereits zwei Tage nach mechanischer Belastung verdoppelte und bei weiterer mechanischer Stimulation weiter anstieg (Xing, Baylink et al. 2005). Daraufhin untersuchten Kesavan *et al.* ein *Ptn*-defizientes Mausmodell in Bezug auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo*. Dabei konnten sie allerdings keine signifikanten Unterschiede der mechanisch induzierten Knochenantwort zwischen den *Ptn*-defizienten und WT-Mäusen nach der Vier-Punkt-Biegung der Tibia beobachten. Daher schlossen Kesavan *et al.*, dass Ptn keine Schlüsselfunktion bei der osteoanabolen Knochenantwort auf eine mechanische Belastung hat (Kesavan and Mohan 2008).

- **Midkine**

Aufgrund der Schlussfolgerung von Lehmann *et al.*, dass Mdk eine wichtige Rolle bei dem Knochen*remodeling* spielen könnte (Lehmann, Schinke et al. 2004), untersuchten Neunaber *et al.* ein *Mdk*-defizientes Mausmodell in Bezug auf die Knochenentwicklung und das Knochen*remodeling* (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010). Bei ihren Untersuchungen haben Neunaber *et al.* keine signifikanten Unterschiede während der Skelettentwicklung zwischen den *Mdk*-positiven und *Mdk*-defizienten Mäusen im Alter von vier Monaten beobachtet. Allerdings zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen und eine erhöhte Zahl von Knochentrabekeln. Die 18 Monate alten Mäuse zeigten zudem eine erhöhte Dicke der Knochentrabekel. Bei der histomorphometrischen Auswertung konnten sie eine deutliche Zunahme der *mineralizing surface* und der *bone formation rate* bei den *Mdk*-defizienten Tieren im Alter von 12 und 18 Monaten beobachten. Zudem zeigten Neunaber *et al.*, dass

der kortikale Knochen der 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Tiere signifikant poröser war und die *Mdk*-defizienten Tiere keinen signifikanten Verlust der trabekulären Knochenmasse nach Ovariektomie zeigten (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010).
Neunaber *et al.* schlossen daher, dass Mdk eine Funktion als negativer Regulator der Knochenmasse hat (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010).
Da die *Ptn*-Defizienz im Mausmodell bei der Studie von Imai *et al.* zu einem Knochenphänotyp mit geringerer Knochenmasse führte (Imai, Heino et al. 2009) und die *Mdk*-Defizienz in dem von Neunaber *et al.* untersuchten Mausmodell zu einer höheren Knochenmasse (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010), scheinen Mdk und Ptn im Rahmen des Knochen*remodelings in-vivo* unterschiedliche Funktionen zu haben, obwohl sie in Bezug auf andere Zellen *in-vitro* ähnliche Effekte vermitteln (Muramatsu 1993; Kadomatsu and Muramatsu 2004; Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010).

- **Der Einfluss von Midkine auf das Knochen*remodeling***

Bei dem Knochen*remodeling* kommt es durch die Osteoklasten zunächst zu einem Abbau von Knochengewebe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mdk die Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen fördert (Maruyama, Muramatsu et al. 2004), so dass im Umkehrschluss die *Mdk*-Defizienz zu einer verringerten Anzahl von Osteoklasten führen könnte. Desweiteren zeigten *Mdk*-defiziente Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten eine signifikant geringere Zahl trabekulärer Osteoklasten, wohingegen die Aktivität der Osteoklasten-spezifischen Tartrat-resistenten aziden Phosphatase (TRAP, ein Marker der Osteoklastenaktivität) und die Menge der Kollagenabbauprodukte im Serum erhöht waren. Dabei zeigten die untersuchten Femora der *Mdk*-defizienten Tiere ab einem Alter von 12 Monaten zunehmend hyperostotische Läsionen mit einer signifikant größeren Zahl von Osteoklasten in der Kortikalis. Daher wurde vermutet, dass diese lokale Erhöhung der Osteoklastenzahl und -aktivität für die Erhöhung der TRAP-Aktivität und der Serumkonzentration der Kollagenabbauprodukte verantwortlich war (Neunaber 2009). In der vorliegenden Studie konnten allerdings - genauso wie bei der histomorphometrischen Auswertung (Vogele 2010) - keine morphologischen Auffälligkeiten an den untersuchten Tibiae und Ulnae der Mäuse im Alter von ca. 13 Monaten beobachtet werden.
Nach der Knochenresorption folgt bei dem Knochen*remodeling* die Knochenformation bei der die durch Osteoklasten abgebaute Knochenmasse durch Osteoblasten wieder

aufgebaut wird. Dabei konnte in einer *in-vitro* Untersuchung zur Differenzierung primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien gezeigt werden, dass die Expression von Mdk im Verlauf der Differenzierung zunimmt und eine Zugabe von Mdk zu einer verringerten Expression von c-Fos und dem Proliferationsmarker H4 führte (Zöllner 2008). Zudem zeigten *Mdk*-defiziente Osteoblasten in weiteren Zellkulturversuchen eine erhöhte Aktivität der Alpl und einen erhöhten Mineralisationsgrad (Neunaber 2009). Desweiteren zeigten *Mdk*-defiziente Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen sowie eine erhöhte *mineralizing surface* und *bone formation rate*. Dabei konnte im Alter von 18 Monaten zudem eine erhöhte Osteoblastenzahl und Osteoblastenoberfläche gezeigt werden (Neunaber, Catala-Lehnen et al. 2010).

Neben diesen Ergebnissen der *Mdk*-Defizienz im Mausmodell konnten wir einen tendenziell negativen Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort zeigen. Sowohl nach der Vier-Punkt-Biegung als auch nach der Druckbelastung (*sham loading*) der Tibia konnten wir eine Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche beobachten. Dabei zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse sowohl nach der Vier-Punkt-Biegung als auch nach der Druckbelastung eine tendenziell stärkere Bildung von Geflechtknochen im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen (siehe Abbildung 36). Bei der axialen Kompression der Ulna konnten wir zeigen, dass die Kortikalisdicke, das mineralisierte Kortikalisvolumen, die *Tissue Area*, die *Bone Area* und das Maximum des FTM bei den *Mdk*-defizienten Tieren insgesamt - vor allem in den *distalen* Segmenten - tendenziell stärker zugenommen hat als bei den *Mdk*-positiven Tieren. Die *Marrow Area* zeigte hingegen - und im Gegensatz zu den *Mdk*-positiven Tieren - bei den *Mdk*-defizienten Tieren eine tendenzielle Abnahme nach mechanischer Stimulation der Ulna im Vergleich zu der Kontrollseite. Dies könnte durch die tendenziell stärkere Zunahme der kortikalen Knochenmasse bei den *Mdk*-defizienten Tieren erklärbar sein. Bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen der Ulna wurde an der endokortikalen Knochenoberfläche eine signifikant stärkere Zunahme der *mineral apposition rate* und an der periostalen Knochenoberfläche eine signifikant stärkere Zunahme der *mineralizing surface*, *mineral apposition rate* und *bone formation rate* bei den *Mdk*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen nachgewiesen (Vogele 2010).

Diese Ergebnisse weisen auf einen negativen Einfluss von Mdk auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* und die mechanisch induzierte Knochenantwort *in-vivo* hin. Der Wachstumsfaktor Mdk könnte durch die Beeinflussung der am Knochen*remodeling* beteiligten Zellen zu einer verringerten adaptiven Antwort des kortikalen Knochens auf mechanische Stimulation *in-vivo* führen.

4.5. Einfluss von Midkine auf den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg

Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg (siehe Einleitung 1.6.) spielt eine wichtige Rolle für die Knochenentwicklung, für die Regulation der Knochenmasse sowie für die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Krishnan, Bryant et al. 2006).

Robinson *et al.* zeigten, dass der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg *in-vivo* und *in-vitro* durch mechanische Stimulation induzierbar ist. Bei ihren Versuchen kam es nach Vier-Punkt-Biegung der Tibia von Mäusen und nach mechanischer Stimulation von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MC3T3-E1-Zellen) zu einer verstärkten Aktivität des Signalwegs und zu einer verstärkten Expression Wnt-abhängiger Gene wie *Wnt10b*, *Sfrp1*, *Wisp2* und *Cxn43*. Zudem erhöhte der kanonische Wnt-Signalweg die Sensitivität der Knochenzellen für mechanische Stimulation (Robinson, Chatterjee-Kishore et al. 2006). Sawakami *et al.* zeigten bei der Untersuchung *Lrp5*-defizienter Mäuse, dass die *Lrp5*-defizienten Tiere - im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren - nicht mit einer Knochenformation auf eine mechanische Stimulation der Ulna *in-vivo* reagierten (Sawakami, Robling et al. 2006). Desweiteren konnten Armstrong *et al.* nach der mechanischen Stimulation von ROS 17/2.8-osteoblastären Zellen eine Zunahme der β-Catenin-Konzentration im Zellkern und eine damit verbundene verstärkte Transkriptionsaktivität von Tcf/Lef zeigen (Armstrong, Muzylak et al. 2007).

Dabei sind bereits mehrere Zielgene des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs wie *Runx2* (Kahler and Westendorf 2003; Gaur, Lengner et al. 2005; Dong, Soung do et al. 2006), *Rankl* (Spencer, Utting et al. 2006), *Cebpα*, *Pparγ* (Kang, Bennett et al. 2007), *Alpl*, *c-Fos* und *c-Myc* bekannt, die an der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beteiligt sind und deren Expression für die Mineralisation der Knochenmatrix von Bedeutung ist (Rodan and Noda 1991; Staal, Weerkamp et al. 2004; Katoh 2007).

Ein bekannter Rezeptor für Mdk ist Ptprζ (Maeda, Ichihara-Tanaka et al. 1999; Muramatsu 2002), der an der durch Mdk induzierten Migration von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (UMR106) beteiligt ist (Qi, Ikematsu et al. 2001). Schinke *et al.* postulierten, dass Ptprζ eine physiologische Rolle bei dem Prozess des Knochen*remodelings* hat und an der Regulation der Knochenformation *in-vivo* beteiligt ist (Schinke, Gebauer et al. 2008).

Um den Einfluss von Mdk und Ptprζ auf die Transkriptionsaktivität des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zu untersuchen, führten Neunaber *et al.* Transfektionsversuche mit Hilfe eines TOPflash-Plasmids an Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MC3T3-E1-Zellen) durch. Bei den Transfektionsversuchen wurde das TOPflash-Plasmid, das in der Promotorregion eine Bindungsstelle für den über den Wnt/β-Catenin-Signalweg induzierbaren Transkriptionsfaktor Tcf hat, in die Zellen eingeschleust. Nach Bindung von Tcf wurde das Enzym Luciferase aktiviert und dadurch indirekt die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs angezeigt. Eine Transfektion von Wnt3a führte durch Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs zu einer Zunahme der Signalintensität des TOPflash-Plasmids. Eine Co-Transfektion von Mdk führte zu einer signifikanten Abnahme und eine Co-Transfektion von Mdk und Ptprζ führte zu einer kompletten Hemmung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs. Eine alleinige Co-Transfektion von Ptprζ führte dagegen zu keiner signifikanten Abnahme der Signalintensität. Aus diesen Versuchen konnte geschlossen werden, dass Mdk einen negativen Einfluss auf den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg ausübt, der durch die Interaktion mit Ptprζ verstärkt wird (Neunaber 2009; Liedert, Mattausch et al. 2011).

Um den Einfluss von Mdk und Ptprζ auf den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg weiter zu untersuchen, haben Neunaber *et al.* Wildtyp- und *Ptprζ*-defiziente-Osteoblasten aus Mauskalvarien über einen Zeitraum von zehn Tagen differenziert und dann mit Wnt3a oder mit Wnt3a zusammen mit Mdk inkubiert. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit einem phospho-β-Catenin-Antikörper, der inaktives phosphoryliertes β-Catenin (β-Catenin ist das Schlüsselmolekül des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs) detektiert. Die Zugabe von Wnt3a führte sowohl bei den Wildtyp-Osteoblasten als auch bei den *Ptprζ*-defizienten-Osteoblasten zu einer Abnahme des phosphorylierten β-Catenins. Die Zugabe von Mdk führte bei den Wildtyp-Osteoblasten - nicht aber bei den *Ptprζ*-defizienten-Osteoblasten - zu einer Zunahme des phosphorylierten β-Catenins. Die kombinierte Zugabe von Mdk und Wnt3a führte nur bei den Wildtyp-Osteoblasten und

nicht auch bei den *Ptprζ*-defizienten Osteoblasten zu einer Zunahme des phosphorylierten β-Catenins. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Mdk in Abhängigkeit von der Expression von Ptprζ einen negativen Effekt auf die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs ausübt, was sich durch die Zunahme des phosphorylierten und damit zur Degradation im Proteasom bestimmten β-Catenins zeigte. Die fehlende Wirkung von Mdk auf die Konzentration des phosphorylierten β-Catenins in den *Ptprζ*-defizienten Osteoblasten ist somit durch das Fehlen des Rezeptors für Mdk zu erklären (Neunaber 2009; Liedert, Mattausch et al. 2011).

Um den hemmenden Einfluss von Mdk über Ptprζ auf den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg im Zusammenhang mit dem Knochen*remodeling* weiter zu untersuchen, haben Liedert *et al.* die Expression von Zielgenen des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs an Tag 21 der Kultivierung von Osteoblasten nach Zugabe von rekombinantem Mdk untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Expression der Alpl, welche eine entscheidende Rolle bei der Mineralisation der Knochen spielt (Whyte 2010). Ebenso zeigte sich auf Proteinebene eine Abnahme der Alpl nach Zugabe von Mdk bei einer Western-Blot-Analyse. Liedert *et al.* untersuchten zudem den Einfluss von Mdk zusammen mit einer mechanischen Stimulation und ohne einer mechanischen Stimulation auf die durch den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg induzierte Expression von c-Fos und c-Myc (zwei Transkriptionsfaktoren, die für die Proliferation von Osteoblasten eine wichtige Rolle spielen) *in-vitro*. Dabei führte eine mechanische Stimulation zu einer Zunahme der Expression von c-Fos und c-Myc, ohne mechanische Belastung führte die Anwesenheit von Mdk zu einer Abnahme der Expression der beiden Transkriptionsfaktoren und die Zunahme der Expression von c-Fos und c-Myc durch mechanische Stimulation wurde durch die Anwesenheit von Mdk praktisch aufgehoben (Liedert, Mattausch et al. 2011).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass eine verbesserte Funktion der Osteoblasten in den *Mdk*-defizienten Mäusen, die aus einer fehlenden Hemmung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs durch Mdk resultiert, für die erhöhte osteoanabole Knochenantwort auf mechanische Belastung verantwortlich ist (Neunaber 2009; Liedert, Mattausch et al. 2011).

So zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse in der vorliegenden Studie - im Vergleich zu den *Mdk*-positiven Mäusen - eine tendenziell stärkere Formation von Geflechtknochen an der

periostalen Knochenoberfläche sowohl nach der Vier-Punkt-Biegung als auch nach der Druckbelastung der Tibia und zudem eine tendenziell stärkere Zunahme der kortikalen Knochenmasse (Kortikalisdicke, mineralisiertes Kortikalisvolumen, *Bone Area*) und des FTM nach axialer Kompression der Ulna. Desweiteren zeigten die *Mdk*-defizienten Mäuse bei der histomorphometrischen Auswertung eine signifikant stärkere Zunahme der *bone formation rate*, *mineralizing surface* und *mineral apposition rate* an der periostalen Knochenoberfläche nach axialer Belastung der Ulna im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Vogele 2010).

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde der *in-vivo* Einfluss des Wachstumsfaktors Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort bzw. auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* an Mäusen untersucht. Zudem wurde die in dieser Studie verwendete und am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm entwickelte Stimulationsmaschine für weitere Studien erprobt und die mechanisch induzierte Knochenantwort sowohl für das Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia als auch für das Modell der axialen Kompression der Ulna von Mäusen für weitere Studien charakterisiert.

In folgenden Studien sollte eine Optimierung der in dieser Studie verwendeten Untersuchungsmethodik und der Untersuchungsbedingungen erfolgen. Es sollte ein Computertomogramm-Gerät mit höherer Auflösung verwendet werden und zudem sollte die Knochenmineraldichte erfasst werden. Dadurch könnten zum einen auch geringe Unterschiede detektierbar gemacht werden und zum anderen könnte das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* auch in Bezug auf Veränderungen der Knochenmineraldichte charakterisiert werden. Zudem wäre ein längerer Stimulationszeitraum sinnvoll, um eine stärkere mechanisch induzierte Knochenformation zu erzielen. Diese Knochenformation könnte schließlich besser detektiert werden und wäre gerade für die Analyse der biomechanischen Eigenschaften sinnvoll und notwendig. Desweiteren sollte das FTM entlang der anatomischen Hauptachsen bestimmt werden, damit der mechanisch induzierte Knochenzuwachs das FTM auch direkt beeinflusst und eine Zunahme des FTM damit auch nachweisbar wird. Durch diese Optimierungen könnte es in weiteren Studien möglich sein, die mechanisch induzierte Knochenantwort bzw. das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* noch besser zu untersuchen und zu charakterisieren.

Die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse lassen zusammen mit den Ergebnissen der histomorphometrischen Auswertung (Vogele 2010) und mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen auf einen negativen Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort bzw. das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo* über eine Hemmung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs schließen. Desweiteren wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass prinzipiell bei allen an den mechanisch

nicht-stimulierten Tibiae und Ulnae untersuchten Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen (*Mdk +/+* und *Mdk -/-*) bestanden. Zudem zeigte sich bei den *ex-vivo* Kalibrierungsversuchen, dass die Applikation einer Kraft sowohl bei der Vier-Punkt-Biegung der Tibia als auch bei der axialen Kompression der Ulna zu keinen Unterschieden der auftretenden Belastung an der Knochenoberfläche zwischen den beiden Genotypen führte. Daher lässt sich der in dieser Studie beobachtete tendenziell negative Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort sowie der bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen der Ulna beobachtete negative Einfluss von Mdk auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo* (Vogele 2010) auf die *Mdk*-Defizienz und nicht auf eine unterschiedliche Knochenantwort aufgrund vorbestehender Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bzgl. der kortikalen Knochenstruktur, des FTM und der bei der mechanischen Stimulation auftretenden Belastung zurückführen. Schließlich wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass die mechanisch induzierte Knochenantwort vor allem von der Größe und Verteilung der Belastung - bei ansonsten konstanten Belastungsbedingungen - abhängt und die Belastungsverteilung wiederum von der Form und Struktur der Knochen (Akhter, Raab et al. 1992). Daraus lässt sich schließen, dass die in dieser Studie und die bei der histomorphometrischen Analyse beobachteten Unterschiede auf das Fehlen des Wachstumsfaktors Mdk zurückzuführen sind und nicht das Resultat einer unterschiedlichen Knochenantwort aufgrund einer unterschiedlichen kortikalen Knochenstruktur und Belastungsverteilung zwischen den beiden Genotypen sind.

Somit könnte die Entwicklung und Gabe eines Mdk-Inhibitors bzw. Mdk-Antagonisten - ggf. in Kombination mit der Applikation einer mechanischen Belastung, zum Beispiel mit Hilfe von Ganzkörper-Vibrationsplatten (*whole-body vibration*) - eine Möglichkeit darstellen zur osteoanabolen Therapie der postmenopausalen Osteoporose beizutragen.

5. Zusammenfassung

Midkine (Mdk) bildet zusammen mit Pleiotrophin (Ptn) die hochkonservierte Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren. Mdk wird unter anderem während der Knochenfrakturheilung exprimiert. Bei der Untersuchung eines *Mdk*-defizienten Mausmodells wurde ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen der *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort bzw. auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo* untersucht werden. Dazu wurden die jeweils rechten Tibiae und Ulnae von Wildtyp-Mäusen und von *Mdk*-defizienten Mäusen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Die jeweils linken Tibiae und Ulnae wurden mechanisch nicht belastet und dienten als interne Kontrollen zu den mechanisch belasteten Knochen. Für die mechanische Stimulation wurden zwei nicht-invasive Belastungsmodelle verwendet. Die Tibia wurde mittels Vier-Punkt-Biegung und die Ulna mittels axialer Kompression belastet. Anschließend wurden Micro-Computertomogramm-Bilder der Knochen für die Analyse kortikaler Strukturparameter und des Flächenträgheitsmoments (FTM) erstellt. Zudem wurde eine nicht-destruktive Drei-Punkt-Biegung zur Bestimmung der Biegesteifigkeit der Knochen durchgeführt. Die bestimmten Parameter wurden jeweils innerhalb der beiden Gruppen - mechanisch nicht-stimulierte Knochen (Kontrollseite) und mechanisch stimulierte Knochen (Stimulationsseite) - miteinander verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich der Parameter zwischen den beiden Genotypen, um den Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte Knochenantwort bzw. das mechanisch induzierte Knochen*remodeling* zu untersuchen. Nach der Vier-Punkt-Biegung der Tibia zeigte sich in der untersuchten *Region of Interest* sowohl *medial* als auch *lateral* eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke. Ebenso zeigte sich eine signifikante Zunahme des Maximums des FTM in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Das mineralisierte Kortikalisvolumen, das mineralisierte Geflechtknochenvolumen und das Minimum des FTM zeigten eine tendenzielle Zunahme nach mechanischer Stimulation. Die *Mdk*-defizienten Mäuse zeigten eine tendenziell stärkere Formation von Geflechtknochen an der periostalen Knochenoberfläche im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Bei der Biegesteifigkeit der Tibia zeigten sich weder bei dem Vergleich der Kontroll- mit der Stimulationsseite noch zwischen den beiden Gruppen

signifikante Unterschiede. Nach der axialen Kompression der Ulna zeigte sich in den untersuchten Segmenten der *Region of Interest* insgesamt eine tendenzielle Zunahme der Kortikalisdicke, des mineralisierten Kortikalisvolumens, der *Tissue Area*, der *Bone Area* sowie des Maximums und Minimums des FTM besonders in den *distalen* Segmenten. Dabei konnte eine tendenziell stärkere Zunahme der Parameter bei den *Mdk*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen gezeigt werden. Die *Marrow Area* zeigte bei den *Mdk*-defizienten Tieren eine tendenzielle Abnahme nach mechanischer Stimulation. Bei der Biegesteifigkeit der Ulna zeigten sich - wie bei der Tibia - weder bei dem Vergleich der Kontroll- mit der Stimulationsseite noch zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede. In der vorliegenden Studie wurde somit zum einen die Knochenantwort nach Vier-Punkt-Biegung der Tibia und nach axialer Kompression der Ulna von Mäusen mit der am Institut entwickelten und in der Studie verwendeten Stimulationsmaschine charakterisiert. Dabei erschien das Modell der axialen Kompression der Ulna - im Vergleich zu dem Modell der Vier-Punkt-Biegung der Tibia - als besser geeignet, um die adaptiven Prozesse der Knochen auf mechanische Stimulation zu untersuchen. Zum anderen zeigte sich in der vorliegenden Studie insgesamt ein tendenziell negativer Einfluss von Mdk auf die mechanisch induzierte kortikale Knochenantwort *in-vivo*. Analog zu dieser Studie wurde bei der histomorphometrischen Analyse von Knochenschliffen der Ulna von Mäusen aus der gleichen Studie ein negativer Einfluss von Mdk auf das mechanisch induzierte kortikale Knochen*remodeling in-vivo* beobachtet. Desweiteren konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass zwischen den mechanisch nicht-stimulierten Tibiae und Ulnae prinzipiell keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kortikalen Knochenstruktur, des FTM, der Biegesteifigkeit und der bei der mechanischen Belastung am Knochen auftretenden Dehnung zwischen den in der Studie verwendeten weiblichen *Mdk*-defizienten und *Mdk*-positiven Mäusen im Alter von 51 bis 54 Wochen bestanden. Somit lässt sich der in dieser Studie beobachtete tendenziell negative Einfluss von Mdk sowie der bei der histomorphometrischen Analyse beobachtete negative Einfluss von Mdk auf das mechanisch induzierte Knochen*remodeling in-vivo* auf die *Mdk*-Defizienz zurückführen und nicht auf eine unterschiedliche Knochenantwort aufgrund vorbestehender Unterschiede der kortikalen Knochenstruktur, des FTM oder der bei der mechanischen Stimulation am Knochen auftretenden Belastung zwischen den beiden Mausgruppen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham N. S., Cohen D. C., Rivers B., Richardson P.: Validation of administrative data used for the diagnosis of upper gastrointestinal events following nonsteroidal anti-inflammatory drug prescription. Aliment Pharmacol Ther 24: 299-306 (2006)
2. Adachi Y., Matsubara S., Pedraza C., Ozawa M., Tsutsui J., Takamatsu H., Noguchi H., Akiyama T., Muramatsu T.: Midkine as a novel target gene for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). Oncogene 13: 2197-2203 (1996)
3. Akhter M. P., Cullen D. M., Pedersen E. A., Kimmel D. B., Recker R. R.: Bone response to in vivo mechanical loading in two breeds of mice. Calcif Tissue Int 63: 442-449 (1998)
4. Akhter M. P., Cullen D. M., Recker R. R.: Bone adaptation response to sham and bending stimuli in mice. J Clin Densitom 5: 207-216 (2002)
5. Akhter M. P., Raab D. M., Turner C. H., Kimmel D. B., Recker R. R.: Characterization of in vivo strain in the rat tibia during external application of a four-point bending load. J Biomech 25: 1241-1246 (1992)
6. Akiyama T.: Wnt/beta-catenin signaling. Cytokine Growth Factor Rev 11: 273-282 (2000)
7. Alam I., Warden S. J., Robling A. G., Turner C. H.: Mechanotransduction in bone does not require a functional cyclooxygenase-2 (COX-2) gene. J Bone Miner Res 20: 438-446 (2005)
8. Alliston T., Derynck R.: Medicine: interfering with bone remodelling. Nature 416: 686-687 (2002)
9. Amet L. E., Lauri S. E., Hienola A., Croll S. D., Lu Y., Levorse J. M., Prabhakaran B., Taira T., Rauvala H., Vogt T. F.: Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. Mol Cell Neurosci 17: 1014-1024 (2001)
10. Andersen T. L., Sondergaard T. E., Skorzynska K. E., Dagnaes-Hansen F., Plesner T. L., Hauge E. M., Plesner T., Delaisse J. M.: A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. Am J Pathol 174: 239-247 (2009)
11. Aridome K., Tsutsui J., Takao S., Kadomatsu K., Ozawa M., Aikou T., Muramatsu T.: Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. Jpn J Cancer Res 86: 655-661 (1995)

12. Armstrong V. J., Muzylak M., Sunters A., Zaman G., Saxon L. K., Price J. S., Lanyon L. E.: Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. J Biol Chem 282: 20715-20727 (2007)
13. Babij P., Zhao W., Small C., Kharode Y., Yaworsky P. J., Bouxsein M. L., Reddy P. S., Bodine P. V., Robinson J. A., Bhat B., Marzolf J., Moran R. A., Bex F.: High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. J Bone Miner Res 18: 960-974 (2003)
14. Bassey E. J., Ramsdale S. J.: Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. Osteoporos Int 4: 72-75 (1994)
15. Behrens J.: Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases. J Cell Sci 113 (Pt 6): 911-919 (2000)
16. Bennett C. N., Longo K. A., Wright W. S., Suva L. J., Lane T. F., Hankenson K. D., MacDougald O. A.: Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3324-3329 (2005)
17. Bernard-Pierrot I., Heroult M., Lemaitre G., Barritault D., Courty J., Milhiet P. E.: Glycosaminoglycans promote HARP/PTN dimerization. Biochem Biophys Res Commun 266: 437-442 (1999)
18. Bielby R., Jones E., McGonagle D.: The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. Injury 38 Suppl 1: S26-32 (2007)
19. Bonewald L. F.: Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. Bonekey Osteovision 3: 7-15 (2006)
20. Boonen S., Aerssens J., Dequeker J., Nicholson P., Cheng X., Lowet G., Verbeke G., Bouillon R.: Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I: potential implications for age-related (type II) osteoporotic fracture occurrence. Calcif Tissue Int 61: 173-178 (1997)
21. Buckwalter J. A., Cooper R. R.: Bone structure and function. Instr Course Lect 36: 27-48 (1987)
22. Burger E. H., Klein-Nulend J.: Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. FASEB J 13 Suppl: S101-112 (1999)
23. Burr D. B.: Targeted and nontargeted remodeling. Bone 30: 2-4 (2002)
24. Burr D. B., Robling A. G., Turner C. H.: Effects of biomechanical stress on bones in animals. Bone 30: 781-786 (2002)

25. Burr D. B., Schaffler M. B., Yang K. H., Lukoschek M., Sivaneri N., Blaha J. D., Radin E. L.: Skeletal change in response to altered strain environments: is woven bone a response to elevated strain? Bone 10: 223-233 (1989)
26. Cadigan K. M., Nusse R.: Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev 11: 3286-3305 (1997)
27. Cann C. E., Adachi R. R.: Bone resorption and mineral excretion in rats during spaceflight. Am J Physiol 244: R327-331 (1983)
28. Centrella M., Casinghino S., Kim J., Pham T., Rosen V., Wozney J., McCarthy T. L.: Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor beta induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. Mol Cell Biol 15: 3273-3281 (1995)
29. Chambers T. J.: The pathobiology of the osteoclast. J Clin Pathol 38: 241-252 (1985)
30. Chauhan A. K., Li Y. S., Deuel T. F.: Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 679-682 (1993)
31. Chen Y., Alman B. A.: Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. J Cell Biochem 106: 353-362 (2009)
32. Cohen M. M., Jr.: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. Am J Med Genet A 140: 2646-2706 (2006)
33. Cullen D. M., Smith R. T., Akhter M. P.: Time course for bone formation with long-term external mechanical loading. J Appl Physiol 88: 1943-1948 (2000)
34. Cullen D. M., Smith R. T., Akhter M. P.: Bone-loading response varies with strain magnitude and cycle number. J Appl Physiol 91: 1971-1976 (2001)
35. Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L., Yang Y.: Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell 8: 739-750 (2005)
36. Delany A. M., Canalis E.: Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. Am J Physiol 274: C734-740 (1998)
37. Dong Y. F., Soung do Y., Schwarz E. M., O'Keefe R. J., Drissi H.: Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. J Cell Physiol 208: 77-86 (2006)
38. Ducy P., Schinke T., Karsenty G.: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science 289: 1501-1504 (2000)

39. Duncan R. L., Turner C. H.: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. Calcif Tissue Int 57: 344-358 (1995)
40. Ehrlich P. J., Noble B. S., Jessop H. L., Stevens H. Y., Mosley J. R., Lanyon L. E.: The effect of in vivo mechanical loading on estrogen receptor alpha expression in rat ulnar osteocytes. J Bone Miner Res 17: 1646-1655 (2002)
41. Eriksen E. F., Mosekilde L., Melsen F.: Effect of sodium fluoride, calcium, phosphate, and vitamin D2 on trabecular bone balance and remodeling in osteoporotics. Bone 6: 381-389 (1985)
42. Fang W., Hartmann N., Chow D. T., Riegel A. T., Wellstein A.: Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. J Biol Chem 267: 25889-25897 (1992)
43. Forwood M. R., Bennett M. B., Blowers A. R., Nadorfi R. L.: Modification of the in vivo four-point loading model for studying mechanically induced bone adaptation. Bone 23: 307-310 (1998)
44. Forwood M. R., Turner C. H.: Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats. Bone 17: 197S-205S (1995)
45. Frost H. M.: Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calcif Tissue Res 3: 211-237 (1969)
46. Frost H. M.: Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. Anat Rec 219: 1-9 (1987)
47. Frost H. M.: Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. Anat Rec 226: 403-413 (1990)
48. Frost H. M.: Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. Anat Rec 226: 414-422 (1990)
49. Gaur T., Lengner C. J., Hovhannisyan H., Bhat R. A., Bodine P. V., Komm B. S., Javed A., van Wijnen A. J., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B.: Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem 280: 33132-33140 (2005)
50. Glass D. A., 2nd, Karsenty G.: In vivo analysis of Wnt signaling in bone. Endocrinology 148: 2630-2634 (2007)
51. Gong Y., Slee R. B., Fukai N., Rawadi G., Roman-Roman S., Reginato A. M., Wang H., Cundy T., Glorieux F. H., Lev D., Zacharin M., Oexle K., Marcelino J., Suwairi W.,

Heeger S., Sabatakos G., Apte S., Adkins W. N., Allgrove J., Arslan-Kirchner M., Batch J. A., Beighton P., Black G. C., Boles R. G., Boon L. M., Borrone C., Brunner H. G., Carle G. F., Dallapiccola B., De Paepe A., Floege B., Halfhide M. L., Hall B., Hennekam R. C., Hirose T., Jans A., Juppner H., Kim C. A., Keppler-Noreuil K., Kohlschuetter A., LaCombe D., Lambert M., Lemyre E., Letteboer T., Peltonen L., Ramesar R. S., Romanengo M., Somer H., Steichen-Gersdorf E., Steinmann B., Sullivan B., Superti-Furga A., Swoboda W., van den Boogaard M. J., Van Hul W., Vikkula M., Votruba M., Zabel B., Garcia T., Baron R., Olsen B. R., Warman M. L.: LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell 107: 513-523 (2001)

52. Goodship A. E., Lanyon L. E., McFie H.: Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. J Bone Joint Surg Am 61: 539-546 (1979)
53. Hagino H., Okano T., Akhter M. P., Enokida M., Teshima R.: Effect of parathyroid hormone on cortical bone response to in vivo external loading of the rat tibia. J Bone Miner Metab 19: 244-250 (2001)
54. Harada S., Rodan G. A.: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 423: 349-355 (2003)
55. Harter L. V., Hruska K. A., Duncan R. L.: Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. Endocrinology 136: 528-535 (1995)
56. Hert J., Fiala P., Petrtyl M.: Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. Bone 15: 269-277 (1994)
57. Hill T. P., Spater D., Taketo M. M., Birchmeier W., Hartmann C.: Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell 8: 727-738 (2005)
58. Hu H., Hilton M. J., Tu X., Yu K., Ornitz D. M., Long F.: Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development 132: 49-60 (2005)
59. Huang H., Kamm R. D., Lee R. T.: Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. Am J Physiol Cell Physiol 287: C1-11 (2004)
60. Huang W., Yang S., Shao J., Li Y. P.: Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. Front Biosci 12: 3068-3092 (2007)

61. Hughes D. E., Dai A., Tiffee J. C., Li H. H., Mundy G. R., Boyce B. F.: Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. Nat Med 2: 1132-1136 (1996)
62. Ichihara-Tanaka K., Oohira A., Rumsby M., Muramatsu T.: Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. J Biol Chem 281: 30857-30864 (2006)
63. Ikeda S., Kishida S., Yamamoto H., Murai H., Koyama S., Kikuchi A.: Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. EMBO J 17: 1371-1384 (1998)
64. Imai S., Heino T. J., Hienola A., Kurata K., Buki K., Matsusue Y., Vaananen H. K., Rauvala H.: Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. Bone 44: 785-794 (2009)
65. Imai S., Kaksonen M., Raulo E., Kinnunen T., Fages C., Meng X., Lakso M., Rauvala H.: Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). J Cell Biol 143: 1113-1128 (1998)
66. Jacob A. L., Smith C., Partanen J., Ornitz D. M.: Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. Dev Biol 296: 315-328 (2006)
67. Jimi E., Akiyama S., Tsurukai T., Okahashi N., Kobayashi K., Udagawa N., Nishihara T., Takahashi N., Suda T.: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. J Immunol 163: 434-442 (1999)
68. Johnson M. L.: The high bone mass family--the role of Wnt/Lrp5 signaling in the regulation of bone mass. J Musculoskelet Neuronal Interact 4: 135-138 (2004)
69. Johnson M. L., Harnish K., Nusse R., Van Hul W.: LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. J Bone Miner Res 19: 1749-1757 (2004)
70. Jones D. B., Nolte H., Scholubbers J. G., Turner E., Veltel D.: Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. Biomaterials 12: 101-110 (1991)

71. Kadomatsu K., Hagihara M., Akhter S., Fan Q. W., Muramatsu H., Muramatsu T.: Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. Br J Cancer 75: 354-359 (1997)
72. Kadomatsu K., Huang R. P., Suganuma T., Murata F., Muramatsu T.: A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. J Cell Biol 110: 607-616 (1990)
73. Kadomatsu K., Muramatsu T.: Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. Cancer Lett 204: 127-143 (2004)
74. Kadomatsu K., Tomomura M., Muramatsu T.: cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. Biochem Biophys Res Commun 151: 1312-1318 (1988)
75. Kahler R. A., Westendorf J. J.: Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. J Biol Chem 278: 11937-11944 (2003)
76. Kamioka H., Honjo T., Takano-Yamamoto T.: A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. Bone 28: 145-149 (2001)
77. Kaname T., Kuwano A., Murano I., Uehara K., Muramatsu T., Kajii T.: Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. Genomics 17: 514-515 (1993)
78. Kang S., Bennett C. N., Gerin I., Rapp L. A., Hankenson K. D., Macdougald O. A.: Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Biol Chem 282: 14515-14524 (2007)
79. Kato M., Patel M. S., Levasseur R., Lobov I., Chang B. H., Glass D. A., 2nd, Hartmann C., Li L., Hwang T. H., Brayton C. F., Lang R. A., Karsenty G., Chan L.: Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol 157: 303-314 (2002)

80. Katoh M.: WNT signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res 13: 4042-4045 (2007)
81. Kawachi H., Fujikawa A., Maeda N., Noda M.: Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 6593-6598 (2001)
82. Kawasaki K., Buchanan A. V., Weiss K. M.: Biomineralization in humans: making the hard choices in life. Annu Rev Genet 43: 119-142 (2009)
83. Kesavan C., Mohan S.: Lack of anabolic response to skeletal loading in mice with targeted disruption of the pleiotrophin gene. BMC Res Notes 1: 124 (2008)
84. Kesavan C., Mohan S., Oberholtzer S., Wergedal J. E., Baylink D. J.: Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. J Appl Physiol 99: 1951-1957 (2005)
85. Klein-Nulend J., van der Plas A., Semeins C. M., Ajubi N. E., Frangos J. A., Nijweide P. J., Burger E. H.: Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. FASEB J 9: 441-445 (1995)
86. Kojima T., Katsumi A., Yamazaki T., Muramatsu T., Nagasaka T., Ohsumi K., Saito H.: Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. J Biol Chem 271: 5914-5920 (1996)
87. Kovesdi I., Fairhurst J. L., Kretschmer P. J., Bohlen P.: Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins. Biochem Biophys Res Commun 172: 850-854 (1990)
88. Krishnan V., Bryant H. U., Macdougald O. A.: Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest 116: 1202-1209 (2006)
89. Kuruvilla S. J., Fox S. D., Cullen D. M., Akhter M. P.: Site specific bone adaptation response to mechanical loading. J Musculoskelet Neuronal Interact 8: 71-78 (2008)
90. Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., Kelley M. J., Dunstan C. R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y. X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W. J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93: 165-176 (1998)
91. LaMothe J. M., Hamilton N. H., Zernicke R. F.: Strain rate influences periosteal adaptation in mature bone. Med Eng Phys 27: 277-284 (2005)

92. Lau K. H., Kapur S., Kesavan C., Baylink D. J.: Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. J Biol Chem 281: 9576-9588 (2006)
93. Lee K. C., Jessop H., Suswillo R., Zaman G., Lanyon L. E.: The adaptive response of bone to mechanical loading in female transgenic mice is deficient in the absence of oestrogen receptor-alpha and -beta. J Endocrinol 182: 193-201 (2004)
94. Lee K. C., Maxwell A., Lanyon L. E.: Validation of a technique for studying functional adaptation of the mouse ulna in response to mechanical loading. Bone 31: 407-412 (2002)
95. Lehmann W., Schinke T., Schilling A. F., Catala-Lehnen P., Gebauer M., Pogoda P., Gerstenfeld L. C., Rueger J. M., Einhorn T. A., Amling M.: Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. Bone 35: 1247-1255 (2004)
96. Li G., Bunn J. R., Mushipe M. T., He Q., Chen X.: Effects of pleiotrophin (PTN) over-expression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair. Calcif Tissue Int 76: 299-306 (2005)
97. Li X., Zhang Y., Kang H., Liu W., Liu P., Zhang J., Harris S. E., Wu D.: Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. J Biol Chem 280: 19883-19887 (2005)
98. Li Y. S., Hoffman R. M., Le Beau M. M., Espinosa R., 3rd, Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., Deuel T. F.: Characterization of the human pleiotrophin gene. Promoter region and chromosomal localization. J Biol Chem 267: 26011-26016 (1992)
99. Liedert A., Kaspar D., Blakytny R., Claes L., Ignatius A.: Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. Biochem Biophys Res Commun 349: 1-5 (2006)
100. Liedert A., Mattausch L., Rontgen V., Blakytny R., Vogele D., Pahl M., Bindl R., Neunaber C., Schinke T., Harroch S., Amling M., Ignatius A.: Midkine-deficiency increases the anabolic response of cortical bone to mechanical loading. Bone 48: 945-951 (2011)
101. Little R. D., Carulli J. P., Del Mastro R. G., Dupuis J., Osborne M., Folz C., Manning S. P., Swain P. M., Zhao S. C., Eustace B., Lappe M. M., Spitzer L., Zweier S.,

Braunschweiger K., Benchekroun Y., Hu X., Adair R., Chee L., FitzGerald M. G., Tulig C., Caruso A., Tzellas N., Bawa A., Franklin B., McGuire S., Nogues X., Gong G., Allen K. M., Anisowicz A., Morales A. J., Lomedico P. T., Recker S. M., Van Eerdewegh P., Recker R. R., Johnson M. L.: A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. Am J Hum Genet 70: 11-19 (2002)

102. Logan C. Y., Nusse R.: The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20: 781-810 (2004)
103. Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Kimura T., Kadomatsu K., Muramatsu T., Noda M.: A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. J Biol Chem 274: 12474-12479 (1999)
104. Maruyama K., Muramatsu H., Ishiguro N., Muramatsu T.: Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 50: 1420-1429 (2004)
105. Masuda H., Tsujimura A., Yoshioka M., Arai Y., Kuboki Y., Mukai T., Nakamura T., Tsuji H., Nakagawa M., Hashimoto-Gotoh T.: Bone mass loss due to estrogen deficiency is compensated in transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1. Biochem Biophys Res Commun 238: 528-533 (1997)
106. Matsubara S., Take M., Pedraza C., Muramatsu T.: Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. J Biochem 115: 1088-1096 (1994)
107. McAteer M. E., Niziolek P. J., Ellis S. N., Alge D. L., Robling A. G.: Mechanical stimulation and intermittent parathyroid hormone treatment induce disproportional osteogenic, geometric, and biomechanical effects in growing mouse bone. Calcif Tissue Int 86: 389-396 (2010)
108. McCauley L. K., Nohutcu R. M.: Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. J Periodontol 73: 1377-1391 (2002)
109. McHugh K. P., Hodivala-Dilke K., Zheng M. H., Namba N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F. P., Hynes R. O., Teitelbaum S. L.: Mice lacking beta3 integrins are

osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. J Clin Invest 105: 433-440 (2000)

110. Meng K., Rodriguez-Pena A., Dimitrov T., Chen W., Yamin M., Noda M., Deuel T. F.: Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 2603-2608 (2000)
111. Midura R. J., Su X., Morcuende J. A., Tammi M., Tammi R.: Parathyroid hormone rapidly stimulates hyaluronan synthesis by periosteal osteoblasts in the tibial diaphysis of the growing rat. J Biol Chem 278: 51462-51468 (2003)
112. Mitsiadis T. A., Salmivirta M., Muramatsu T., Muramatsu H., Rauvala H., Lehtonen E., Jalkanen M., Thesleff I.: Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. Development 121: 37-51 (1995)
113. Morgan E. F., Mason Z. D., Chien K. B., Pfeiffer A. J., Barnes G. L., Einhorn T. A., Gerstenfeld L. C.: Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. Bone 44: 335-344 (2009)
114. Mosley J. R., Lanyon L. E.: Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. Bone 23: 313-318 (1998)
115. Mosley J. R., March B. M., Lynch J., Lanyon L. E.: Strain magnitude related changes in whole bone architecture in growing rats. Bone 20: 191-198 (1997)
116. Muramatsu H., Zou K., Sakaguchi N., Ikematsu S., Sakuma S., Muramatsu T.: LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. Biochem Biophys Res Commun 270: 936-941 (2000)
117. Muramatsu H., Zou P., Kurosawa N., Ichihara-Tanaka K., Maruyama K., Inoh K., Sakai T., Chen L., Sato M., Muramatsu T.: Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. Genes Cells 11: 1405-1417 (2006)
118. Muramatsu H., Zou P., Suzuki H., Oda Y., Chen G. Y., Sakaguchi N., Sakuma S., Maeda N., Noda M., Takada Y., Muramatsu T.: alpha4beta1- and alpha6beta1-

integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. J Cell Sci 117: 5405-5415 (2004)

119. Muramatsu T.: Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. Int J Dev Biol 37: 183-188 (1993)
120. Muramatsu T.: Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. J Biochem 132: 359-371 (2002)
121. Muramatsu T.: Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 86: 410-425 (2010)
122. Nakagawara A., Milbrandt J., Muramatsu T., Deuel T. F., Zhao H., Cnaan A., Brodeur G. M.: Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. Cancer Res 55: 1792-1797 (1995)
123. Nakamura E., Kadomatsu K., Yuasa S., Muramatsu H., Mamiya T., Nabeshima T., Fan Q. W., Ishiguro K., Igakura T., Matsubara S., Kaname T., Horiba M., Saito H., Muramatsu T.: Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. Genes Cells 3: 811-822 (1998)
124. Nakanishi T., Kadomatsu K., Okamoto T., Ichihara-Tanaka K., Kojima T., Saito H., Tomoda Y., Muramatsu T.: Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. J Biochem 121: 197-205 (1997)
125. Nakashima K., de Crombrugghe B.: Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. Trends Genet 19: 458-466 (2003)
126. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., de Crombrugghe B.: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 108: 17-29 (2002)
127. Neunaber C.: Untersuchungen zur Funktion des Wachstumsfaktors Midkine im Knochenstoffwechsel anhand eines Mausdefizienzmodells. Med Dissertation, Universität Hamburg (2009)

128. Neunaber C., Catala-Lehnen P., Beil F. T., Marshall R. P., Kanbach V., Baranowsky A., Lehmann W., Streichert T., Ignatius A., Muramatsu T., Schinke T., Amling M.: Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine. J Bone Miner Res (2010)
129. Ohta S., Muramatsu H., Senda T., Zou K., Iwata H., Muramatsu T.: Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. J Bone Miner Res 14: 1132-1144 (1999)
130. Parfitt A. M.: The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. Clin Orthop Relat Res 236-247 (1977)
131. Parfitt A. M.: The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. Calcif Tissue Int 36 Suppl 1: S37-45 (1984)
132. Parfitt A. M.: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. J Cell Biochem 55: 273-286 (1994)
133. Parfitt A. M.: The mechanism of coupling: a role for the vasculature. Bone 26: 319-323 (2000)
134. Pavalko F. M., Norvell S. M., Burr D. B., Turner C. H., Duncan R. L., Bidwell J. P.: A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. J Cell Biochem 88: 104-112 (2003)
135. Pedersen E. A., Akhter M. P., Cullen D. M., Kimmel D. B., Recker R. R.: Bone response to in vivo mechanical loading in C3H/HeJ mice. Calcif Tissue Int 65: 41-46 (1999)
136. Perez-Pinera P., Chang Y., Deuel T. F.: Pleiotrophin, a multifunctional tumor promoter through induction of tumor angiogenesis, remodeling of the tumor microenvironment, and activation of stromal fibroblasts. Cell Cycle 6: 2877-2883 (2007)
137. Phimphilai M., Zhao Z., Boules H., Roca H., Franceschi R. T.: BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. J Bone Miner Res 21: 637-646 (2006)
138. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147 (1999)

139. Plotkin L. I., Manolagas S. C., Bellido T.: Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. J Biol Chem 277: 8648-8657 (2002)
140. Qi M., Ikematsu S., Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Sakuma S., Noda M., Muramatsu T., Kadomatsu K.: Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 276: 15868-15875 (2001)
141. Raab-Cullen D. M., Akhter M. P., Kimmel D. B., Recker R. R.: Bone response to alternate-day mechanical loading of the rat tibia. J Bone Miner Res 9: 203-211 (1994)
142. Raab-Cullen D. M., Akhter M. P., Kimmel D. B., Recker R. R.: Periosteal bone formation stimulated by externally induced bending strains. J Bone Miner Res 9: 1143-1152 (1994)
143. Raisz L. G.: Estrogen and bone: new pieces to the puzzle. Nat Med 2: 1077-1078 (1996)
144. Rambaut P. C., Goode A. W.: Skeletal changes during space flight. Lancet 2: 1050-1052 (1985)
145. Rauvala H.: An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. EMBO J 8: 2933-2941 (1989)
146. Reynolds P. R., Mucenski M. L., Le Cras T. D., Nichols W. C., Whitsett J. A.: Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. J Biol Chem 279: 37124-37132 (2004)
147. Robinson J. A., Chatterjee-Kishore M., Yaworsky P. J., Cullen D. M., Zhao W., Li C., Kharode Y., Sauter L., Babij P., Brown E. L., Hill A. A., Akhter M. P., Johnson M. L., Recker R. R., Komm B. S., Bex F. J.: Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. J Biol Chem 281: 31720-31728 (2006)
148. Robling A. G., Castillo A. B., Turner C. H.: Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng 8: 455-498 (2006)
149. Robling A. G., Duijvelaar K. M., Geevers J. V., Ohashi N., Turner C. H.: Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. Bone 29: 105-113 (2001)

150. Robling A. G., Hinant F. M., Burr D. B., Turner C. H.: Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. J Bone Miner Res 17: 1545-1554 (2002)
151. Robling A. G., Turner C. H.: Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. Bone 31: 562-569 (2002)
152. Rodan G. A., Noda M.: Gene expression in osteoblastic cells. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1: 85-98 (1991)
153. Rodda S. J., McMahon A. P.: Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. Development 133: 3231-3244 (2006)
154. Ross S. E., Hemati N., Longo K. A., Bennett C. N., Lucas P. C., Erickson R. L., MacDougald O. A.: Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. Science 289: 950-953 (2000)
155. Rubin C. T., Lanyon L. E.: Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. Calcif Tissue Int 37: 411-417 (1985)
156. Sawakami K., Robling A. G., Ai M., Pitner N. D., Liu D., Warden S. J., Li J., Maye P., Rowe D. W., Duncan R. L., Warman M. L., Turner C. H.: The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. J Biol Chem 281: 23698-23711 (2006)
157. Scheven B. A., Visser J. W., Nijweide P. J.: In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. Nature 321: 79-81 (1986)
158. Schinke T., Gebauer M., Schilling A. F., Lamprianou S., Priemel M., Mueldner C., Neunaber C., Streichert T., Ignatius A., Harroch S., Amling M.: The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. Bone 42: 524-534 (2008)
159. Schriefer J. L., Warden S. J., Saxon L. K., Robling A. G., Turner C. H.: Cellular accommodation and the response of bone to mechanical loading. J Biomech 38: 1838-1845 (2005)
160. Seto E. S., Bellen H. J.: The ins and outs of Wingless signaling. Trends Cell Biol 14: 45-53 (2004)

161. Shimada H., Nabeya Y., Tagawa M., Okazumi S., Matsubara H., Kadomatsu K., Muramatsu T., Ikematsu S., Sakuma S., Ochiai T.: Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci 94: 628-632 (2003)
162. Shoback D.: Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. J Clin Endocrinol Metab 92: 747-753 (2007)
163. Simon-Chazottes D., Matsubara S., Miyauchi T., Muramatsu T., Guenet J. L.: Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: midkine (Mdk) and basigin (Bsg). Mamm Genome 2: 269-271 (1992)
164. Souttou B., Juhl H., Hackenbruck J., Rockseisen M., Klomp H. J., Raulais D., Vigny M., Wellstein A.: Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors. J Natl Cancer Inst 90: 1468-1473 (1998)
165. Spencer G. J., Utting J. C., Etheridge S. L., Arnett T. R., Genever P. G.: Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci 119: 1283-1296 (2006)
166. Staal F. J., Weerkamp F., Baert M. R., van den Burg C. M., van Noort M., de Haas E. F., van Dongen J. J.: Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. J Immunol 172: 1099-1108 (2004)
167. Stoica G. E., Kuo A., Powers C., Bowden E. T., Sale E. B., Riegel A. T., Wellstein A.: Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. J Biol Chem 277: 35990-35998 (2002)
168. Take M., Tsutsui J., Obama H., Ozawa M., Nakayama T., Maruyama I., Arima T., Muramatsu T.: Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). J Biochem 116: 1063-1068 (1994)
169. Tare R. S., Oreffo R. O., Sato K., Rauvala H., Clarke N. M., Roach H. I.: Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. Biochem Biophys Res Commun 298: 324-332 (2002)

170. Tezuka K., Takeshita S., Hakeda Y., Kumegawa M., Kikuno R., Hashimoto-Gotoh T.: Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. Biochem Biophys Res Commun 173: 246-251 (1990)
171. Torrance A. G., Mosley J. R., Suswillo R. F., Lanyon L. E.: Noninvasive loading of the rat ulna in vivo induces a strain-related modeling response uncomplicated by trauma or periostal pressure. Calcif Tissue Int 54: 241-247 (1994)
172. Tsutsui J., Kadomatsu K., Matsubara S., Nakagawara A., Hamanoue M., Takao S., Shimazu H., Ohi Y., Muramatsu T.: A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. Cancer Res 53: 1281-1285 (1993)
173. Tsutsui J., Uehara K., Kadomatsu K., Matsubara S., Muramatsu T.: A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. Biochem Biophys Res Commun 176: 792-797 (1991)
174. Turner C. H.: Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. Bone 23: 399-407 (1998)
175. Turner C. H., Akhter M. P., Raab D. M., Kimmel D. B., Recker R. R.: A noninvasive, in vivo model for studying strain adaptive bone modeling. Bone 12: 73-79 (1991)
176. Turner C. H., Forwood M. R., Otter M. W.: Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? FASEB J 8: 875-878 (1994)
177. Turner C. H., Forwood M. R., Rho J. Y., Yoshikawa T.: Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. J Bone Miner Res 9: 87-97 (1994)
178. Turner C. H., Pavalko F. M.: Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. J Orthop Sci 3: 346-355 (1998)
179. Vacherot F., Caruelle D., Chopin D., Gil-Diez S., Barritault D., Caruelle J. P., Courty J.: Involvement of heparin affin regulatory peptide in human prostate cancer. Prostate 38: 126-136 (1999)
180. Vico L., Chappard D., Alexandre C., Palle S., Minaire P., Riffat G., Novikov V. E., Bakulin A. V.: Effects of weightlessness on bone mass and osteoclast number in pregnant rats after a five-day spaceflight (COSMOS 1514). Bone 8: 95-103 (1987)

181. Vogele D.: Untersuchung des mechanisch-induzierten Knochenremodelings an Midkine-defizienten Mäusen. Med Dissertation, Universität Ulm (2010)
182. Warden S. J., Hurst J. A., Sanders M. S., Turner C. H., Burr D. B., Li J.: Bone adaptation to a mechanical loading program significantly increases skeletal fatigue resistance. J Bone Miner Res 20: 809-816 (2005)
183. Warden S. J., Turner C. H.: Mechanotransduction in the cortical bone is most efficient at loading frequencies of 5-10 Hz. Bone 34: 261-270 (2004)
184. Westendorf J. J., Kahler R. A., Schroeder T. M.: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene 341: 19-39 (2004)
185. Whyte M. P.: Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. Ann N Y Acad Sci 1192: 190-200 (2010)
186. Wolff J.: Das Gesetz der Transformation der Knochen. A. Hirchwald, Hrsg. Berlin (1892)
187. Wright H. L., McCarthy H. S., Middleton J., Marshall M. J.: RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. Curr Rev Musculoskelet Med 2: 56-64 (2009)
188. Xing W., Baylink D., Kesavan C., Hu Y., Kapoor S., Chadwick R. B., Mohan S.: Global gene expression analysis in the bones reveals involvement of several novel genes and pathways in mediating an anabolic response of mechanical loading in mice. J Cell Biochem 96: 1049-1060 (2005)
189. Yang X., Tare R. S., Partridge K. A., Roach H. I., Clarke N. M., Howdle S. M., Shakesheff K. M., Oreffo R. O.: Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. J Bone Miner Res 18: 47-57 (2003)
190. Zöllner L. D.: Bedeutung Heparin-bindender Polypeptide sowie des WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges in der Regulation der Knochenmasse. Med Dissertation, Universität Ulm (2008)
191. Zou L., Zou X., Li H., Mygind T., Zeng Y., Lu N., Bunger C.: Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. Adv Exp Med Biol 585: 431-441 (2006)

192. Zou P., Muramatsu H., Sone M., Hayashi H., Nakashima T., Muramatsu T.: Mice doubly deficient in the midkine and pleiotrophin genes exhibit deficits in the expression of beta-tectorin gene and in auditory response. Lab Invest 86: 645-653 (2006)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Anita Ignatius, der Leiterin des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit am Institut anzufertigen, danken. Ebenso möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Liedert, die mich während der gesamten Zeit begleitet hat, für ihre Betreuung und Unterstützung danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Robert Blakytny, Frau Dipl.-Biol. Viktoria Röntgen und Daniel Vogele für die Durchführung der mechanischen Stimulation der Mäuse und Frau Dipl.-Biol. Viktoria Röntgen für ihre Unterstützung auch im weiteren Verlauf, vor allem bei der Auswertung der µCT-Schnittbilder.
Zudem möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Michael Ohnmacht für seine Unterstützung bei der praktischen Durchführung der biomechanischen Versuche und Herrn Dr. Tim Wehner für die Hilfe bei der Auswertung der biomechanischen Versuche danken.

Ich danke auch meiner besten Freundin Florentine Manger für ihre bedingungslose Unterstützung, die mich seit unserer gemeinsamen Tage im Kindergarten durch die gesamte Schulzeit und nun auch durch das Studium begleitet hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie für die fortwährende und unermüdliche Unterstützung in allen Lebensbereichen, für die Motivation und für den immer gewährten Rückhalt.

Ich bedanke mich ebenso bei allen hier nicht namentlich genannten Personen und Freunden, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank!

Lebenslauf

30.11.1984	geboren in Augsburg als Sohn von Werner Pahl und Sonja Pahl
1991 - 1995	Grundschule Rotes Tor, Augsburg
1995 - 2004	Holbein Gymnasium, Augsburg
2004 - 2005	Studium der Biochemie an der Technischen Universität München
2005 - 2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
Herbst 2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007 - 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
2010 - 2011	Praktisches Jahr