

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling

Alters- und Phosphatstoffwechselabhängige Veränderungen der Knochenqualität muriner Gehörknöchelchen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maximilian Maria Delsmann
aus München

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.02.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Johannes Keller

Inhaltsverzeichnis

1 Zielsetzung	5
2 Einleitung	6
2.1 Das Skelettsystem	6
2.1.1 Knochenentwicklung	6
2.1.2 Knochenbestandteile und -aufbau.....	8
2.1.3 Zellen des Knochens.....	10
2.1.4 Knochenstoffwechsel – Remodeling	13
2.1.5 Calciumhomöostase.....	16
2.1.6 Genetische Knochenerkrankung: Phosphatdiabetes / X-linked hypophosphatemia (XLH).....	18
2.2 Gehörknöchelchen des Menschen	20
2.2.1 Anatomie humaner Gehörknöchelchen.....	21
2.2.2 Embryogenese humaner Gehörknöchelchen.....	23
2.3 Gehörknöchelchen der Maus	25
2.3.1 Anatomie muriner Gehörknöchelchen.....	26
2.3.2 Embryogenese muriner Gehörknöchelchen.....	28
2.4 Funktion der Gehörknöchelchen	29
2.5 Zelluläre Prozesse humaner Gehörknöchelchen	34
2.6 Auswirkung der Knochenqualität muriner Gehörknöchelchen auf die Hörfähigkeit	36
3 Material und Methoden	38
3.1 Mausmodell	38
3.1.1 C57BL/6-Mausmodell.....	38
3.1.2 <i>Hyp</i> Mausmodell.....	38
3.2 Probengewinnung	39
3.2.1 Präparation des Os temporale	39
3.2.2 Isolation der Ossicula auditoria	42
3.3 Mikro-Computertomographie (μ-CT)	43
3.4 Morphometrische Analyse	43
3.5 Histologische Aufarbeitung	44
3.6 Rasterelektronenmikroskopie (Quantitative backscattered electron imaging, qBEI)	46
3.7 Histologische Analyse	48
3.8 Statistische Auswertung	50

4	Ergebnisse	51
4.1	Morphometrische Analyse	51
4.2	Rasterelektronenmikroskopie (Quantitative backscattered electron imaging, qBEI).....	52
4.3	Histologische Analyse	59
4.4	<i>Hyp</i> Mausmodell.....	62
5	Diskussion	65
6	Zusammenfassung	76
7	Abkürzungsverzeichnis	78
8	Literaturverzeichnis	79
9	Danksagung	91
10	Lebenslauf	92
11	Eidesstattliche Erklärung	93

1 Zielsetzung

Säugetiere verfügen über drei im Mittelohr lokalisierte, gelenkig miteinander verbundene Gehörknöchelchen – Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes). Sie leiten akustische Schwingungen des Trommelfells mechanisch auf das Innenohr weiter. Die Entwicklungsstadien der Gehörknöchelchen zeichnen sich durch zelluläre Besonderheiten aus, welche bei keinem anderen Knochen zu beobachten sind. So findet die vollständige Ossifikation der humanen Gehörknöchelchen pränatal statt. In der Entwicklung der Gehörknöchelchen der Maus zeigt sich im Gegensatz zu der des Menschen, dass die pränatalen Entwicklungsstadien beim Menschen in der Maus erst postnatal stattfinden. Somit kann die Maus als Modell für die humanmedizinische Forschung dienen, um Knochenentwicklungsprozesse der Gehörknöchelchen zu analysieren und beeinflussende Faktoren zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse muriner („die Maus betreffend“) Gehörknöchelchen in unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien und die Aufstellung eines histologischen und histomorphometrischen Entwicklungsmodells sowie die rasterelektronenmikroskopische Analyse des Mineralisationsgrades (CaMean), der strukturellen Knochenveränderung (Porosität) und der Veränderung von Anzahl und Erscheinungsbild der Osteozytenlakunen.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse muriner Gehörknöchelchen des *Hyp* Mausmodells zur Entschlüsselung des Einflusses des aus dem Knochenfeld bekannten Signalproteins FGF23 auf die Entwicklung und Mineralisation der Gehörknöchelchen. Hierdurch soll der Zusammenhang zwischen der Knochenqualität der Gehörknöchelchen und der bei vielen genetischen Skeletterkrankungen vorliegenden Hörminderung untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Das Skelettsystem

Die Knochen stellen das Endoskelett des Organismus von Wirbeltieren dar. Sie weisen eine große Varianz in Struktur, Form und Größe auf. Neben Muskeln und Sehnen sind sie Hauptorgan des Stütz- und Bewegungsapparates und somit entscheidend für das bewegliche Erscheinungsbild. Das Skelett übernimmt weitreichende lebensnotwendige Funktionen. Im menschlichen Körper ist es neben der Sicherung der Stabilität und Bewegung essentiell für den Schutz der inneren Organe, sowie als Ursprungsort des blutbildenden Systems und als Speicher von Mineralstoffen unentbehrlich. Der Knochen stellt somit das größte Reservoir von Calcium und Phosphat im Körper dar und ist somit bedeutend für den Mineralstoffwechsel. Kennzeichnend für den Knochen ist die Anpassung an seine effektiven Beanspruchungen, wie bereits 1892 durch Julius Wolff in „Das Gesetz der Transformation des Knochens“ festgestellt wurde (Wolff, 1892).

2.1.1 Knochenentwicklung

Die Knochenentwicklung im Organismus des Menschen erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen über den direkten Weg der desmalen Ossifikation und zum anderen über den indirekten Weg der chondralen Ossifikation. Zu Beginn beider Wege der Osteogenese steht eine Verdichtung des embryonalen Mesenchyms.

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren Mesenchymzellen zu Osteoblasten, welche wiederum über Zell-Zell-Kanäle (Gap-Junctions) verbunden sind. Diese lagern um ihre Zellkörper und -ausläufer unmineralisierte Knochenmatrix

(genannt Osteoid) ab, welches in der Folge zunehmend mineralisiert wird. Einige der Osteoblasten werden so in die Knochenmatrix eingemauert und differenzieren im Knochen zu Osteozyten. Die weitere Osteogenese findet durch appositionelles Wachstum statt, indem in der Peripherie lokalisierte Osteoblasten Osteoid an die vorhandene Knochensubstanz anlagern. Die desmale Ossifikation ist unter anderem bei der Osteogenese des Schädeldachs, des Gesichtsschädels und des Schlüsselbeins zu beobachten (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Die chondrale Ossifikation zeichnet sich durch eine anfängliche Differenzierung des mesenchymalen Bindegewebes zu Chondroblasten, welche Vorläuferzellen der Knorpelmatrix darstellen, aus. Das Zwischenergebnis ist ein Primordialskelett, ein Modell des Skeletts vollständig aus hyalinem Knorpel. Aus diesem differenziert sich im Weiteren die mineralisierte Knochensubstanz. Die Prozesse der chondralen Ossifikation sind in peri- und enchondrale Ossifikation zu unterteilen. Bei der perichondralen Ossifikation bildet sich zunächst eine Knochenmanschette um die Zirkumferenz des Knorpelmodells herum. Dieses findet zunächst im Bereich der Diaphyse statt und breitet sich anschließend divergent aus. Aus der Knochenmanschette entwickelt sich später das Periost, von welchem das Dickenwachstum appositionell ausgehen wird. Die zellulären Vorgänge bei der perichondralen Ossifikation entsprechen hierbei denen der desmalen Ossifikation (Welsch and Deller, 2010). Die enchondrale Ossifikation findet im Inneren des Primordialskelettes statt. Durch die sich bildende Knochenmanschette sprießen Blutgefäße mit Chondroblasten, Osteoblasten, Osteoklasten und Knochenmarkszellen in das Innere des Knorpelskelettes ein (Mackie et al., 2008). Durch Abbauvorgänge der Chondroblasten und Aufbauvorgänge der Osteoblasten wird die Knorpelsubstanz durch ein Knochengeflecht ersetzt.

Es entsteht so die primäre Markhöhle und die Substantia spongiosa. In der primären Markhöhle wird sich später das Knochenmark bilden. In den Epiphysen kommt es bei dem heranwachsenden Menschen durch ständige Prozesse der enchondralen Ossifikation zum interstitiellen Längenwachstum des Knochens. Spezifische Punkte, von denen die Ossifikationsvorgänge starten, werden hierbei als Ossifikationszentren bezeichnet (Michels et al., 2007).

2.1.2 Knochenbestandteile und -aufbau

Makroskopisch stellen die Substantia kompakta und die Substantia spongiosa die zwei Bauformen des Knochens dar. Die Kompakta (Kortikalis; Abbildung 1 A) fungiert als homogen erscheinende Rindenschicht, welche von außen von der äußeren Knochenhaut (Periost) überzogen wird. Die Spongiosa liegt im Inneren des Knochens. Sie ist ein schwammartiges Gitterwerk aus feinen Knochenbälkchen (Trabekel; Abbildung 1 B). Die Spongiosa ist dabei so angeordnet, dass die Trabekel auf Zug oder Druck belastet werden. Sämtliche Innenflächen des Knochens werden von der inneren Knochenhaut (Endost) überzogen. Je nach Knochen unterscheidet sich der Anteil von Kortikalis und Spongiosa. So bestehen die langen Röhrenknochen vor allem aus Kortikalis, während die Wirbelkörper zu einem größeren Teil aus Spongiosa aufgebaut sind (Abbildung 1).

Hauptbestandteile des menschlichen Knochens sind die mineralisierte Extrazellulärmatrix (EZM) und die verschiedenen Zelltypen. Unter knochenspezifischen Zelltypen sind Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten zusammenzufassen. Die Extrazellulärmatrix ist ein dreidimensionales Konstrukt, welches dem Knochen seine räumliche Organisation und Struktur gibt. Sie besteht zu 35% aus organischem Material wie Kollagenfibrillen

des Typs I, Proteoglykanen und Knochenproteinen. In diese Matrix werden anorganische Materialien wie Calciumsalze (Hydroxylapatit) und Ionen eingelagert. Die eingelagerten anorganischen Substanzen stellen hierbei 65% der Extrazellulärmatrix dar.

Die Extrazellulärmatrix als strukturgebende Knochenformation kann als Geflecht- oder Lamellenknochen organisiert sein. Geflechtknochen stellt die primitive Form des Knochens dar, welcher bei beiden Arten der Ossifikation zunächst gebildet wird. Die Kollagenfasern des Geflechtknochens liegen ungeordnet vor und die Knochenbälkchen bilden ein dreidimensionales Konstrukt. Die bindegewebigen und gefäßführenden Zwischenräume dieses Konstrukts bilden das primäre Knochenmark (Welsch and Deller, 2010). Geflechtknochen sind beim erwachsenen Menschen lediglich im Felsenbein, in den Schädelnähten und in den Gehörknöchelchen zu finden (Moll and Moll, 2006). Aber auch im Verlauf der Frakturheilung stellt der Geflechtknochen, in welchem ausgeprägte Auf- und Abbauvorgänge der Knochensubstanz ablaufen, einen essentiellen Zwischenschritt dar (Welsch and Deller, 2010).

Im Laufe des physiologisch stattfindenden Knochenumbaus wird der Geflechtknochen nach und nach durch Lamellenknochen ersetzt. Lamellen fungieren als Baueinheiten, welche sich im Gegensatz zum Geflechtknochen durch charakteristische Anordnungen und Verlaufsrichtungen von Kollagenfibrillen auszeichnen. Verschiedene Arten von Lamellen werden hierbei unterschieden. Speziallamellen sind die am häufigsten auftretenden Lamellen. Sie zeichnen sich durch eine konzentrische, zylindrische Lamellenanordnung aus, in welcher zentral der Havers-Kanal verläuft, welcher Blutgefäße und Nervenfasern führt. Eine solche Baueinheit wird als Osteon bezeichnet. Havers-Kanäle sind untereinander über horizontale Volkmann-Kanäle verbunden und die Osteone sind ihrerseits durch

proteoglykanhaltige Zementlinien voneinander getrennt. Die Ausrichtungen der Kollagenfibrillen wechseln in jedem Osteon. So können, angepasst an die effektiven Beanspruchungen, durch biomechanisch sinnvolle Ausrichtungen höhere Stabilitäten erzielt werden (Jerosch et al., 2002). Zwischen den intakten Osteonen sind Schaltlamellen vorzufinden. Sie sind schotterartige Rückstände abgebauter Knochenlamellen und füllen die Räume zwischen neu entstandenen Osteonen auf (Petersen, 2013).

Die äußerste und innerste Schicht der Kompakta wird durch Generallamellen organisiert. Hier liegen die Lamellen nicht als Osteone vor, sondern umfassen kontinuierlich die ganze innere und äußere Zirkumferenz (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

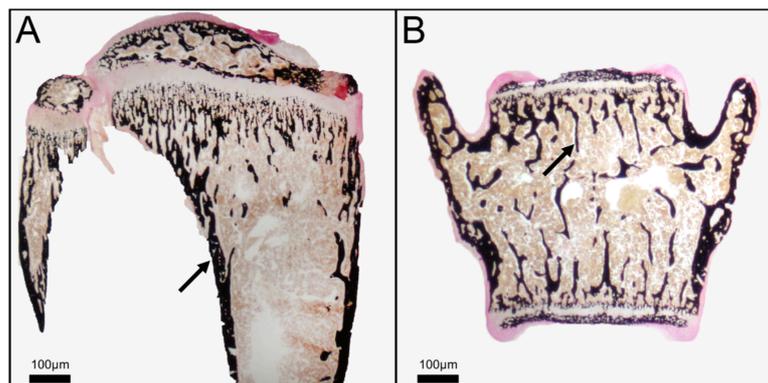


Abbildung 1: Histologische Übersichtsaufnahmen von Knochen (von Kossa Färbung). A: Maus Tibia, schwarzer Pfeil: kortikaler Knochen. B: Maus Wirbelkörper, schwarzer Pfeil: spongiöser/trabekulärer Knochen.

2.1.3 Zellen des Knochens

Zu den knochenspezifischen Zellen zählen Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die drei erstgenannten Zellen gehören vom Ursprung her zu einem Zelltyp, befinden sich allerdings in unterschiedlichen funktionellen Phasen. Osteoprogenitorzellen stellen die früheste dieser Phasen dar.

Sie sind Vorläuferzellen, welche sich aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren. Aus ihnen bilden sich Osteoblasten. Osteoprogenitorzellen sind auch noch bei Erwachsenen zu finden und können beispielsweise im Prozess der Frakturheilung aktiviert werden. Sie sind im Endost und Periost lokalisiert (Welsch and Deller, 2010).

Osteoblasten sind einkernige, kubische knochenbildende Zellen. Sie sind ebenfalls sowohl im wachsenden als auch im ausgewachsenen Knochen zu finden. Sie sind aktiv sezernierende Zellen, welche untereinander über Nexus verbunden sind und die noch nicht verkalkte Knochenmatrix – das Osteoid – bilden. Osteoid ist nahezu überall auf den Knochenoberflächen eines wachsenden Knochens zu finden (Florencio-Silva et al., 2015). Mit steigendem Alter nimmt die Anzahl der Osteoblasten deutlich ab. Sobald die Osteoblasten ihre knochenbildende Funktion vollendet haben, gehen sie entweder durch Apoptose zugrunde, werden zu in Knochenmatrix eingemauerten, Osteozyten oder entwickeln sich zu Saumzellen („bone-lining cells“) (Jilka et al., 1998). Saumzellen befinden sich auf der Knochenoberfläche, an welcher weder Knochenresorption noch Knochenneubildung stattfindet. Sie befinden sich in einem Status des Ruhezustandes. Untereinander und zu benachbarten Osteozyten stehen die Saumzellen in Kontakt. So können von Saumzellen ausgehende Signale zu Osteozyten in Knochen-Canaliculi und bestehende Zell-Zell-Verbindungen (Gap junctions) zwischen Saumzellen untereinander beobachtet werden (Miller et al., 1989).

Osteoblasten, welche sich zu Osteoid-Osteozyten und terminal zu Osteozyten ausdifferenzieren, liegen schlussendlich eingemauert als einkernige reife Zellen in Knochenlakunen der Knochenmatrix vor. Während der Differenzierung verlieren die Zellkörper deutlich an Volumen. So ist eine Abnahme des Zellkörpervolumens von 30% bei Osteoid-Osteozyten und schließlich eine Reduzierung des Volumens von

70% bei ausdifferenzierten Osteozyten zu verzeichnen (Aarden et al., 1994). Osteozyten sind die häufigste zelluläre Komponente des Knochens (Franz-Odendaal et al., 2006). Sie stellen rund 90-95% der gesamten Knochenzellanzahl dar (Florencio-Silva et al., 2015) und besitzen stark verzweigte dendritische Fortsätze. Über diese Fortsätze, welche sich in Knochen-Canaliculi befinden, stehen die Osteozyten untereinander und zur Knochenoberfläche in Verbindung. Durchschnittlich können Osteozyten eine Lebensdauer von 25 Jahren erreichen (Frost, 1963). Osteozyten werden als Mechanosensoren angesehen und können die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten modulieren (Welsch and Deller, 2010). Die Anzahl der Osteozyten fällt nach Frost mit steigendem Alter stetig ab. So sinkt die Anzahl der mit Osteozyten besetzten Knochenlakunen von 95% im Alter von 10 Jahren auf 70% im Alter von 40 Jahren ab (Frost, 1963, Rolvien et al., 2018). Hierbei können die Osteozyten auf zweierlei Art und Weise zugrunde gehen. Zum einen können sie nach einigen Jahren durch Apoptose sterben. Bei diesem Weg kann für einige Monate noch ein pyknotischer Zellkern in der Knochenlakune verbleiben, ehe diese infolge durch mineralisierte Knochenmatrix aufgefüllt werden kann. Lichtmikroskopisch sind die ehemaligen Knochenlakunen zu diesem späten Zeitpunkt nicht mehr sichtbar. Zum anderen können Osteozyten durch Osteoklasten im Verlauf der Knochenresorption abgebaut werden (Parfitt, 2002).

Osteoklasten sind Knochenmatrix resorbierende Zellen. Sie sind mehrkernige Zellen, welche bis zu 50 Kerne besitzen können und treten im Vergleich zu anderen knochenspezifischen Zellen mit 2-3 Zellen pro Kubikmillimeter selten auf (Miyamoto and Suda, 2003). Sie entstehen durch die Fusion von einkernigen Vorläuferzellen, von welchen auch Makrophagen und Blutmonozyten abstammen. Somit unterscheidet sich dieser Zelltyp fundamental von den Osteoblasten/-zyten. Anzutreffen sind Osteoklasten zumeist in Einbuchtungen des Knochens - den

sogenannten Howship-Lakunen (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). In diesen Lakunen herrscht ein deutlich erniedrigter pH-Wert (ca. 4,5), der durch aktiven Protonentransport erreicht wird und dem Abbau der mineralisierten Matrix dient (Clarke, 2008). Die zum Knochen gerichtete Seite der Osteoklasten ist dabei stark geriffelt und erzielt auf diese Weise eine bedeutende Vergrößerung der Resorptionsoberfläche (Stenbeck, 2002).

2.1.4 Knochenstoffwechsel – Remodeling

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, welches durch hoch koordinierte Vorgänge kontinuierlich einen Prozess des Knochenumbaus erfährt, welcher das gesamte Leben über stattfindet. Dieser Umbau wird als Knochenremodeling bezeichnet. Durch das Remodeling wird pro Jahr ungefähr 10% der gesamten Knochenmenge umgesetzt (Manolagas, 2000). Zweck dieses physiologischen Prozesses ist zum einen die Umwandlung des infantilen Geflechtknochens in biomechanisch kompetenteren Lamellenknochen (vor allem im Wachstum) und zum anderen die ständige Erneuerung und Anpassung des Skeletts um beispielsweise tote Knochenbereiche oder Mikrofrakturierungen zu erneuern. Das Knochenremodeling ist somit für den Organismus unverzichtbar, um sich an wandelnde Umwelteinflüsse aktiv anpassen zu können und zusätzlich um ein funktionierende Calciumhomöostase zu gewährleisten (Rucci, 2008).

Interessanterweise ist das Knochenremodeling bei den menschlichen Gehörknöchelchen kaum noch aktiv, sobald sie ihre finale Größe erreicht haben. Sie verlieren die Fähigkeit des Remodelings (Rolvien et al., 2018, Palumbo et al., 2012), welches möglicherweise auf eine funktionelle Bedeutung bezüglich der Schallweiterleitung zurückzuführen ist.

Das Remodeling wird durch räumlich und zeitlich koordinierte Cluster von knochenresorbierenden Osteoklasten und knochensynthetisierenden Osteoblasten durchgeführt. Sie bilden eine temporäre anatomische Struktur und stellen die kleinste zelluläre Einheit des Knochens dar, die „basic multicellular unit“ (BMU) (Raggatt and Partridge, 2010). Im Laufe des Knochenumbaus frisst ein Cluster von Osteoklasten einen Bohrkanal in die Knochenmatrix, welcher den Durchmesser eines zukünftigen Osteons besitzt. Dieses geschieht ohne Rücksicht auf bestehende Osteone. Den Osteoklasten folgt ein Cluster von knochenbildenden Osteoblasten. Sie synthetisieren an die Wand des Bohrkanals die erste Osteoid-Lamellenschicht. Weitere Cluster von Osteoblasten folgen und bilden weitere sich nach innen anschließende Lamellenschichten. Bis zur Ausbildung eines vollständigen Osteons wiederholt sich dieser Prozess 5-20 mal. Zentral kommt es so zur Ausbildung eines Hohlraums, dem Havers-Kanal. Die Bildung eines Osteons nimmt mehrere Monate in Anspruch (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Im Rahmen des Remodelings nehmen Osteozyten eine regulatorische Funktion ein, indem sie mechanosensorische Signale an Osteoblasten und Osteoklasten senden. So ist das Sklerostin eine von Osteozyten bei mechanischer Minderbeanspruchung des Knochens sezernierte Signalsubstanz, welche die Aktivität der Osteoblasten inhibiert (Eriksen, 2010).

Außerdem wird das Remodeling durch Zytokine, wie M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) und OPG (Osteoprotegerin), reguliert. Alle drei Signalsubstanzen werden durch Osteoblasten sezerniert. RANKL bindet hierbei an den RANK-Rezeptor, der sich auf Osteoklasten befindet. Die RANKL/RANK-Interaktion und das Zytokin M-CSF bewirken ihrerseits eine Proliferation der Osteoklastenvorläufer. Infolge findet eine vermehrte Knochenresorption statt. Das Zytokin OPG bindet an RANKL und kann auf diese

Weise die RANKL/RANK-Interaktion unterbinden. Als Decoy-Receptor (Lockvogel-Rezeptor) verhindert OPG so eine weitere Knochenresorption. Eine Beendigung der Knochenresorption wird außerdem durch Ephrin-Proteine herbeigeführt. Diese binden sowohl an Osteoklasten als auch an Osteoblasten. Sie führen durch die Bindung zu einer Verminderung der Osteoklasten-Tätigkeit und zu einer Vermehrung der Knochenbildung durch Osteoblasten. Außerdem wird die Knochenbildung durch TGF- β (transforming growth factor) und durch das Hormon Östrogen positiv beeinflusst. Weitere Hormone, wie Parathormon (PTH), Glucocorticoide oder das Calcitriol (Aktives Vitamin D) beeinflussen ebenfalls das Knochenremodeling, indem sie in diesen RANKL-OPG-Formenkreis eingreifen.

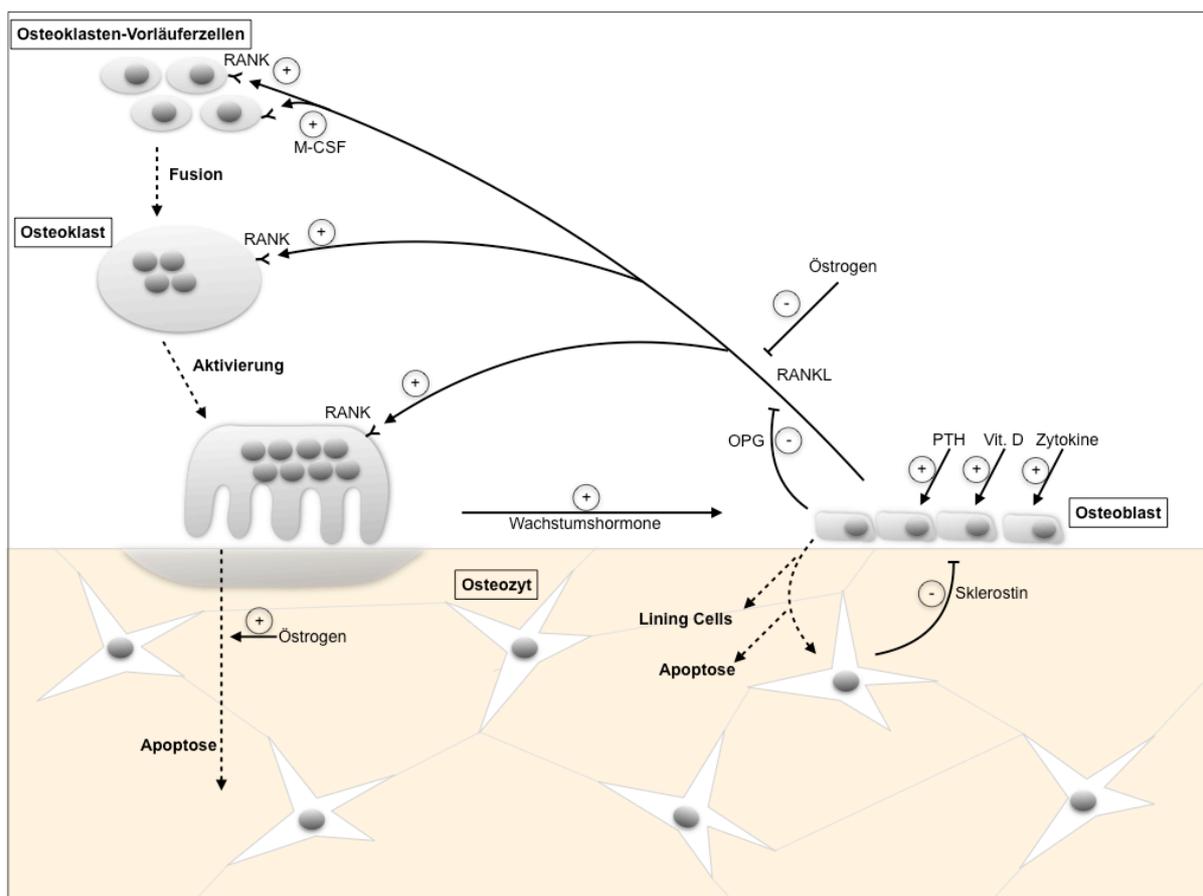


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Remodelings der Knochenstruktur durch knochenabbauende Osteoklasten, knochenaufbauende Osteoblasten und Osteozyten. (+) Stimulation und (-) Hemmung. RANKL, M-CSF und OPG stellen durch Osteoblasten synthetisierte Zytokine dar. PTH: Parathormon. Vit D: 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (Calcitriol).

2.1.5 Calciumhomöostase

Die Calciumhomöostase dient der Aufrechterhaltung einer konstanten Calcium-Konzentration im Zytoplasma der Zelle, welches für die zelluläre Funktion essentiell ist. Stellglieder der Calciumhomöostase sind der Magen-Darm-Trakt zur Calciumaufnahme, die Niere bzw. der Darm zur Calciumausscheidung und das Skelett. So stellt das Skelett das wichtigste Depotorgan des Organismus für Calcium dar. Es lagert zusammen mit den Zähnen rund 99% des gesamten im Körper befindlichen Calciums ein (Sunyecz, 2008). Hieraus resultiert eine Gesamtmenge von rund 1000g Calcium im Skelett. Der Anteil des Calciums, welches in die Knochenmatrix eingelagert ist, wird durch den Mineralisationsgrad des Knochens bestimmt und ist maßgeblich mit für die Knochenqualität verantwortlich. So stellt auch die Knochenmineralisation einen bedeutenden Analyseparameter für die Analyse der Gehörknöchelchen in dieser Arbeit dar. Sie kann herangezogen werden, um den Grad der Ossifikation in der frühen Entwicklung des Knochens zu bestimmen und um die weitere Entwicklung von Mineralisations- und Qualitätsgrad im steigenden Alter genauer zu untersuchen.

Maßgeblich wird die Knochenmineralisation durch die Hauptregulatoren der Calciumhomöostase beeinflusst. Hierbei sind hauptsächlich das Parathormon (PTH) und das aktive Vitamin D₃-Derivat Calcitriol zu nennen. Parathormon (PTH) wird bei Calciummangel von der Nebenschilddrüse gebildet und ins Blut sezerniert. Umgekehrt wird die Parathormonsekretion bei erhöhten Calcium-Spiegeln inhibiert. Außerdem wirkt Calcitriol, dessen Produktion wiederum durch PTH stimuliert wird, autoregulativ auf die Sekretion des PTH. PTH bewirkt am Knochen eine Steigerung der Osteoklastenaktivität und infolge eine stimulierte Osteolyse. Es resultiert ein steigender Calcium- und Phosphationenspiegel. Die Phosphationen werden nun

vermehrt renal eliminiert, da ein Zuwachs des Phosphatspiegels wiederum einen Calciumanstieg entgegenwirkt (Amann-Vesti, 2006).

Calcitriol (1,25(OH)₂-Vitamin D₃) stellt den aktiven Metaboliten des Vitamin D₃ (Cholecalciferol) dar, wobei es sich per definitionem nicht um ein Vitamin handelt, sondern vielmehr um ein Steroidhormon, da der Körper die Fähigkeit der Eigensynthese dieses Hormons besitzt. Vitamin D₃ kann folglich sowohl per Nahrung aufgenommen und im Darm resorbiert werden oder aber auch eigenständig im Körper synthetisiert werden. Hierbei wird zunächst aus dem körpereigenem Cholesterol in der Leber 7-Dehydrocholesterol gebildet, welches in der Haut unter UVB-Bestrahlung (Optimum bei einer Wellenlänge von 295 nm) (Lehmann et al., 2001) zu Cholecalciferol umgewandelt wird. Das Cholecalciferol wird folglich durch eine zweifache Hydroxylierung zunächst in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu Calcidiol (25-(OH)-Vitamin D₃) und abschließend in der Niere durch die 1 α -Hydroxylase zum aktiven Metaboliten Calcitriol (1,25(OH)₂D₃) umgewandelt (Christakos et al., 2010). Die renale Produktion von Calcitriol wird stimuliert durch PTH und durch einen niedrigen Calcium- beziehungsweise Phosphat-Spiegel. Umgekehrt wird die Calcitriolbildung durch einen hohen Phosphat-Spiegel und durch FGF23 (fibroblast growth factor 23) gehemmt (genauere Erläuterung zu FGF23 im Kapitel 2.1.6). Neben dem regulatorischen Einfluss von aktivem Vitamin D auf die Calciumhomöostase durch die Nieren und dem Darm wird ein direkter Einfluss auf den Knochenstoffwechsel sowie auf die Knochenmineralisation vermutet. So sind auf vielen Zellarten, wie zum Beispiel Osteoblasten oder auch Osteoklasten, Rezeptoren für Calcitriol vorzufinden. So führt Calcitriol laut Karlson zu einer verbesserten Knochenmineralisation, besonders in noch nicht mineralisierten neu gebildeten Knochenarealen (Karlson and Doenecke, 2005). Ein Mangel an Vitamin D führt

wiederum zu einer erhöhten Apoptose von Osteozyten sowie einer Vergrößerung der Osteozytenlakunen (Rolvien et al., 2017).

Des Weiteren üben Steroidhormone, wie Glucocorticoide und Östrogene einen Einfluss auf die Knochenmineralisation aus. So führen Glucocorticoide hierbei über eine gesteigerte Produktion der Osteoklasten zu einer vermehrten Knochenresorption (Canalis and Delany, 2002), während Östrogene über Wirkungen auf Osteoblasten und Osteoklasten zu einer Steigerung der Knochenmineralisation und -masse führen. So erfüllt Östrogen, sowohl bei Frauen als auch bei Männern, eine wichtige Rolle in der Knochenentwicklung (Vaananen and Harkonen, 1996).

2.1.6 Genetische Knochenerkrankung: Phosphatdiabetes / X-linked hypophosphatemia (XLH)

Der Phosphatdiabetes beziehungsweise die X-chromosomal vererbte hypophosphatämische Rachitis („X-linked hypophosphatemia“, XLH) stellt eine genetische Stoffwechselerkrankung dar, welche auf eine Mutation im *PheX*-Gen („phosphate regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome“) auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms zurückzuführen ist (Vidmar et al., 2017). Folge dieser Mutation ist eine vermehrte Bildung von FGF23. FGF23 ist ein Protein, welches im normalem Knochenstoffwechsel von Osteozyten und Osteoblasten bei vermehrter oraler Phosphataufnahme oder niedrigem Calcitriolspiegel gebildet wird (Jüppner, 2011) und mit dem Co-Rezeptor Klotho vor allem in der Niere eine verminderte Expression des Natrium-Phosphat-Cotransporters bewirkt. Hierdurch resultiert eine verringerte Phosphatrückresorption und somit eine erhöhte Phosphatausscheidung durch die Nieren (Berndt and Kumar, 2007). Außerdem bewirkt FGF23 durch eine Inhibierung der 1α -Hydroxylase eine

verminderte Hydroxylierung von Calcitriol, was wiederum eine verringerte gastrointestinale Absorption von Calcium und Phosphat bewirkt (Lane et al., 2013).

Im Falle der XLH führt die vermehrte FGF23 Expression ebenfalls zu einer verminderten gastrointestinalen Phosphatresorption und einer vermehrten Phosphaturie durch die Nieren, welches zu verringerten Phosphatspiegeln im Blut und im Knochenstoffwechsel führt. Phosphat spielt im Knochenstoffwechsel eine essentielle Rolle. Es beeinflusst zusammen mit Calcium maßgeblich die Mineralisation. So führt eine chronische Hypophosphatämie über eine verringerte Mineralisation der Knochenmatrix zu einer hypophosphatämischen Osteomalazie (Kinoshita and Fukumoto, 2018), so auch im Falle der XLH. Die Osteomalazie manifestiert sich häufig innerhalb der ersten zwei Lebensjahre durch Verbiegungen der unteren Extremitäten (X- oder O-Beinstellung) mit auffälligem Gangbild. Sie kann allerdings auch erst im Erwachsenenalter durch eine vorher nicht weitergehend untersuchte kleinwüchsige körperliche Statur in Erscheinung treten (Ruppe, 1993). Als weitere Komplikationen der XLH sind neben einer gestörten Zahnentwicklung mit Neigung zu spontanen Zahnabszessen ein vermehrtes Auftreten von Nephrokalzinosen, Enthesiopathien (Kalzifikationen von Sehnen, Bändern und Gelenkkapseln) und Arthritiden zu nennen. Außerdem ist ein vermehrtes Auftreten von Schwerhörigkeiten sensorineuralen und konduktiven Ursprungs zu verzeichnen (Chesher et al., 2018).

Zur näheren Untersuchung der Stoffwechselerkrankung XLH spielt das *Hyp* Mausmodell eine entscheidende Rolle. Es beruht entsprechend zur XLH auf einer Spontanmutation im *PheX*-Gen (Brownstein et al., 2010) und weist einige Charakteristika auf, welche man ebenfalls bei der XLH des Menschen beobachten kann. Dieses wird im Abschnitt „3.1.2 *Hyp* Mausmodell“ näher erläutert. In dieser Arbeit wurden *Hyp* Mäuse verwendet, um den Effekt des aus dem Knochenfeld

bekanntes Signalprotein FGF23 an den Gehörknöchelchen genauer zu untersuchen. Hierbei wurde vor allem die Auswirkung auf die Mineralisation der Gehörknöchelchen näher betrachtet, um Rückschlüsse von der Mineralisation der Gehörknöchelchen der Maus auf die Gehörknöchelchen der an XLH erkrankten Menschen zu gewinnen. Durch die Untersuchung der Gehörknöchelchen bei einer genetischen Erkrankung mit primärem Mineralisationsdefekt können möglicherweise auch Rückschlüsse auf die mechanistischen Aspekte der Matrixmineralisation der Gehörknöchelchen gezogen werden.

2.2 Gehörknöchelchen des Menschen

Die Gehörknöchelchen (Ossicula auditoria) Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) stellen die kleinsten Knochen des menschlichen Körpers dar. Sie sind in der luftgefüllten Paukenhöhle (Cavum tympani) des Mittelohres lokalisiert und bilden in ihrer Gesamtheit die Gehörknöchelchenkette. Die Mittelohren befinden sich hierbei paarig angelegt auf beiden Seiten des Schädels in den Schläfenbeinen (Os temporale) und stellen die Verbindung zwischen dem äußeren Gehörgang (Meatus acusticus externus) und dem Innenohr (Auris interna) dar. Die Paukenhöhle selber ist zum äußeren Gehörgang durch das Trommelfell (Membrana tympani) abgegrenzt.

Der Malleus ist der am weitesten lateral liegende Knochen der Gehörknöchelchenkette und liegt dem Trommelfell (Membrana tympani), welches äußeren Gehörgang und Paukenhöhle voneinander trennt, an. Auf den Malleus folgen der Incus in Funktion eines Bindegliedes und schließlich der Stapes. Der Stapes als der am weitesten medial liegende Ossikel der Kette stellt durch die

Artikulation seiner Fußplatte mit dem ovalen Fenster (Fenestra ovalis), welches Mittelohr und Innenohr voneinander trennt, die Verbindung zum Innenohr dar.

Die drei Gehörknöchelchen des Menschen sind untereinander über zwei diarthrotische Gelenke miteinander verbunden (Treuting et al., 2012). So stellt die *Articulatio incudomallearis* die Verbindung zwischen Malleus und Incus und die *Articulatio incudostapedia* die Verbindung zwischen Incus und Stapes dar. Durch ihre Anatomie begründet erscheinen die Gehörknöchelchen als bewegliche Einheit. Auf das Trommelfell treffende Schallwellen versetzen dieses in Schwingung. Die Gehörknöchelchenkette verstärkt und überträgt die Energie dieser mechanischen Schwingungen (Waldeyer, 2002). Am Fenestra ovalis findet die mechanische Weiterleitung auf das Innenohr statt. Die Verbindung zwischen der Basis des Stapes und dem Fenestra ovalis weist hierbei typische Charakteristika einer Syndesmose auf (Whyte et al., 2002).

2.2.1 Anatomie humaner Gehörknöchelchen

Malleus

Der Malleus ist der größte Ossikel der Gehörknöchelchenkette. Seine anatomische Struktur besteht aus einem Kopf (*Caput mallei*), einem Hals (*Collum mallei*), einem Hammergriff (*Manubrium mallei*) und zwei Fortsätzen (*Processus anterior* und *Processus posterior*). Mit dem rundlich erscheinenden *Caput mallei* artikuliert der Malleus mit dem Incus. Das *Manubrium mallei* ist längs vollständig in das Trommelfell eingewoben und hierdurch äußerst sensibel für die dort auftreffenden Schwingungen. Durch Betrachtung des Trommelfells ist das *Manubrium mallei* als äußere Zeichnung (*Stria mallearis*) sichtbar zu erkennen. Das Trommelfell wird außerdem durch den *Processus lateralis* leicht nach außen

vorgewölbt, während der Processus anterior, nach vorne unten gerichtet ist (Waldeyer, 2002, Noussios et al., 2016).

Incus

Der Incus weist eine geringere Größe auf als der Malleus. Die Grundform des Incus ähnelt laut Waldeyer der Struktur eines zweiwurzigen Zahnes. Die Krone wird hierbei durch das Caput incudis gebildet und die Wurzeln durch die beiden Schenkel (Crus longum incudis und Crus breve incudis). Der Incus artikuliert über zwei Gelenkoberflächen mit den anderen beiden Gehörknöchelchen. Zum einen wird die erste diarthrotische Verbindung mit dem Malleus über eine Gelenkoberfläche hergestellt, welche sich auf dem Caput incudis befindet. Die zweite der Gelenkoberflächen ist am distalen Ende des Crus longum incudis zu finden. Dort liegt ein ovales Köpfchen, der Processus lenticularis, welcher mit dem Stapes verbunden ist (Waldeyer, 2002). Der zweite Schenkel, das Crus breve incudis, ist divergent zu seinem längeren Pendant orientiert.

Stapes

Der Stapes stellt den kleinsten der drei Ossikel dar und besitzt seinem Namen entsprechend die Grundstruktur eines Steigbügels. Die Basis des Stapes bildet eine Fußplatte (Basis stapedis). Die seitlichen Komponenten werden durch zwei Schenkel (Crus anterius, Crus posterius) gebildet. Diese verbinden die Fußplatte mit dem Caput stapedis, welcher sich gegenüber der Fußplatte befindet. Mit der sich am Caput befindenden Gelenkfläche artikuliert der Stapes mit dem Incus. Über die Fußplatte steht er im Kontakt mit dem Fenestra ovalis (Waldeyer, 2002, Noussios et al., 2016).

2.2.2 Embryogenese humaner Gehörknöchelchen

Die Gehörknöchelchen entstehen während der Embryogenese aus dem Mesenchym des ersten und zweiten Kiemenbogens. So entstammen Caput und Collum des Malleus und Corpus des Incus vom ersten Kiemenbogen, während sich das Manubrium des Malleus, der Crus longum des Incus und der Großteil des Stapes aus dem zweiten Kiemenbogen entwickeln. Die Basis des Stapes hingegen besitzt einen zweifachen Ursprung. So entspringt die Basis des Stapes aus dem zweiten Kiemenbogen und aus der Labyrinthkapsel (Whyte et al., 2008, Ars, 1989, Bowden, 1977).

Die Ossifikation der Gehörknöchelchen geschieht durch eine chondrale Osteogenese. Zunächst differenzieren sich die Mesenchymzellen zu Chondroblasten, wodurch sich ein vollständig knorpelig angelegtes Skelett ergibt. Die ersten Mesenchymverdichtungen sind bereits am 36. Tag der Schwangerschaft zu beobachten. Am 41. bis 44. Schwangerschaftstag folgt die Differenzierung der kondensierten Mesenchymzellen zu Chondroblasten, welche kollagenreiche Knorpelmatrix sezernieren. Resultat ist das vollständig aus hyalinem Knorpel bestehende temporäre Primordialskelett. Am 48. Tag ist dieses bereits vollständig knorpelig entwickelt (Whyte et al., 2008).

Die weitere Ossifikation der Gehörknöchelchen, zu unterteilen in die perichondrale und enchondrale Ossifikation, startet im zweiten Trimenon der Schwangerschaft zunächst perichondral mit der Bildung einer das Knorpelgewebe umgebenden Knochenmanschette (Richany et al., 1954). Der Prozess der Knochenbildung startet hierbei von Ossifikationszentren ausgehend (Michels et al., 2007). Sobald der perichondrale Knochen gebildet worden ist, ist das Größenwachstum abgeschlossen. Dieser Zeitpunkt ist bei den humanen

Gehörknöchelchen nach der 25. Schwangerschaftswoche (Richany et al., 1954) erreicht. Zeitlich versetzt zur peripher stattfindenden perichondralen Ossifikation läuft in den zentralen Bereichen des Knochens die enchondrale Ossifikation ab. Hierbei wird nun auch im Inneren der Gehörknöchelchen das Knorpelgewebe in Knochensubstanz umgewandelt. Enchondrale Ossifikationsprozesse können bereits im Falle des Malleus und Incus in der 19. Schwangerschaftswoche und beim Stapes in der 20. Schwangerschaftswoche beobachtet werden (Richany et al., 1954, Whyte et al., 2008). Diese Transformation des knorpeligen Kerns der Gehörknöchelchen ist hierbei ein langsam fortschreitender Prozess, während der perichondrale Knochen zu diesem Zeitpunkt schon größtenteils dem eines ausgereiften Knochens entspricht. Mit der Vollendung der enchondralen Ossifikationsprozesse in der 32. Schwangerschaftswoche ist die Ossifikation der Gehörknöchelchen abgeschlossen (Dass and Makhni, 1966, Anbuhl et al., 2017). Somit sind die Gehörknöchelchen die ersten komplett ossifizierten Knochen des menschlichen Organismus und liegen bereits zum Zeitpunkt der physiologischen Geburt vollständig verknöchert vor (Enlow, 1990). Bekräftigt wird dieses durch Untersuchungen, welche zeigten, dass postnatal keine nennenswerten morphologische Größenveränderungen der Gehörknöchelchen zu beobachten sind (Rolvien et al., 2018, Padmini, 2014).

2.3 Gehörknöchelchen der Maus

Wie beim Menschen liegen auch bei der Maus drei Gehörknöchelchen in der luftgefüllten Paukenhöhle vor – Malleus, Incus und Stapes (siehe Abbildung 3). Die Grundstruktur und Reihenfolge der Gehörknöchelchenkette verhält sich äquivalent zu der des Menschen.

Anders als beim Menschen sind Malleus und Incus bei der Maus allerdings durch eine knorpelige Synchondrose miteinander verbunden (Articulatio incudomallearis). Die Synchondrose weist keinen Gelenkspalt auf, sondern stellt eine kontinuierliche knorpelige Verbindung dar, welche somit nicht als „echtes Gelenk“ anzusehen ist. Sie ist den „unechten Gelenken“ (Synarthrosen) zuzuordnen. Die Verbindung zwischen Incus und Stapes ist hingegen, wie beim Menschen, ein diarthrotisches Gelenk (Treuting et al., 2012).

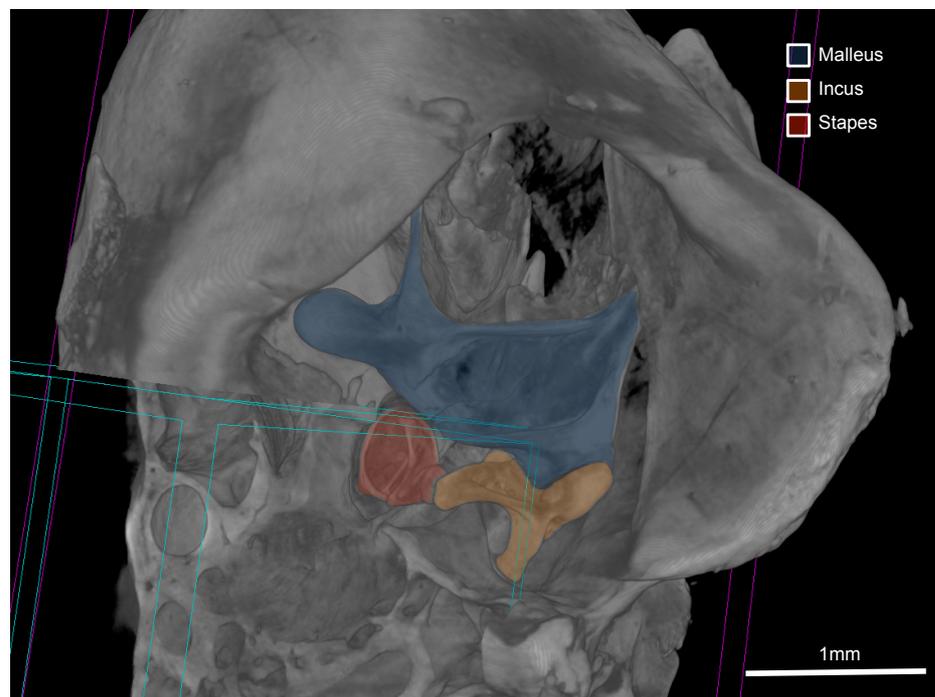


Abbildung 3: Mikro-computertomographische Darstellung des Mittelohres samt Gehörknöchelchen durch virtuelle Fensterung des Schläfenbeins (Os temporale).

2.3.1 Anatomie muriner Gehörknöchelchen

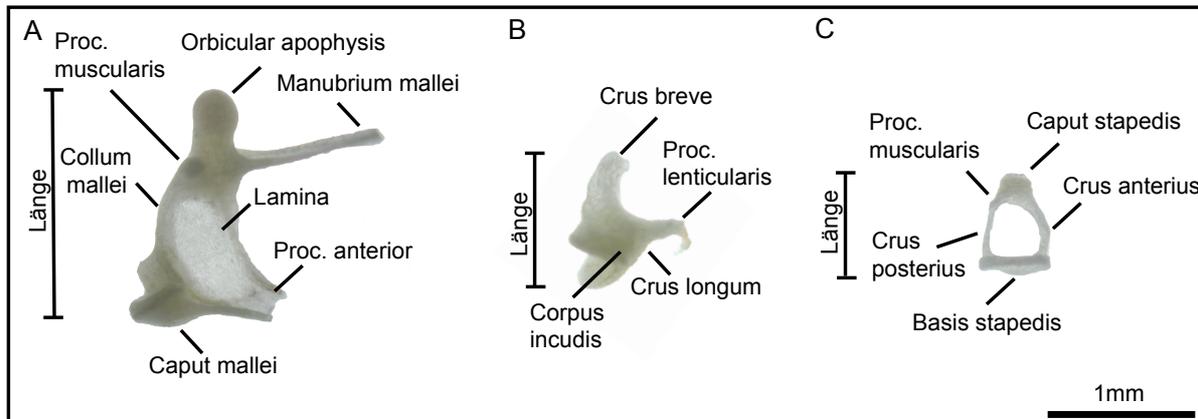


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der anatomischen Strukturen der Gehörknöchelchen. Grafisch dargestellt der Längenparameter der morphometrischen Analyse. A: Malleus. B: Incus. C: Stapes.

Malleus

Der Malleus ist der am weitesten lateral gelegene Ossikel. Er besteht aus einem Kopf (Caput mallei), mit welchem er mit dem Incus artikuliert. An das Caput mallei schließt sich der lange Hals (Collum mallei) an. Dieser verbindet das Caput mallei mit dem Manubrium mallei. Zwischen Corpus mallei, Collum mallei und Processus anterior ist eine Lamina („transversal lamina“) gespannt (Sakamoto et al., 2017).

Der Hammergriff (Manubrium mallei) stellt einen langen Arm dar, welcher dem Trommelfell von Seiten der Paukenhöhle anliegt und zur anatomischen Rotationsachse, welche durch das Caput mallei hindurchführt, nahezu parallel verläuft (Dong et al., 2013).

Des Weiteren weist der Malleus der Maus Processus auf. Der Processus anterior ist der längste Processus und liegt zumeist dem Trommelfell an (Mohammadpour, 2010). Sein Ursprung erscheint dem Manubrium mallei nahezu

rechtwinklig. Der Processus muscularis liegt am Bindestück zwischen dem Hals (Collum mallei) und dem Hammergriff (Manubrium mallei) des Malleus auf der von der Membrana tympani abgewandten Seite (medial). Hier inseriert der Musculus tensor tympani. Dieser zieht den Malleus nach medial und spannt so das Trommelfell. Beim Processus brevis ist zu beachten, dass dieser eigentlich aus zwei Strukturen besteht: die „Orbicular apophysis“ und dem Processus lateralis. In der Literatur werden diese beiden anatomischen Leitstrukturen häufig als Processus brevis zusammengefasst (Sakamoto et al., 2017). Der Processus lateralis ist als lateraler Vorsprung des Manubrium mallei am Trommelfell sichtbar. Er liegt somit gegenüber dem Processus muscularis. Die „Orbicular apophysis“ ist ein ballförmiger Fortsatz des Malleus, welcher beim Menschen nicht vorhanden ist. In einem Hochfrequenzohr, wie es bei der Maus vorliegt, erhöht diese Struktur das Trägheitsmoment um die anatomische Rotationsachse. Der genauere Zweck ist noch nicht weitergehend erforscht (Mason, 2013). Es lässt sich jedoch ein bedeutender Einfluss bei der Erzeugung der Hebelkräfte der Gehörknöchelchen und damit auf den Ablauf der Schallweiterleitung vermuten.

Incus

Der Incus besteht aus einem Körper (Corpus incudis) und zwei Fortsätzen (Processus). An dem Corpus incudis ist eine prominente Gelenkoberfläche zu beobachten, welche mit dem Caput des Malleus artikuliert. Die beiden Fortsätze Crus longum und Crus brevis stehen divergent zueinander und werden über den Corpus incudis miteinander verbunden. An dem Crus longum schließt sich der Processus lenticularis an. Dieser stellt die Verbindung zum Stapes dar.

Stapes

Der Stapes der Maus verhält sich von Struktur und Nutzen äquivalent zu dem des Menschen. Er ist der kleinste und am medialsten liegende Ossikel. Auch bei der Maus weist er die Grundstruktur eines Steigbügels auf und besteht ebenfalls aus einer Fußplatte (Basis stapedis), zwei seitlichen Schenkeln (Crus anterius, Crus posterius) und einem Kopf (Caput stapedis). Am Caput stapedis ist ein Processus muscularis gelegen, an welchem der Musculus stapedius inseriert (Sakamoto et al., 2017, Mohammadpour, 2010). Die Artikulationen werden über den Caput stapedis zum Incus und über die Basis stapedis zum Fenestra ovalis gebildet.

2.3.2 Embryogenese muriner Gehörknöchelchen

Die Gehörknöchelchen der Maus entstehen, gleich denen des Menschen, aus dem ersten und zweiten Kiemenbogen. Der Malleus und Incus entspringen nahezu vollständig aus dem ersten Kiemenbogen (Teng et al., 2017). Der Processus brevis des Malleus entsteht als einzige Struktur des Malleus aus dem zweiten Kiemenbogen (O'Gorman, 2005). Ebenso entstammt der Stapes aus dem zweiten Kiemenbogen (Anthwal et al., 2013, Jenkinson, 1911).

Die Ossifikation geschieht ebenfalls, wie bei humanen Gehörknöchelchen, durch eine chondrale Osteogenese. Im Gegensatz zu humanen Gehörknöchelchen zeichnen sich die Gehörknöchelchen der Maus vor allem dadurch aus, dass sie durch eine postnatale Entwicklung gekennzeichnet sind. Sie sind besonders durch ein postnatales Knochenwachstum charakterisiert. So weisen die Gehörknöchelchen am 1. postnatalen Tag lediglich 41-45% der endgültigen Gesamtlänge auf, am 10. postnatalen Tag sind jedoch schon 85-91% der Gesamtlänge erreicht (Huangfu and Saunders, 1983). Somit ist die perichondrale Knochenbildung weitgehend bis zum

10. postnatalen Tag abgeschlossen und eine feine Knochenmanschette um die Zirkumferenz der Gehörknöchelchen ist bereits gebildet. Zeitlich versetzt startet die enchondrale Knochenbildung im Kern der Gehörknöchelchen. Dieser Teil der Ossifikation ist derzeitiger Bestandteil der Forschung.

Erkenntnisse über Größen wie zeitliche Entwicklung der Mineralisation oder die strukturelle Entwicklung der Osteozytenlakunen konnten bisher noch nicht gewonnen werden, während diese bei humanen Gehörknöchelchen bereits vorliegen (Rolvien et al., 2018).

2.4 Funktion der Gehörknöchelchen

Säugetiere besitzen ein großes Spektrum von akustisch wahrnehmbaren Schallwellen. Allerdings unterscheiden sich Säugetiere untereinander in den hörbaren Frequenzbereichen, so auch bei Mensch und Maus. So liegt der Hörbereich des Menschen zwischen 31 Hz und 17.6 kHz (bei einem Schalldruckpegel (SPL) von 60dB). Schallwellen, welche über diesem Bereich liegen, werden als Ultraschall und jene, welche unterhalb dieses Bereiches liegen, werden als Infraschall bezeichnet. Sie sind nicht hörbar (Heffner and Heffner, 2007). Mit steigendem Alter ist eine Verringerung des Hörbereiches zu verzeichnen. So kommt es zunächst zu einem Verlust der Wahrnehmung hoher Frequenzen, während im höheren Alter eher ein Verlust niedrigerer Frequenzen zu verzeichnen ist (Wiley et al., 2008).

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus ein Hörbereich von 2300 Hz bis 90 kHz (SPL: 60dB) (Heffner and Masterton, 1980). Die Maus kann also niederfrequente Wellen, welche für den Menschen noch hörbar sind, nicht wahrnehmen. Allerdings zeigen Mäuse eine deutlich bessere Wahrnehmung

hochfrequenter Töne des Ultraschallbereiches. So befinden sich die wichtigsten Laute der Maus im Ultraschallbereich. Beispielhaft kann hierfür der Notruf von Jungtieren im Frequenzbereich von 40 kHz genannt werden (Lawlor, 2003).

Die Weiterleitung der durch den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell treffenden Schallwellen wird durch die Gehörknöchelchen garantiert. Durch das Auftreffen von Schallwellen *via* Luftleitung wird das Trommelfell in mechanische Schwingungen versetzt. Diese Schwingungen werden auf die Gehörknöchelchenkette übertragen. Die Gehörknöchelchenkette ist hierbei in ihrer Gesamtheit als bewegliche, funktionelle Einheit anzusehen. Hierbei wird zunächst der erste Ossikel, der Malleus, in Schwingung versetzt, welcher die Bewegung auf die zwei folgenden Ossikel der Gehörknöchelchenkette überträgt. So folgt auf den Malleus zunächst der Incus in Funktion eines Bindegliedes. Der Incus überträgt die Schwingung auf den letzten Ossikel, den Stapes. Dieser versetzt wiederum das ovale Fenster in Schwingung und stellt somit die Verbindung zum Innenohr dar.

Die Schallübertragung von dem luftgefüllten Mittelohr auf das flüssigkeitsgefüllte Innenohr erfolgt mit einer erheblichen Erhöhung des Schallwiderstandes (Impedanz) (Kurokawa and Goode, 1995). So würden in der Theorie durch den erheblichen „Impedance Mismatch“ 99,9% der auftreffenden Schwingungen reflektiert werden (Purves et al., 2000). Unter diesen Bedingungen wäre ein regelrechtes Hören *via* Luftleitung nicht möglich. Daher führen die Gehörknöchelchen nicht nur lediglich zu einer reinen Weiterleitung der mechanischen Schwingungen, sondern bewirken außerdem eine bedeutende Impedanzanpassung, sprich eine Schallverstärkung. Dieses wird durch zwei Wirkmechanismen gewährleistet. So wird beim humanen Mittelohr eine Schallverstärkung zum einen über wirkende Hebelkräfte der Gehörknöchelchenkette um das 1,3-fache erreicht. Zum anderen führt die Flächendifferenz zwischen dem

Trommelfell (ca. 55 mm²) und dem erheblich kleineren ovalen Fenster (3,2 mm²) sogar zu einer Schalldruckverstärkung um das 17-fache. Multiplikativ durch beide Mechanismen ergibt sich hierdurch ein um das 22-fache größerer Schalldruck am ovalen Fenster im Vergleich zum Trommelfell (Khurana, 2014).

Auch im murinen Ohr findet eine Schallverstärkung aufgrund von wirkenden Hebelkräften und der Flächendifferenz zwischen Trommelfell und ovalem Fenster statt (Dong et al., 2013). So verdeutlicht die Abbildung 3, dass ein bedeutendes Hebelverhältnis zwischen Malleus und Amboss vorliegt. Dadurch dass der Malleus einen deutlich längeren Hebelarm aufweist und zusätzlich mit der massiven „Orbicular apophysis“ ein Gegengewicht am Ende des Hebelarmes besitzt, werden die Schwingungen des Trommelfells über den Malleus auf den Incus mit deutlich kürzerem Hebelarm mit beachtlicher Schallverstärkung weitergeleitet. So resultiert durch Hebelkräfte eine Schallverstärkung um das 2,2-fache. Durch die Flächendifferenz zwischen der Pars tensa des Trommelfells (2,67 mm²) und dem ovalen Fenster (0,082 mm²) wird zusätzlich eine maßgebliche Schallverstärkung sogar um das 32,5-fache erzeugt (Huangfu and Saunders, 1983). Insgesamt wird somit im murinen Mittelohr eine Gesamtschallverstärkung um das 71,5-fache erreicht, welches bedeutend über der Impedanzanpassung des humanen Mittelohres liegt. Folglich resultiert ein deutlich geringerer „Impedance Mismatch“, wodurch entscheidend weniger Schallwellen reflektiert und mehr absorbiert werden.

Die Luftleitung stellt postpartal den primären Übertragungsweg von Schallwellen zum Innenohr dar. Allerdings kommt es neben der Luftleitung auch permanent zu einer Übertragung von Schallwellen *via* Knochenleitung. Hierbei wird abhängig von der Intensität des Schallereignisses auf den Schädel Schallenergie übertragen und der gesamte Schädel so in Schwingung versetzt. Über knöcherne

Fortleitung folgt eine Übertragung der Schwingungen auf die Cochlea, worauf eine akustische Klangwahrnehmung induziert wird (Stenfelt, 2011).

Nach früheren Auffassungen läuft die Schallweiterleitung *via* Knochenleitung unter Umgehung der Gehörknöchelchenkette ab. Doch es konnte gezeigt werden, dass die Knochenleitung auf hoch komplexe Mechanismen beruht, welche es differenziert zu betrachten gilt. So ist die Gehörknöchelchenkette auch bei der knöchernen Schallweiterleitung von essentieller Bedeutung. Dieses ist durch das Trägheitsmoment, sprich das physikalische Bestreben an einer Position zu verharren, der Ossikel zu begründen (Frost et al., 2010). Aufgrund der an ihrer Position verharrenden Gehörknöchelchen resultieren Relativbewegungen, bei denen sich der akustisch induziert schwingende Schädel um die ruhenden Gehörknöchelchen bewegt. Infolge werden Schalleindrücke erzeugt, welche grundlegend den akustischen Gesamtschalleindruck mit generieren. Resümierend sind also auch bei der Schallweiterleitung *via* Knochenleitung, gleich der Luftleitung, ebenfalls alle Komponenten des Hörorgans an der Erzeugung der akustischen Wahrnehmung mitbeteiligt.

Außerdem konnte durch weitere Untersuchungen an humanen Ohren gezeigt werden, dass die Resonanzfrequenz der Knochenleitung bei 1,5-2 kHz liegt. Die Resonanzfrequenz beschreibt hierbei die Schallwellenfrequenz, welche an den Gehörknöchelchen die größte Schwingungsamplitude erzeugt. Diese Frequenz befindet sich erheblich über der Resonanzfrequenz der Luftleitung, welche bei 0,8-1,2 kHz liegt. Warum eine solch deutliche Differenz vorliegt, ist Bestandteil der derzeitigen Forschung. Allerdings konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Gehörknöchelchen bei der Schallweiterleitung *via* Knochenleitung derart bedeutend sind, dass die Generierung des Schalleindrucks durch Relativbewegungen der Gehörknöchelchen im Bereich der Resonanzfrequenz um 2 kHz den primären

Mechanismus darstellt (Homma et al., 2009). Dieses zeigt, dass die Gehörknöchelchen, entgegen der früheren Annahme, ebenfalls und sogar maßgeblich auch an der Knochenleitung beteiligt sind. Dieses wird bei fortgeschrittener Otosklerose durch das Phänomen der Carhart-Senke, welche eine wannenförmige Senke in der Knochenleitungsschwellenkurve bei 2 kHz darstellt, untermauert. Aufgrund der otosklerotischen Stapesfixation im ovalen Fenster und der daraus folgenden Funktionseinschränkung der Schallweiterleitung durch die Gehörknöchelchenkette kommt es nachweislich nicht nur zu einer Beeinträchtigung der Luftleitung, sondern auch zu einer der Knochenleitung. Begründet durch die Fixation des Stapes fällt im Resonanzfrequenzbereich von 2 kHz der dominante Mechanismus der Knochenleitung weg. Hierdurch resultiert eine Senke im Audiogramm in diesem Frequenzbereich. Sobald die Otosklerose durch eine erfolgreiche Stapesplastik therapiert worden ist, zeigt sich wieder eine regelrechte Knochenleitungsschwellenkurve ohne Carhart-Senke.

Im Vergleich zum postnatalen ist außerdem der pränatale Hörvorgang zu betrachten. Der sich in der Fruchtblase befindliche humane Fetus ist von Amnionflüssigkeit umgeben. Amnionflüssigkeit befindet sich außerdem im äußeren Gehörgang und ist ebenfalls in der Paukenhöhle zusammen mit mesenchymaler Matrix zu finden (Priner et al., 2003). Zu frühen Entwicklungszeitpunkten ist hierdurch bedingt noch keine gelenkige Bewegung der Gehörknöchelchen möglich. Außerdem ist in diesen Stadien die noch sehr kleine Paukenhöhle für die Beweglichkeit der Gehörknöchelchen ein limitierender Faktor (Richard et al., 2017). Die ersten Bewegungen können beim Menschen in der späten Fetalzeit detektiert werden. So sind hierbei ab dem 8. Schwangerschaftsmonat (Takahara and Sando, 1987), häufig simultan zum Schluckakt, geringe Bewegungen der Gehörknöchelchen zu beobachten (Whyte et al., 2008). Pränatal findet hierbei die Schallwahrnehmung

maßgeblich über die Knochenleitung statt. Auf den mütterlichen Körper treffende Schallwellen werden über das Fruchtwasser auf den Schädel des Fetus weitergeleitet, um anschließend über die knöcherne Weiterleitung zum Innenohr zu gelangen. Dieses konnte bereits durch Untersuchungen bei Tierfeten bestätigt werden (Gerhardt et al., 1996).

So kann impliziert werden, dass bereits in utero in der späten Fetalzeit die *via* Knochenleitung übertragenen Schallwellen auf die Gehörknöchelchen einwirken und diese somit akustisch induzierte mechanische Reize erfahren. So würden die Gehörknöchelchen bereits in diesem Entwicklungsstadium durch auf sie einwirkende mechanistische Kräfte Bestandteil des Hörvorgangs sein.

2.5 Zelluläre Prozesse humaner Gehörknöchelchen

In den Gehörknöchelchen sind zelluläre Prozesse zu beobachten, welche in dieser Form und diesem Ausmaß in keinem anderen Knochen des menschlichen Organismus zu finden sind. So lassen sich bereits pränatal, sobald die Gehörknöchelchen nach Vollendung der perichondralen Ossifikation ihre finale Größe erreicht haben, abrupt einsetzende apoptotische Prozesse detektieren. Mit steigendem Alter nehmen diese stetig zu (Palumbo et al., 2012). So ist bereits frühzeitig ein deutlicher Abfall der Osteozytenanzahl zu beobachten, welcher vor allem in den ersten Lebensmonaten zu verzeichnen ist (Rolvien et al., 2018). Diese Prozesse des programmierten Zelltodes finden in den Gehörknöchelchen rasanter und umfangreicher statt als in den restlichen Knochen des menschlichen Organismus. So sind im zweiten Lebensjahr bei bereits 40% der Osteozyten, welches deutlich über dem Prozentsatz anderer Knochen liegt, apoptotische Prozesse oder der bereits eingetretene Zelltod zu beobachten. Ein derartiger

Prozentsatz wird beispielsweise bei der Klavikula erst bei einem Alter jenseits des 80. Lebensjahres beobachtet. Im Neugeborenenalter hingegen liegt der Prozentsatz apoptotischer Osteozyten der Klavikulae bei 1% (Marotti et al., 1998).

Entsprechend zu den früh einsetzenden apoptotischen Prozessen ist im Zeitverlauf unter lichtmikroskopischer Betrachtung eine Zunahme der Anzahl leerer Osteozytenlakunen und Osteozytenlakunen mit lebensunfähigen Osteozyten, häufig mit pyknotischen Kernen, zu beobachten (Palumbo et al., 2012).

Außerdem sind bereits zum Zeitpunkt der Geburt hypermineralisierte (mikropetrotische) Knochenlakunen zu detektieren. Diese sind mit akkumulierten kalzifizierten Nanosphären angefüllt, nehmen mit steigendem Alter linear bedeutend zu und treten vor allem in Bereichen der Gehörknöchelchen auf, in denen das kapillare Gefäßsystem weniger prominent ausgebildet ist. Nennenswert sind hier anatomische Strukturen wie der Kopf des Stapes oder die Körper des Malleus und Incus (Marotti et al., 1998). Infolgedessen nimmt die Gesamtanzahl an Osteozytenlakunen und die Lakunendichte bedeutend ab (Rolvien et al., 2018).

Während dieser Prozesse ist ein altersabhängiger signifikanter Anstieg der Knochenmineralisation der Gehörknöchelchen zu verzeichnen. Dieser ist in den peripheren Zonen wiederum signifikant höher als in zentralen und findet ebenfalls vor allem in den ersten Lebensjahren statt. Außerdem kann in den Gehörknöchelchen ab einem Alter von einem Lebensjahr kein morphologisches Zeichen des Knochenremodelings mehr beobachtet werden (Rolvien et al., 2018). Die Gehörknöchelchen verlieren also die Fähigkeit der Knochenregeneration und des Knochenumbaus (Palumbo et al., 2012). Hierbei konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem Abfall der Osteozytenzahl mit dem Auftreten von hypermineralisierten mikropetrotischen Osteozytenlakunen und der Abnahme, beziehungsweise Verlust, des Knochenremodelings aufgezeigt werden (Busse et al., 2010).

Unter Betrachtung dieser Untersuchungsergebnisse kann angenommen werden, dass für die Gehörknöchelchen aufgrund ihrer kontinuierlichen und niedrigen Belastungen und ausbleibender anderer mechanischer Reize eine Fähigkeit der Anpassung nicht von Nutzen ist. Somit sind sie, nachdem sie ihre finale Größe erreicht haben, nicht gezwungen sich an wandelnde Umwelteinflüsse anzupassen. Dieses korreliert mit der von Frost verfassten „Mechanostat Theorie“, in welcher kurzauftretende Maximalkräfte das Ausmaß des Knochenumbaus bestimmen (Frost, 1987). In den Gehörknöchelchen würde somit das Fehlen von diesen Maximalkräften ein ausbleibenden Knochenumbau bedingen. Außerdem wird vermutet, dass durch eine sich nicht ändernde Knochenarchitektur eine kontinuierliche und gleichbleibende Schallweiterleitung garantiert werden kann.

2.6 Auswirkung der Knochenqualität muriner Gehörknöchelchen auf die Hörfähigkeit

Im Temporalknochen der Maus, einschließlich der Gehörknöchelchen, findet ein deutlich langsamerer Knochenumbau statt als in langen Röhrenknochen. Dieses wiederum basiert möglicherweise zum Teil auf einem hohen Vorkommen von OPG, dem Decoy-Rezeptor für RANKL und dem Schlüsselregulator der Differenzierung der Osteoklasten (Kanzaki et al., 2011). Mausmodelle mit defektem OPG (OPG^{-/-}) zeigen infolge stark erhöhter Osteoklastenpopulationen osteoporotische und verschmälerte Gehörknöchelchen. Folge dieser Knochendeformation und des damit verbundenen Qualitätsverlustes ist ein signifikanter Hörverlust der Mäuse (Kanzaki et al., 2006) (Zehnder et al., 2006). Außerdem kommt es zum Auftreten einer Stapesankylose, wobei der Stapes mit der Labyrinthkapsel um das ovale Fenster fusioniert (Kanzaki et al., 2006), welches der Pathologie der Otosklerose entspricht.

Gegensätzlich verhält es sich bei der Modifikation des Zytokins RANKL (RANKL^{-/-}) oder dem Transkriptionsfaktors c-Fos (Fos^{-/-}). Hier kommt es zu einer Einschränkung der Osteoklasten und einer verminderten Knochenresorption. Infolge sind osteopetrotische Gehörknöchelchen vorzufinden, welche eine deutliche Dickenzunahme erfahren haben und einen höheren Anteil von knorpeligem Gewebe beinhalten. Auch hier ist ein signifikanter Hörverlust mit eingeschränktem Vibrationsverhalten der Gehörknöchelchen zu beobachten (Kanzaki et al., 2011).

Das in Osteoblastenvorläuferzellen produzierte Signalprotein FGF23 stellt einen wichtigen Regulator des Knochenstoffwechsels dar. In einer Studie von Lysaght et al. konnte gezeigt werden, dass eine FGF23-Defizienz mit einhergehender Hyperphosphatämie und Hyperkalziämie zu dysplastischen Veränderungen an den Ossikeln führt. Außerdem wurde eine signifikante Hörminderung bei den FGF23-defizienten Mäusen festgestellt. Diese Hörminderung hatte sowohl einen sensorineuralen als auch einen konduktiven Ursprung. Erhöhte FGF23 Konzentrationen, wie man sie bei der XLH bzw. beim dem von uns untersuchten *Hyp* Mausmodell vorfindet, wurden von Lysaght et al. nicht analysiert (Lysaght et al., 2014). Gleichwohl ist die Untersuchung der Gehörknöchelchen dieses Mausmodells mit Mineralisationsdefekt besonders interessant, da bisher nicht klar ist, ob dieser Mineralisationsdefekt auch in den vergleichsweise hoch mineralisierten Gehörknöchelchen zu finden ist.

3 Material und Methoden

3.1 Mausmodell

3.1.1 C57BL/6-Mausmodell

In den Analysen wurden als Wildtyp-Mäuse ausschließlich Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Alle untersuchten Mäuse stammten aus dem Mausarchiv des Institutes für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Für die Aufstellung des Entwicklungsmodells wurden 5 Altersgruppen (3, 6, 12, 24, 52 Wochen) untersucht. Pro Alter umfasste die Anzahl der Mausgruppe dabei immer mindestens fünf Mäuse.

Mäuse des Genotypes C57BL/6 sind ein, unter anderem in den Forschungsgebieten der Entwicklungsbiologie, Immunologie, kardiovaskulären Forschung und Neurobiologie, weit verbreiteter Inzuchtstamm. Zu den Charakteristika dieses Stammes zählen unter anderem Anfälligkeiten für Fettleibigkeit, Typ 2 Diabetes und Atherosklerose. Außerdem neigt dieser Wildtyp-Stamm zu einer geringen Knochendichte und einer altersabhängigen Schallempfindungsschwerhörigkeit, welche für unsere Untersuchung relevant ist (Beamer et al., 1996, Ison et al., 2007).

3.1.2 *Hyp* Mausmodell

Das *Hyp* Mausmodell wurde erstmals 1976 von Eicher et al. beschrieben (Eicher et al., 1976). Wie bereits erläutert beruht das Mausmodell auf einer Spontanmutation im *Phex*-Gen, welches äquivalent zum Phosphatdiabetes (XLH) zu einer vermehrten Expression von FGF23 in den Osteoblasten und Osteozyten und

zu einer vermehrten Phosphaturie durch die Nieren führt (Seitz et al., 2013, Miyagawa et al., 2014). Folge ist eine bedeutende Hypophosphatämie in den Mäusen des *Hyp* Mausmodells. So kommt es, wie bei der XLH beim Menschen, in den *Hyp* Mäusen zu einer signifikant verringerten Knochenmineralisation mit der Folge einer hypophosphatämischen Osteomalazie (Miao et al., 2001) und Kleinwuchs (Uchihashi et al., 2013, Santos et al., 2013). Außerdem zeigt sich bei *Hyp* Mäusen ein signifikant verringertes Körpergewicht, ein häufiges Auftreten von skelettalen Abnormitäten, welche auch die kraniofazialen Knochen betreffen (Shetty and Meyer, 1991) und vermehrte Veränderungen im Bereich der Wachstumsfugen (Fuente et al., 2018). Des Weiteren kommt es wie bei der XLH zu einer Störung der Zahnentwicklung in Form von einer Hypomineralisation des Dentins, welches vermutlich neben der Hypophosphatämie auf einen intrinsischen Defekt in den Odontoblasten zurückzuführen ist (Ogawa et al., 2006).

In unserer Untersuchung wurden die Gehörknöchelchen einer Gruppe von 5 *Hyp* Mäusen im Alter von 24 Wochen der histologischen und elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen und mit gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen des Genotyps C57BL/6 verglichen.

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Präparation des Os temporale

Nachdem die bindegewebigen Strukturen an der zu präparierenden Maus entfernt worden waren, folgte die Abtrennung des Schädels vom restlichen Körper.

Die weiteren Schritte folgten am Schädel. Zunächst wurde mit einer Schere und einem Skalpell der Kopf von ventral durch parasagittale Schnitte eröffnet und das

Gehirn entnommen. Die im Bereich des Hirnstammes und Cerebellum liegenden Knochenstrukturen der Innenseite des Os temporale wurden nun sichtbar. Von außen war die genaue Identifikation des Os temporale durch das Aufsuchen des äußeren Gehörganges leicht möglich. Nun wurden mittels Skalpell und einer Spitzpinzette die fibrösen Verbindungen zwischen Os temporale und Schädel gelockert, sodass man den Temporalknochen vorsichtig isolieren konnte (Bohne and Harding, 2011). Alle Schritte bis zu diesem Punkt waren makroskopisch möglich. Bis zu den weiteren Schritten wurden die isolierten Knochen in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen in 80%igem Ethanol konserviert.

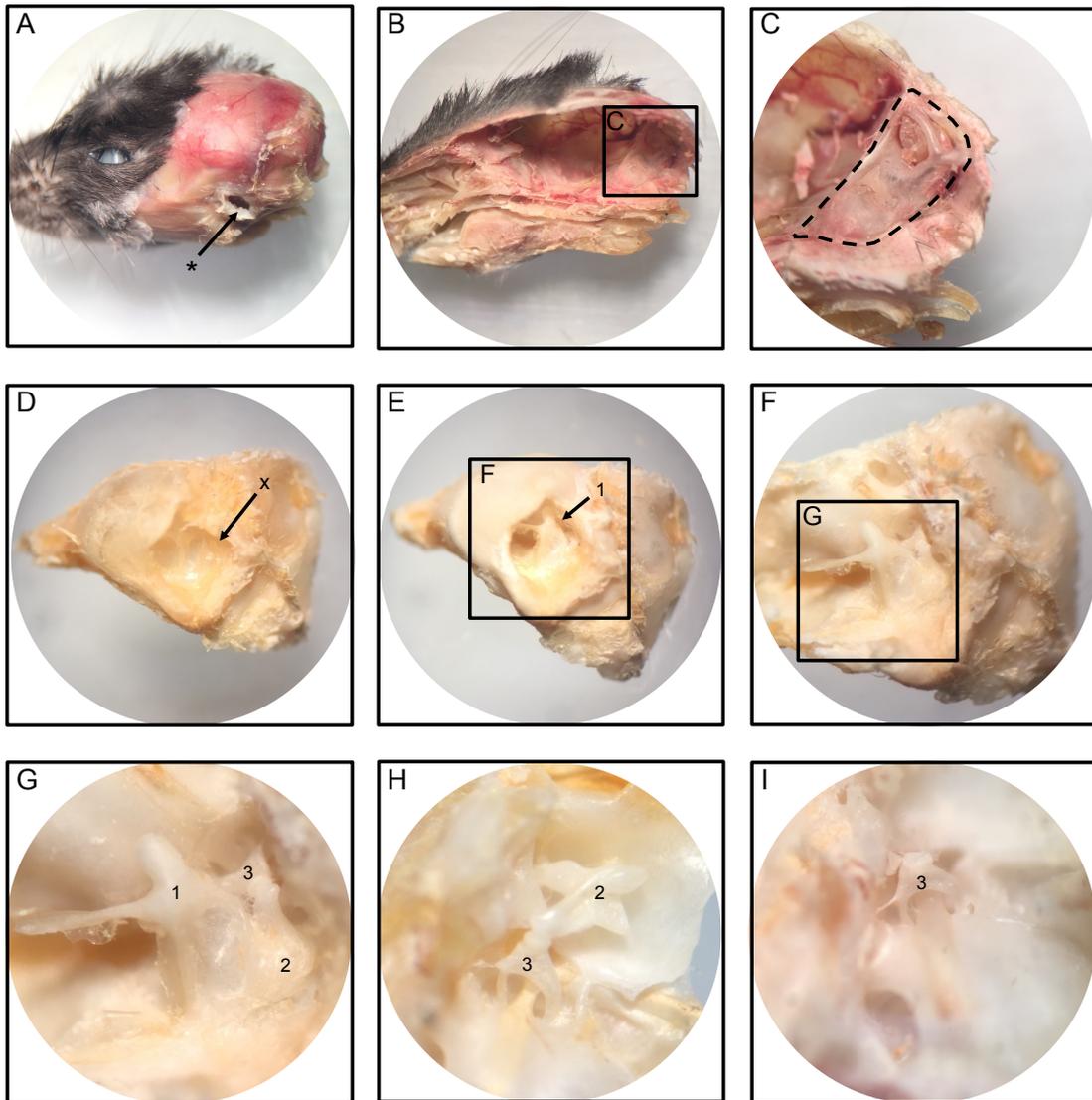


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung der Präparationsschritte der Gehörknöchelchen. A: Isolierter Mauskopf mit Markierung (*) des linken äußeren Gehörganges. B: Kopf in der Sagittalebene mittig durchtrennt. Nach Entfernung der zerebralen Strukturen freie Sicht von medial auf das Os temporale. C: Vergrößerte Ansicht von „B“. Gestrichelte Linien kennzeichnen das Os temporale. D: Isoliertes Os temporale (Sicht von lateral). Pfeil (x) markiert das Trommelfell mit durchscheinendem Malleus. E: Sicht auf das Os temporale mit reseziertem Trommelfell. Sicht auf den Malleus (1). F: Knöcherne Strukturen des Os temporale entfernt, sodass freie Sicht auf die drei Gehörknöchelchen gewährt ist. G: Vergrößerte Darstellung von Malleus (1), Incus (2) und Stapes (3). H: Malleus bereits entnommen. Präparat um 180° gedreht. Sicht auf die gelenkige Verbindung von Incus (2) und Stapes (3). Deutlich zu erkennen die nicht obliterierte Arteria stapedis, welche durch den Stapes hindurchzieht und der M. stapedis ausgehend vom Processus muscularis stapedis. I: Isolierte Darstellung des Stapes (3) nach Entnahme des Incus.

3.2.2 Isolation der Ossicula auditoria

Die weiteren Präparationsschritte erfolgten, unter Zuhilfenahme eines binokularen Mikroskops, am Os temporale. Bei mikroskopischer Betrachtung des Trommelfells fiel bereits eine Zeichnung des am Trommelfell in der Paukenhöhle anliegenden Malleus auf. Die Eröffnung der Paukenhöhle wurde stets durch die Entfernung des Processus styloformis durchgeführt, ein sich anterior befindender knöcherner Fortsatz des Temporalknochens. Dieser Schritt wurde mit einer Schere durchgeführt. Nun konnten von anterior ausgehend in Richtung posterior vorsichtig Teile der in der Maus lateral liegenden Seite des Temporalknochens mit Skalpell und Spitzpinzette herausgetrennt werden. Nachdem nun das Trommelfell vom Malleus gelöst und entfernt worden war, erlangte man freie Einsicht auf die Ossicula auditoria. Im Folgenden konnte die Isolation der einzelnen Ossikel beginnen. Dieses musste stets unter großer Vorsicht passieren, da die Ossikel äußerst fragil waren und leicht zerbrachen. Hierfür wurde eine Präzisionspinzette mit einer extra feinen Spitze der Dicke 0,01mm verwendet (Dumont-Spitzpinzette No.5). Zunächst wurde der Malleus entnommen. Die knorpelige synarthrotische Verbindung zu dem Incus war hierbei regelmäßig nur schwer zu trennen. Außerdem musste vor der Entnahme der Musculus tensor tympani durchtrennt werden, der auf der vom Betrachter abgewandten Seite an dem Malleus inseriert.

Es folgte die Isolation des Incus. Die diarthrotische Verbindung zum Stapes war hierbei leicht zu lösen und der vergleichsweise stabile Ossikel konnte nach Durchtrennen des Ligamentes, welches den kurzen Arm des Incus mit dem Os temporale verbindet, entnommen werden.

Anschließend wurde als letzter Schritt der Stapes präpariert. Dieser war der am schwierigsten zu isolierende Ossikel. Zum einen dadurch, dass er stets sehr fragil

war und zum anderen dadurch, dass er mit der Fußplatte einer knöchernen Absenkung am ovalen Fenster anlag. So war es vom Vorteil, wenn man mit der Präzisionspinzette den Stapes vor der endgültigen Entnahme zunächst leicht mobilisierte. Besonders imponierte bei der Isolation des Stapes die Arteria stapedia, welche bei Mäusen persistiert und inmitten durch die steigbügelartige Form zieht. Als das Blutgefäß entfernt war, konnte nach Durchtrennung des Ligamentes des Musculus stapedius auch der letzte Ossikel unter Vorsicht entnommen werden. Bis zu den ersten Schritten der Aufarbeitung wurden die Ossikel in 80%igem Ethanol in 1,5ml Zentrifugenröhrchen konserviert.

3.3 Mikro-Computertomographie (μ -CT)

Um die anatomische Lage und die Größenverhältnisse der Gehörknöchelchen in Bezug auf das Schläfenbein bildlich zu verdeutlichen wurde eine Analyse mittels μ -CT durchgeführt. Hierbei wurde ein Bruker Skyscan 1272 high-resolution μ -CT System (Bruker, Kontich, Belgium) verwendet.

3.4 Morphometrische Analyse

Die morphometrische Analyse der Gesamtlänge der einzelnen Ossicula auditoria wurde mittels der Computersoftware „cellSens“ (Olympus, Tokyo, Japan), verbunden mit einem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland), durchgeführt. Mit der Funktion der Linienmessung war es so nach Einstellung des Vergrößerungs-Grades des Mikroskops möglich, den Längenparameter zu bestimmen. Dazu wurden alle Ossicula auditoria einzeln unter das Mikroskop auf einen Objektträger platziert. Die Überführung der Ossikel auf den Objektträger wurde jeweils mittels einer transparenten 3 ml Transfer-Pipette (BD

Falcon, Bedford, MA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der Ossikel aus dem Zentrifugenröhrchen aufgesaugt und auf den Objektträger pipettiert. Auf diese Weise war ein sicheres Übertragen mit minimiertem Risiko des Zerschneidens möglich. Anschließend wurde überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger mittels eines Papiertuches vorsichtig entfernt und die Länge der Ossikel bestimmt. Die genauen Ausrichtungen der Ossikel bei der Längenmessung sind in Abb.4 (A-C) dargestellt.

3.5 Histologische Aufarbeitung

Um einen Verlust der kleinen Ossicula in den nächsten Arbeitsschritten zu vermeiden wurden diese in gefaltetem wasserdurchlässigen Filterpapier in Biopsie-Einbettkassetten aufbewahrt. Bei dem Falten des Filterpapiers war darauf zu achten, dass man keinen zu großem Druck auf die Ossikel ausübt, um diese nicht zu zerbrechen. Folgend wurden die sich in den Biopsiekassetten befindenden Präparate in einem automatisierten Entwässerungsgerät (Modell Nr. 2050/1.5, BAVIMED, Birkenau, Deutschland) mit aufsteigender Alkoholreihe über Nacht dehydriert. Hierbei wurden die Proben den Alkoholkonzentrationen von 70% bis 100% (Apotheke UKE) in Fünferschritten ausgesetzt. Das zeitliche Management erfolgte über eine Zeitschaltuhr. Die Dehydrierung lief über 24h. Nach der Dehydrierung folgte eine zweimalige Infiltration über je 24h in den Infiltrationslösungen I und II in der Kühlung unter 4°C. Die Infiltrationslösungen bestanden aus 1000 ml Methylmethacrylat (Merck800590), 100 ml Nonylphenyl-polyethylenglycolacetat (Fluka-Biochemika 74432) und 3,3 ml Benzoylperoxid (Merck 801641). Die Infiltration diente der Unterbindung der vorzeitigen Polymerisation beim Aushärten des Acrylates.

Im nächsten Schritt folgte die Einbettung in Acrylat. Dazu wurden die einzelnen Gehörknöchelchen aus den Biopsie-Einbettkassetten und den

Filterpapieren entnommen und in Rollrand-Schnappdeckelgläser gelegt. Die Gläser wurden mit einer zuvor angesetzten Gießlösung und der Startlösung (N,N-Dimethyl-p-Toluidin) im Verhältnis 200:1 aufgefüllt. Die sich in den mit der Lösung befüllten Rollrandschnappgläsern befindlichen Ossikel wurden mit einer Spitzpinzette vorsichtig im Gefäß zentriert. Diese Schritte der Einbettung erfolgten allesamt unter einem Laborabzug. Infolge wurden die Rollrandschnappgläser zum Aushärten luftdicht verschlossen und zur Unterbindung einer überschießenden Polymerbildung für mindestens 12h unter 4°C in ein Wasserbad aufbewahrt.

Nach Aushärten des Acrylates wurden die Blöcke aus den Gläsern herausgelöst. Im Folgenden wurden die Oberflächen der Acrylatblöcke durch ein rotierendes Mikroschleifsystem (Phoenix Alpha; Fa. Buehler, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Nass-Schleifpapier der Körnung P80 (Fa. Hermes, Hamburg, Deutschland) in Form eines Sechsecks seitlich abgeschliffen. Dieses diente der Minimierung der Schnittoberfläche und infolgedessen einer geringeren Abnutzung des Messers beim Anfertigen der histologischen Schnitte in späteren Schritten.

3.6 Rasterelektronenmikroskopie (Quantitative backscattered electron imaging, qBEI)

Für die Analyse der Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie („Quantitative backscattered electron imaging“, qBEI) wurden die Acrylatblöcke zunächst planparallel geschliffen. Dieses wurde mit dem EXAKT 400 CS Tellerschleifgerät (EXAKT-Apparatebau, Norderstedt) durchgeführt. Dabei wurde im ersten Schritt die nicht zu untersuchende Seite 5 Minuten mit dem Nassschleifpapier Hermes WS Flex (Hermes Abrasives Ltd., Virginia Beach, Virginia) mit dem Körnungsgrad 800 planparallel geschliffen. Im Anschluss wurde nun die zu untersuchende Seite geschliffen. Zunächst lediglich wenige Sekunden mit dem Silicon-Carbide-Nassschleifpapier der Körnung 1200 (Allied High Tech Products Inc., Rancho Dominguez, California). Die genaue Dauer wurde an die jeweiligen Gehörknöchelchen angepasst, um einen optimalen Querschnitt des Präparates zu erzielen. Nachdem die Ebene des Schliffes überprüft und für gut befunden worden war, wurde nun die zu untersuchende Seite mit dem Silicon-Carbide-Nassschleifpapier der Körnung 4000 (Allied High Tech Products Inc., Rancho Dominguez, California) 4 Minuten lang poliert. Nachdem die Blöcke getrocknet waren, wurden die polierten Oberflächen im Anschluss im BAL-TECH CED 030 Carbon Evaporator mit Kohlenstoff besprüht.

Folgend wurde die elektronenmikroskopische Analyse (Beschleunigungsspannung konstant 20 kV bei 680 pA) durchgeführt. Dabei wurden stets 8 Acrylatblöcke zeitgleich auf dem Objektisch des Elektronenmikroskops (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd.; Cambridge, England) mit schmalen Klebestreifen befestigt und infolge die Aufnahmen getätigt. Die Auswertung dieser Aufnahmen wurde mit der Computersoftware ImageJ (National Institutes of Health, NIH) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst bei jedem Bild der Maßstab durch

Zuordnung einer bekannten Strecke auf die Anzahl der Pixel festgelegt und das Bild durch das „Threshold“-Werkzeug in ein Schwarz-Weiß-Bild konvertiert. So konnte nun die zu analysierende Knochenfläche markiert und die Untersuchungsparameter festgelegt werden.

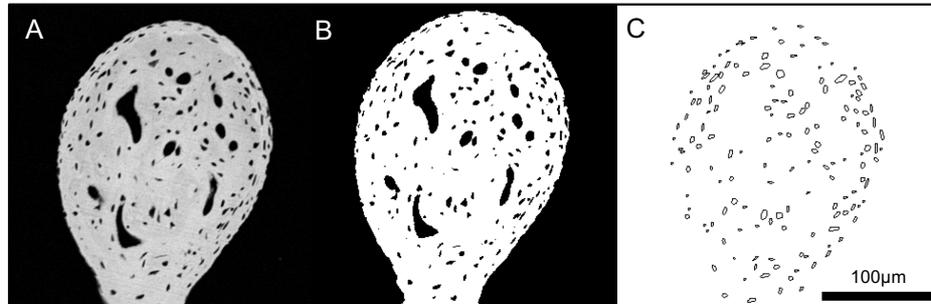


Abbildung 6: Illustration der einzelnen Schritte zur Auswertung der Osteozytenlakunenzahl und -größe mittels des Rasterelektronenmikroskops. A: Originale qBEI-Aufnahme. B: Bearbeitung des Bildes mittels des Threshold-Werkzeugs (Schwellenwert). C: Isolierte Darstellung in Form von Ellipsen der einzelnen Osteozytenlakunen der Größe 4-100 μm^2 .

Die Untersuchungsparameter waren hierbei die Flächen der als Knochenlakunen oder Blutgefäße/Porosität imponierenden schwarzen Löcher im Knochengewebe. Die Differenzierung dieser beiden Untersuchungsaspekte geschah über die Größe. So wurden Knochenausparungen der Größe 4-100 μm^2 als Knochenlakunen identifiziert und jene größer $>100 \mu\text{m}^2$ unter das Kriterium Blutgefäße/Porosität zusammengefasst. Die Knochenlakunen wurden in Bezug auf ihre Größe (Lc.Ar in μm^2) und Anzahl (N.Ot/B.Ar in $1/\text{mm}^2$) ausgewertet. Dadurch, dass die Software die identifizierte Auswahl im Folgenden stets anzeigt, war eine Überprüfung im Nachhinein immer möglich. Außerdem wurde eine Durchschnittsgröße der Lakunen errechnet.

Als weiterer Parameter wurde zusätzlich der Mineralisationsgrad als mittlerer Calcium-Gehalt (CaMean in Wt%) bestimmt. Der Mineralisationsgrad wurde aus den Grauwerten der einzelnen Ossikel mittels eines vorprogrammierten Eichgrads

abgeleitet. Dieses konnte so durchgeführt werden, da ein direktes proportionales Verhältnis zwischen Grauwert und Calcium-Gehalt des Knochens besteht (Roschger et al., 1995). Außerdem wurde der am häufigsten vorkommende Mineralisationsgrad im untersuchten Knochenbereich (CaPeak in Wt%) und die Breite der Verteilung der Mineralisationsgrade (CaWidth in Wt%), welche die Homogenität der Mineralisation der Ossikel widerspiegelt, untersucht. Des Weiteren wurde die Anzahl hypermineralisierter Knochenlakunen pro Knochenfläche analysiert (N.Mn.Lc in $1/\text{mm}^2$). Die hypermineralisierten Lakunen wurden manuell gezählt und in Relation zur analysierten Knochenfläche gesetzt.

3.7 Histologische Analyse

Aus den Acrylatblöcken wurden zur histologischen Analyse mittels eines Rotationsmikrotoms (CVT 4060E, micro Tec, Walldorf, Deutschland) und einem Mikrotommessers aus Hartmetall (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) Schnittpräparate mit einer Dicke von 4 μm angefertigt. Die Schnitte wurden horizontal zum Präparat angefertigt, sodass sich ein möglichst großer Präparatquerschnitt ergab. Während des Schnittprozesses wurde das Mikrotommesser und die Präparatoberfläche stets mit einer Schneidflüssigkeit (WIV Schneidflüssigkeit, Fa. WIV Schwetzingen, Deutschland) befeuchtet. Hierdurch wurde eine Minimierung der Artefakte erzielt. Die Übertragung der angefertigten Schnitte auf die Objektträger erfolgte mithilfe eines ebenfalls mit Schneidflüssigkeit benetzten Haarpinsels. Die Objektträger waren zuvor zum Nutzen der besseren Haftung der Präparate mit Chromalaungelatine gleichmäßig beschichtet worden. Die Schnitte wurden hierbei in Serie aufgezogen, sodass jeder Schnitt auf einen Objektträger übertragen wurde. Pro Objektträger wurden hierbei 4 Schnitte aufgezogen. Anschließend wurden die

Schnitte mit einer Strecklösung (Isopropanolol, 80%) geglättet und Luftblasen vorsichtig mit einem seichten Haarpinsel rausgestrichen. Nun wurde eine PE-Folie auf die Objektträger aufgebracht und diese in einem Trockenblock vorgetrocknet. Anschließend kamen die Objektträger bei 60°C über Nacht in eine Druckpresse.

Es folgte die Färbung der Schnittpräparate. Die ausgewählte Standardfärbung war hierbei die Toluidinblau Färbung. Hierzu wurden die Objektträger aus der Druckpresse genommen und die PE Folie entfernt. Zunächst konnten diese ein 3x5 min Entplaster (2-Methoxyethyl-acetat Merck 806061) und eine absteigende Alkoholreihe (2x100%-, 96%-, 80%-, 70%-, 50%-Ethanol, Aqua dest.; für je 2 min) durchlaufen. Anschließend wurde die Färbung mit dem Toluidinblau-Farbstoff (1% pH 4,5) für 30 min durchgeführt, bevor eine aufsteigende Alkoholreihe (Aqua dest., 50%-, 70%-, 80%-, 96%-, 2x100%-Ethanol) folgte. Abschließend folgte die Behandlung der Schnittpräparate mit Xylol I-III für je 5 min und das Eindecken mit DXP. Abschließend wurde ein mit Harz bestrichenes Deckgläschen mit dem Objektträger aufgeklebt.

Die histologischen Abbildungen wurden mittels der Osteomeasure Software (OsteoMetrics Inc. Atlanta, GA) aufgenommen, welche ebenfalls wie bei der morphometrischen Analyse mit dem Lichtmikroskop verbunden war. Histomorphometrische Untersuchungsparameter waren neben der Osteozytenanzahl pro untersuchter Knochenfläche (N.Ot/B.Ar in $1/\text{mm}^2$) die bone volume fraction (BV/TV in %) und die osteoid volume per bone volume (OV/BV in %). Hierbei gibt die bone volume fraction den Anteil mineralisierter Knochensubstanz pro untersuchter Volumeneinheit an und die osteoid volume per bone volume den den Osteoidanteil pro untersuchter Knochenfläche.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm Microsoft Excel. Da in dieser Arbeit stets 5 Altersgruppen mit jeweils mindestens fünf Mäusen untersucht wurden, wurden in der Auswertung Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Altersgruppen bestimmt. Diese Werte wurden anschließend untereinander verglichen und auf Signifikanzen überprüft. Dieses erfolgte mittels eines t-Testes. Eine Signifikanz lag dabei vor, wenn $p \leq 0,05$ ergab. In den grafischen Darstellungen wurden Signifikanzen mit einem Stern gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Morphometrische Analyse

Die zunächst durchgeführte Analyse der Größenentwicklung beim Malleus, Incus und Stapes in den einzelnen Altersklassen zeigten keine signifikanten Längenveränderungen. Lediglich stellte sich eine Tendenz bezüglich der Abnahme der Länge beim Malleus dar, allerdings ohne Signifikanz bei $p \leq 0,05$ (3 Wochen: $1565,60 \pm 32,32 \mu\text{m}$; 6 Wochen: $1559,80 \pm 14,92 \mu\text{m}$; 12 Wochen: $1549,81 \pm 16,36 \mu\text{m}$; 24 Wochen: $1530,34 \pm 28,19 \mu\text{m}$; 52 Wochen: $1527,27 \pm 31,30 \mu\text{m}$) (siehe Abb.7 A). Beim Incus war keine Entwicklungslinie erkennbar. So betrug die Länge bei 3 Wochen $910,64 \pm 68,74 \mu\text{m}$, während sie bei 12 Wochen bei $818,60 \pm 96,97 \mu\text{m}$ und bei 52 Wochen bei $896,39 \pm 74,11 \mu\text{m}$ lag (siehe Abb.7 B). Im Falle des Stapes lag nach einem kleinen nicht-signifikanten Anstieg des Längenparameters zwischen den Altersklassen 3 bis 6 Wochen eine tendenzielle Abnahme des Längenparameters, zwischen den Altersklassen 6 bis 52 Wochen vor (äquivalent zum Malleus). Für den Stapes wurden folgende Werte ermittelt: 3 Wochen: $630,31 \pm 12,95 \mu\text{m}$; 6 Wochen: $631,04 \pm 6,14 \mu\text{m}$; 12 Wochen: $621,92 \pm 9,34 \mu\text{m}$; 24 Wochen: $622,195 \pm 6,70 \mu\text{m}$; 52 Wochen: $616,814 \pm 8,15 \mu\text{m}$ (siehe Abb.7 C).

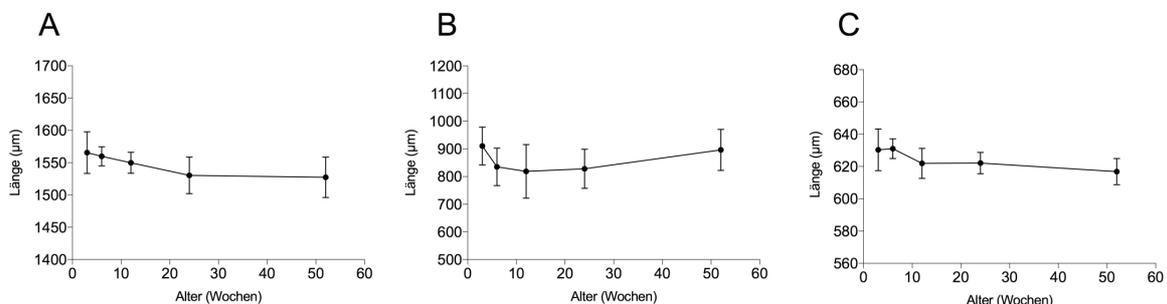


Abbildung 7: Kurvendiagramme (A-C) der Größenentwicklung über die Altersklassen von 3 bis 52 Wochen (in μm). A: Malleus. B: Incus. C: Stapes.

4.2 Rasterelektronenmikroskopie (Quantitative backscattered electron imaging, qBEI)

Die mittels Rasterelektronenmikroskopie (qBEI) erhobenen Daten zeigten in der Analyse für Malleus, Incus und Stapes ähnliche Entwicklungen. Die qBEI-Aufnahmen sind in Abbildung 8 dargestellt. In den Entwicklungen des Mineralisationsgrades (CaMean in Wt%) waren in den Altersklassen von 3 bis 24 Wochen bei allen drei Ossikeln signifikante Zunahmen zu beobachten. Hierbei stieg der Mineralisationsgrad beim Malleus von $28,77 \pm 0,52$ % (Woche 3) auf $31,48 \pm 0,43$ % (Woche 24) an. Zeitlich parallel war beim Incus ein Anstieg von $28,66 \pm 0,72$ % auf $31,79 \pm 0,26$ % und beim Stapes ein Anstieg von $27,35 \pm 0,56$ % auf $29,82 \pm 0,43$ % zu beobachten. Im Folgenden kam es bis zur 52. Woche in den Analysen aller drei Ossikel zu einem signifikanten Abfall der Mineralisationsgrade. So fiel der Mineralisationsgrad beim Malleus auf $30,54 \pm 0,25$ %, beim Incus auf $31,13 \pm 0,42$ % und beim Stapes auf $28,68 \pm 0,48$ % ab (siehe Abbildung 9).

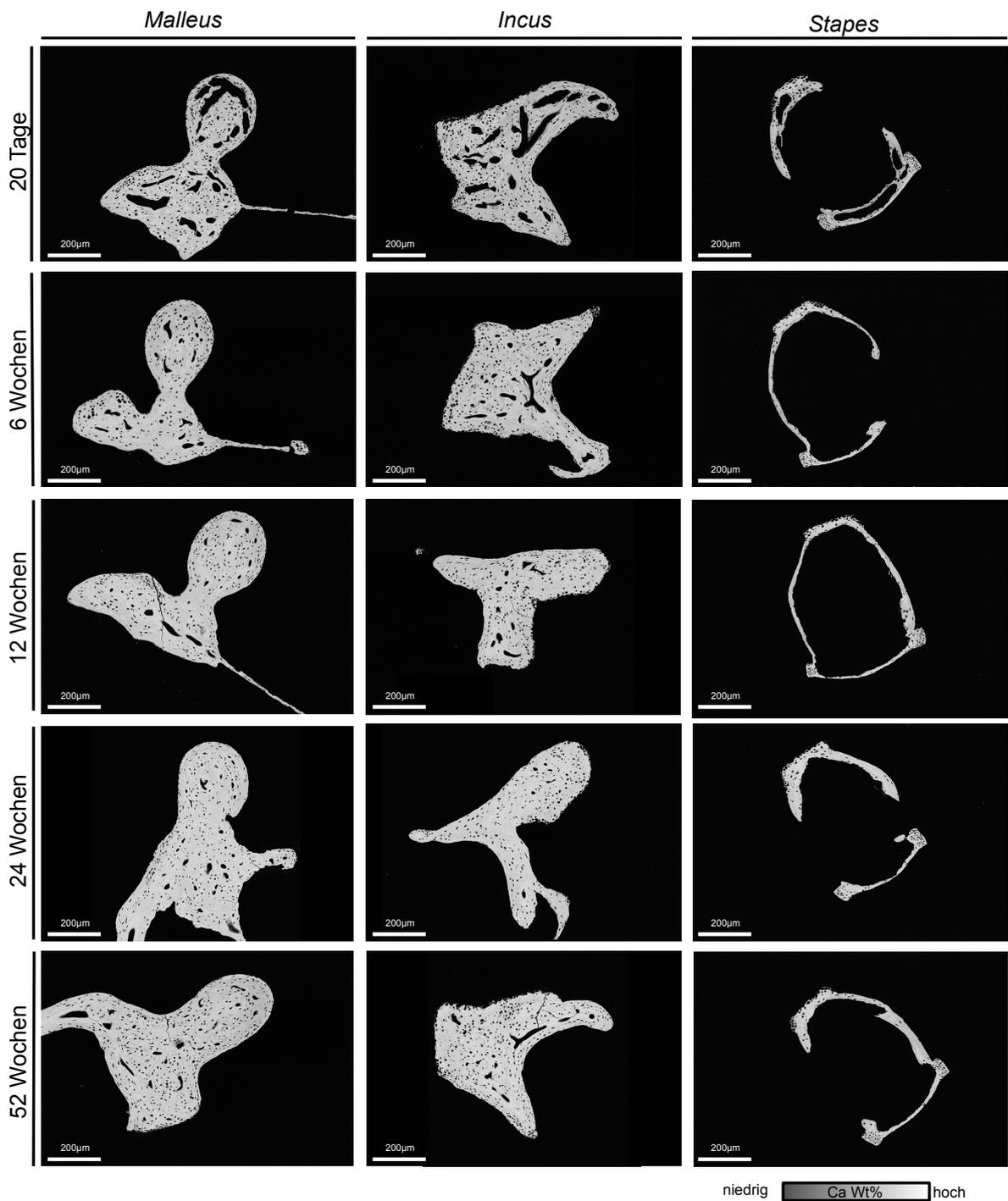


Abbildung 8: qBEI-Querschnittsaufnahmen der einzelnen Entwicklungsstadien von Malleus (anatomische dargestellte Struktur: „Orbicular apophysis“), Incus und Stapes.

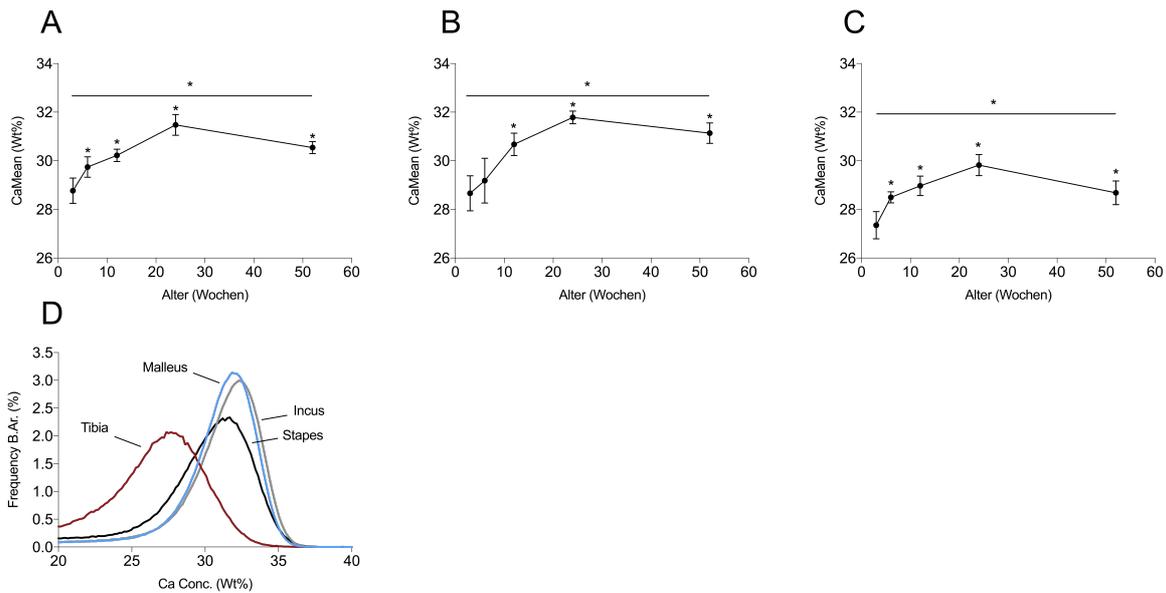


Abbildung 9: Entwicklung des Mineralisationsgrades (CaMean%). A: Malleus. B: Incus. C: Stapes. D: Verteilungskurven der Mineralisationsgrade der einzelnen Gehörknöchelchen in Gegenüberstellung zur murinen Tibia.

Im Vergleich der Mittelwerte der Mineralisationsgrade der Ossikel untereinander zeigt sich für den Incus in der Verteilungskurve die höchste Mineralisation, gefolgt vom Malleus und dem Stapes. Der Stapes weist hierbei die geringste Mineralisation der Gehörknöchelchen auf. Im Vergleich zu anderen Knochen, wie der murinen Tibia von altersentsprechenden Wildtyp Mäusen, zeigt sich in allen Gehörknöchelchen eine bedeutend höhere Mineralisation (siehe Abbildung 9 D).

Im Folgenden wurde eine Analyse der Osteozytenlakunenanzahl pro Fläche (N.Ot.Lc/B.Ar), ebenfalls mittels Rasterelektronenmikroskopie, durchgeführt. Auch hier zeigte sich für die drei Ossikel eine ähnliche Entwicklung. So nahm die Anzahl der Osteozyten jeweils in dem Zeitraum zwischen der 3. und der 24. Woche signifikant ab, gefolgt von einer Zunahme der Osteozytenlakunenanzahl bis zur 52. Woche. Hierbei war zunächst beim Malleus ein Abfall von $2382,90 \pm 177,49$ $1/\text{mm}^2$

auf $1474,23 \pm 95,90$ $1/\text{mm}^2$, beim Incus von $2296,05 \pm 189,65$ $1/\text{mm}^2$ auf $1524,79 \pm 97,43$ $1/\text{mm}^2$ und beim Stapes von $2596,04 \pm 248,09$ $1/\text{mm}^2$ auf $2201,38 \pm 256,42$ $1/\text{mm}^2$ zu beobachten, bevor die Osteozytenlakunenanzahl beim Malleus wieder auf $2103,95 \pm 161,10$ $1/\text{mm}^2$, beim Incus auf $2154,66 \pm 115,27$ $1/\text{mm}^2$ und beim Stapes auf $2488,56 \pm 278,09$ $1/\text{mm}^2$ bis zur 52. Woche anstieg. In dem Entwicklungsprozess des Malleus lässt sich überdies konstatieren, dass der Endwert der Woche 52 trotz des erneuten Anstiegs signifikant unter dem Ausgangswert der Woche 3 liegt (siehe Abbildung 10 A-C).

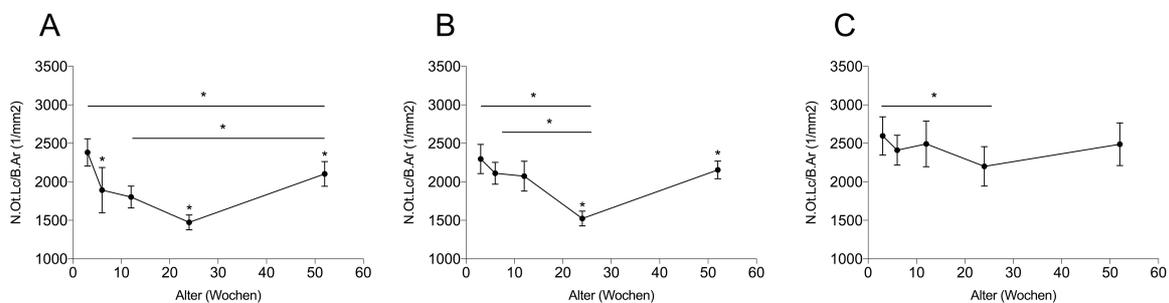


Abbildung 10: Entwicklung der Osteozytenlakunenanzahl pro Fläche ($1/\text{mm}^2$). A: Malleus. B: Incus. C: Stapes.

Auch bei der Entwicklung der Osteozytenlakunengröße (Lc.Ar) stellte sich bei dem Malleus und Incus ebenfalls, vergleichbar zur Osteozytenlakunenanzahl, zunächst ein Abfall bis zur 24. Woche mit einem anschließendem moderaten Anstieg bis zur 52. Woche dar. So sank die durchschnittliche Osteozytenlakunengröße beim Malleus von $18,53 \pm 0,86$ μm^2 auf $15,74 \pm 1,05$ μm^2 signifikant ab und stieg anschließend auf $17,25 \pm 0,85$ μm^2 an. Beim Incus lag der Ausgangswert bei $21,32 \pm 2,53$ μm^2 , der Tiefpunkt in Woche 24 signifikant verringert bei $16,06 \pm 1,19$ μm^2 und der leicht angestiegene Endwert in der Woche 52 bei $17,8 \pm 0,23$ μm^2 . Hierbei waren sowohl beim Malleus als auch beim Incus der Endwert in Woche 52 signifikant kleiner als der Ausgangswert in Woche 3. In der Analyse der

Osteozytenlakunengröße des Stapes war keine Entwicklungslinie erkennbar. So bewegten sich die Werte zwischen $19,38 \pm 1,98 \mu\text{m}^2$ (Maximalwert im Alter von 3 Wochen) und $16,37 \pm 2,30 \mu\text{m}^2$ (Minimalwert im Alter von 12 Wochen).

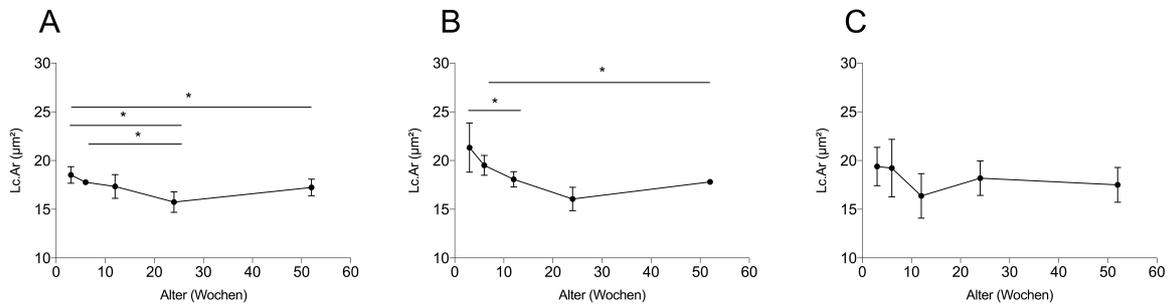


Abbildung 11: Entwicklung der Osteozytenlakunengröße. A: Malleus. B: Incus. C: Stapes.

Des Weiteren wurde die Porosität (%) der Ossikel analysiert, sprich der Anteil nicht mineralisierter Fläche an der Gesamtknochenfläche. Aufgrund der geringen zu analysierenden Fläche des Stapes wurde diese Untersuchung auf den Malleus und Incus beschränkt. Bei Malleus und Incus zeigten sich kongruente Entwicklungen. Während bei Mäusen der Altersklasse 3 Wochen noch ausgeprägte Leerräume erkennbar waren, mineralisierten diese rasch in den ersten Lebenswochen zu. So lag der Anteil nicht mineralisierter Leerräume in der 3. Woche beim Malleus bei $14,51 \pm 1,89 \%$ und beim Incus von $11,63 \pm 5,82 \%$, während sie bereits in der 6. Woche beim Malleus auf $4,68 \pm 1,84 \%$ und beim Incus auf $3,85 \pm 1,80 \%$ gesunken waren. Im Falle des Incus konnte hierbei noch eine signifikante Abnahme der Porosität von der 6. auf die 24. Woche nachgewiesen werden, in welcher der Prozentsatz bei $1,20 \pm 0,66 \%$ lag.

Die Entwicklung der Porositätswerte kann hierbei durch eine logarithmische Kurvenfunktion beschrieben werden, welche zwischen der 12. und 52. Woche, sowohl beim Malleus als auch beim Incus, keine signifikanten Veränderungen der Porosität aufwies.

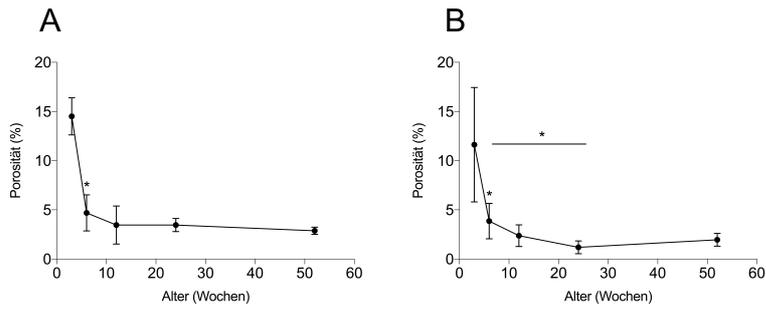


Abbildung 12: Entwicklung der Porosität (%). A: Malleus. B: Incus.

In Hinblick auf frühzeitig einsetzende degenerative Prozesse wurde außerdem eine Quantifizierung von hypermineralisierten (mikropetrotischen) Osteozytenlakunen (siehe Abbildung 14) durchgeführt (N.Mn.Lc 1/mm²). In dieser Analyse der Ossikel war jedoch keine Entwicklungslinie zu erkennen. So waren hypermineralisierte Osteozytenlakunen bei den Ossikeln in allen Entwicklungsstadien in gleichem Häufigkeitsgrad anzutreffen. Im Vergleich der einzelnen Ossikel untereinander wies der Stapes eine signifikant größere Anzahl an hypermineralisierter Osteozytenlakunen als der Incus auf. Der Incus wiederum besaß eine signifikant größere Anzahl als der Malleus (siehe Abbildung 13).

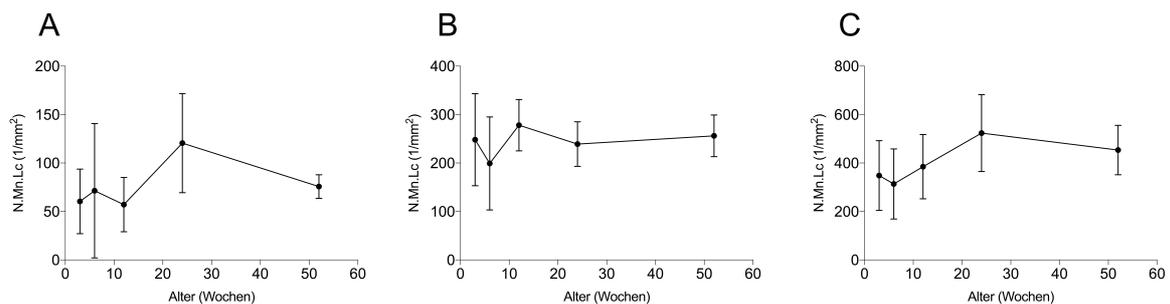


Abbildung 13: Entwicklung der Anzahl der hypermineralisierten (mikropetrotischen) Osteozytenlakunen. A: Malleus. B: Incus. C: Stapes.

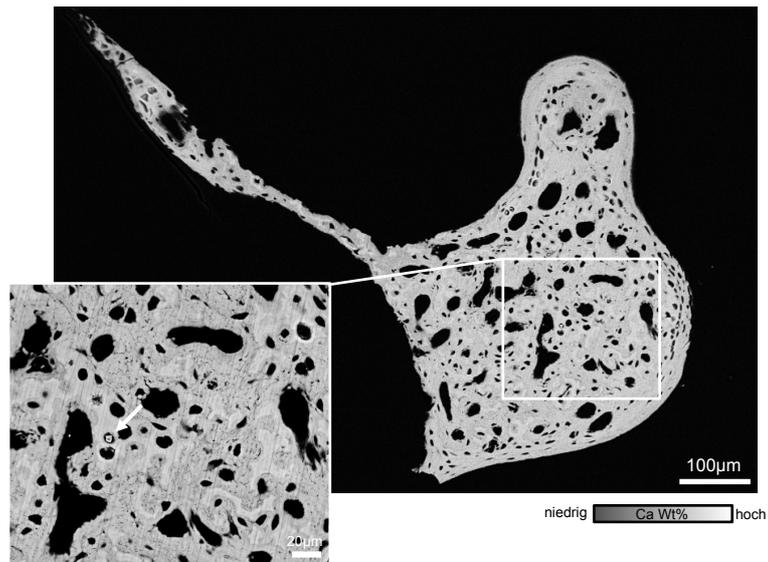


Abbildung 14: qBEI-Aufnahme von der „Orbicular Apophysis“ des Malleus (20 Tage) mit Vergrößerung und Kennzeichnung einer hypermineralisierten (mikropetrotischen) Osteozytenlakune.

4.3 Histologische Analyse

Bei der Betrachtung der Histologien der Gehörknöchelchen der einzelnen Altersklassen konnte neben Übereinstimmungen zu den Analyseergebnissen des Rasterelektronenmikroskops außerdem ein der Porosität zugrunde liegender Prozess in der „Orbicular apophysis“ des Malleus festgestellt werden. So waren die im Rasterelektronenmikroskop schwarz erscheinenden nicht mineralisierten und als Porosität quantifizierten Leerräume hier als vaskuläre Strukturen zu identifizieren (siehe Abbildung 15).

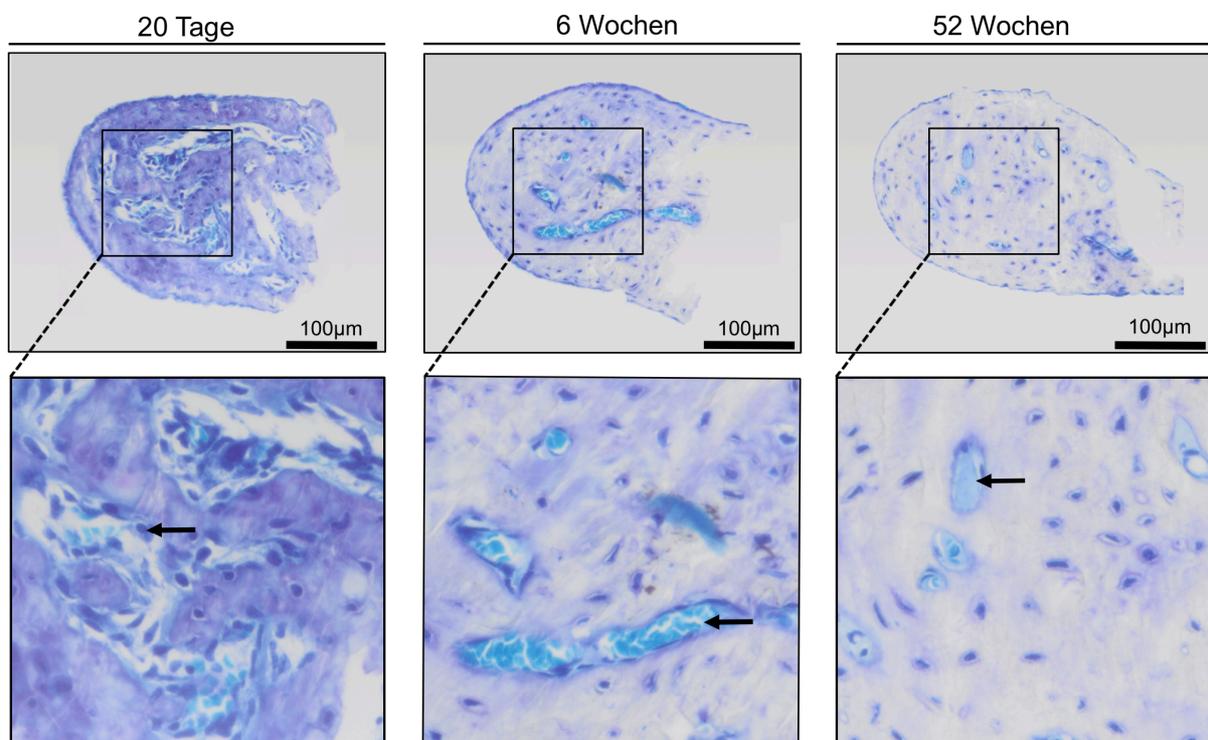


Abbildung 15: Histologien der „Orbicular Apophysis“ des Malleus in einem Alter von 20 Tagen, 6 und 52 Wochen in Toluidin-Färbung. Mit schwarzem Pfeil gekennzeichnet in der Altersklasse 20 Tage ein Osteoblast, welcher sich an der Wand eines Blutgefäßes befindet, in der Altersklasse 6 Wochen das Lumen eines Blutgefäßes und in der Altersklasse 52 Wochen eine mit Osteoid gefüllte Lakune.

In diesen Blutgefäßen waren hierbei neben Erythrozyten und mesenchymalen Zellen knochenbauende Osteoblasten in dem Bereich der Gefäßwände zu erkennen. In den folgenden analysierten Entwicklungsstadien war eine Rückbildung

der Blutgefäße zu beobachten, bei denen die Blutgefäße durch eine von Osteoblasten gebildete Knochensubstanz ersetzt wurden. Während in der Altersklasse 20 Tage noch ausgeprägte Blutgefäße zu erkennen waren, so waren bereits in der 6. Woche die Durchmesser der Blutgefäßlumina deutlich verringert. Bei Mäusen des Alters von 52 Wochen waren lediglich kleine persistierende Blutgefäße mit wenigen Erythrozyten oder kleine Gefäße mit Osteoid in der „Orbicular apophysis“ des Malleus vorzufinden (siehe Abbildung 15). Die knochenaufbauenden Osteoblasten entwickelten sich derweil zu in Knochensubstanz eingemauerten Osteozyten, welches in Abbildung 17 schematisch verdeutlicht wurde.

Dieser Prozess spiegelte sich auch anhand der bone volume fraction (BV/TV in %) wieder. So betrug der Knochenanteil pro untersuchter Fläche bei 3 Wochen alten Mäusen noch $84,21 \pm 7,91$ %, während dieser Wert zur 6. Woche bereits auf $96,52 \pm 2,02$ % anstieg. Nach diesem Zeitpunkt wurde ein Plateau erreicht und die Werte veränderten sich lediglich noch unwesentlich. In der Altersklasse 24 Wochen wurde mit $98,07 \pm 1,17$ % der höchste BV/TV-Wert gemessen (siehe Abbildung 16 A). In Hinblick auf die Entwicklung der Osteozytenanzahl zeigte sich ein inverses Bild. So wurde in der Altersklasse 3 Wochen mit $2575,15 \pm 579,99$ $1/\text{mm}^2$ der maximale Wert gemessen, welcher infolge bis zur 24. Woche auf $1490,41 \pm 158,99$ $1/\text{mm}^2$ abfiel, um bis zur 52. Woche wieder auf $1591,02 \pm 246,90$ $1/\text{mm}^2$ anzusteigen (siehe Abbildung 16 B). Bei beiden dieser Untersuchungsparameter waren die Tendenzen jedoch nicht mit Signifikanzen ausgezeichnet.

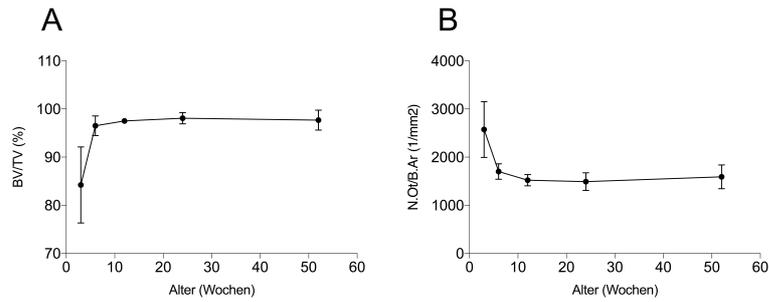


Abbildung 16: Entwicklung der Histomorphometrie: A: bone volume fraction (BV/TV in %). B: Osteozytenlakunenanzahl (1/mm²) in der „Orbicular apophysis“ des Malleus.

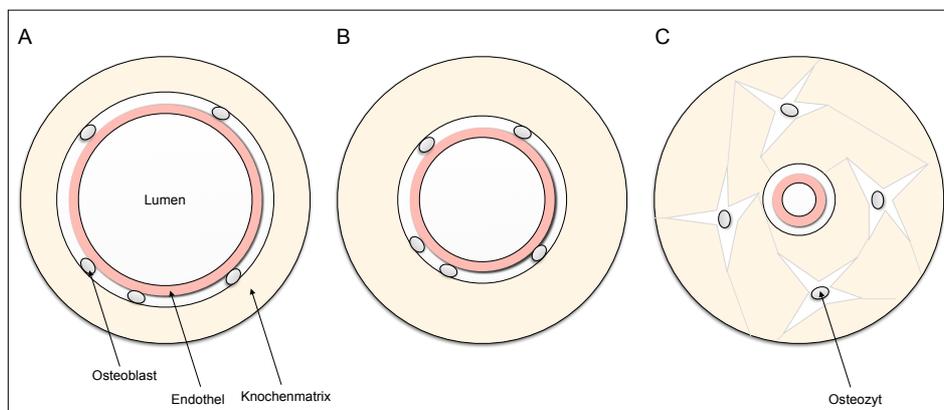


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Ossifikationsstadien anhand eines Modells. A-B: Zu erkennen die mit dem Endothel assoziierten Osteoblasten, welche perivaskuläre Knochenmatrix sezernieren. Hierdurch nimmt im Verlauf der Lumendurchmesser des Gefäßes ab, während die Knochenmatrix zunimmt. C: In Knochenmatrix eingemauerte Osteozyten mit einem kleinen persistierenden Blutgefäß zu erkennen.

4.4 *Hyp* Mausmodell

Die mithilfe des Rasterelektronenmikroskops (qBEI; siehe Abbildung 18 A-B) und der Histologie erhobenen Daten der *Hyp* Mäuse im Alter von 24 Wochen zeigten im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen bedeutende Unterschiede. Diese waren bei Betrachtung der qBEI- und Histologie-Aufnahmen bereits ersichtlich (siehe Abbildung 18). So waren in den qBEI-Aufnahmen großflächige intraossikuläre nicht mineralisierte Bereiche zu beobachten, welche in den Histologien als Osteoid imponierten.

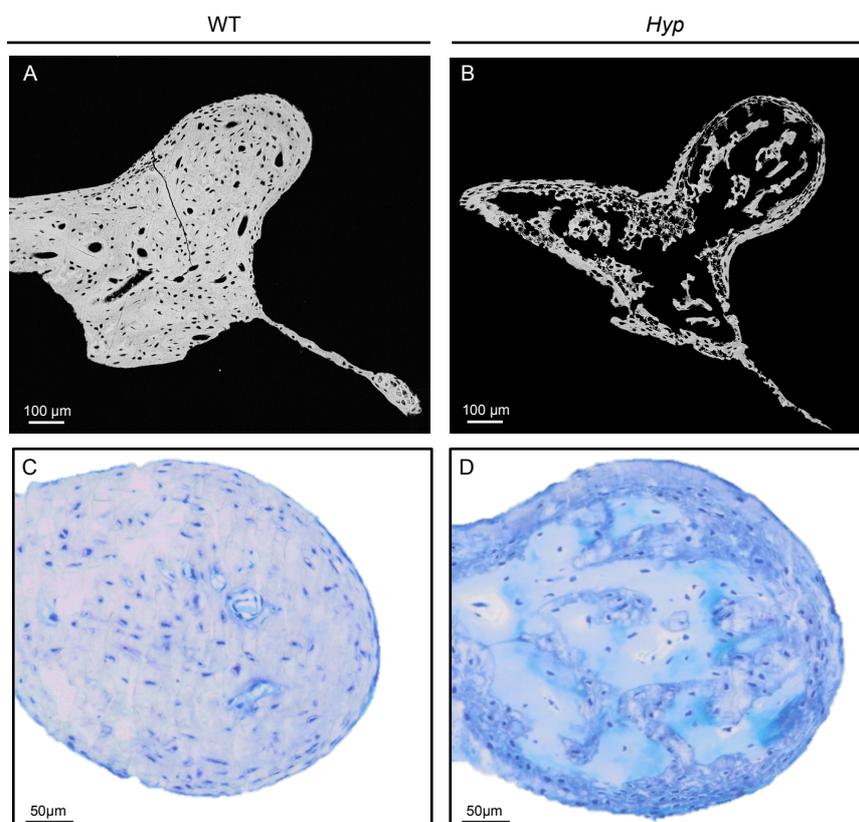


Abbildung 18: qBEI-Aufnahmen und Histologien der „Orbicular apophysis“ des Malleus. A und C: Wildtyp-Maus. B und D: *Hyp* Maus.

Im Bezug auf die Mineralisation zeigten sich bei den *Hyp* Mäusen bedeutend geringere Mineralisationsgrade. So konnte bei den *Hyp* Mäusen ein Mittelwert der Mineralisationsgrade (CaMean in Wt%) von $26,52 \pm 0,40$ % festgestellt werden,

während im Vergleich hierzu die Ossikel der gleichaltrigen Wildtyp-Mäuse mit $28,90 \pm 0,26$ % eine signifikant höhere Mineralisation aufwiesen bei $p \leq 0,05$ (siehe Abbildung 19 A). Auch der am häufigsten vorkommende Mineralisationswert (CaPeak in Wt%) der einzelnen Wildtyp-Mäuse lag mit $31,68 \pm 0,49$ % im Mittelwert signifikant über dem der *Hyp* Mäuse mit $29,50 \pm 0,70$ % (siehe Abbildung 19 B). Diese Ergebnisse spiegeln sich ebenfalls in der Verteilungskurve der Mineralisationsgrade der beiden Gruppen deutlich wieder (siehe Abbildung 19 D). Außerdem zeigte hierzu die Breite der Verteilung der Mineralisationsgrade (CaWidth in Wt%) der einzelnen Ossikel bei den *Hyp* Mäusen mit $6,10 \pm 0,05$ % signifikant inhomogenere Mineralisationswerte als die der Wildtyp-Mäuse mit $5,48 \pm 0,2$ % (siehe Abbildung 19 C). In Hinsicht auf die Ausbildung der Osteozytenlakunen war bezüglich der Größe der Osteozytenlakunen ebenfalls eine Signifikanz festzustellen. So lag die mittlere Osteozytenlakunengröße der *Hyp* Mäuse mit $31,13 \pm 3,43$ μm^2 signifikant über der Osteozytenlakunengröße der Wildtyp-Mäuse mit $19,40 \pm 1,20$ μm^2 (siehe Abbildung 19 E). In Bezug auf die Osteozytenlakunenanzahl waren zwischen den *Hyp* Mäusen ($2115,22 \pm 575,70$ $1/\text{mm}^2$) und den Wildtyp-Mäusen ($1725,62 \pm 204,32$ $1/\text{mm}^2$) hingegen keine signifikanten Unterschiede festzustellen (siehe Abbildung 19 F). Außerdem wurde die Porosität analysiert, wobei auch hier ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte. So besaßen die *Hyp* Mäuse mit Porositätswerten von $47,31 \pm 8,75$ % signifikant weniger Knochenmasse pro untersuchter Knochenfläche als die Wildtyp-Mäuse mit $3,94 \pm 1,35$ % (siehe Abbildung 19 G), welches im Falle der *Hyp* Mäuse auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als großflächige schwarze, nicht mineralisierte Binnenbereiche imponierte (siehe Abbildung 18 A-B).

Durch die histologische Analyse (siehe Abbildung 18 C-D) war im Folgenden die nähere Identifikation dieser nicht mineralisierten Bereiche möglich. Die zuvor in den

qBEI-Aufnahmen schwarz erscheinenden Bereiche waren als nicht mineralisierte Knochenmatrix in Form von Osteoid zu identifizieren. Dies muss von den schwarzen Bereichen der jungen Mäuse des Entwicklungsmodells abgegrenzt werden, bei dem diese tatsächlich nicht vorhandenem Knochen entsprechen. Die nähere Quantifizierung des Osteoid-Anteils der untersuchten Knochenfläche durch den Parameter OV/BV (%) zeigte einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. So besaßen die *Hyp* Mäuse einen Osteoid-Anteil von $55,69 \pm 5,45$ %, während dieser Wert bei den Wildtyp-Mäusen lediglich bei $0,00652 \pm 0,015$ % lag (siehe Abbildung 19 H).

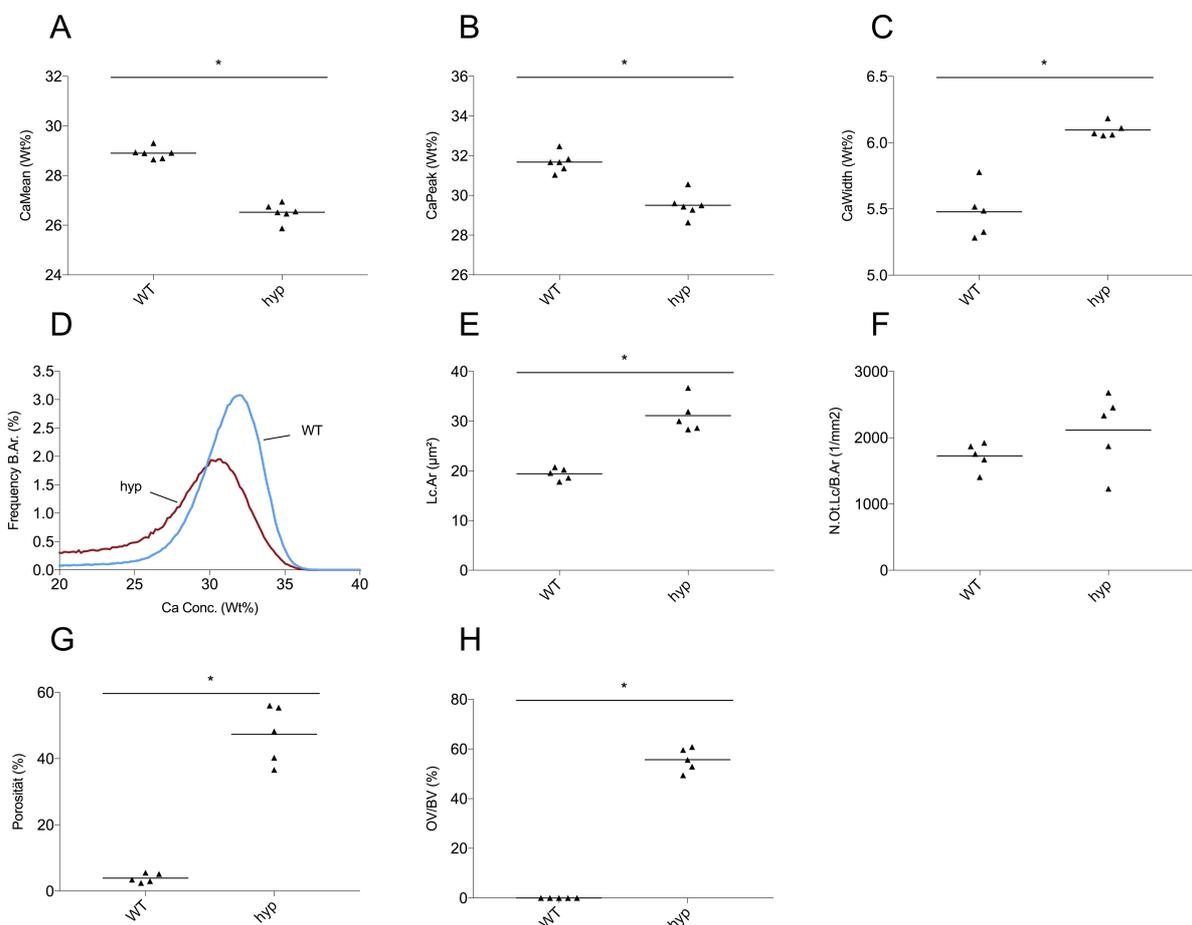


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsparameter zwischen *Hyp* und Wildtyp Mäusen. A: CaMean (Wt%). B: CaPeak (Wt%). C: CaWidth (Wt%). D: Verteilungskurven der Mineralisationsgrade. E: Lc.Ar (μm^2). F: N.Ot.Lc/B.Ar (1/mm²). G: Porosität (%). H: OV/BV (%).

5 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die postnatale morphometrische, histomorphometrische, histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung muriner Gehörknöchelchen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (20 Tage, 6-, 12-, 24- und 52-wöchig) sowie die Analyse der Ossikel im Rahmen eines gestörten Phosphatstoffwechsels, speziell durch Analyse des *Hyp* Mausmodells.

Bei Betrachtung der Längenentwicklung der Gehörknöchelchen hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass keine signifikanten Längenveränderungen, weder im positiven noch im negativen Sinne, in den untersuchten Altersklassen vom 20. Tag bis zur 52. postnatalen Woche vorliegen. Somit haben die Gehörknöchelchen bereits zu Beginn unseres Entwicklungsmodells, in der dritten postnatalen Woche, ihre finale Größe erreicht. Dieses deckt sich mit vorherigen Untersuchungen von Huangfu (Huangfu and Saunders, 1983), bei denen die Größenentwicklungen anatomischer Strukturen des Mittelohres in dem Zeitraum vom 1. bis zum 45. postnatalen Tag untersucht wurden. Hier konnte beim Malleus und Incus gezeigt werden, dass bereits am 20. postnatalen Tag 98% der Gesamtlänge erreicht waren. Dieses Ergebnis konnte in dem Entwicklungsmodell unserer Untersuchungen bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem, im Gegensatz zu den bisherigen Publikationen, ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Gehörknöchelchen bis in das höhere Alter gelegt, um eventuelle degenerative oder später einsetzende Entwicklungsprozesse zu detektieren. Aber auch hier ließen sich, selbst im hohen Alter, weder positive noch negative Größenentwicklungen feststellen.

Nach Stand der jetzigen Forschung kann davon ausgegangen werden, dass mit der Beendigung des Größenwachstums ebenso die perichondrale Ossifikation weitgehend abgeschlossen ist, somit in den murinen Gehörknöchelchen bis zu dem

Zeitpunkt der 3. postnatalen Woche. Vergleicht man die Größenentwicklung muriner Gehörknöchelchen mit der des Menschen zeigen sich hierbei bedeutende Unterschiede. So wird bei murinen Gehörknöchelchen die Vollendung des Längenwachstums und somit der perichondralen Ossifikation im Vergleich zum Menschen zu einem deutlich späteren Zeitpunkt erreicht. Während dieser Zeitpunkt bei murinen Gehörknöchelchen erst postnatal erreicht wird, zeigte sich in Untersuchungen von Whyte und Richany, dass die perichondrale Knochenmanschette bei humanen Gehörknöchelchen bereits pränatal in der 24.-25. Schwangerschaftswoche vollständig ausgebildet ist (Whyte et al., 2008, Richany et al., 1954). Die perichondralen Ossifikationsprozesse muriner Gehörknöchelchen laufen also im Vergleich zu den humanen in den entsprechenden Entwicklungsphasen zeitlich verzögert ab.

Dadurch dass während der enchondralen Ossifikation, welche sich der perichondralen Ossifikation anschließt, die Binnenstruktur und damit das Trabekelwerk des Knochens gebildet wird, stellt diese einen bedeutenden Prozess der Ossifikation der Gehörknöchelchen dar, um die Biomechanik dieser im Hörvorgang zu gewährleisten. Durch die Auswahl der untersuchten Altersklassen in dieser Arbeit konnte eine genaue Analyse vor allem dieses Abschnitts der Ossifikation durchgeführt werden. So konnten die Prozesse der enchondralen Ossifikation anhand des Analyseparameters der Porosität quantifiziert und in der histologischen Analyse genauer qualifiziert werden. In den frühen Altersklassen (bis zur 6. Woche) konnten in der „Orbicular apophysis“ des Malleus die nicht mineralisierten Bereiche als ausgeprägte Blutgefäße in der Histologie identifiziert werden. In diesen waren Ansammlungen von Osteoblasten, Erythrozyten und mesenchymalen Zellen zu beobachten. Diese Beobachtungen lassen sich eindeutig den Ossifikationsprozessen der enchondralen Ossifikation zuordnen. Die Prozesse

sind hierbei so zu erklären, dass vor der enchondralen Ossifikation das Knorpelmodell avaskulär ist. Während der enchondralen Ossifikation hypertrophieren die Chondrozyten und synthetisieren Signalmoleküle, welche die Angiogenese stimulieren. Hierbei werden Chondroklasten und die Gefäßinvasion stimuliert (Yang et al., 2012). Im Folgenden ist davon auszugehen, dass die in den histologischen Aufnahmen beobachteten Ansammlungen von Osteoblasten im Rahmen der enchondralen Ossifikation Knochenmatrix in den peripheren Zonen der Blutgefäße synthetisieren und die Volumina der Blutgefäße somit abnehmen. Die Blutgefäße werden durch Knochenmatrix ersetzt. So stellten sich die Blutgefäße der Gehörknöchelchen bei 6 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu Mäusen im Alter von 20 Tagen bereits deutlich verkleinert dar. Ab der 12. Woche waren lediglich nur noch kleine mit Osteoid gefüllte Zonen oder auch kleine persistierende Blutgefäße zu erkennen. Ausgeprägte Blutgefäße waren ab diesem Zeitpunkt nicht mehr zu beobachten. Matsuo konnte in diesem Zusammenhang großlumige und mit Endothelzellen ausgekleidete Kapillarschleifen in der „Orbicular apophysis“ des Malleus in den ersten Lebenswochen nachweisen. In naher Umgebung zu diesen Kapillaren waren hierbei vermehrt matrixproduzierende Osteoblasten zu beobachten. Durch die Matrixproduktion kommt es, vor allem in dem Zeitraum vom 21. bis zum 35. postnatalen Tag, zu einer rapiden Abnahme des Lumendiameters der Kapillaren. Am 56. Tag sind die Kapillarlumina weitgehend mit Matrix aufgefüllt und mit eingemauerten Osteozyten besetzt (Matsuo et al., 2015).

In der quantitativen Analyse im Sinne der Porosität waren ab der 12. Woche keine signifikanten Veränderungen des Anteils nicht mineralisierter Bereiche in den Gehörknöchelchen festzustellen. Hierbei korrelierte die Entwicklung der elektronenmikroskopisch bestimmten Porosität mit der Entwicklung des in der Histomorphometrie bestimmten BV/TV-Werts.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass die enchondrale Ossifikation muriner Gehörknöchelchen, im Gegensatz zu den humanen Gehörknöchelchen, welche bereits in der 32. Schwangerschaftswoche pränatal vollständig ossifiziert sind (Dass and Makhni, 1966, Anbuhl et al., 2017), erst zwischen der 6.-12. postnatalen Woche als vollendet gelten kann. Mit der Vollendung der enchondralen Ossifikationsprozesse kann auch die gesamte Ossifikation der murinen Gehörknöchelchen als abgeschlossen angesehen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass es auch nach dem Abschluss der enchondralen Ossifikation zu Veränderungen des Mineralisationsgrades der Gehörknöchelchen und der Eigenschaften der Osteozytenlakunen kommt. So liegt bei allen murinen Gehörknöchelchen ein stetiger signifikanter Anstieg des Mineralisationsgrades (Wt%) bis zur 24. Woche vor. Dieses lässt darauf schließen, dass es auch nach Abschluss der enchondralen Ossifikation in der 6.-12. Woche noch zu bedeutenden Einlagerung von Calcium in die Knochenmatrix kommt.

Abweichungen von der Knochenbeschaffenheit in den Gehörknöchelchen, so auch im Falle des Mineralisationsgrades, scheinen mit einer verringerten Schalleitungsfähigkeit einherzugehen. Dieses zeigt sich beim Menschen eindrucksvoll bei den Krankheitsbildern der Osteopetrose, der Osteoporose oder der Osteogenesis imperfecta. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Knochenqualität der Gehörknöchelchen und der Hörfähigkeit festgestellt werden. Beim Krankheitsbild der Osteopetrose war sowohl bei der malignen autosomal rezessiven Form, welche im infantilen Alter bereits auftritt, als auch bei der autosomal dominanten Form (Kindesalter bis Adoleszenz) eine Häufung von Schwerhörigkeiten nachzuweisen (Wilson and Vellodi, 2000, Bollerslev et al., 1988). Bei der genetischen Veranlagung der malignen infantilen Form treten hierbei in 78%

der Fälle Schwerhörigkeiten auf, welche wiederum zu 100% eine konduktive Komponente, sprich eine Schallleitungsstörung, und zu 26% eine sensorineural Komponente aufweisen (Dozier et al., 2005). Im Falle der autosomal dominanten Form wurden neben pathologischen Fibrosierungen der interossikulären Gelenke außerdem Verformungen, Verdickungen und abnorme Sklerosierungen der Gehörknöchelchen, vor allem des Stapes, festgestellt. Auch bei der autosomal dominanten Form lag eine Häufung von Schwerhörigkeiten vor (Milroy and Michaels, 1990). Ebenso konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Osteoporose und einer erhöhten Inzidenz eines Hörverlust im Rahmen einer Metaanalyse nachgewiesen werden (Upala et al., 2017). Ursächlich für diese Schwerhörigkeit aufgrund von Osteoporose werden multifaktorielle Ursachen diskutiert, wobei sich allerdings eine konduktive Komponente vermuten lässt, da in hohen Frequenzbereichen (4-8 kHz) bereits ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Knochenstatus mit geringer Knochendichte und einer Beeinträchtigung der Schallweiterleitung gezeigt werden konnte (Ozkiris et al., 2013). Zuletzt ist auch der häufig anzutreffende Hörverlust bei Patienten mit Glasknochenkrankheit (Osteogenesis imperfecta) ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Knochenqualität der Ossikel und der Hörfähigkeit (Pillion et al., 2011).

Für eine optimale Schallübertragung scheint in den Gehörknöchelchen die physiologische Knochenbeschaffenheit das optimale Mischverhältnis zwischen Elastizität und Stabilität darzustellen. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass für eine physiologische Knochenausreifung der murinen Gehörknöchelchen der postnatale Zeitraum bis zur 24. Woche essentiell ist, um eine volle Funktionstüchtigkeit der Ossikel mit regelrechter Schallleitung zu erreichen.

Im Gegensatz zu humanen Gehörknöchelchen, bei denen im Verlauf des Lebens eine logarithmische Steigung des Mineralisationsgrades zu beobachten ist (Rolvien et al., 2018), zeigt sich interessanterweise im fortgeschrittenem Alter bei Mäusen allerdings eine gegensätzliche Entwicklung. So ist ab der 24. Woche ein signifikanter Abfall der Mineralisation zu beobachten. Inwiefern hier ein degeneratives Phänomen vorliegt, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Allerdings zeigte sich außerdem, dass murine Gehörknöchelchen im Mittel eine höhere Mineralisation aufweisen, als die humanen Gehörknöchelchen (Rolvien et al., 2018). Der höchste Mineralisationsgrad der Ossikel unter den Säugetieren wurde hingegen bei Walen gefunden. Dieser liegt mit rund 35 Wt% deutlich über dem Mineralisationsgrad der Ossikel anderer Spezies und sogar über dem der Walzähne. Dieses stellt die Voraussetzung für ein exzellentes Hören über große Distanzen in Frequenzbereichen von über 30 kHz dar (Schmidt et al., 2018).

Auffällig ist, dass bei den murinen Gehörknöchelchen neben dem Mineralisationsgrad auch bei der Osteozytenlakunengröße (Lc.Ar) und bei der Osteozytenlakunenanzahl (N.Ot.Lc/B.Ar) gegensätzliche Entwicklungen ab der 24. Woche zu beobachten sind. So ist bei allen Ossikeln in Bezug auf die Osteozytenlakunenanzahl und beim Malleus und Incus ebenfalls bei der Osteozytenlakunengröße ein zu der vorherigen abfallenden Entwicklung ein gegensätzlicher Anstieg der Parameter zu verzeichnen. Auch bei diesen beiden Parametern ist beim Menschen keine Veränderung der Entwicklungsrichtung zu beobachten. So ist beim Menschen, sowohl bei der Osteozytenlakunenanzahl als auch bei der Osteozytenlakunengröße im Verlauf des Lebens ein logarithmischer leichter Abfall zu verzeichnen (Rolvien et al., 2018). Zu der Entwicklung der Parameter bei murinen Gehörknöchelchen ist außerdem zu bemerken, dass sich der Verlauf des Mineralisationsgrades genau gegensätzlich zu der

Osteozytenlakunenanzahl und -größe verhält. Eine gegenseitige Abhängigkeit oder gar ein direktes Zusammenspiel zwischen diesen Entwicklungen kann hierbei nicht attestiert, allerdings vermutet werden.

Es lässt sich also bis hierher konstatieren, dass bis zur 24. postnatalen Woche der Maus eine kongruente Entwicklung zwischen Maus und Mensch in Bezug auf den Mineralisationsgrad, der Osteozytenlakunenanzahl und der Osteozytenlakunengröße vorliegt. Ab der 24. Woche zeigt sich allerdings bei der Maus gegenläufige Entwicklungen, auch im Vergleich zur Verlaufskurve beim Menschen.

Ein weiterer Analyseparameter stellte die Anzahl der hypermineralisierten (mikropetrotischen) Osteozytenlakunen dar. Das Phänomen der hypermineralisierten Osteozytenlakunen war, ebenso wie bei humanen Gehörknöchelchen, auch in den murinen Gehörknöchelchen zu beobachten. Bei beiden Spezies konnten direkt nach der Geburt hypermineralisierte Knochenlakunen erkannt werden. Allerdings nahmen sie beim Menschen mit steigendem Alter linear signifikant zu, während in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass bei der Maus über alle Altersklassen keine signifikanten Veränderungen (bei hoher Varianz) vorlagen. Dennoch waren in den murinen Gehörknöchelchen in allen Altersklassen Werte zu festzustellen, welche bei humanen Gehörknöchelchen erst im hohen Lebensalter vorzufinden waren.

Dadurch dass beim Menschen bereits ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Osteozytenanzahl, der Zunahme von hypermineralisierten Osteozytenlakunen und dem Verlust der Fähigkeit des Knochenremodelings gezeigt werden konnte (Busse et al., 2010), kann bei dem Auftreten von hypermineralisierten Osteozytenlakunen in humanen Gehörknöchelchen von einem altersbedingtem degenerativen Phänomen ausgegangen werden. Bei murinen Gehörknöchelchen scheinen hierbei differente zelluläre Prozesse abzulaufen, welche bereits frühzeitig

eine hohe Anzahl an hypermineralisierten Knochenlakunen begründen und bei denen es im steigenden Alter bei einer gleichbleibenden Anzahl bleibt.

Bezüglich aller Entwicklungsstadien und Analyseparameter dieses Entwicklungsmodells lässt sich resümieren, dass die Knochenentwicklungen der murinen und humanen Gehörknöchelchen bedeutende Parallelen aufweisen. Vor allem konnte gezeigt werden, dass bei murinen Gehörknöchelchen die Ossifikation und zelluläre Prozesse postnatal ablaufen, welche bei humanen Gehörknöchelchen bereits intrauterin stattfinden. Außerdem war als bedeutende Gemeinsamkeit eine zeitweise parallele Entwicklung in den postnatalen Stadien beider Individuen in Analyseparametern wie Osteozytenlakunenanzahl, Osteozytenlakunengröße und Mineralisationsgrad zu erkennen. Dieses galt für die frühen (ab der 3. Woche) bis mittleren (bis zur 24. Woche) Entwicklungsstufen der Maus, während sich nach der 24. Woche eine differente Entwicklung in den Gehörknöchelchen zwischen Mensch und Maus zeigte.

Bei der Analyse der Ossikel der Phex-defizienten *Hyp* Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration des Signalproteins FGF23 auch bei den sonst hoch mineralisierten Gehörknöchelchen einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung dieser hat. So konnten wir in unserem *Hyp* Mausmodell zeigen, dass es durch eine FGF23 vermittelte Hypophosphatämie zu einer signifikanten Steigerung der Porosität der Gehörknöchelchen kommt, welches mit einem deutlich gesteigertem intraossikulären Vorkommen von nichtmineralisiertem Osteoid einhergeht. Außerdem lag eine bedeutende Verminderung der Knochenmineralisation vor, welches durch signifikante Veränderungen der Analyseparameter CaMean (Wt%) und CaPeak (Wt%) gezeigt werden konnte. Durch die hierdurch bedingte Herabsetzung der Knochenqualität ist davon auszugehen, dass es zu einer erheblichen funktionellen Einschränkung der Gehörknöchelchen

kommt. Dieses würde sich im Hörvorgang im Sinne einer konduktiven Schallweiterleitungsstörung widerspiegeln. Bei erniedrigten FGF23-Konzentrationen und folglich erhöhten Phosphatspiegeln konnte Lysaght bereits eine signifikante Schwerhörigkeit mit konduktiver Komponente bei Mäusen nachweisen (Lysaght et al., 2014).

Neben Veränderungen in Bezug auf die Knochenmineralisation zeigten sich in den Ossikeln der *Hyp* Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant vergrößerte Osteozytenlakunen. Eine Zunahme der Osteozytenlakunengröße konnte ebenfalls bereits bei laktierenden Mäusen in Tibia, Femur und Wirbelkörper gezeigt werden. Dieses Phänomen zeigte sich reversibel und konnte lediglich bis zum 7. Tag nach Entwöhnung der Laktation nachgewiesen werden. Während der Laktation dient das Skelett als wichtige Quelle von Calcium, sodass Mäuse während der Laktation 20-30% des Knochenminerals verlieren. Frühere Studien bei laktierenden Mäusen, bei welchen die Osteoklasten mittels Pamidronat inaktiviert wurden, zeigten jedoch lediglich eine Blockierung des Rückgangs der Knochenmineraldichte von 60% (Qing et al., 2012). Dieses ließ auf andere knochenabbauende Mechanismen schließen. Durch den Nachweis von Osteoklasten-spezifischen Markern, wie TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), Cathepsin K oder MMP-13 (Matrix Metalloproteinase-13), welche durch Osteozyten exprimiert wurden, konnte auf ein durch die Osteozyten initiiertes transientes perilacunäres Remodeling des Knochens geschlossen werden. Hierdurch stellen die Osteozyten einen bedeutenden Regulator des Calcium Metabolismus dar. Das Phänomen der osteozytären perilacunären Osteolysen konnte durch gezieltes Blockieren des PTHR1 (Parathormon Rezeptor 1) verhindert werden. Die Gabe vom PTHrP (Parathormon-related Protein) induzierte eine erhöhte TRAP-Aktivität und eine vermehrte Expression von Cathepsin K in den Osteozyten, was zu einer vermehrten Osteolyse führte (Qing et al., 2012). Ein

äquivalenter Mechanismus der osteozytären Osteolyse ist auch im *Hyp* Mausmodell bereits gezeigt worden. So konnten in vorherigen Untersuchungen von Tibia und Schädelkalotte bei *Hyp* Mäusen ebenfalls vergrößerte Osteozytenlakunen mit gleichzeitigem Vorkommen von Markern wie Cathepsin K und MMP-13 nachgewiesen werden. Eine Behandlung dieser *Hyp* Mäuse mit Calcitriol bzw. mit FGF23Ab (FGF 23 blocking antibody) zeigte eine Reversibilität der osteozytären Osteolyse, sodass die Größe der Osteozytenlakunen in Tibia und Schädelkalotte wieder sank und die canaliculäre Konnektivität stieg (Tokarz et al., 2018). Diese Untersuchungen geben Anlass zur Annahme, dass auch die signifikant vergrößerten Osteozytenlakunen in unserer Analyse der Gehörknöchelchen des *Hyp* Mausmodells auf dem Mechanismus der osteozytären Osteolyse entstanden sind. Im Hinblick darauf sollten nun in den Gehörknöchelchen der *Hyp* Mäuse die Reversibilität der Osteozytenlakunengröße mittels Behandlung der Mäuse mit Calcitriol bzw. FGF23Ab und der Nachweis von Osteoklasten-spezifischen Markern wie Cathepsin K, MMP-13 oder TRAP untersucht werden.

Auch bei Vitamin D Mangel konnte bereits das Phänomen der osteozytären Osteolyse bei gleichzeitigem Vorkommen von signifikant vergrößerten Osteozytenlakunen und Osteoklasten-spezifischen Markern wie Cathepsin K mit einer verringerten lacunären Konnektivität gezeigt werden (Rolvien et al., 2017, Tsourdi et al., 2018).

Die Erkenntnisse dieses Entwicklungsmodells geben Anlass zu der Hoffnung, dass murine Gehörknöchelchen in der humanmedizinischen Forschung stellvertretend zur Analyse von Knochenentwicklungsprozessen und derer beeinflussender Faktoren bei der Entwicklung humaner Gehörknöchelchen eingesetzt werden können. Aufgrund der bedeutenden Parallelen zum Menschen in den frühen Entwicklungsstadien der Maus bis einschließlich der 24. postnatalen

Woche, lässt sich vermuten, dass murine Gehörknöchelchen vor allem für die Analyse früher ossärer Entwicklungsprozesse besonders geeignet sind.

So stellt das vorliegende Entwicklungsmodell muriner Gehörknöchelchen von Wildtyp-Mäusen die Normentwicklung dieser Gehörknöchelchen dar und kann als Referenzobjekt und Hilfsmittel in der Humanforschung bei der Untersuchung der Einflussnahme von Noxen, Medikamenten sowie bei Erforschung von genetischen Knochenerkrankungen, wie des Phosphatdiabetes (XLH) anhand des *Hyp* Mausmodells, dienlich sein. Darüberhinaus sollte bei diesen Untersuchungen mittels Hörtests analysiert werden, ob die beobachteten strukturellen Veränderungen des Knochens eine Hörminderung im Sinne einer konduktiven Schalleitungsschwerhörigkeit verursachen und ob bei entsprechender Behandlung eine Reversibilität dieser Phänomene erreicht werden kann.

6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die postnatale morphometrische, histomorphometrische, histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung muriner Gehörknöchelchen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (20 Tage, 6-, 12-, 24- und 52-wöchig). Bei der Untersuchung der Entwicklung des Längenwachstums zeigten sich keine Veränderungen in den verschiedenen Altersklassen. Bereits am 20. postnatalen Tag war die maximale Größe erreicht, welches gleichzusetzen ist mit dem Abschluss der perichondralen Ossifikation.

Die enchondrale Ossifikation muriner Gehörknöchelchen zeigte sich im Zeitraum von der 6. bis zur 12. Woche postnatal vollendet. Ab diesem Zeitpunkt konnte keine signifikante Abnahme der Porosität mehr festgestellt werden. Die Mineralisation der Gehörknöchelchen nahm jedoch bis zur 24. Woche weiter zu, um anschließend abzufallen. Ein gegensätzlicher Verlauf zeigte sich bei der Entwicklung der Osteozytenlakunenanzahl sowie der Osteozytenlakunengröße. Diese fielen bis zur 24. Woche zunächst ab, zeigten dann jedoch steigende Tendenzen. Die Anzahl hypermineralisierter (mikropetrotischer) Osteozytenlakunen zeigte keine signifikanten Veränderungen im Beobachtungszeitraum.

Es konnte darüberhinaus durch die Analyse von *Phex*-defizienten *Hyp* Mäusen gezeigt werden, dass die normalerweise sehr hohe Matrixmineralisation der Ossikel durch erhöhte Spiegel des Signalproteins FGF23 im Sinne einer verringerten Mineralisation und erhöhten Porosität beeinflusst werden kann. Außerdem waren signifikant vergrößerte Osteozytenlakunen zu beobachten. Im Ausblick auf weitere Analysen sollte nun untersucht werden, ob die verringerte Mineralisation der Ossikel im *Hyp* Mausmodell folglich mit einem herabgesetzten Hörvermögen aufgrund einer verringerten konduktiven Schalleitung einhergeht.

The subject of the present study is the postnatal morphometric, histomorphometric, histological and electron microscopic examination of murine ossicles in different developmental stages (20 days, 6, 12, 24 and 52 weeks). In the study of the development of longitudinal growth no changes in the various age groups were observed. The maximal size was already reached on 20th day postnatal, which is equivalent to the completion of perichondral ossification. Whereas, completion of the endochondral ossification of murine ossicles was observed between the 6th and 12th week postnatal. From this point on no further significant decrease in porosity could be detected. However, the mineralization of the ossicles continued to increase until the 24th week and dropped afterwards. An opposite development was noticed regarding the number of osteocytes and the sizes of the osteocytes lacunae. These decreased until the 24th week, but then showed increasing tendencies. The number of hypermineralized osteocyte lacunae showed no significant changes during the observation period.

In addition, analysis of *Phex*-deficient Hyp mice has shown that the normally very high matrix mineralization of the ossicles can be influenced by signal proteins such as FGF23 in terms of reduced mineralization and increased porosity. Moreover, significantly enlarged osteocyte lacunae were observed. Focus of upcoming research should be to analyze whether reduced mineralization of the ossicles in the Hyp mouse model is accompanied by a reduced hearing due to a reduced conduction of sound.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMU	basic multicellular unit
BV/TV	bone volume fraction
CaMean	mittlerer Calciumgehalt (qBEI, wt%)
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF23	fibroblast growth factor 23
FGF23Ab	FGF 23 blocking antibody
(k)Hz	(Kilo-)Hertz
Lc.Ar	mittlere Lakunenfläche (μm^2)
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MMP-13	Matrix Metalloproteinase-13
N.Ot/B.Ar	Osteozytenzahl pro Knochenfläche (N/mm^2)
OPG	Osteoprotegerin
OV/BV	osteoid volume per bone volume
Phex	phosphate regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related Protein
qBEI	quantitative backscattered electron imaging
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
SPL	Schalldruckpegel
TGF- β	transforming growth factor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
XLH	X-linked hypophosphatemia
μ -CT	Mikro-Computertomographie

8 Literaturverzeichnis

1. AARDEN, E. M., BURGER, E. H. & NIJWEIDE, P. J. 1994. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*, 55, 287-99.
2. AMANN-VESTI, B. R. 2006. *Klinische Pathophysiologie*, Georg Thieme Verlag.
3. ANBUHL, K. L., UHLER, K. M., WERNER, L. A. & TOLLIN, D. J. 2017. Early Development of the Human Auditory System. *Fetal and Neonatal Physiology*. Elsevier.
4. ANTHWAL, N., JOSHI, L. & TUCKER, A. S. 2013. Evolution of the mammalian middle ear and jaw: adaptations and novel structures. *J Anat*, 222, 147-60.
5. ARS, B. 1989. Organogenesis of the middle ear structures. *J Laryngol Otol*, 103, 16-21.
6. BEAMER, W. G., DONAHUE, L. R., ROSEN, C. J. & BAYLINK, D. J. 1996. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*, 18, 397-403.
7. BERNDT, T. & KUMAR, R. 2007. Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 69, 341-59.
8. BOHNE, B. A. & HARDING, G. 2011. Dissection Manual for the Mouse Temporal Bone.
9. BOLLERSLEV, J., GRONTVED, A. & ANDERSEN, P. E., JR. 1988. Autosomal dominant osteopetrosis: an otoneurological investigation of the two radiological types. *Laryngoscope*, 98, 411-3.
10. BOWDEN, R. E. 1977. Development of the middle and external ear in man. *Proc R Soc Med*, 70, 807-15.

-
11. BROWNSTEIN, C. A., ZHANG, J., STILLMAN, A., ELLIS, B., TROIANO, N., ADAMS, D. J., GUNDBERG, C. M., LIFTON, R. P. & CARPENTER, T. O. 2010. Increased bone volume and correction of HYP mouse hypophosphatemia in the Klotho/HYP mouse. *Endocrinology*, 151, 492-501.
 12. BUSSE, B., DJONIC, D., MILOVANOVIC, P., HAHN, M., PUSCHEL, K., RITCHIE, R. O., DJURIC, M. & AMLING, M. 2010. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell*, 9, 1065-75.
 13. CANALIS, E. & DELANY, A. M. 2002. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci*, 966, 73-81.
 14. CHESHER, D., ODDY, M., DARBAR, U., SAYAL, P., CASEY, A., RYAN, A., SECHI, A., SIMISTER, C., WATERS, A., WEDATILAKE, Y., LACHMANN, R. H. & MURPHY, E. 2018. Outcome of adult patients with X-linked hypophosphatemia caused by PHEX gene mutations. *J Inherit Metab Dis*, 41, 865-876.
 15. CHRISTAKOS, S., AJIBADE, D. V., DHAWAN, P., FECHNER, A. J. & MADY, L. J. 2010. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39, 243-53.
 16. CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-9.
 17. DASS, R. & MAKHNI, S. S. 1966. Ossification of ear ossicles. The stapes. *Arch Otolaryngol*, 84, 306-12.
 18. DONG, W., VARAVVA, P. & OLSON, E. S. 2013. Sound transmission along the ossicular chain in common wild-type laboratory mice. *Hear Res*, 301, 27-34.
 19. DOZIER, T. S., DUNCAN, I. M., KLEIN, A. J., LAMBERT, P. R. & KEY, L. L., JR. 2005. Otologic manifestations of malignant osteopetrosis. *Otol Neurotol*, 26, 762-6.

-
20. EICHER, E. M., SOUTHARD, J. L., SCRIVER, C. R. & GLORIEUX, F. H. 1976. Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 4667-71.
21. ENLOW, D. H. 1990. *Facial growth*, WB Saunders Company.
22. ERIKSEN, E. F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, 219-27.
23. FLORENCIO-SILVA, R., SASSO, G. R., SASSO-CERRI, E., SIMOES, M. J. & CERRI, P. S. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015, 421746.
24. FRANZ-ODENDAAL, T. A., HALL, B. K. & WITTEN, P. E. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 235, 176-90.
25. FROST, D. M., CRONIN, J. & NEWTON, R. U. 2010. A biomechanical evaluation of resistance: fundamental concepts for training and sports performance. *Sports Med*, 40, 303-26.
26. FROST, H. M. 1963. *Bone remodelling dynamics*, Thomas.
27. FROST, H. M. 1987. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec*, 219, 1-9.
28. FUENTE, R., GIL-PENA, H., CLARAMUNT-TABERNER, D., HERNANDEZ-FRIAS, O., FERNANDEZ-IGLESIAS, A., HERMIDA-PRADO, F., ANES-GONZALEZ, G., RUBIO-ALIAGA, I., LOPEZ, J. M. & SANTOS, F. 2018. Marked alterations in the structure, dynamics and maturation of growth plate likely explain growth retardation and bone deformities of young Hyp mice. *Bone*, 116, 187-195.
29. GERHARDT, K. J., HUANG, X., ARRINGTON, K. E., MEIXNER, K., ABRAMS, R. M. & ANTONELLI, P. J. 1996. Fetal sheep in utero hear through bone conduction. *Am J Otolaryngol*, 17, 374-9.

-
30. HEFFNER, H. & MASTERTON, B. 1980. Hearing in glires: domestic rabbit, cotton rat, feral house mouse, and kangaroo rat. *J Acoust Soc Am*, 68, 1584-1599.
31. HEFFNER, H. E. & HEFFNER, R. S. 2007. Hearing ranges of laboratory animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 46, 20-2.
32. HOMMA, K., DU, Y., SHIMIZU, Y. & PURIA, S. 2009. Ossicular resonance modes of the human middle ear for bone and air conduction. *J Acoust Soc Am*, 125, 968-79.
33. HUANGFU, M. & SAUNDERS, J. C. 1983. Auditory development in the mouse: structural maturation of the middle ear. *J Morphol*, 176, 249-59.
34. ISON, J. R., ALLEN, P. D. & O'NEILL, W. E. 2007. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex. *J Assoc Res Otolaryngol*, 8, 539-50.
35. JENKINSON, J. W. 1911. The Development of the Ear-Bones in the Mouse. *J Anat Physiol*, 45, 305-18.
36. JEROSCH, J., BADER, A. & UHR, G. 2002. *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*, Georg Thieme Verlag.
37. JILKA, R. L., WEINSTEIN, R. S., BELLIDO, T., PARFITT, A. M. & MANOLAGAS, S. C. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 13, 793-802.
38. JÜPPNER, H. 2011. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl*, 79121, S24-7.
39. KANZAKI, S., ITO, M., TAKADA, Y., OGAWA, K. & MATSUO, K. 2006. Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone*, 39, 414-9.

-
40. KANZAKI, S., TAKADA, Y., NIIDA, S., TAKEDA, Y., UDAGAWA, N., OGAWA, K., NANGO, N., MOMOSE, A. & MATSUO, K. 2011. Impaired vibration of auditory ossicles in osteopetrotic mice. *Am J Pathol*, 178, 1270-8.
41. KARLSON, P. & DOENECKE, D. 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Georg Thieme Verlag.
42. KHURANA, I. 2014. *Textbook of human physiology for dental students*, Elsevier Health Sciences.
43. KINOSHITA, Y. & FUKUMOTO, S. 2018. X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment. *Endocr Rev*, 39, 274-291.
44. KUROKAWA, H. & GOODE, R. L. 1995. Sound pressure gain produced by the human middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 113, 349-55.
45. LANE, N. E., PARIMI, N., CORR, M., YAO, W., CAULEY, J. A., NIELSON, C. M., IX, J. H., KADO, D., ORWOLL, E. & OSTEOPOROTIC FRACTURES IN MEN STUDY, G. 2013. Association of serum fibroblast growth factor 23 (FGF23) and incident fractures in older men: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) study. *J Bone Miner Res*, 28, 2325-32.
46. LAWLOR, M. 2003. A Home For A Mouse. *Psychologists for the Ethical Treatment of Animals*, 8.
47. LEHMANN, B., GENEHR, T., KNUSCHKE, P., PIETZSCH, J. & MEURER, M. 2001. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in an in vitro human skin equivalent model. *J Invest Dermatol*, 117, 1179-85.
48. LÜLLMANN-RAUCH, R. & PAULSEN, F. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme.

-
49. LYSAGHT, A. C., YUAN, Q., FAN, Y., KALWANI, N., CARUSO, P., CUNNANE, M., LANSKE, B. & STANKOVIC, K. M. 2014. FGF23 deficiency leads to mixed hearing loss and middle ear malformation in mice. *PLoS One*, 9, e107681.
50. MACKIE, E. J., AHMED, Y. A., TATARCZUCH, L., CHEN, K. S. & MIRAMS, M. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 46-62.
51. MANOLAGAS, S. C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21, 115-37.
52. MAROTTI, G., FARNETI, D., REMAGGI, F. & TARTARI, F. 1998. Morphometric investigation on osteocytes in human auditory ossicles. *Ann Anat*, 180, 449-53.
53. MASON, M. J. 2013. Of mice, moles and guinea pigs: functional morphology of the middle ear in living mammals. *Hear Res*, 301, 4-18.
54. MATSUO, K., KURODA, Y., NANGO, N., SHIMODA, K., KUBOTA, Y., EMA, M., BAKIRI, L., WAGNER, E. F., TAKEDA, Y., YASHIRO, W. & MOMOSE, A. 2015. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus. *Development*, 142, 3912-20.
55. MIAO, D., BAI, X., PANDA, D., MCKEE, M., KARAPLIS, A. & GOLTZMAN, D. 2001. Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology*, 142, 926-39.
56. MICHELS, H., NEUMANN, C. L. & HOLTERMANN, H. 2007. *Kurzlehrbuch Anatomie*, Elsevier Health Sciences Germany.
57. MILLER, S. C., DE SAINT-GEORGES, L., BOWMAN, B. M. & JEE, W. S. 1989. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*, 3, 953-60; discussion 960-1.

-
58. MILROY, C. M. & MICHAELS, L. 1990. Temporal bone pathology of adult-type osteopetrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 116, 79-84.
59. MIYAGAWA, K., YAMAZAKI, M., KAWAI, M., NISHINO, J., KOSHIMIZU, T., OHATA, Y., TACHIKAWA, K., MIKUNI-TAKAGAKI, Y., KOGO, M., OZONO, K. & MICHIGAMI, T. 2014. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. *PLoS One*, 9, e93840.
60. MIYAMOTO, T. & SUDA, T. 2003. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med*, 52, 1-7.
61. MOHAMMADPOUR, A. A. 2010. Morphological Study of Auditory Ossicles in the Mouse. *J Appl Anim Res*, 37, 269-271.
62. MOLL, K. J. & MOLL, M. 2006. *Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog*, Elsevier, Urban & Fischer.
63. NOUSSIOS, G., CHOURIDIS, P., KOSTRETZIS, L. & NATSIS, K. 2016. Morphological and Morphometrical Study of the Human Ossicular Chain: A Review of the Literature and a Meta-Analysis of Experience Over 50 Years. *J Clin Med Res*, 8, 76-83.
64. O'GORMAN, S. 2005. Second branchial arch lineages of the middle ear of wild-type and Hoxa2 mutant mice. *Dev Dyn*, 234, 124-31.
65. OGAWA, T., ONISHI, T., HAYASHIBARA, T., SAKASHITA, S., OKAWA, R. & OOSHIMA, T. 2006. Dentinal defects in Hyp mice not caused by hypophosphatemia alone. *Arch Oral Biol*, 51, 58-63.
66. OZKIRIS, M., KARACAVUS, S., KAPUSUZ, Z., BALBALOGLU, O. & SAYDAM, L. 2013. Does bone mineral density have an effect on hearing loss in postmenopausal patients? *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 122, 648-52.

-
67. PADMINI, M. 2014. Morphometry of Human Fetal Ear Ossicles: A Human Cadaveric Study. *Br J Med Med Res*, 4, 1873-1882.
68. PALUMBO, C., CAVANI, F., SENA, P., BENINCASA, M. & FERRETTI, M. 2012. Osteocyte apoptosis and absence of bone remodeling in human auditory ossicles and scleral ossicles of lower vertebrates: a mere coincidence or linked processes? *Calcif Tissue Int*, 90, 211-8.
69. PARFITT, A. M. 2002. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2, 499-500.
70. PETERSEN, H. 2013. *Histologie und Mikroskopische Anatomie*, Springer Berlin Heidelberg.
71. PILLION, J. P., VERNICK, D. & SHAPIRO, J. 2011. Hearing loss in osteogenesis imperfecta: characteristics and treatment considerations. *Genet Res Int*, 2011, 983942.
72. PRINER, R., FREEMAN, S., PEREZ, R. & SOHMER, H. 2003. The neonate has a temporary conductive hearing loss due to fluid in the middle ear. *Audiol Neurootol*, 8, 100-10.
73. PURVES, D., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LAMANTIA, A. S., MCNAMARA, J. O., WILLIAMS, S. M. & AUGUSTINE, G. J. 2000. *Neuroscience*, Sinauer Associates.
74. QING, H., ARDESHIRPOUR, L., PAJEVIC, P. D., DUSEVICH, V., JAHN, K., KATO, S., WYSOLMERSKI, J. & BONEWALD, L. F. 2012. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*, 27, 1018-29.
75. RAGGATT, L. J. & PARTRIDGE, N. C. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285, 25103-8.

-
76. RICHANY, S. F., ANSON, B. J. & BAST, T. H. 1954. The development and adult structure of the malleus, incus and stapes. *Q Bull Northwest Univ Med Sch*, 28, 17-45.
77. RICHARD, C., COURBON, G., LAROCHE, N., PRADES, J. M., VICO, L. & MALAVAL, L. 2017. Inner ear ossification and mineralization kinetics in human embryonic development - microtomographic and histomorphological study. *Sci Rep*, 7, 4825.
78. ROLVIEN, T., KRAUSE, M., JESCHKE, A., YORGAN, T., PUSCHEL, K., SCHINKE, T., BUSSE, B., DEMAY, M. B. & AMLING, M. 2017. Vitamin D regulates osteocyte survival and perilacunar remodeling in human and murine bone. *Bone*, 103, 78-87.
79. ROLVIEN, T., SCHMIDT, F. N., MILOVANOVIC, P., JAHN, K., RIEDEL, C., BUTSCHEIDT, S., PUSCHEL, K., JESCHKE, A., AMLING, M. & BUSSE, B. 2018. Early bone tissue aging in human auditory ossicles is accompanied by excessive hypermineralization, osteocyte death and micropetrosis. *Sci Rep*, 8, 1920.
80. ROSCHGER, P., PLENK, H., JR., KLAUSHOFER, K. & ESCHBERGER, J. 1995. A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning Microsc*, 9, 75-86; discussion 86-8.
81. RUCCI, N. 2008. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 5, 49-56.
82. RUPPE, M. D. 1993. X-Linked Hypophosphatemia. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., STEPHENS, K. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews*((R)). Seattle (WA).

-
83. SAKAMOTO, A., KURODA, Y., KANZAKI, S. & MATSUO, K. 2017. Dissection of the Auditory Bulla in Postnatal Mice: Isolation of the Middle Ear Bones and Histological Analysis. *J Vis Exp*.
84. SANTOS, F., FUENTE, R., MEJIA, N., MANTECON, L., GIL-PENA, H. & ORDONEZ, F. A. 2013. Hypophosphatemia and growth. *Pediatr Nephrol*, 28, 595-603.
85. SCHMIDT, F. N., DELSMANN, M. M., MLETZKO, K., YORGAN, T. A., HAHN, M., SIEBERT, U., BUSSE, B., OHEIM, R., AMLING, M. & ROLVIEN, T. 2018. Ultra-high matrix mineralization of sperm whale auditory ossicles facilitates high sound pressure and high-frequency underwater hearing. *Proc Biol Sci*, 285, 20181820.
86. SEITZ, S., RENDENBACH, C., BARVENCIK, F., STREICHERT, T., JESCHKE, A., SCHULZE, J., AMLING, M. & SCHINKE, T. 2013. Retinol deprivation partially rescues the skeletal mineralization defects of Phex-deficient Hyp mice. *Bone*, 53, 231-8.
87. SHETTY, N. S. & MEYER, R. A., JR. 1991. Craniofacial abnormalities in mice with X-linked hypophosphatemic genes (Hyp or Gy). *Teratology*, 44, 463-72.
88. STENBECK, G. 2002. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol*, 13, 285-92.
89. STENFELT, S. 2011. Acoustic and physiologic aspects of bone conduction hearing. *Adv Otorhinolaryngol*, 71, 10-21.
90. SUNYECZ, J. A. 2008. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*, 4, 827-36.
91. TAKAHARA, T. & SANDO, I. 1987. Mesenchyme remaining in temporal bones from patients with congenital anomalies. A quantitative histopathologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 96, 333-9.

-
92. TENG, C. S., YEN, H. Y., BARSKE, L., SMITH, B., LLAMAS, J., SEGIL, N., GO, J., SANCHEZ-LARA, P. A., MAXSON, R. E. & CRUMP, J. G. 2017. Requirement for Jagged1-Notch2 signaling in patterning the bones of the mouse and human middle ear. *Sci Rep*, 7, 2497.
93. TOKARZ, D., MARTINS, J. S., PETIT, E. T., LIN, C. P., DEMAY, M. B. & LIU, E. S. 2018. Hormonal Regulation of Osteocyte Perilacunar and Canalicular Remodeling in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res*, 33, 499-509.
94. TREUTING, P. M., DINTZIS, S. M., FREVERT, C. W., LIGGITT, D., LIGGITT, H. D. & MONTINE, K. S. 2012. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas (Expert Consult)*, Elsevier Science.
95. TSOURDI, E., JAHN, K., RAUNER, M., BUSSE, B. & BONEWALD, L. F. 2018. Physiological and pathological osteocytic osteolysis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 18, 292-303.
96. UCHIHASHI, K., NAKATANI, T., GOETZ, R., MOHAMMADI, M., HE, X. & RAZZAQUE, M. S. 2013. FGF23-induced hypophosphatemia persists in Hyp mice deficient in the WNT coreceptor Lrp6. *Contrib Nephrol*, 180, 124-37.
97. UPALA, S., RATTANAWONG, P., VUTTHIKRAIVIT, W. & SANGUANKEO, A. 2017. Significant association between osteoporosis and hearing loss: a systematic review and meta-analysis. *Braz J Otorhinolaryngol*, 83, 646-652.
98. VAANANEN, H. K. & HARKONEN, P. L. 1996. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas*, 23 Suppl, S65-9.
99. VIDMAR, A. P., MIYAZAKI, B., SANCHEZ-LARA, P. A. & PITUKCHEEWANONT, P. 2017. X-linked Hypophosphatemic Rickets, del(2)(q37.1;q37.3) Deletion Syndrome and Mosaic Turner Syndrome, mos 45,X/46,X, del(2)(q37.1;q37.3) in a 3-year-old Female. *J Bone Metab*, 24, 257-261.

-
100. WALDEYER, A. 2002. *Anatomie des Menschen*, De Gruyter, Germany.
101. WELSCH, U. & DELLER, T. 2010. *Lehrbuch Histologie*, Elsevier, Urban & Fischer.
102. WHYTE, J., CISNEROS, A., YUS, C., OBON, J., WHYTE, A., SERRANO, P., PEREZ-CASTEJON, C. & VERA, A. 2008. Development of the dynamic structure (force lines) of the middle ear ossicles in human fetuses. *Histol Histopathol*, 23, 1049-60.
103. WHYTE, J. R., GONZALEZ, L., CISNEROS, A. I., YUS, C., TORRES, A. & SARRAT, R. 2002. Fetal development of the human tympanic ossicular chain articulations. *Cells Tissues Organs*, 171, 241-9.
104. WILEY, T. L., CHAPPELL, R., CARMICHAEL, L., NONDAHL, D. M. & CRUICKSHANKS, K. J. 2008. Changes in hearing thresholds over 10 years in older adults. *J Am Acad Audiol*, 19, 281-92; quiz 371.
105. WILSON, C. J. & VELLODI, A. 2000. Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Arch Dis Child*, 83, 449-52.
106. WOLFF, J. 1892. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, A. Hirschwald.
107. YANG, Y. Q., TAN, Y. Y., WONG, R., WENDEN, A., ZHANG, L. K. & RABIE, A. B. 2012. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*, 4, 64-8.
108. ZEHNDER, A. F., KRISTIENSEN, A. G., ADAMS, J. C., KUJAWA, S. G., MERCHANT, S. N. & MCKENNA, M. J. 2006. Osteoprotegrin knockout mice demonstrate abnormal remodeling of the otic capsule and progressive hearing loss. *Laryngoscope*, 116, 201-6.

9 Danksagung

Großer Dank gebührt zu allererst meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung im Institut für Osteologie und Biomechanik durchzuführen, sondern mich auch durch das von ihm entgegengebrachte Vertrauen besonders motiviert und gefördert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Tim Rolvien für die hervorragende, außerordentlich intensive wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm für die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft, für zahlreiche konstruktive, wertvolle Ratschläge, Anregungen und Denkanstöße, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Osteologie und Biomechanik für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich meine besondere Wertschätzung und herzlichste Dankbarkeit meiner Familie ausdrücken, dass sie mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mich zu jedem Zeitpunkt grenzenlos vertrauensvoll und aus vollem Herzen unterstützen.

10 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Maximilian Maria Delsmann