

Die Rolle des Fibronektins im Knochen und in der diabeti- schen Nephropathie

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anke Bentmann

geboren in Frankfurt am Main

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 6.10.2008

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikation:

Kawelke N, **Bentmann A**, Hackl N, Hager HD, Feick P, Geursen A, Singer MV, Nakchbandi IA
„An Isoform of Fibronectin Mediates Bone Loss in Patients with Primary Biliary Cirrhosis by Suppressing Bone Formation“ *J Bone Miner Res* 2008, 23(8):1278-1286. (**geteilte Erstautorschaft**)

Tagungsbeiträge:

- | | |
|------------------------------------|--|
| 03/2007 Poster
Osteologie Wien | Bentmann A , Kawelke N, Kasperk C, Felsenberg D, Fässler R,
Nakchbandi IA
„Die Ausschaltung des Fibronektins in den Osteoblasten beeinträchtigt die
Knochendichte“ |
| 03/2007 Vortrag
Osteologie Wien | Kawelke N, Bentmann A , Felsenberg D, Kasperk C, Berger I, Singer M,
Fässler R, Nakchbandi IA
„Onkofötale Fibronektin führt zu einer Verminderung der Knochendichte
und könnte für die hepatische Osteodystrophie verantwortlich sein“ |
| 03/2007 Poster
DGE Salzburg | Bentmann A , Kawelke N, Kasperk C, Felsenberg D, Fässler R,
Nakchbandi IA
“Selective deletion of fibronectin in osteoblasts affects bone density” |
| 03/2007 Poster
DGE Salzburg | Kawelke N, Bentmann A , Felsenberg D, Kasperk C, Berger I, Singer M,
Fässler R, Nakchbandi IA
„Oncofetal fibronectin decreases bone formation and mediates bone loss
in patients with chronic cholestatic liver disease” |
| 09/2007 Vortrag
ASBMR Hawaii | Bentmann A , Kawelke N, Nakchbandi IA
“Selective deletion of fibronectin in osteoblasts affects bone density and
osteoblast function” |
| 09/2007 Poster
ASBMR Hawaii | Kawelke N, Bentmann A , Hackl N, Feick P, Singer MV, Nakchbandi IA
„An isoform of fibronectin is responsible for decreased bone formation in
patients with primary biliary cirrhosis and this effect is not exclusively
mediated by beta1 integrins“ |

- 04/2008 Vortrag **Bentmann A**, Kawelke N, Bala Y, Nakchbandi IA
Osteologie Hannover „Fibronectin aus der Leber ist für eine normale Knochenstruktur unerlässlich“
- 04/2008 Vortrag **Bentmann A**, Kawelke N, Bala Y, Nakchbandi IA
Osteologie Hannover „Die Funktion der Osteoblasten wird von Osteoblasten-spezifischem Fibronectin beeinflusst“
- 05/2008 Poster **Bentmann A**, Kawelke N, Bala Y, Nakchbandi IA
ECTS Barcelona “Circulating plasma fibronectin is needed for a normal bone density”
- 05/2008 Poster **Bentmann A**, Kawelke N, Bala Y, Nakchbandi IA
ECTS Barcelona “Osteoblast fibronectin affects their behavior *in vivo*”
- 05/2008 Poster Kawelke N, **Bentmann A**, Hackl N, Nakchbandi IA
ECTS Barcelona “Bone loss in patients with primary biliary cirrhosis is caused by a fibronectin isoform”

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen..... VIII-XII

I. Einleitung..... 1

I.1. Das Fibronektin 1

I.1.1. Struktur des Fibronektins 1

I.1.1.1. Allgemeiner Aufbau..... 1

I.1.1.2. Entstehung der Isoformen des Fibronektins..... 2

I.1.1.2.1. Alternatives Spleißen der Fibronektin-mRNA 2

I.1.1.2.2. Glykosylierung des Fibronektins 3

I.1.2. Interaktionen des Fibronektins 3

I.1.3. Aufgaben des Fibronektins..... 4

I.1.3.1. Fibronektin in der Embryogenese 4

I.1.3.2. Fibronektin in der Wundheilung und der Hämostase 5

I.1.3.3. Fibronektin kann anti-apoptotisch wirken 5

I.1.4. Die Bedeutung der verschiedenen Fibronektin-Isoformen 6

I.1.4.1. Die variable Region des Fibronektins 6

I.1.4.2. Die EDA-Domäne des Fibronektins 6

I.1.4.3. Die EDB-Domäne des Fibronektins 7

I.1.4.4. Das onkofötale Fibronektin 7

I.2. Die Rolle des Fibronektins im Knochen..... 8

I.2.1. Allgemeine Eigenschaften des Knochens 8

I.2.1.1. Das Skelett..... 9

I.2.1.2. Anatomie des Knochens 9

I.2.2. Die Knochenmatrix..... 10

I.2.2.1. Zusammensetzung der Knochenmatrix..... 10

I.2.2.2. Materialeigenschaften der Knochenmatrix 10

I.2.3. Die Knochenzellen 11

I.2.3.1. Die Osteoblasten-Abstammungslinie 11

I.2.3.1.1. Herkunft der Osteoblasten 11

I.2.3.1.2. Eigenschaften und Funktion der Osteoblasten 13

I.2.3.1.3. Schicksalswege reifer Osteoblasten 13

I.2.3.2. Die Osteoklasten-Abstammungslinie 14

I.2.3.3.	Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten.....	16
I.2.4.	Knochenbildung und Knochenreifung	16
I.2.4.1.	Mögliche Wege der Knochenbildung	16
I.2.4.2.	Über Knochenremodeling zum reifen Lamellenknochen.....	17
I.2.4.3.	Bedeutung des Knochenremodelings	18
I.2.4.4.	Besonderheiten des Knochenremodelings bei Maus und Ratte.....	19
I.2.4.5.	Ausgewählte Hormone und Faktoren des Knochenstoffwechsels	19
I.2.5.	Knochendefekte	20
I.2.5.1.	Osteoporose	20
I.2.5.2.	Weitere Knochendefekte.....	21
I.2.6.	Die Bedeutung des Fibronektins für den Knochen	21
I.2.6.1.	Bindung des Fibronektins an Osteoblasten über Integrine	21
I.2.6.2.	Wirkung des Fibronektins auf Osteoblasten.....	22
I.2.6.3.	Bedeutung des Fibronektins für ein Kollagengerüst.....	22
I.3.	Das Fibronektin und die diabetische Nephropathie.....	24
I.3.1.	Die Niere	24
I.3.1.1.	Anatomie und Funktion der Niere	24
I.3.1.2.	Der Glomerulus.....	25
I.3.2.	Der Diabetes mellitus und seine Folgen.....	26
I.3.2.1.	Krankheitsbild des Diabetes mellitus	26
I.3.2.2.	Die diabetische Nephropathie	27
I.3.2.2.1.	Pathologie und Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie	27
I.3.2.2.2.	Mechanismen der Entstehung einer diabetischen Nephropathie	28
I.4.	Die Mausmodelle	29
I.4.1.	Ausschaltung des Fibronektin-Gens in Mäusen	30
I.4.1.1.	Notwendigkeit konditioneller Fibronektin Knockout-Mäuse.....	30
I.4.1.2.	Die konditionellen Fibronektin Knockout-Mäuse	30
I.4.2.	Weitere Mausmodelle	32
I.4.2.1.	Reporter-Mäuse	32
I.5.	Zielsetzung der Arbeit.....	33
II.	Material und Methode	34
II.1.	Laboraüstattung und Chemikalien/Bioreagenzien	34
II.1.1.	Verwendete Geräte	34

II.1.2.	Herstellerverzeichnis.....	35
II.1.3.	Puffer, Medien und Reagenzien.....	37
II.1.4.	Ausgewähltes Verbrauchsmaterial.....	40
II.1.5.	Verwendete Antikörper und deren Konzentrationen.....	41
II.1.5.1.	Primärantikörper	41
II.1.5.2.	Sekundärantikörper und Streptavidin.....	42
II.2.	Labormethoden	42
II.2.1.	Versuchstiere	42
II.2.1.1.	Wildtypische Mäuse	42
II.2.1.2.	Genetisch veränderte Mauslinien.....	43
II.2.1.2.1.	ColCre-Linie	43
II.2.1.2.2.	MxCre-Linie.....	43
II.2.1.2.3.	AlbCre-Linie	44
II.2.1.2.4.	ROSA-Linie	44
II.2.1.3.	Den Mäusen verabreichte Injektionen.....	44
II.2.1.3.1.	Induktion des Mx-Promoters mit plpC	44
II.2.1.3.2.	Fluoreszenzmarker der Knochenmineralisierung	45
II.2.1.3.3.	BrdU	45
II.2.1.3.4.	Streptozotocin und Insulin (Diabetes-Experiment)	45
II.2.1.4.	Tötung der Mäuse und Entnahme von Blut.....	46
II.2.2.	Zellkultur.....	46
II.2.2.1.	Murine Osteoblasten	46
II.2.2.1.1.	Isolation primärer Calvaria-Osteoblasten	46
II.2.2.1.2.	Kultivierung primärer Calvaria-Osteoblasten.....	47
II.2.2.1.3.	Differenzierung primärer Calvaria-Osteoblasten	47
II.2.2.1.4.	Von Kossa-Färbung der Kalziumphosphat-haltigen Knoten.....	47
II.2.2.1.5.	Immunfluoreszenz-Färbung der Osteoblasten	48
II.2.2.2.	Kultivierung weiterer Zelltypen	48
II.2.2.2.1.	Hybridoma-Kulturen	48
II.2.3.	Nukleinsäure-Methoden	49
II.2.3.1.	Genotypisierung der Mäuse	49
II.2.3.1.1.	DNA-Gewinnung aus Mausgewebe	49
II.2.3.1.2.	PCR-Analyse zur Genotypisierung.....	49
II.2.3.1.3.	Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen zur Genotypisierung	50
II.2.3.2.	DNA-Isolation aus Zellen und PCR.....	50
II.2.3.2.1.	DNA-Isolation aus Zellen.....	50
II.2.3.2.2.	PCR auf genomische DNA kultivierter Osteoblasten.....	50
II.2.3.2.3.	Oligonukleotid-Sequenzen zur PCR auf kultivierte Osteoblasten.....	51

II.2.3.3.	DNA-Gelelektrophorese	51
II.2.4.	Protein-Methoden.....	51
II.2.4.1.	Fibronectin-Isolation und Markierung	51
II.2.4.1.1.	Fibronectin-Isolation (pFN/oFN) über eine Gelatine-Säule.....	51
II.2.4.1.2.	Fibronectin-Depletion des FCS	52
II.2.4.1.3.	Aufkonzentration des isolierten Fibronectins	52
II.2.4.1.4.	Fluoreszenzmarkierung von Fibronectin	52
II.2.4.2.	Proteingewinnung aus Zellen.....	52
II.2.4.3.	Proteinmengenbestimmung	53
II.2.4.4.	Protein-Gelelektrophorese	53
II.2.4.5.	Western Blotting.....	53
II.2.4.5.1.	Protein-Transfer auf eine Membran.....	53
II.2.4.5.2.	Immundetektion von Proteinen nach dem Western Blotting.....	54
II.2.4.6.	ELISA.....	54
II.2.4.6.1.	Gesamt-Fibronectin-ELISA (pFN-ELISA)	54
II.2.4.6.2.	EDA-Fibronectin-ELISA (EDA-ELISA).....	55
II.2.4.6.3.	EDB-Fibronectin-ELISA (EDB-ELISA).....	55
II.2.4.6.4.	Onkofötales Fibronectin-ELISA (oFN-ELISA).....	55
II.2.4.6.5.	Osteokalzin-ELISA	55
II.2.5.	Knochenmethoden	56
II.2.5.1.	Radiologische Messungen von Knochendichte und -architektur.....	56
II.2.5.1.1.	Bestimmung der Knochendichte mittels pQCT.....	56
II.2.5.1.2.	Bestimmung der Ultrastruktur des Knochens mittels μ CT	57
II.2.5.2.	Histologische Untersuchungen mineralisierten Knochengewebes	58
II.2.5.2.1.	Einbettung von Knochenproben in Kunststoff	58
II.2.5.2.2.	Anfertigung der Kunststoffschnitte.....	58
II.2.5.2.3.	Masson-Goldner Färbung der Kunststoffschnitte	59
II.2.5.3.	Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenschnitte	59
II.2.5.4.	Infrarot-Spektroskopie an Knochenproben.....	59
II.2.5.5.	Biomechanische Untersuchungen an Knochenproben	60
II.2.5.5.1.	Bestimmung der Mikrohärtte	60
II.2.5.6.	Untersuchungen an entmineralisierten Knochengeweben	61
II.2.5.6.1.	Entkalkung der Knochenproben	61
II.2.5.6.2.	X-Gal-Färbung entkalkter Knochenschnitte.....	61
II.2.5.6.3.	Immunfluoreszenz-Färbung entkalkter Knochenschnitte.....	61
II.2.5.6.4.	Chromogene Immunfärbung entkalkter Knochenschnitte.....	62
II.2.5.7.	Herstellung von Knochenlysaten.....	62
II.2.5.7.1.	Herstellung von Proteinlysaten für Western Blotting	62
II.2.5.7.2.	Herstellung von Proteinlysaten für eine Hydroxyprolin-Bestimmung	63

II.2.5.8.	Bestimmung des Mineralgehalts des Knochens	63
II.2.5.8.1.	Veraschung der Knochenproben.....	63
II.2.6.	Nierenmethoden.....	64
II.2.6.1.	Gefrierschnitte.....	64
II.2.6.2.	Paraffinschnitte	64
II.2.6.3.	Beurteilung des GSI.....	64
II.2.7.	Statistische Auswertung.....	65
III.	Ergebnisse.....	66
III.1.	Erzeugung der genetisch veränderten Versuchstiere	66
III.2.	Projekt A: Die Rolle des Osteoblasten-Fibronektins.....	67
III.2.1.	Nachweis der Spezifität des Col-Promoters.....	67
III.2.2.	Erfolgreiche Ausschaltung über ColCre in Osteoblasten <i>in vitro</i>	68
III.2.2.1.	Cre-Färbung kultivierter Osteoblasten	68
III.2.2.2.	Isolation genomischer DNA aus den Osteoblasten.....	69
III.2.2.3.	Bestimmung der Fibronektin-Produktion der Osteoblasten.....	69
III.2.3.	<i>In vivo</i> Untersuchungen zum Fibronektin der Osteoblasten.....	70
III.2.3.1.	Fibronektingehalt des Knochens.....	70
III.2.3.1.1.	Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten	70
III.2.3.1.2.	Fibronektin in Knochenlysaten	71
III.2.3.2.	Knochendichte und -architektur	72
III.2.3.2.1.	Untersuchung der Knochendichte mittels pQCT	72
III.2.3.2.2.	Untersuchung der Knochenarchitektur mittels μ CT.....	73
III.2.3.3.	Zusammensetzung der Knochen	74
III.2.3.3.1.	Untersuchung der Knochenkomposition mittels Infrarot-Spektroskopie	74
III.2.3.4.	Histomorphometrische Analyse der Knochen	74
III.2.3.4.1.	Statische Histomorphometrie	74
III.2.3.4.2.	Dynamische Histomorphometrie	76
III.2.3.4.3.	Kombination von statischer und dynamischer Histomorphometrie	77
III.2.3.4.4.	Bestimmung der Raten von Proliferation und Apoptose.....	78
III.2.3.4.5.	Bestimmung der Osteozytenzahlen der ColCre-Linie.....	79
III.2.3.5.	Untersuchung der Blutproben mittels ELISA.....	79
III.2.3.5.1.	Untersuchung des Osteokalzingehalts des Blutes	79
III.2.3.5.2.	Untersuchung des Fibronektingehalts des Blutes	80
III.3.	Projekt B: Die Rolle des Plasmafibronektins der Leber im Knochen	80
III.3.1.	Zirkulierendes Fibronektin gelangt in den Knochen	80

III.3.1.1.	Fibronectin der kranken Leber im Knochen	80
III.3.1.2.	Plasmafibronectin gelangt in den Knochen	81
III.3.2.	Effekt der Ausschaltung des Plasmafibronectins in Mäusen	83
III.3.2.1.	Erfolgreiche Ausschaltung über den Mx- und den Alb-Promoter	83
III.3.2.1.1.	Beweis der Ausschaltung des Plasmafibronectins über ELISA	83
III.3.2.1.2.	Beweis der Ausschaltung des Plasmafibronectins über Western Blotting ..	83
III.3.2.2.	Untersuchung des Fibronectingehalts des Knochens	84
III.3.2.2.1.	Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten	84
III.3.2.2.2.	Untersuchung von Knochenlysaten mittels Western Blotting	85
III.3.2.3.	Knochendichte und -architektur	85
III.3.2.3.1.	Untersuchung der Knochendichte mittels pQCT	85
III.3.2.3.2.	Untersuchung der Knochenarchitektur mittels μ CT	86
III.3.2.4.	Zusammensetzung/Eigenschaften der Knochen	88
III.3.2.4.1.	Untersuchung der Knochenkomposition mittels Infrarot-Spektroskopie	88
III.3.2.4.2.	Untersuchung der Mikrohärtigkeit der MxCre-Linie	88
III.3.2.4.3.	Bestimmung des Kollagengehalts der Knochen	89
III.3.2.4.4.	Bestimmung des Mineralgehalts der Knochen	89
III.3.2.5.	Histomorphometrische Analyse der Knochen	90
III.3.2.6.	Untersuchung des Osteokalzingehalts des Blutes	90
III.3.3.	Injektion von Plasmafibronectin in Mäuse	90
III.3.3.1.	Versuchsaufbau des Plasmafibronectin-Injektionsexperiments	90
III.3.3.2.	Ergebnisse des Plasmafibronectin-Injektionsexperiments	91
III.4.	Projekt C: Fibronectin in der diabetischen Nephropathie	92
III.4.1.	Detektion des Plasmafibronectins in den Glomeruli	92
III.4.2.	Induktion eines Diabetes mellitus in Mäusen	93
III.4.3.	Versuchsaufbau, Grunddaten und Resultate	95
III.4.3.1.	Weniger Todesfälle bei den konditionellen Knockouts	95
III.4.3.2.	Grunddaten der diabetischen Mäuse im Vergleich untereinander	96
III.4.3.3.	Vergleich der diabetischen und nicht-diabetischen Mäuse miteinander	97
III.4.3.4.	Bestimmung der Expansion des Mesangiums	98
III.4.3.5.	Bestimmung des Fibronectingehalts der Glomeruli	100
IV.	Diskussion	102
IV.1.	Die Rolle des Fibronectins im Knochen	102
IV.1.1.	Ausschaltung des Fibronectins der Osteoblasten	102
IV.1.2.	Ausschaltung des Fibronectins in der Leber	104
IV.1.3.	Ursprung des Fibronectins der Knochenmatrix	105

IV.1.4.	Bedeutung des Fibronektins für die Knochenzellen	107
IV.1.5.	Bedeutung des Fibronektins für die Knochenkomposition und die biomechanischen Eigenschaften	112
IV.1.6.	Interpretation der Rolle des Fibronektins im Knochen.....	114
IV.2.	Die Rolle des Fibronektins bei der diabetischen Nephropathie.....	115
IV.2.1.	Herkunft des Fibronektins der Niere.....	115
IV.2.2.	Folgen der Diabetes-Induktion	117
IV.2.3.	Interpretation der Rolle des Fibronektins in der diabetischen Nephropathie	119
IV.2.4.	Ausblick.....	120
V.	Zusammenfassung	122
VI.	Summary.....	123
VII.	Literaturverzeichnis	124
VIII.	Anhang.....	137
VIII.1.1.1.	Abkürzungscode der Aminosäuren	137
VIII.1.1.2.	Abkürzungscode der Nukleotide	137
VIII.1.1.3.	Genetischer Standardcode	137
VIII.1.1.4.	Histomorphometrie nach der ASBMR Nomenklatur.....	138
Lebenslauf*	139
Danksagung*	140-141
Versicherung	142
Veröffentlichung	143-151

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aFN	amniotische Flüssigkeit-Fibronectin
AGE	„advanced glycation end products“
Aj. AR	„adjusted apposition rate“
Alb	Albumin
α MEM	„advanced minimum essential medium“
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
ASBMR	„american society of bone and mineral research“
ATG	Startkodon (Nukleotide mit der Basenfolge Adenin-Thymin-Guanin)
ATP	Adenosintrisphosphat
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
BFU	„bone forming unit“
BFR	„bone formation rate“
BGP	„bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein“ = Osteokalzin
Bp	Basenpaare
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BMD	„bone mineral density“
BMP	„bone morphogenetic protein“
BMU	„bone/basic multicellular unit“
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRU	„bone remodeling unit“
BS	„bone surface“
BSP	„bone sialoprotein“
Bsp.	Beispiel
BV	„bone volume“
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBFA1	„core-binding factor α -1“ = RUNX2
CD	„cluster of differentiation“
c-Fms	CSF-1/M-CSF Rezeptor
cFN	„cellular fibronectin“
CFU-GM	„colony-forming unit-granulocytes/macrophages“
CFU-F	„colony-forming unit-fibroblasts“
CHO	„chinese hamster ovary“
cKO	konditioneller Knockout

Col	2,3 Kb α_1 Typ I Kollagen
Cre	„causes recombination“
CS-1	„connecting segment-1“
CSF	„colony-stimulating factor“
CSF-1	„colony-stimulating factor-1“ = M-CSF
c-src	„cellular-sarcoma“
CT	Kontrolle
CTGF	„connective tissue growth factor“
Cy3	„cyanine 3“
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	„deoxyribonucleotide triphosphate“
DPBS	Dulbecco's PBS
Dsh	Dishevelled
EDA	„extra domain A“
EDB	„extra domain B“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetracetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
engl.	englisch
ERK	„extracellular signal regulated kinase“
F1	Filial 1
F2	Filial 2
FCS	„fetal calf serum“
FGF	„fibroblast growth factor“
fl	floxed (von „flanked by loxP“)
FN	Fibronectin
GFAP	„glial fibrillary protein“
GH	„growth hormone“ = Somatotropin
gla	„ γ -carboxyglutamic acid“
GLUT-1	„glucose transporter 1“
GSI	„glomerular sclerotic index“
Gly-X-Y	Glycin-Aminosäure X-Aminosäure Y
HA	Hydroxylapatit
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HBM	„high bone mass“
H ₂ O _d	destilliertes Wasser

H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HRP	„horseradish peroxidase“
I. E.	internationale Einheiten
i. p.	intraperitoneal
IGF	„insulin-like growth factor“
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
Kan	Kaninchen
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
lacZ-Gen	kodiert β -Galaktosidase
LAP	„latency-associated propeptide“
lat.	lateinisch
LDL	„low density lipoprotein“
LDV	Leucin-Asparaginsäure-Valin
LoxP	„locus of crossing-over“
LRP5/6	„LDL receptor related protein 5/6“
Lsg.	Lösung
LTBP-1	„latent TGF- β binding protein-1“
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP Kinase
M-CSF	„macrophage colony-stimulating factor“ = CSF-1
μ CT	Mikro-Computertomographie
Mit	„mineralization lag time“
MMA	Methylmethacrylat
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
MS	„mineralizing surface“
MSC	Mesenchymale Stammzellen
Mx	„myxovirus resistance 1“
MyoD	„myogenic differentiation 1“
NBF	„neutral buffered formalin“
OB	Osteoblasten
oFN	onkofötale Fibronectin
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand = RANKL
OS	„osteoid surface“

OSF-1	Osteoblasten stimulierender Faktor-1 = Pleiotrophin
OSX	Osterix
OV	„osteoid volume“
PAS	„periodic acid Schiff“
PBS	„phosphate buffered saline“
PBS-T	„phosphate buffered saline“-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	„platelet derived growth factor“
PE	Polyethylen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pFN	Plasmafibronectin
pIpC	„polyinosinic-polycytidylic acid“
PKC	Proteinkinase C
PPAR γ 2	„peroxisome proliferator-activated receptor γ 2“
PHSRN	Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
PTHrP	„PTH-related peptide“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qBEI	„quantitative backscattered electron imaging“
QCT	quantitative Computertomographie
Rac1	„Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“
RANK	„receptor activator of nuclear factor κ -B“
RANKL	„receptor activator of nuclear factor κ -B ligand“
REDV	Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	„ribonucleic acid“
ROSA26R	ROSA26 Reporter
rpm	„rounds per minute“
RUNX2	„Runt related transcription factor 2“ = CBFA1
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Sca-1	„stem cell antigen-1“
SDS	„sodium dodecylsulfate“
shRNA	„short hairpin RNA“
Smad	„small mothers against decapentaplegic“
Smo	Smoothened
Sox9	„SRY (sex determining region Y)-box 9“
sRANKL	„soluble receptor activator of nuclear factor κ -B ligand“

Src	Sarcoma
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	„tris buffered saline“
TBS-T	„tris buffered saline“-Tween
TGF	„transforming growth factor“
TLR4	„toll-like receptor 4“
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	„tartrate-resistant acid phosphatase“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TV	„tissue volume“
u. a.	unter anderem
u. v. m.	und viele mehr
ü. N.	über Nacht
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
vgl.	vergleiche
VR	variable Region
vs.	versus
VTHPGY	Valin-Threonin-Histidin-Prolin-Glycin-Tyrosin
WB	Western Blotting
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

I. Einleitung

I.1. Das Fibronektin

Der Name Fibronektin leitet sich von den lateinischen Begriffen „fibra“ (Faser) und „conectere“ (verknüpfen) ab. Fibronektin ist ein extrazelluläres Protein, das ubiquitär in Geweben und Flüssigkeiten der Wirbeltiere nachgewiesen werden kann [1,2]. Es vermag mit diversen anderen Makromolekülen sowie mit Zellen zu interagieren und spielt für zahlreiche physiologische Prozesse eine Rolle. Die lösliche Variante des Fibronektins im Blut (ca. 300 µg/ml) [3] wird Plasmafibronektin (pFN) genannt und von den Hepatozyten der Leber gebildet. In der extrazellulären Matrix hingegen ist das Fibronektin in Fibrillen organisiert. Das so genannte zelluläre Fibronektin (cFN) kann von verschiedenen Zellarten exprimiert werden. Typische Fibronektin produzierende Zellen sind die Fibroblasten, aber auch spezialisierte Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen, Granulozyten, Myoblasten, Chondrozyten und Osteoblasten können Fibronektin bilden [1]. Die Befähigung sehr vieler und z. T. ganz unterschiedlicher Arten von Zellen zur Fibronektin-Expression unterstreicht dessen Bedeutung für den Organismus.

I.1.1. Struktur des Fibronektins

I.1.1.1. Allgemeiner Aufbau

Fibronektin ist ein großes (ca. 500 kDa), heterodimerisiertes Protein. Je zwei nahezu identische Fibronektin-Monomere sind an ihrem C-Terminus durch zwei Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbunden (Abb. I.1) [1,2]. Funktionell lässt sich jedes Fibronektin-Monomer in mehrere Domänen unterteilen, die aus historischen Gründen nach ihren Bindepartnern benannt sind (z. B. Gelatinebindende-Domäne). Eine allgemein gültige Nomenklatur existiert jedoch nicht, da mehr als ein Bindepartner für jede Domäne vorkommt. Die Domänen setzen sich aus unterschiedlichen Kombinationen dreier Arten von Modulen zusammen (Typ I, II und III), die vermutlich während der Evolution durch mehrere partielle Gen-Duplikationen (Multiplikationen) entstanden sind [4]. Etwa 90% der Aminosäuresequenz des Fibronektins bestehen aus diesen Modulen (15x Typ I, 2x Typ II und 15-17x Typ III). Obwohl verschiedene Isoformen des Fibronektins existieren, werden

doch alle von einem einzelnen Gen kodiert [5]. Sämtliche Isoformen werden daher posttranskriptional gebildet.

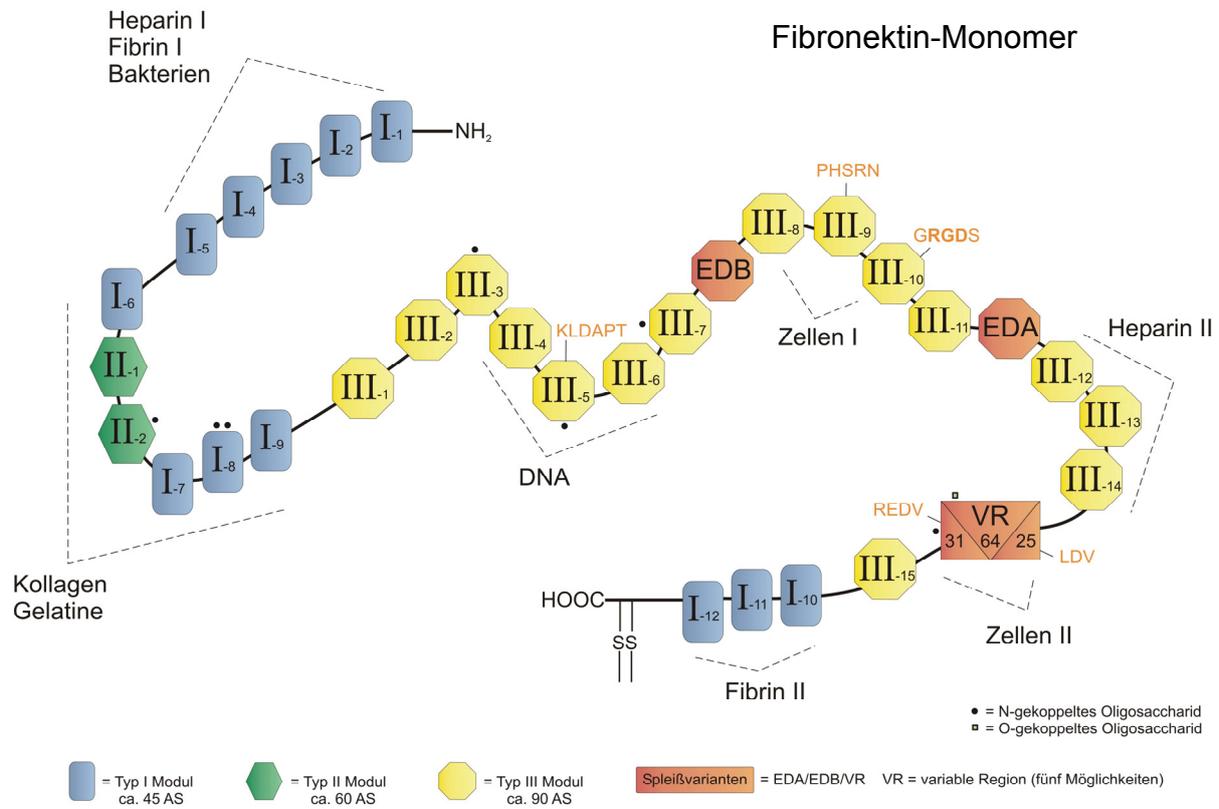


Abbildung I.1: Schematische Darstellung eines Fibronektin-Monomers

Diese Abbildung veranschaulicht grob den Aufbau eines Fibronektin-Monomers (ca. 250 kDa). Die funktionellen Domänen, mögliche Glykosylierungsstellen und einige für die Interaktion des Fibronektins mit Zellen wichtige Peptidsequenzen (letztere in orange) sind dargestellt (Schema in Anlehnung an [1,2,6]).

I.1.1.2. Entstehung der Isoformen des Fibronektins

I.1.1.2.1. Alternatives Spleißen der Fibronektin-mRNA

Eine Ursache für die Existenz verschiedener Fibronektin-Isoformen ist im alternativen Spleißen auf mRNA-Ebene zu finden. Auf diese Weise werden maßgeblich drei Regionen der Fibronektin-mRNA variiert. Die Segmente EDA (auch EDI oder EIIIA) [7] und EDB (auch EDII oder EIIIB) [8] werden entweder komplett entfernt oder verbleiben in der mRNA und somit im Protein (Abb. I.1). Aufgrund dieser Besonderheit kann man diese Module, die in ihrem Grundmuster den Typ III-Modulen zuzuordnen sind, auch als eigenständige Domänen bezeichnen. Die so genannte variable Region (VR) besteht nicht aus Modulen und muss in mindestens einem der beiden Fibronektin-Monomere anwesend sein, damit die Fibronektin-Dimere von den Zellen gebildet und sezerniert werden können [9]. Ein alternativer Name für diesen Bereich ist IIICS (für engl. „type III connecting segment“), da er sich zwischen zwei Typ III-Modulen befindet. Die variable Region selbst

besteht wiederum aus drei Abschnitten (mit einer Länge von 31, 64 und 25 Aminosäuren), die an- oder abwesend sein können, so dass (zumindest beim Menschen) allein durch die variable Region fünf verschiedene Varianten (VR120^{31/64/25}, VR95^{31/64/0}, VR89^{0/64/25}, VR64^{0/64/0}, VR0^{0/0/0}) jedes Fibronectin-Monomers entstehen können [1,10]. Unter Einbezug der voneinander unabhängigen möglichen An- bzw. Abwesenheit der Module EDA und EDB sind beim Menschen somit insgesamt zwanzig verschiedene Spleißvarianten des Fibronectins pro Monomer möglich. Zusätzlich zu den verschiedenen Spleißformen können auch noch posttranslationale Modifikationen erfolgen, z. B. Glykosylierungen.

I.1.1.2.2. Glykosylierung des Fibronectins

Fibronectin wird als ein Glykoprotein bezeichnet, da die angehängten Karbohydrate einen Anteil von 4-10% ausmachen können [6]. Dabei gibt es große Unterschiede zwischen verschiedenen Fibronectin-Varianten, z. B. dem Plasmafibronectin (4-5%) [11] und dem Fibronectin aus amniotischer Flüssigkeit (9-10%) [12]. Grundsätzlich erhöhen Zuckerreste die Stabilität des Fibronectins gegen Hydrolyse [13], aber es sind weitere Effekte denkbar wie eine direkte Wirkung auf Zellen (z. B. über spezifische Rezeptoren). Zumeist sind die Zuckerreste über Stickstoffatome verknüpft, mindestens einmal jedoch auch über ein Sauerstoffatom (Abb. I.1 und I.1.4.4)

I.1.2. Interaktionen des Fibronectins

Bevor Fibronectin genauer charakterisiert werden konnte, hatte es bereits zahlreiche Namen erhalten (wie z. B. engl. „migration-stimulating factor“ und „anti-gelatin factor“), die u. a. aus seiner Eigenschaft resultieren, mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren zu können. So ist Fibronectin in der Lage Kollagen, Fibrin, Fibrinogen, Heparin, Transglutinasen (wie Faktor XIIIa) und zahlreiche weitere Proteine zu binden [1,2]. Des Weiteren haftet Fibronectin an DNA, Bakterien sowie Komponenten des Komplementsystems (C1q) und wirkt so opsonisierend. Insbesondere für die Ausbildung eines Netzwerks ist auch die Eigenschaft des Fibronectins mit sich selbst zu interagieren von entscheidender Bedeutung. Durch die Multimerisation entsteht ein Fibronectingerüst, das wiederum als eine Art Matrice für ein Kollagennetzwerk zu dienen vermag [14]. Auf diese Weise ist das Fibronectin direkt an der Entstehung der extrazellulären Matrix beteiligt und kann als Bestandteil derselben mit Zellen in Kontakt treten.

Fibronectin übt einen Einfluss auf Anhaftung, Wanderung, Proliferation, Differenzierung und viele weitere Funktionen diverser Zelltypen aus [2]. Daher sind die Wechselwirkungen zwischen dem Fibronectin und den Zellen von großer Bedeutung. Die Bindung der Zellen an Fibronectin findet

maßgeblich über Integrine (heterodimerisierte Transmembranproteine) statt. Die zentrale Zellbindende-Domäne des Fibronektins enthält die RGD-Sequenz (steht für die Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure). Dieses Aminosäure-Triplett kommt auch in anderen Proteinen vor (z. B. in Osteopontin, Vitronektin, Fibrillin und Kollagen [15-17]) und wird von den Zellen hauptsächlich über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ erkannt [18]. Beim Fibronektin befindet sich die RGD-Sequenz im Modul III-10 (Abb. I.1). Durch einen Synergieeffekt mit der Sequenz PHSRN (Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin) im Modul III-9 [19] wird zusätzlich eine besonders effiziente Bindung an das Integrin $\alpha_5\beta_1$ erreicht. Dieses Integrin wird aus diesem Grund auch Fibronektin-Rezeptor genannt [6]. Des Weiteren können Zellen auch im Bereich der variablen Region an Fibronektins haften [20]. Im vorderen Bereich der variablen Region liegt die LDV-Sequenz (Leucin-Asparaginsäure-Valin) [21]. Diese wird z. B. von dem Integrin $\alpha_4\beta_1$ [22] erkannt. Eine zweite Stelle in der variablen Region (REDV für Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin) wird ebenfalls von diesem Integrin gebunden [23]. Außerdem vermag die Domäne EDA mit Zellen zu interagieren [24]. Dies geschieht über die Integrine $\alpha_9\beta_1$ und $\alpha_4\beta_1$ [25]. Das Modul EDA führt daneben auch zu einer Verstärkung der Bindung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ an Fibronektin [26,27].

Es ist davon auszugehen, dass bislang noch nicht alle Motive bekannt sind, über welche Wechselwirkungen des Fibronektins mit Zellen stattfinden können. Neben Integrinen kann Fibronektin auch an andere Rezeptoren auf Zellen binden, so z. B. an Syndecan-4 [28] und an CD44 [29], das auch Hyaluronsäure-Rezeptor genannt wird.

I.1.3. Aufgaben des Fibronektins

Fibronektin ist an zahlreichen Abläufen im Organismus beteiligt. Dies wird im Folgenden an ausgewählten Beispielen erläutert.

I.1.3.1. Fibronektin in der Embryogenese

Fibronektin erscheint schon sehr früh während der Embryogenese. In der Maus konnte es bereits vor der Implantation und Gastrulation im Blastozysten-Stadium nachgewiesen werden [30]. *In vitro* Experimente an Trophoblastenzellen ergaben, dass Fibronektin und andere Matrixproteine für deren Migration wichtig sind und dieser Effekt über Integrine auf den Zellen vermittelt wird [31]. Auch bei der Gastrulation, der Entstehung der Somiten und der Ausbildung der Chorda dorsalis scheint Fibronektin von Bedeutung zu sein [1,32,33]. Bei der Morphogenese übt Fibronektin Effekte auf die Zelladhäsion aus und ist an der Organisation des Zytoskeletts und der Basalmembranen beteiligt [1]. Mausembryonen, die kein Fibronektin exprimieren können, versterben bereits *in utero* [33]. Dabei ist interessant, dass Fibronektin im Stadium der Periimplantation

(Zeitspanne von der ungebundenen Blastozyste über die Anhaftung bis zur Differenzierung des Trophoblasten) zwar exprimiert wird, die Embryonen aber auch in Abwesenheit von Fibronectin implantieren und die frühen Stadien der Gastrulation absolvieren können [34].

I.1.3.2. Fibronectin in der Wundheilung und der Hämostase

Ein anderes Beispiel für die Relevanz des Fibronectins zeigt sich bei der Wundheilung. So ist Fibronectin neben Fibrin, den Blutplättchen und den Leukozyten an der Bildung einer provisorischen Matrix des Thrombus (Blutpfropf) beteiligt, die z. B. bei einer Schnittwunde im Zuge der Blutgerinnung entsteht [2,35,36]. Die Bindung von Fibronectin und Fibrin wird durch den Blutgerinnungsfaktor XIIIa kovalent verknüpft [37]. Die auf diese Weise entstandene Fibronectin-Fibrin-Matrix kann als Adhäsionssubstrat für Zellen dienen [38,39]. Bei der Heilung einer Wunde wird Fibronectin vermehrt exprimiert und macht einen großen Teil der neu gebildeten Matrix aus [2]. Untersuchungen an konditionellen Fibronectin-Knockout Mäusen, die kein Plasmafibronectin bilden konnten, ergaben, dass Fibronectin nach einer experimentellen Gefäßverletzung für die Entstehung und Stabilisierung eines Thrombus bedeutend war [36]. Unter Abwesenheit des Plasmafibronectins (Rest 2%) und eines Großteils des Fibronectins der Blutplättchen (Rest 20%) konnte der Thrombus im Mausmodell zwar mit der Gefäßwand verankert werden, die Bindung der Thrombozyten untereinander war jedoch weniger stabil. In der Folge verlangsamte sich das Wachstum des Pfropfs deutlich, da immer wieder Plättchen mit dem Blutstrom verloren gingen. Die Heilung von Wunden dieser Tiere verlief hingegen normal [40]. Dabei konnte in den Wunden zunächst das Fibronectin der Blutplättchen, später das aus dem Wundgewebe stammende Fibronectin nachgewiesen werden.

I.1.3.3. Fibronectin kann anti-apoptotisch wirken

Eine schützende Rolle des im Blut zirkulierenden Fibronectins konnte an Mäusen demonstriert werden, bei denen experimentell eine Ischämie (Mangeldurchblutung) im Gehirn erzeugt wurde [40]. Tiere, deren Plasmafibronectin ausgeschaltet worden war, hatten einen größeren Infarktbereich als ihre wildtypischen Kontrollen. Dies lag vermutlich daran, dass das zirkulierende Fibronectin in den Kontrolltieren über Integrine an die Zellen zu binden vermochte und so zu einer Erhöhung des anti-apoptotischen Signals führte [41,42].

I.1.4. Die Bedeutung der verschiedenen Fibronektin-Isoformen

I.1.4.1. Die variable Region des Fibronektins

Die verschiedenen Spleißvarianten des Fibronektins werden zum einen abhängig vom Entwicklungsgrad des Organismus, zum anderen Zelltyp-abhängig gebildet. Das Plasmafibronektin trägt nur in einer der beiden Monomerketten die variable Region [43]. Das zelluläre Fibronektin der Fibroblasten hingegen zeichnet sich praktisch immer durch die Anwesenheit (zumindest von Teilen) der variablen Region in beiden Monomerketten aus. Dieser Unterschied jener beiden Varianten des Fibronektins ist vermutlich die Ursache dafür, dass bei der Blutgerinnung die Vernetzung des Plasmafibronektins bzw. des zellulären Fibronektins mit Fibrin durch den Faktor XIIIa unterschiedlich verläuft [44]. Dies betrifft die Effizienz, aber auch die Art der Verknüpfungen.

I.1.4.2. Die EDA-Domäne des Fibronektins

EDA-haltiges Fibronektin wird besonders in schnell proliferierenden Geweben gebildet, z. B. bei der Embryonalentwicklung [45]. Doch auch in adulten Geweben kann EDA-positives Fibronektin vorkommen wie in Tumoren [46] oder bei der Wundheilung [47]. Anscheinend wird die Expression des Fibronektins, das EDA enthält, unter Anwesenheit des Zytokins TGF- β (für engl. „transforming growth factor- β “) herauf reguliert [48]. In Entzündungen schaltet EDA-haltiges Fibronektin vermutlich die Immunantwort über eine Aktivierung von TLR4 (für engl. „toll-like receptor 4“) ein [49]. Das Plasmafibronektin beinhaltet die Domäne EDA normalerweise nicht [50] oder zumindest nur in sehr geringen Mengen [51].

EDA-positives Fibronektin wirkt möglicherweise fördernd auf die Metastasierung durch Tumorzellen. So wird berichtet, dass EDA-haltiges Fibronektin die Motilität bestimmter Tumorzelllinien erhöht [52]. *In vitro* Experimente mit CHO Zellen (für engl. „chinese hamster ovary“), in denen EDA-positives Fibronektin überexprimiert wurde, ergaben eine vermehrte Ausdehnung und Migration der Zellen (unabhängig von EDB) [26]. Zusätzlich stellte sich heraus, dass diese Wirkung vermutlich auf eine verstärkte Bindung an den Fibronektin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ zurückging und auch stimulierend für das Fortschreiten des Zellzyklus war [27].

Die EDA-haltige Isoform des Fibronektins ist im Zusammenhang mit weiteren Humanerkrankungen interessant. Für Patienten, die an einer Sepsis (Blutvergiftung durch Infektionserreger) litten, konnte gezeigt werden, dass jene Patienten, die später verstarben, signifikant erhöhte Mengen EDA-positiven Fibronektins in ihrem Blut hatten [53]. Dabei gab es eine negative Korrelation mit

der Leberfunktion. Auch in Patienten mit Diabetes mellitus wurde eine fast 2,5-fache Erhöhung des Fibronektins mit der Domäne EDA festgestellt [54], wobei EDA im Diabetes ein Marker für die Aktivierung der Endothelzellen zu sein scheint und somit vermutlich das Ausmaß an Gefäßschäden reflektiert.

I.1.4.3. Die EDB-Domäne des Fibronektins

Die EDB-Domäne verändert das Fibronektin nicht nur durch reine An- oder Abwesenheit alleine. Es wurde gezeigt, dass bei Anwesenheit des EDB-Moduls durch eine Veränderung der Konformation im benachbarten Bereich III-7 eine kryptische Sequenz exponiert wird, die bei Abwesenheit der EDB-Domäne versteckt ist [55].

Die Expression des EDB-haltigen Fibronektins ähnelt der des EDA-haltigen Fibronektins [56]. Auch EDB wird besonders in stark proliferierenden Geweben gefunden. So ist es ebenfalls in embryonalen Geweben anzutreffen [57] sowie in Tumoren [58] und Wunden [59]. Es wurden positive Effekte von EDB-haltigem Fibronektin auf die Adhäsion und die Ausbreitung von Zellen beschrieben [60]. Ebenso wie für EDA gilt auch für EDB, dass die Expression von EDB-positivem Fibronektin vermutlich durch TGF- β erhöht wird [59]. *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass die Anwesenheit der Domänen EDA oder EDB die Fähigkeit des Fibronektins in eine bereits existierende Matrix einzudringen steigert [61]. Auch für EDB lässt sich festhalten, dass Plasmafibronektin normalerweise zumindest weitestgehend negativ für diese Domäne ist [51].

Des Weiteren gilt EDB-positives Fibronektin als Marker für die Angiogenese [62]. Daher wird die EDB-Domäne sogar als möglicher therapeutischer Angriffspunkt gegen Tumoren untersucht [63]. Eine vorgeschlagene Strategie ist hierbei, ein bioaktives Molekül an ein Antikörperfragment zu koppeln, das spezifisch an die EDB-Domäne des Fibronektins bindet [64].

I.1.4.4. Das onkofötale Fibronektin

Eine weitere Fibronektin-Variante, die besonders in Tumoren und in fötalen Zellen vorkommt, wurde mithilfe des Antikörpers FDC-6 charakterisiert [65]. Dieses spezielle Fibronektin wird auch onkofötale Fibronektin (oFN) genannt. Dieser Name kann zuweilen irreführend sein, da manchmal auch EDB-haltiges Fibronektin als onkofötal bezeichnet wird/wurde. Die Bezeichnung wird aber in der vorliegenden Arbeit ausschließlich für FDC-6-positives Fibronektin verwendet.

Kennzeichen des onkofötalen Fibronektins ist ein besonderer Zuckerrest, der sich in der variablen Region am Threonin des Hexapeptids VTHPGY (Valin-Threonin-Histidin-Prolin-Glycin-

Tyrosin) befindet und über ein Sauerstoffatom angehängt ist [66]. Es handelt sich um ein sialylgalactosyl-N-acetylgalactosaminyl Saccharid (Abb. 1.2), das über ein bestimmtes Enzym, die α -N-Acetylgalactosaminyltransferase, angefügt wird. Dieses Enzym ist zwar auch in normalen Geweben zu finden, aber nur eine besondere Variante dieses Enzyms, die eine veränderte Spezifität aufweist, ist in der Lage diese spezielle Glykosylierung des Fibronektins durchzuführen [67].

Einen besonders hohen Anteil onkofötalen Fibronektins findet man unter anderem in amniotischer Flüssigkeit (Fruchtwasser) [68]. Es wird von den Epithelzellen des Amnions produziert und scheint ein Marker der Membranintegrität zu sein [69,70]. Daher kann bei vorzeitigen Geburtswehen durch eine Bestimmung der Menge des onkofötalen Fibronektins im Zervixschleim schwangerer Frauen mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden, ob eine Geburt in den nächsten 7-10 Tagen wahrscheinlich ist [70].

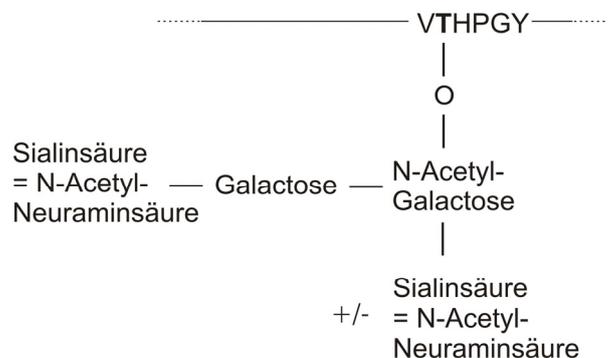


Abbildung 1.2: Sialylgalactosyl-N-acetylgalactosaminyl Saccharid des onkofötalen Fibronektins (oFN) Der dargestellte Zuckerrest, der von dem Antikörper FDC-6 erkannt wird, ist am Threonin der Aminosäure-Sequenz VTHPGY (Valin-Threonin-Histidin-Prolin-Glycin-Tyrosin) angehängt (Schema in Anlehnung an [66]).

I.2. Die Rolle des Fibronektins im Knochen

I.2.1. Allgemeine Eigenschaften des Knochens

Knochen dient der Stabilisierung des Körpers und muss zahlreiche Kriterien zugleich erfüllen. So soll Knochen fest, aber nicht zu schwer, hart, aber auch elastisch sein. Dies wird durch spezielle architektonische, materielle und organisatorische Besonderheiten gewährleistet.

I.2.1.1. Das Skelett

Bei Knochen (lat. „Os“) handelt es sich um ein sehr stabiles, aber dynamisches Bindegewebe, das aus einer mineralisierten organischen Matrix mit darin eingelagerten Zellen besteht. Alle Wirbeltiere (lat. „Vertebrata“) zeichnen sich durch den Besitz eines knöchernen Endoskeletts aus. Das adulte menschliche Skelett im Speziellen ist aus mehr als 200 einzelnen Knochen zusammengesetzt. Die Knochen machen etwa 9% des menschlichen Körpervolumens aus [71]. Am Körpergewicht ist das Skelett sogar zu 17% beteiligt.

Das Skelett dient zum einen als innere Stütze des Körpers und hat zum anderen die Aufgabe, die innen liegende Organe zu schützen. Des Weiteren beherbergen die Knochen das Knochenmark, welches für die Blutbildung verantwortlich ist. Knochen dienen außerdem als Mineralspeicher des Körpers und können das Säure/Base-Gleichgewicht des Blutes abpuffern [72]. Zusätzlich sind sie in der Lage schädliche Stoffe zu binden, ermöglichen das Hören und vieles mehr.

I.2.1.2. Anatomie des Knochens

Innerhalb eines einzelnen Knochens differenziert man den Kortex (auch Kortikalis oder Rindenschicht des Knochens genannt) und die vom Kortex umhüllte innere Schicht, die man als Spongiosa bezeichnet (schwammartige Bälkchenschicht). Die Anteile von Kortex und Spongiosa an den einzelnen Knochen sind sehr unterschiedlich ausgeprägt. Das adulte menschliche Skelett besteht in seiner Gesamtheit aus etwa 80% Kortex und etwa 20% Spongiosa [73].

Die Spongiosa besteht makroskopisch betrachtet aus einem schwamm- oder wabenartigen Netzwerk von Knochenbälkchen (Trabekeln), die horizontal und vertikal verlaufen und untereinander verbunden sind. Durch diese spezielle Struktur des Knochens wird maximale Festigkeit bei minimalem Gewicht erreicht. Die Spongiosa stellt im Vergleich zum Kortex den Hauptteil der Knochenoberfläche. Daher findet die meiste Aktivität am trabekulären Knochen statt [73]. Dies führt dazu, dass Veränderungen in der Dichte des Knochens, in seiner dreidimensionalen Struktur und bezüglich der Knochenzellen im Bereich der Spongiosa am deutlichsten zu sehen sind.

Knochen besteht aus der Knochenmatrix und den Knochenzellen. Im Folgenden wird auf beide Komponenten nacheinander genauer eingegangen.

I.2.2. Die Knochenmatrix

I.2.2.1. Zusammensetzung der Knochenmatrix

Die Knochensubstanz besteht (bezogen auf das Gewicht) grob zu etwa 50-70% aus Mineral, etwa 20-40% aus organischem Material, etwa 5-10% aus Wasser [74] und zu weniger als 3% aus Fetten [75]. Der anorganische Bestandteil, also das Mineral des Knochens, ist maßgeblich alkalisches Karbonapatit (Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ mit 4-6% Anteil an Karbonat). Außer den Hauptbestandteilen des Hydroxylapatits, dem Kalzium und dem Phosphat, findet man im Knochen aber u. a. auch Magnesium, Natrium, Kalium, Chlor, Fluor und weitere Spurenelemente.

Die organische Knochenmatrix (das Osteoid) setzt sich zu etwa 90% aus Kollagen Typ I zusammen [76]. Die Struktur dieses Proteins ist eine rechtsdrehende Tripelhelix, die aus zwei identischen $\alpha_1(\text{I})$ -Ketten und einer $\alpha_2(\text{I})$ -Kette besteht. Die $\alpha_2(\text{I})$ -Kette ähnelt den $\alpha_1(\text{I})$ -Ketten strukturell, wird aber durch ein anderes Gen kodiert. Kollagen Typ I ist sehr reich an der Aminosäure Glycin (ca. 33%, typisches $(\text{Gly-X-Y})_n$ -Muster) und enthält außerdem große Mengen Prolin und Hydroxyprolin [77]. Die für Kollagen weitestgehend spezifische Aminosäure Hydroxyprolin entsteht durch Hydroxylierung des Prolins. Dieser Prozess ist Vitamin C-abhängig [78]. Das Kollagen Typ I des Knochens wird von den Osteoblasten als Pro-Kollagen („Precursor“) sezerniert und dann proteolytisch gespalten, so dass sich je drei Ketten zum Tropokollagen verdrillen. Diese Kollagen-Helices lagern sich zu Fibrillen (ca. 100-200 nm Durchmesser) und letztere wiederum zu dicken Fasern (Durchmesser ca. 20 μm) zusammen. In den freien „Löchern“ zwischen den Kollagenfibrillen beginnen sich im Zuge der Mineralisierung Kristalle abzulagern. Mit zunehmender Knochenreife vergrößern sich diese Kristalle durch Wachstum und Aggregation [79,80]. Neben Kollagen beinhaltet die Knochenmatrix jedoch noch zahlreiche weitere Proteine wie z. B. Osteokalzin, Osteonektin, Dekorin, alkalische Phosphatase, Knochen Sialoprotein, Matrix Gla Protein, Vitronektin, Osteopontin und Fibronektin [75].

I.2.2.2. Materialeigenschaften der Knochenmatrix

Der hohe Mineralgehalt bewirkt die Festigkeit und Steifheit des Knochengewebes, wobei zum Ausgleich eine gewisse Elastizität und Flexibilität durch die organische Matrix gewährleistet wird. So entsteht eine ideale Kombination, die verhältnismäßig starke Stoß-, Torsions- und Zugkräfte aushält. Gesunder Knochen vereint Biege- und Bruchfestigkeit (Elastizität gegen Steifheit) in optimaler Abstimmung miteinander. Hierbei sind die in der englischen Literatur verwendeten Begriffe besonders präzise. So ist gegen „stress“ (Kraft pro Flächeneinheit) eine hohe Festigkeit des Gewebes nötig, wohingegen der Begriff „strain“ (Veränderbarkeit der Form/Länge durch Kräfte)

die Verformbarkeit des Materials beschreibt. Die „toughness“ gibt den Bruchwiderstand eines Knochens an. Zu harter Knochen ist spröde und splittert leicht (Hypermineralisierung, z. B. die so genannten Glasknochen bei Osteogenese imperfecta), zu weicher Knochen hingegen kann sich verformen (Hypomineralisierung, z. B. bei Rachitis und Osteomalazie).

I.2.3. Die Knochenzellen

I.2.3.1. Die Osteoblasten-Abstammungslinie

I.2.3.1.1. Herkunft der Osteoblasten

Jene Zellen, die für die Knochenbildung zuständig sind, werden Osteoblasten genannt. Osteoblasten entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen, die sich außer zu Osteoblasten auch zu Adipozyten (Fettzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen), Myoblasten (Muskelzellen), Stromazellen und Fibroblasten (Bindegewebszellen) entwickeln können [81-83] (Abb. I.3). An der Reifung der Osteoblasten aus den mesenchymalen Stammzellen heraus sind vor allem der Wnt/ β -Catenin Signalweg und damit die osteogenen Transkriptionsfaktoren CBFA1/RUNX2 (für engl. „core-binding factor α -1/Runt related transcription factor 2“) und Osterix beteiligt. Prä-Osteoblasten sitzen in zweiter Reihe hinter den reifen Osteoblasten und haben noch Proliferationspotential, das bei der Reifung zum Osteoblasten aufgegeben wird [84].

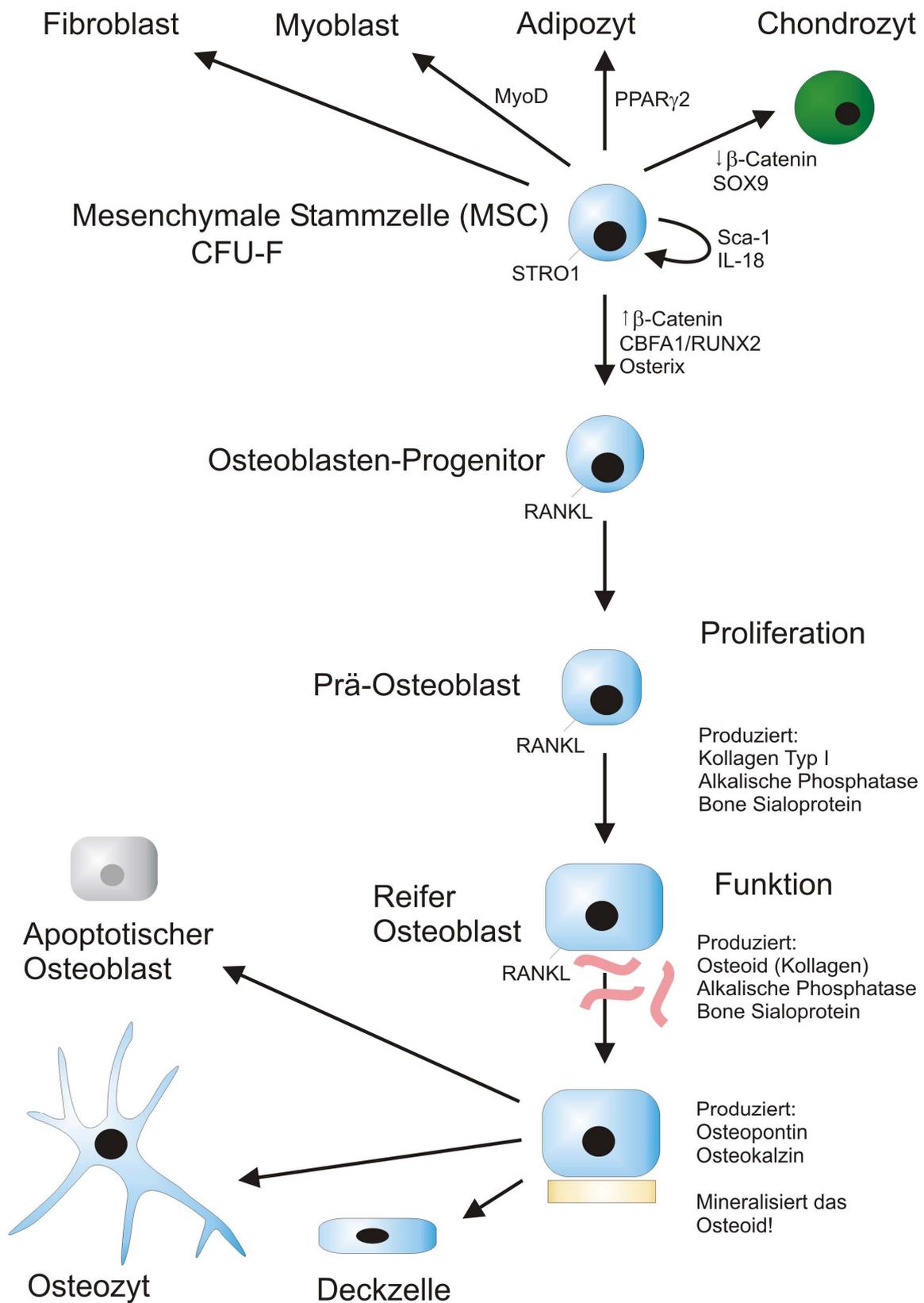


Abbildung 1.3: Entstehung der Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen

Dieses Schema veranschaulicht grob die Entstehung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen sowie das weitere Schicksal der Osteoblasten (Schema in Anlehnung an [85]).

I.2.3.1.2. Eigenschaften und Funktion der Osteoblasten

Aktive humane Osteoblasten sind etwa 20 µm groß, würfelförmig plump geformt und perl-schnurartig wie Palisaden nebeneinander aufgereiht am Ort aktiver Knochenbildung anzutreffen. In Zellkultur sind Osteoblasten äußerlich praktisch nicht von Fibroblasten zu unterscheiden [86]. Daher kann man sie gewissermaßen auch als spezialisierte Fibroblasten betrachten. Der wichtigste Marker, der zumindest mineralisierende Osteoblasten von Fibroblasten abhebt, ist die Produktion von Osteokalzin [87,88].

Reife Osteoblasten sondern eine unmineralisierte organische Matrix ab, die Kollagenfibrillen enthält und als Osteoid bezeichnet wird. Durch Ausschüttung des Enzyms alkalische Phosphatase (AP) bereiten sie das produzierte Osteoid im Anschluss an dessen Ablagerung auf seine Mineralisierung vor und sorgen so für die Einlagerung des Kalziumphosphates [89]. Die Umschaltung von Osteoid-Produktion auf Mineralisierung zeigt sich an ihrem Expressionsprofil. Mineralisierende Osteoblasten produzieren neben Osteokalzin auch Osteopontin und Knochen Sialoprotein (BSP für engl. „bone sialoprotein“) [90], mit deren Hilfe sie den Mineralisierungsprozess modulieren. Dabei ist hervorzuheben, dass die Mineralisierung in zwei Schritten verläuft: Zunächst wird das Osteoid innerhalb weniger Tage auf 70% des endgültigen Mineralgehalts mineralisiert (primäre Mineralisation) [91], die anschließende Mineralisierung auf 100% kann Monate bis Jahre in Anspruch nehmen (sekundäre Mineralisation) [92].

I.2.3.1.3. Schicksalswege reifer Osteoblasten

Ist eine Osteoblastengruppe mit dem Prozess der Knochenbildung fertig, so können die einzelnen Zellen hauptsächlich drei verschiedene Schicksalswege einschlagen:

50 bis 80% der Osteoblasten sterben durch Apoptose [93]. Die verbleibenden Zellen verwandeln sich entweder in abgeflachte, „inaktive“ Deckzellen (engl. „bone lining cells“), die auf dem neu entstandenen Knochen verbleiben und diesen bedecken, oder sie werden in die Knochen-substanz mit eingebaut. Diese ausdifferenzierten Osteoblasten werden als Osteozyten bezeichnet [94]. Die Osteozyten bleiben in der mineralisierten Knochenmatrix und verschmelzen untereinander zu einem Synzytium [94]. Ihre Zellkörper sitzen in Lakunen, stehen aber durch zahlreiche lange Zellfortsätze, die durch Kanälchen (lat. „Caniculi“) verlaufen, miteinander sowie auch mit den Zellen an der Knochenoberfläche in Verbindung.

Den Osteozyten werden verschiedene Aufgaben zugeschrieben wie z. B. eine Funktion als Messfühler für mechanische Beanspruchung und Belastung des Knochens [95]. Das Verhalten der Osteozyten in ihrer Gesamtheit lässt sich mit dem eines neuronalen Netzwerks vergleichen [96].

Mehrere Untersuchungen haben ergeben, dass lebendige Osteozyten die Aktivierung von Osteoklasten (s. I.2.3.2) verhindern können, wohingegen sterbende oder apoptotische Osteozyten Signale aussenden, die möglicherweise in der Lage sind Osteoklasten zu rekrutieren [97-100]. Das Absterben der Osteozyten ist ein möglicher Grund für eine erhöhte Frakturrate, z. B. bei Patienten, die unter einer Strahlennekrose (Gewebsstod durch ionisierende Strahlung) leiden [101,102].

I.2.3.2. Die Osteoklasten-Abstammungslinie

Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab, genauer aus der Monozyten/Makrophagen-Linie [103] (Abb. I.4). Humane Osteoklasten sind mit 50-100 µm Größe sehr große Zellen und besitzen mehrere Zellkerne (4-20 Stück), da sie durch Fusion ihrer Vorläuferzellen entstehen.

Die Osteoklasten können gewissermaßen als Gegenspieler der Osteoblasten betrachtet werden. Sie vermögen es Knochen abzubauen, indem sie einen speziellen Falten- oder Bürstensaum (engl. „ruffled border“) in Richtung des Knochens ausbilden und darunter, in einen lokal begrenzten und abgeschirmten Bereich (der Howship-Lakune), starke Säuren und spezielle Proteasen sezernieren. Darunter sind die Kollagenasen Cathepsin K [104] und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) [105,106], die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) [107] und die Gelatinase [108]. Damit sich Osteoklasten an eine bestimmte Stelle des Knochens setzen, ist eine Bindung ihrer Integrine an die extrazelluläre Knochenmatrix erforderlich [109]. Die Anhaftung der Osteoklasten findet mit Hilfe dynamischer Strukturen statt, den Aktin-reichen Podosomen. Bei deren Bildung sind Adhäsions-Kinasen beteiligt, u. a. das Proto-Onkogen c-src [110].

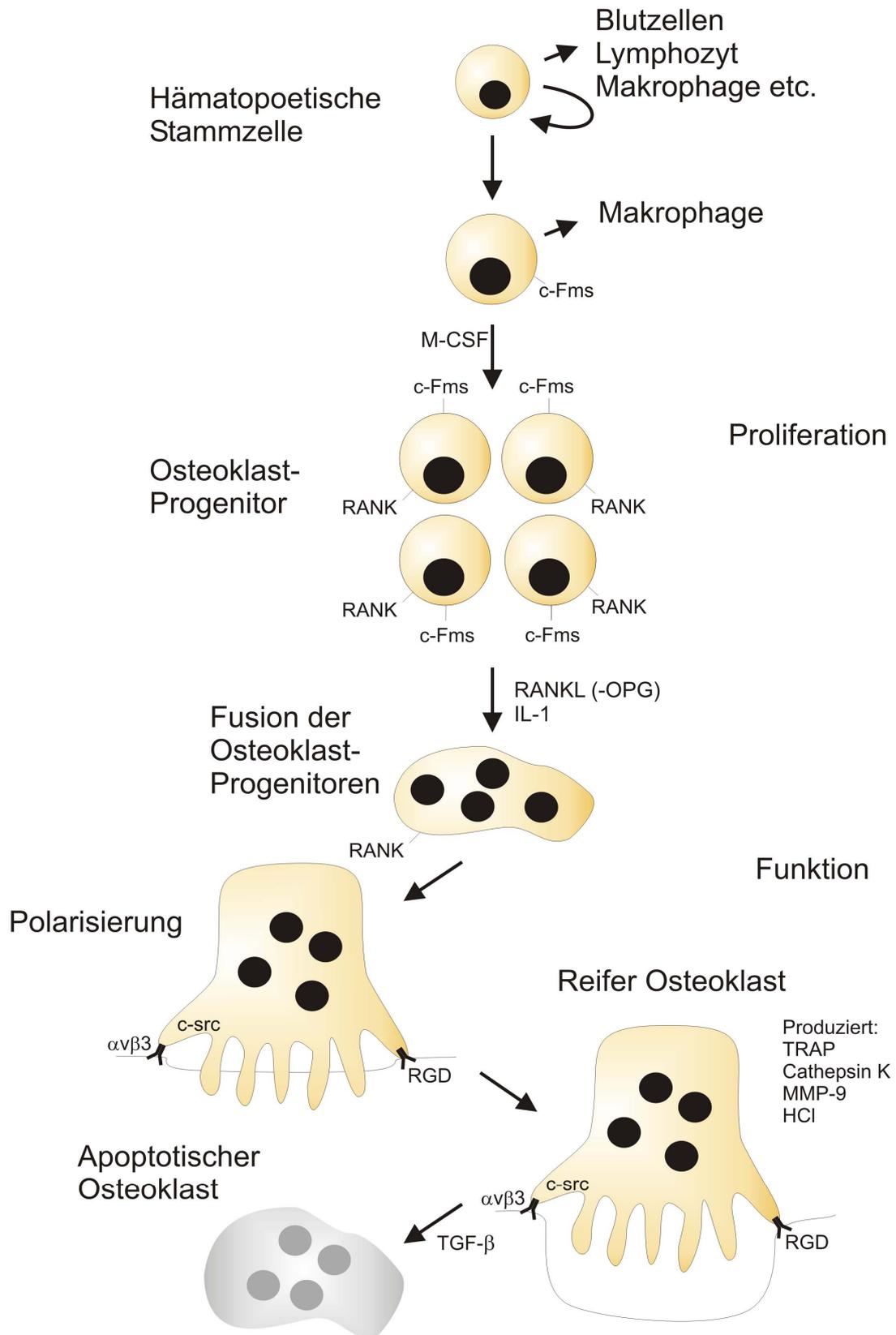


Abbildung I.4: Entstehung der Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen
 Dieses Schema zeigt die Zellen der Osteoblasten-Linie (Schema in Anlehnung an [111]).

I.2.3.3. Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten

Osteoblasten und Osteoklasten interagieren auf verschiedene Art und Weise direkt miteinander. Die Osteoklasten-Vorläuferzellen besitzen beispielsweise einen Rezeptor, der RANK genannt wird (für engl. „receptor activator of nuclear factor κ -B“) [112]. Zellen der Osteoblasten-Linie können über den RANK Ligand (RANKL) [113] die Entstehung und Aktivität der Osteoklasten fördern oder sie durch Expression von Osteoprotegerin (OPG) hemmen (RANK/RANKL/OPG-System). Ein weiterer sehr wichtiger Faktor für Entstehung von Osteoklasten ist M-CSF (für engl. „macrophage colony-stimulating factor“) [114]. Auch M-CSF kann von Zellen der Osteoblasten-Linie gebildet werden [115] und bindet auf den Osteoklasten an seinen Rezeptor c-Fms [116].

I.2.4. Knochenbildung und Knochenreifung

Der Prozess der Knochenbildung und Knochenreifung unterliegt einer komplexen Regulation, an der die Knochenzellen, aber auch exogene Faktoren beteiligt sind.

I.2.4.1. Mögliche Wege der Knochenbildung

Ab der neunten Schwangerschaftswoche beginnt beim menschlichen Fötus die Knochenbildung (Osteogenese). Hierbei kann der Knochen entweder aus Bindegewebe (desmal, engl. „intramembranous“) oder aus Knorpelgewebe (enchondral, engl. „endochondral“) entstehen.

Die häufigere Möglichkeit zur Entstehung von Knochenmaterial ist die enchondrale Ossifikation. Sie basiert auf dem Vorhandensein von Knorpelgewebe als eine Art Matrice, die durch Knochengewebe ersetzt wird. Mesenchymzellen wandern hierzu in den Knorpel ein und differenzieren dort zu Osteoblasten, wobei der so genannte Ersatzknochen entsteht. Beispiele für diesen Prozess sind die epiphysealen Wachstumsfugen (Abb. I.5), an denen vorwiegend das Längenwachstum der Röhrenknochen stattfindet. Es ist besonders hervorzuheben, dass die Knochenbildung gerichtet erfolgt, das bedeutet, die Trabekel sprossen ins Innere des Knochens hinein aus. Dazu proliferieren die Chondrozyten in Reihen aufgestapelt zur Knochenmitte hin. Je weiter sie ins Knocheninnere gelangen, desto schlechter ist ihre Umgebung durchblutet. Sie vergrößern sich, werden hypertroph und sterben. Vor ihrem programmierten Zelltod reichern sie Kalzium in ihren Mitochondrien an, das sie bei ihrer Apoptose in die umliegende Matrix abgeben, wodurch sie deren Verkalkung sowie das Einwandern von Blutgefäßen und Prä-Osteoblasten in den Knorpel fördern.

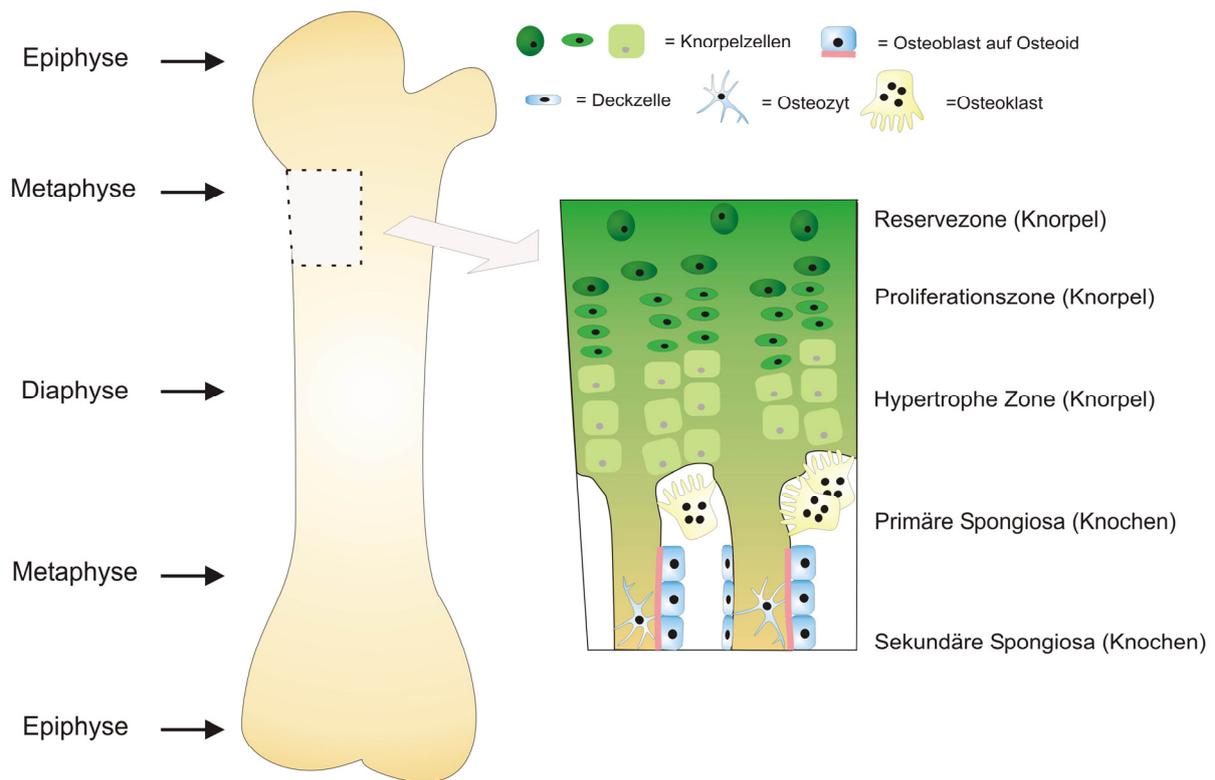


Abbildung I.5: Knochenübersicht und Schema einer Epiphyse

Dieses Schema soll den Ablauf der Knochenbildung an den epiphysealen Wachstumsfugen illustrieren. Die primäre Spongiosa ist ein Ort starker Aktivität des Auf- und Abbaus des Knochens (Schema in Anlehnung an [117]).

I.2.4.2. Über Knochenremodeling zum reifen Lamellenknochen

Unabhängig davon, ob eine Osteogenese desmalen oder enchondralen Art ist, handelt es sich bei dem zunächst gebildeten Knochenmaterial um ein eher unregelmäßiges knöchernes Gewebe, das aufgrund seiner Struktur als Faser- oder Geflechtknochen bezeichnet wird. Dieser „unreife“ Knochen reift beim Menschen noch vor dessen Geburt zu einem organisierten Lamellenknochen heran. Bei diesem so genannten Remodeling des Knochens werden vier Schritte durchlaufen: Aktivierung, Resorption, Aufhebung und Knochenbildung (Abb. I.6). Bei der Aktivierung wird die vormals ruhende Knochenoberfläche angeregt. Hierzu ist die Rekrutierung einkerniger Osteoklasten-Vorläuferzellen erforderlich, die zu mehrkernigen Prä-Osteoklasten verschmelzen [118]. Beim zweiten Schritt, der Resorption, erfährt der Osteoklast eine Polarisierung, in deren Zuge ein besonderes, abgeschirmtes Mikromilieu entsteht. In der Resorptionsphase pumpt der Osteoklast Säure in den Resorptionsbereich, so dass der pH auf Werte um 4,5 abfällt [119,120]. Des Weiteren werden lysosomale Enzyme abgegeben. Im Anschluss an seine resorptive Tätigkeit stirbt der Osteoklast durch Apoptose (Schritt drei, die Aufhebung). Dabei werden Prä-Osteoblasten rekrutiert, um die entstandene Röhre in konzentrischen Lagen wieder mit Knochen aufzufüllen (Schritt vier, die Knochenbildung).

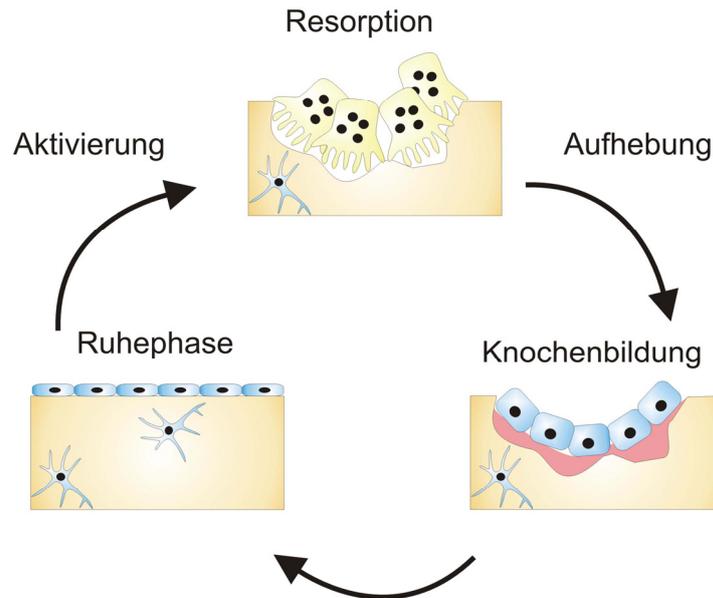


Abbildung 1.6: Schema des Knochenremodelings

Das Knochenremodeling läuft in mehreren aufeinander folgenden Schritten ab (Schema in Anlehnung an [121]).

Durch diesen Prozess des Remodelings entstehen die sekundären Osteone. In der Mitte des aus konzentrischen Lagen von Knochenlamellen entstandenen, röhrenartigen Zylinders verbleibt ein kleiner Kanal (Havers-Kanal), in welchem sich Blutgefäße, einige perivaskuläre Zellen sowie eine Nervenfasern befinden. Der reife Lamellenknochen besteht ausschließlich aus diesen Osteonen und ist somit im Gegensatz zum Geflechtknochen hoch organisiert. Diese besondere Organisation ist auch für die speziellen biomechanischen Eigenschaften des Lamellenknochens verantwortlich.

1.2.4.3. Bedeutung des Knochenremodelings

Neben seiner Bedeutung für den Mineralhaushalt des Körpers, ist das intensive Remodeling, welches der Knochen eines erwachsenen Menschen ständig erfährt, nötig, um die mechanischen Eigenschaften des Knochens zu gewährleisten. Beim Menschen durchlaufen pro Jahr vier bis zehn Prozent des Skeletts ein Remodeling [122], so dass sich der gesamte Knochen etwa alle zehn Jahre komplett erneuert hat. Aufgrund des deutlich größeren Anteils an der Knochenoberfläche ist die „turn-over“ Rate in der Spongiosa bis zu zehnmal höher als im Kortex [72].

Mechanische Belastung stimuliert die Knochenbildung und unterdrückt die Knochenresorption, so dass mehr Knochen auf- als abgebaut wird [123]. Fehlende Belastung führt daher umgekehrt zu einer Abnahme der Knochenmasse [124]. Durch Belastung entstehen Spannungen in der Knochenmatrix, die den Fluss der Interstitialflüssigkeit durch Lakunen und kleine Kanäle (Canaliculi) beeinflussen [125]. Scherkräfte wirken dort auf Osteoblasten und Osteozyten ein und führen zu

biochemischen Signalen. Bei dieser Mechanotransduktion, die netto zur Knochenmassenzunahme durch Belastung führt, wird (zumindest im Mausmodell) unter anderem die Expression des Fibronektin-Gens in den Osteoblasten herauf reguliert [126].

I.2.4.4. Besonderheiten des Knochenremodelings bei Maus und Ratte

Im Gegensatz zum Menschen und anderen größeren Säugetieren [127], findet bei kleinen Nagetieren wie Maus und Ratte [128-130] keine sekundäre Knochenreifung des Kortex mit Ausbildung typischer sekundärer Osteone statt. Da das Remodeling bei der Maus eher an das Wachstum des Tieres angepasst ist, bleiben zahlreiche Kortexbereiche, inklusive der Osteozyten, bis zum Lebensende des Tieres erhalten. Passend dazu schließt sich die Wachstumsfuge bei Maus und Ratte nicht, sondern bleibt deren ganzes Leben lang knorpelig und bildet Trabekel [131]. Die Zahl der Trabekel scheint dabei in Abhängigkeit vom Mausstamm genetisch determiniert zu sein [132]. Durch das rasche „turn-over“ der Spongiosa lässt sich ein Effekt auf die Knochendichte und Knochenzellen in experimentellen Tiermodellen besonders gut an den Trabekeln untersuchen.

I.2.4.5. Ausgewählte Hormone und Faktoren des Knochenstoffwechsels

Vitamin D: Mit der Nahrung nimmt der Körper Vitamin D in Form des Provitamins Calciferol auf und wandelt es über mehrere Schritte in das Vitamin D-Hormon Calcitriol um. Durch Calcitriol werden Kalzium und Phosphat vermehrt aus dem Darm rückresorbiert. Calcitriol ist für die Bildung von Osteoklasten und für die korrekte Mineralisation des Knochens durch die Osteoblasten relevant [118,133]. Die Sekretion des Parathormons wird durch Calcitriol indirekt vermindert.

Parathormon (PTH): ist ein Nebenschilddrüsenhormon, das bei niedrigem Blutkalziumspiegel ausgeschüttet wird. Im Knochen bewirkt Parathormon eine Zunahme der Knochenresorption (mehr Kalzium kommt ins Blut), aber auch eine Zunahme der Knochenbildung [134]. Als Antagonist des Parathormons kann man hingegen das Kalzitronin bezeichnen. Dieses Schilddrüsenhormon wird bei hohem Kalziumblutspiegel frei und hemmt die Knochenresorption.

Östrogene: spielen beim Erhalt der Knochenmasse eine Rolle. Sie erhöhen die Osteoblasten-Aktivität und verringern die Verschmelzung der Vorläuferzellen der Osteoklasten [135].

TGF- β : (für engl. „transforming growth factor- β “) beeinflusst vermutlich die Differenzierung von Osteoblasten und Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Rolle von TGF- β ist dabei nicht unstrittig, da wahrscheinlich konzentrationsabhängig divergierende Effekte erzeugt werden [136]. Vermutlich ist TGF- β_1 in frühen Phasen der Osteoblasten-Differenzierung fördernd, indem z. B. über Chemoattraktion mehr Osteoblasten-Vorläuferzellen rekrutiert werden. In späteren Phasen wirkt es aber verzögernd auf Differenzierung, Mineralisierung und Apoptose der Osteoblasten [137]. Die BMPs (für engl. „bone morphogenetic proteins“) gehören zur TGF- β -

Superfamilie und spielen sowohl bei der Reifung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen eine Rolle als auch für die Funktionen reifer Osteoblasten.

Osteokalzin: (auch BGP, engl. „bone gla protein“ genannt für „bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein“) ist ein Protein der Knochenmatrix, dessen Serumspiegel einen spezifischen biochemischen Parameter der Knochenneubildung darstellt [138,139].

I.2.5. Knochendefekte

I.2.5.1. Osteoporose

Es gibt zahlreiche Defekte und Krankheiten, die mit Knochen im Zusammenhang stehen. Der häufigste Knochendefekt ist die Osteoporose (Knochenschwund). Osteoporose ist eine Erkrankung, die auf eine verminderte Knochenmasse zurückgeht. Kennzeichnend sind eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens (Verlust von Spongiosa, Ausdünnung des Kortex) und vor allem ein erhöhtes Frakturrisiko (z. B. für Wirbel- und Oberschenkelhalsbrüche). Osteoporose ist ein Gesellschaftsproblem [140-142], denn die meisten Brüche, welche Menschen im Alter von mehr als 65 Jahren erleiden, gehen auf eine Osteoporose zurück [141,143]. Für die Entstehung einer Osteoporose gibt es zahlreiche mögliche Ursachen. Die primäre (idiopathische) Osteoporose wird u. a. durch ein hohes Lebensalter, Östrogenmangel bei Frauen nach der Menopause und genetische Veranlagung hervorgerufen. Sekundäre Osteoporosen können z. B. durch Arzneimittel (wie Kortison), Alkoholmissbrauch oder verschiedene Stoffwechselerkrankungen (Hyperparathyreoidismus etc.) entstehen.

Zur Diagnose einer Osteoporose wird u. a. die Knochendichte (BMD für engl. „bone mineral density“) ermittelt. Hierzu werden verschiedene Verfahren eingesetzt, die mit Röntgenstrahlung arbeiten. Ein Verfahren, das es ermöglicht die volumetrische physikalische Dichte des Knochens in mg/cm^3 zu bestimmen ist die quantitative Computertomographie (QCT) [144]. Dennoch lässt die Knochendichte keine direkten Rückschlüsse auf die Knochenqualität zu. Als ausschlaggebend für die Knochenqualität werden vier Faktoren beschrieben [145]: das Verhältnis von Mineral und Matrix bzw. der Mineralisierungsgrad, die Anzahl der Mikroschäden, die Architektur sowie die Rate des Gesamtumsatzes des Knochens (engl. „bone turn-over“). Alle vier Faktoren können bei einer Osteoporose beeinträchtigt sein.

Um die Eigenschaften eines Knochens zu bestimmen, werden zahlreiche Methoden eingesetzt [76]. So kann über die histomorphometrische Analyse von Knochenschnitten eine Aussage über die Aktivität der Zellen getroffen werden. Die Infrarot-Spektroskopie ermöglicht es die Komposi-

tion des Minerals und die Eigenschaften der Matrix zu untersuchen. Die Mikro-Computertomographie (μ CT) gibt Aufschluss über die Knochenarchitektur einer Probe und mechanische Tests wie die Mikroindentation ermitteln die biomechanischen Eigenschaften eines Knochens.

I.2.5.2. Weitere Knochendefekte

Hepatische Osteodystrophie: Als hepatische Osteodystrophie wird die Osteopenie (eine Vorstufe der manifesten Osteoporose) sowie die Osteoporose bezeichnet, die durch eine Lebererkrankung entstehen kann [146]. Eine wichtige Rolle spielt dabei eine Isoform des Fibronektins. Eigene Untersuchungen unserer Gruppe über diesen Zusammenhang wurden bereits publiziert [51] (Publikation im Anhang) und es wird in der vorliegenden Arbeit nur kurz darauf eingegangen.

Osteomalazie: Die Osteomalazie ist eine Knochenstörung mit verzögerter und verminderter Mineralisation. Die Kinderform (Rachitis) ist inzwischen durch vorbeugende Vitamin D-Gabe sehr selten geworden. Die mangelnde Mineralisierung des Knochens bei dieser Erkrankung kann zur Verformung der Knochen führen (z. B. einer Verbiegung der langen Knochen; O-Beine).

Osteogenese imperfecta: ist eine angeborene Knochenstörung und wird durch Mutationen im Kollagen Typ I-Gen verursacht [147], die dazu führen, dass die Organisation und der Aufbau des Kollagens gestört sind. Die Krankheitsausprägung kann je nach Mutationsart sehr unterschiedlich stark ausfallen. Erhöhte Knochenbrüchigkeit, Verformungen des Knochens sowie allgemeine Bindegewebsstörungen sind bei Osteogenese imperfecta möglich.

Osteopetrose: Bei der Osteopetrose (auch Osteosklerose oder Marmorknochenkrankheit) ist die Knochenresorption der Osteoklasten beeinträchtigt und die Knochendichte daher übermäßig hoch. Der Verlauf variiert von einer leichten Form mit Verminderung der dynamischen Belastbarkeit bis hin zu tödlichem Ausgang u. a. durch Knochenmarksverdrängung aufgrund des starken Trabekelgehalts der Knochen und einer Einklemmung von Hirnnerven.

I.2.6. Die Bedeutung des Fibronektins für den Knochen

I.2.6.1. Bindung des Fibronektins an Osteoblasten über Integrine

Es ist nicht völlig klar, welche Integrine von Osteoblasten exprimiert werden können. Die Aufstellung eines klaren Integrin-Profiles wird durch mehrere Faktoren erschwert. So durchlaufen die Osteoblasten verschiedene Reife-Grade, es sind Spezies-spezifische Unterschiede denkbar und *in vitro* Kulturen sind als primäre Kulturen mit Fibroblasten kontaminiert, wohingegen Zelllinien mit ihrem Expressionsprofil von den *in vivo* Verhältnissen weit entfernt sein könnten.

Dennoch scheint gesichert, dass Osteoblasten zumindest die folgenden Integrine exprimieren, deren Fähigkeit an Fibronectin zu binden nachgewiesen ist: $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ [18,23,25,148-153]. Auch wenn die meisten beschriebenen Integrine mit der RGD-Region des Fibronectins interagieren können, so schließt dies weder aus, dass es weitere Bindestellen für dieselben Integrine gibt, noch, dass andere Rezeptoren existieren, die z. B. nur an bestimmte Fibronectin-Isoformen binden.

I.2.6.2. Wirkung des Fibronectins auf Osteoblasten

Für verschiedene Zelltypen wurde bereits gezeigt, dass Fibronectin für die Zelladhäsion und die anschließende Zelldifferenzierung wichtig ist [154]. Auch am Beispiel kultivierter Osteoblasten konnte die Bedeutung des Fibronectins für deren Differenzierung belegt werden. Blockte man die Bindung der Zellen an Fibronectin über Antikörper oder spezielle Peptide, so stellte sich heraus, dass die Osteoblasten nicht mehr in der Lage waren, knochenartige Knoten auszubilden [155]. Letztere versteht man als *in vitro* Produkt reifer Osteoblasten. Die Blockade erwies sich in diesem Versuch als besonders wirksam, wenn sie die RGD-Sequenz (inklusive der Synergie-Sequenz PHSRN im Modul III-9) enthielt.

In einem ähnlichen Versuchsansatz wurde das Fibronectin in Zellkulturen geblockt, in denen sich zuvor Osteoblasten bereits ausdifferenziert hatten. Hier stellte sich Fibronectin sogar als ein überlebenswichtiger Faktor für die reifen Osteoblasten dar [156]. Das Fibronectin wird also gewissermaßen von einem Differenzierungs- zu einem Überlebensfaktor. TGF- β konnte hierbei allerdings die Apoptose-Induktion durch die Fibronectin-Blockade zumindest teilweise abfangen [156].

Osteoblasten sind in der Lage Fibronectin zu exprimieren und es wird angenommen, dass sie es während der Knochenbildung in die extrazelluläre Matrix des Knochens mit einbauen [157]. Im Rattenmodell wurde eine erhöhte Expression von Fibronectin in frühen Stadien der Knochenheilung gezeigt [158]. In älterem Knochen wurde Fibronectin ebenfalls nachgewiesen, wenn auch in geringeren Mengen [159]. In Zellkulturen humaner Osteoblasten sowie bei Osteosarkom-Zelllinien konnte EDA- und EDB-positives Fibronectin detektiert werden [160].

I.2.6.3. Bedeutung des Fibronectins für ein Kollagengerüst

Fibronectin vermag an die Kollagene Typ I, II, III, IV und V zu binden [2]. Interessanterweise ist die Bindung zwischen Fibronectin und Gelatine (denaturiertem Kollagen) fester als zu nativem Kollagen [161]. Untersuchungen ergaben jedoch, dass sich die Tripelhelix des Kollagens *in vivo* partiell entwinden kann und dadurch auch im lebendigen Organismus eine starke Bindung zwi-

schen Fibronectin und Kollagen möglich ist [162]. Diverse *in vitro* Experimente deuten darauf hin, dass Fibronectin für die Ausbildung und den Erhalt eines Kollagengerüsts von Bedeutung ist. So wurden Fibroblasten unter der Anwesenheit eines Antikörpers kultiviert, der die Kollagenbindende-Domäne des Fibronectins (nicht aber die Zellbindende-Domäne) blockierte [163]. Die Fibroblasten konnten unter der Blockade dieser Domäne des Fibronectins zwar noch Kollagen produzieren, es aber nicht mehr korrekt ablagern. Fibronectin wird demnach von Fibroblasten benötigt, um *in vitro* das Kollagen zu organisieren und ein fibrilläres Kollagenetzwerk auszubilden. Nachdem Fibronectin und Kollagen aneinander gebunden haben, können sie über Faktor XIIIa Transglutaminase kovalent kreuzvernetzt werden [164].

Weitere *in vitro* Experimente an murinen embryonalen Fibroblasten-Zelllinien, die kein Fibronectin bilden konnten und denen zusätzlich die Integrin-Untereinheiten α_{11} und α_2 fehlten, wohingegen sie den Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ besaßen, zeigten, dass diese Zellen erst unter Gabe exogenen Fibronectins in der Lage waren, das Kollagen zu polymerisieren [14]. Die Anwesenheit der kollagenbindenden Integrine $\alpha_{11}\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ (durch α_{11} und α_2 Transfektion) auf den Zellen wirkte zusätzlich fördernd auf diesen Prozess. Ein ähnliches *in vitro* Experiment an glatten Muskelzellen ergab, dass durch die Blockade des Fibronectin-Rezeptors $\alpha_5\beta_1$ ebenfalls der Aufbau eines Kollagengerüsts verhindert werden konnte [165]. Ohne diese Blockade zeigte sich, dass neu gebildete Kollagenfibrillen in derselben Region entstanden, in der sich auch frisch gebildete Fibronectinfibrillen nachweisen ließen.

Interessanterweise scheint der Einfluss bei der Fibrillenbildung nicht ausschließlich eine einseitige Richtung zu haben, denn es wurde durch andere *in vitro* Untersuchungen auch gezeigt, dass Kollagen (zumindest bei bestimmten Zelltypen) wiederum einen Einfluss auf die Bildung von Fibronectinfibrillen haben kann [166,167]. Die Interaktionen von Fibronectin und Kollagen scheinen bei der Fibrillogenese sehr eng zu sein, zumal auch in nativen, von humanen Fibroblasten gebildeten Kollagenfibrillen Fibronectin nachgewiesen werden konnte [168].

Spezielle „Pulse-Chase“ Experimente mit fluoreszenzmarkiertem Fibronectin und Zellen, deren Fibronectin-Gen ausgeschaltet war, belegen außerdem, dass Fibronectin keine stabile Komponente der extrazellulären Matrix ist [169]. Damit eine fibrilläre Kollagenmatrix erhalten bleibt, ist eine intakte Fibronectinmatrix erforderlich, die wiederum von der permanenten Anwesenheit des Fibronectins abhängig ist.

Eine zusätzliche interessante Entdeckung ist, dass das Fibronectin als Bestandteil einer Extrazellulärmatrix auch in der Lage ist, die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren zu beeinflussen. So wird TGF- β in einem Komplex freigesetzt, der als inaktive Form von der Matrix gebunden werden kann [170]. An diesem Komplex ist LTBP-1 (für engl. „latent TGF- β binding protein-1“) beteiligt und bewirkt durch eine Interaktion mit Fibronectin die Assoziation des Komplexes an die Matrix.

Dabei spielt sowohl das Vorhandensein eines fibrillären Fibronectinnetzwerks als auch eine kontinuierliche Versorgung mit Fibronectin eine entscheidende Rolle. Da TGF- β ein wichtiger Wachstumsfaktor mit zahlreichen Funktionen ist, wird dem Fibronectin durch seine Fähigkeit, die Verfügbarkeit des TGF- β Komplexes zu regulieren, eine wichtige Rolle zuteil.

I.3. Das Fibronectin und die diabetische Nephropathie

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Fibronectins bei der Entstehung der Diabetes-bedingten Nierenerkrankung. Einleitend wird hier zuerst auf das Organ Niere und anschließend auf die Erkrankung Diabetes mellitus eingegangen, bei letzterem insbesondere auf die diabetische Nephropathie.

I.3.1. Die Niere

I.3.1.1. Anatomie und Funktion der Niere

Die Nieren sind lebenswichtige Organe des menschlichen Organismus. Jeder Mensch besitzt zwei dieser Organe, die im Erwachsenen ein Gewicht von 120-200 g erreichen. Die Nieren haben zahlreiche Aufgaben, darunter besonders die Ausscheidung des Harns inklusive der harnpflichtigen Substanzen. Sie tragen so u. a. zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts des Körpers und der Entgiftung bei, spielen für die langfristige Kontrolle des Blutdrucks eine Rolle und bilden Hormone. Zum Beispiel sind sie an der Synthese des für den Knochen wichtigen Vitamin D-Hormons (Calcitriol) beteiligt. Die Nieren gehören zu den am stärksten durchbluteten Organen des Körpers.

Die Niere wird in drei Bereiche unterteilt: die Nierenrinde, das Nierenmark und das Nierenbecken. Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Ein einzelnes Nephron besteht aus einem Malpighi-Körperchen, in welchem die Filtration des Primärharns geschieht, und einem angeschlossenen Tubulus, der (besonders in der Region der Henle-Schleife) für die der Rückresorption des Wassers sowie bestimmter Substanzen aus dem Primärharn verantwortlich ist. Auf diese Weise ist jedes Nephron an der Entstehung des Endharns beteiligt, der letztlich ausgeschieden wird. Das Malpighi-Körperchen besteht aus einem Knäuel feinsten Kapillaren (dem Glomerulus), der

von einer Ausbuchtung des Nephronkanals (der Bowman-Kapsel) umschlossen wird. Während die Tubuli das Nierenmark durchziehen, sind die Nierenkörperchen in den Rindengebieten anzutreffen.

I.3.1.2. Der Glomerulus

Der Glomerulus (Abb. I.7) besteht maßgeblich aus drei Zelltypen. Das Kapillarknäuel wird von Endothelzellen gebildet, zwischen denen es Lücken gibt, durch die der hydrostatische Kapillardruck Flüssigkeit aus dem Blut herauspresst. Die Kapillaren sind engmaschig von den Podozyten und deren Ausläufern umfasst. Die Basalmembran zwischen diesen beiden Zelltypen dient als Ultrafilter des Primärharns, so dass nur Stoffe unterhalb einer gewissen Größe in das Filtrat gelangen (manche werden später auch rückresorbiert), das von der Bowman-Kapsel aufgefangen und in den proximalen Tubulus überführt wird. Die Mesangialzellen bilden die Mesangialmatrix und haben so u. a. die Funktion, den Glomerulus zu stützen. Zusätzlich sind sie phagozytisch aktiv und besitzen kontraktile Filamente [171].

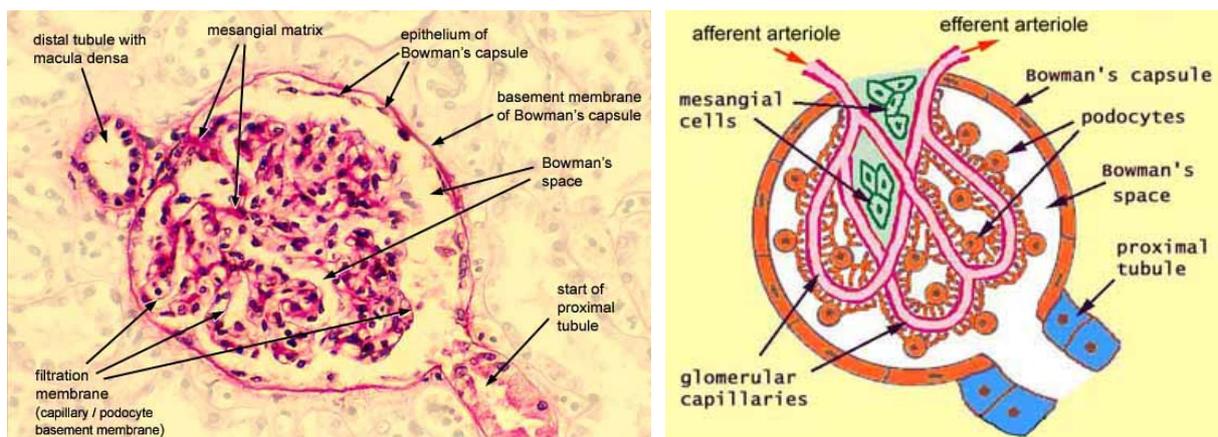


Abbildung I.7: Aufbau eines Malpighi-Körperchens

Die Abbildungen (links lichtmikroskopische Aufnahme, rechts Schema) veranschaulichen den Aufbau eines Malpighi-Körperchens (Abbildungen übernommen von <http://www.siumed.edu/~dking2/crr/RN047b.htm>).

Fibronektin kommt in den Glomeruli der Niere vor, dabei ist es besonders in der mesangialen Matrix sowie in der glomerulären Basalmembran anzutreffen [172]. Andere Proteine der extrazellulären Matrix sind ebenfalls im Glomerulus vertreten. Laminin ist vorwiegend in der glomerulären Basalmembran (Lamina rara), aber auch in geringerem Maße in der mesangialen Matrix nachweisbar (Abb. I.8) [173]. Kollagen Typ IV ist in beiden Bereichen etwa gleichstark vertreten.

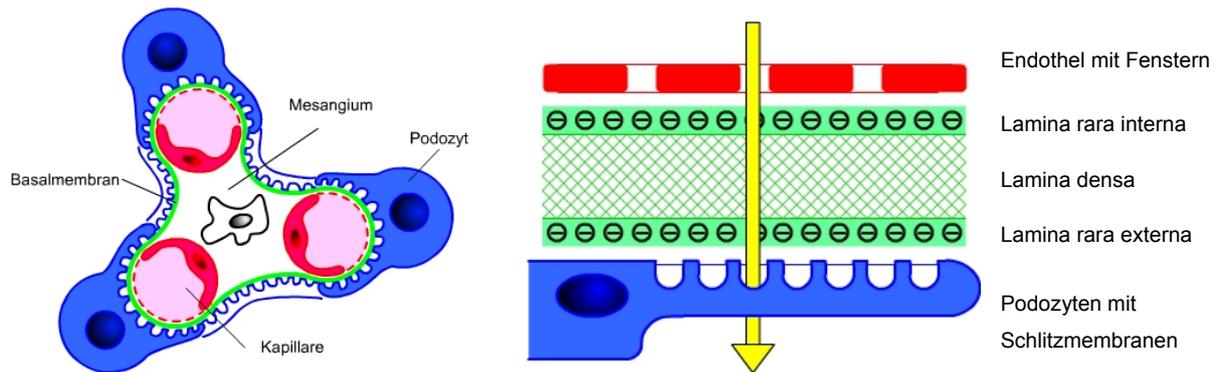


Abbildung I.8: Lage und Gestalt der glomerulären Basalmembran

Die Abbildung veranschaulicht grob die Lage der glomerulären Basalmembran zwischen den Endothelzellen und den Podozyten (links) sowie den Aufbau der Basalmembran (rechts), wobei Fibronektin gemeinsam mit Laminin ein Bestandteil der Lamina rara (in- und externa) ist und Kollagen Typ IV den Hauptbestandteil der Lamina densa ausmacht [173] (Abbildungen übernommen von <http://www.biorama.ch/biblio/b50chem/k30niere/neph020.htm>).

I.3.2. Der Diabetes mellitus und seine Folgen

I.3.2.1. Krankheitsbild des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus bedeutet „honigsüßer Durchfluss“ und wird im Volksmund zumeist als Zuckerkrankheit oder Zucker bezeichnet. Diese Erkrankung des Stoffwechsels ist durch einen chronisch erhöhten Blutzucker (Glykämie) gekennzeichnet [174]. Die Ursache für den erhöhten Blutzuckerspiegel ist entweder ein absoluter (Diabetes mellitus Typ 1) oder ein relativer Mangel an Insulin (Diabetes mellitus Typ 2). Der Insulinmangel führt dazu, dass die Zellen, die Insulin für die Aufnahme von Glukose als Energiequelle brauchen, unfähig sind dies zu tun. Somit „verhungern“ die Zellen trotz eines übermäßigen Nährstoffangebots in ihrer unmittelbaren Umgebung. Typisch für einen Diabetes mellitus sind als Folge der chronisch hohen Blutzuckerwerte (Nüchternblutzucker ≥ 120 mg/dl) ein vermehrtes Durstgefühl und Wasserlassen mit z. T. starkem Gewichtsverlust (besonders bei Typ 1). Die Ursache für einen Teil dieser Symptome liegt darin begründet, dass bei Blutzuckerspiegeln über 180 mg/dl die so genannte Nierenschwelle überschritten wird. Das bedeutet, die Glukose wird über den Harn ausgeschieden und die Rückresorption des Wassers durch die Niere ist beeinträchtigt.

Als typische Begleit- und Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus gelten in schlimmen Fällen Erblindung (durch Retinopathien, Mikroangiopathien), Nierenversagen (durch Nephropathien, Mikroangiopathien), Herz-Kreislauf-Erkrankungen (wie Bluthochdruck, Herzinfarkt), eine Beeinträchtigung des Nervensystems (Neuropathien) und zahlreiche weitere mögliche Komplikationen (z. B. diabetischer Fuß, Amputationen, diabetisches Koma).

I.3.2.2. Die diabetische Nephropathie

Eine wichtige Komplikation ist die Diabetes-bedingte Nierenerkrankung, die in den USA und Westeuropa die häufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz und damit die Behandlung durch Dialyse ist [175]. Die manifeste Beeinträchtigung der Nierenfunktion betrifft etwa 30-40% der Patienten, die mehr als 15 Jahre an Diabetes mellitus leiden. Am Beispiel der USA wurde berechnet, dass die durch die so genannte diabetische Nephropathie entstehenden Kosten für das Gesundheitssystem im Jahr 2010 bei 12 Milliarden Dollar pro Jahr liegen werden [176].

I.3.2.2.1. Pathologie und Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist durch eine tubulointerstitielle Fibrose und eine Verhärtung der Glomeruli (Glomerulosklerose) gekennzeichnet, die beim Menschen diffus (ohne erkennbare Umrisse) oder nodulär (knotig) ausgeprägt sein kann [177]. Das Fortschreiten beider Kennzeichen ist miteinander sowie mit der Verschlechterung der klinischen Werte der Nierenfunktion korreliert [178]. Das Gewicht der erkrankten Nieren ist zudem erhöht [179], weil sie durch die Fibrose mehr Extrazellulärmatrix-Proteine enthalten [180]. Da die Untersuchungen, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, am Mausmodell erfolgten und im Streptozotocin-induzierten Diabetes-Mausmodell keine noduläre Glomerulosklerose erreicht werden kann [181], fokussiert sich die weitere Beschreibung auf die diffuse Glomerulosklerose. Letztere ist durch eine Ausbreitung der Mesangialmatrix (inklusive einer Erhöhung der Anzahl der Mesangialzellen) und eine Verdickung der glomerulären Basalmembran gekennzeichnet (Abb. I.8), die gemeinsam letztlich zum Untergang der Glomeruli führen [182]. Die beginnende diffuse Verdickung der Basalmembran ist dabei zunächst nur durch Elektronenmikroskopie sichtbar zu machen, bei fortgeschrittener Erkrankung aber auch im Lichtmikroskop erkennbar (nach Färbung) [177]. Die der Verdickung zugrunde liegende Einlagerung des Fibronektins und anderer Matrixproteine führt schließlich zu einer Verstopfung der Basalmembran, so dass immer weniger Primärharn erzeugt werden kann. Auch durch die Vergrößerung und Verhärtung des Mesangiums wird die Funktion des Glomerulus gestört. In einem stark betroffenen Glomerulus kann das Mesangium die Endothelzellen und Podozyten so stark zurückdrängen, dass eine regelgerechte Funktion letztlich unmöglich wird [177].

Durch die diabetische Nephropathie entsteht eine sich progressiv verschlechternde Proteinurie (vermehrte Ausscheidung von Proteinen über den Urin), die von steigendem Blutdruck und einer Beeinträchtigung der glomerulären Filtration begleitet wird [177]. Gemessen wird die Proteinurie zumeist über den Albumingehalt des Urins. Der Albumingehalt wird entweder im 24 Stunden-Urin bestimmt (mit Korrektur zum Volumen) oder mit dem Kreatiningehalt des Urins verrechnet. Man unterscheidet die mildere Mikroalbuminurie (30-300 mg Albumin/24 h bzw. 30-300 mg Albumin/g Kreatinin bzw. 3-25 mg Albumin/mmol Kreatinin) von der Makroalbuminurie, welche die für die

Mikroalbuminurie festgelegt, Grenzwerte nach oben überschreitet. Bei einer fortgeschrittenen diabetischen Nephropathie lässt die Filtrationsleistung der Niere gravierend nach bis hin zu einem Nierenversagen.

Die diabetische Nephropathie kann wiederum selbst zu Folgeerkrankungen führen. Besonders gefährlich ist dabei die Auswirkung auf den Blutdruck, da dessen Erhöhung in einer Art Teufelskreis eine Verschlechterung der Nierenerkrankung bewirkt (s. I.3.2.1). Auch eine Osteodystrophie kann als Folgeerkrankung entstehen (z. B. über einen Mangel des Vitamin D-Hormons Calcitriol, s. I.2.4.5).

I.3.2.2.2. Mechanismen der Entstehung einer diabetischen Nephropathie

Die Ursache der Erkrankung kleinster Gefäße im Glomerulus und der Expansion des Mesangiums der Glomeruli in der diabetischen Nephropathie ist auf den erhöhten Blutzucker zurückzuführen [183]. Durch Transplantationsexperimente an Ratten konnte gezeigt werden, dass die Expansion des Mesangiums durch die Transplantation einer Niere von einem diabetischen in ein gesundes Tier zumindest partiell rückgängig gemacht werden konnte [184]. Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch eine Transplantation gesunder Pankreaszellen in diabetische Tiere erreicht werden, wobei sich die Blutzuckerwerte der Diabetiker durch diese Behandlung normalisierten [185]. Auch lässt sich die Entstehung von Kennzeichen der diabetischen Nephropathie im experimentellen Tiermodell vermindern, indem die Blutzuckerwerte durch eine stringente Insulin-Behandlung normalisiert werden [186-188]. Da der Grad des erhöhten Blutzuckers im diabetischen Menschen aber nicht direkt mit der Entstehung und Verschlechterung der Diabetesbedingten Nierenerkrankung verknüpft ist [189], müssen in der Humanmedizin weitere (möglicherweise genetische) Faktoren neben der Hyperglykämie beteiligt sein.

Durch eine nicht-enzymatische Glykierung reagiert die Glukose, deren Blutlevels im Diabetes mellitus erhöht sind, mit zahlreichen Molekülen, z. B. auch Kollagen [190,191]. Hierdurch entstehen so genannte AGE (für engl. „advanced glycation end products“). In Ratten konnte die Gabe eines AGE-Hemmers das Fortschreiten der Glomerulosklerose sowie die Albuminurie abmildern [192]. Möglicherweise führt die vermehrte Reaktion der Glukose mit Proteinen des Blutplasmas zu einer Veränderung der Proteine, die für deren vermehrte Einlagerung in die glomeruläre Basalmembran und die Mesangialmatrix sorgt [183]. Hiervon könnte auch das Plasmafibronektin betroffen sein. Durch die Reaktion der Glukose mit den Proteinen wäre außerdem möglich, dass die Degradation der Proteine nach deren Einlagerung vermindert und deren Akkumulation dadurch beschleunigt würde. Für Fibronektin wurde *in vitro* gezeigt, dass dessen Bindung an die glomeruläre Basalmembran durch die Glykierung gefördert wird [193]. Dadurch wären Veränderungen der Matrixintegrität denkbar, welche die Entwicklung von Defekten vorantreiben könnten.

Bei einer Glomerulosklerose ist die extrazelluläre Matrix des Mesangiums stark verbreitert und auch der Fibronektin Gehalt entsprechend erhöht [182]. Untersuchungen an Zellen *in vitro* ergaben, dass die drei Hauptzelltypen des Glomerulus (s. I.3.1.2) jeweils dazu in der Lage sind, Fibronektin zu bilden [2,194,195]. An der vermehrten Produktion des Fibronektins durch die Mesangialzellen in der diabetischen Nephropathie scheint u. a. auch TGF- β beteiligt zu sein [196]. Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosewerte zu einer vermehrten Produktion von Fibronektin, Kollagen Typ IV und Laminin in Mesangialzellen führten [197]. Experimente an diabetischen Ratten zeigten, dass das Signaltransduktionsprotein Proteinkinase C (PKC) an der vermehrten Expression von TGF- β , Fibronektin und Kollagen Typ IV beteiligt zu sein scheint [198]. Tatsächlich ergab eine Untersuchung, dass Unterschiede in der Promoter-Region des PKC- β_1 -Genes bei Typ 1 Diabetikern zu einer verschiedenen starken Neigung führten, eine diabetische Nephropathie zu entwickeln [199].

Auch die Scherkräfte, die auf die Mesangialzellen einwirken und im Zuge der Glomerulosklerose verstärkt werden, haben einen direkten Einfluss die Fibronektin-Produktion [200]. Als eine mögliche Ursache für eine vermehrte Fibronektin-Produktion durch die Mesangialzellen in der diabetischen Nephropathie hat ein *in vitro* Experiment die mechanische Dehnung der Zellen ermitteln können [201]. Ein Zusammenspiel der erhöhten Glukosewerte und der physikalischen Belastung könnte die Mesangialzellen dazu veranlassen, mehr Matrix zu produzieren [202]. Doch auch das Plasmafibronektin aus dem Blut ist ein Kandidat für den Ursprung des Fibronektins in der Mesangialmatrix. So wurde das Plasmafibronektin beispielsweise im Mausmodell als ein Initiator der fokalen segmentalen Glomerulosklerose beschrieben [203].

Obwohl die Mechanismen, die zu einer vermehrten Fibronektin-Produktion der Mesangialzellen und somit zu einer Expansion des Mesangiums führen, bereits in zahlreichen Experimenten untersucht worden sind, ist doch die Rolle des Fibronektins selbst in der diabetischen Nephropathie noch weitestgehend unklar.

I.4. Die Mausmodelle

Die Rolle des Fibronektins im Knochen und in der diabetischen Nephropathie sollte *in vivo* untersucht werden, um eine Übertragbarkeit wichtiger Erkenntnisse auf den Menschen zu gewährleisten. Dazu wurde mit genetisch veränderten Tieren gearbeitet, auf deren Eigenschaften in diesem Teil der Einleitung genauer eingegangen wird.

I.4.1. Ausschaltung des Fibronektin-Gens in Mäusen

I.4.1.1. Notwendigkeit konditioneller Fibronektin Knockout-Mäuse

Die Möglichkeit, Gene in Mäusen gezielt auszuschalten, hat die experimentelle Forschung bedeutend erweitert, da auf diese Weise die Aufgaben diverser Proteine *in vivo* näher untersucht werden konnten. In der konventionellen Knockout-Maus wird ein Gen komplett entfernt. Es ist dadurch keine Expression des entsprechenden Proteins im gesamten Organismus mehr möglich. Um die Bedeutung des Fibronektins in einem physiologischen Zusammenhang zu untersuchen, wären daher Fibronektin Knockout-Mäuse bestens geeignet. Jedoch führt der Verlust des Fibronektins im Gesamtorganismus zu einem frühen Versterben der Mäuse während ihrer Embryonalentwicklung (Tag 8,5 von 21) [33]. An diesem Phänomen sind multiple Defekte beteiligt wie beispielsweise Fehler in der Entstehung der Blutgefäße des Dottersacks [33]. Ein Grund hierfür scheint zu sein, dass die Endothelzellen nicht in der Lage sind, eine korrekte Basalmembran zu bilden, so dass die Angiogenese gestört ist [204]. Auch die Ausschaltung des Integrinmonomers α_5 bewirkt ein Absterben der Embryonen *in utero*, was auf das Fehlen des Fibronektin-Rezeptors $\alpha_5\beta_1$ zurückgeführt wird [205]. Zwar versterben diese Tiere erst etwas später (Tag 10-11 der Embryonalentwicklung), dies könnte jedoch über eine Teilkompensation durch andere Fibronektin-bindende Integrine erklärt werden.

Die frühe letale Wirkung einer kompletten Fibronektin-Ausschaltung in der Maus belegt die Wichtigkeit des Fibronektins für die Bildung einer extrazellulären Matrix, macht aber Untersuchungen an adulten Fibronektin Knockout-Mäusen unmöglich. Daher war es für die geplanten Untersuchungen der Rolle des Fibronektins im Knochen und in der diabetischen Nephropathie erforderlich konditionelle Knockout-Mäuse herzustellen.

I.4.1.2. Die konditionellen Fibronektin Knockout-Mäuse

Um den Effekt einer Ausschaltung des Fibronektins in bestimmten Zellen *in vivo* untersuchen zu können, wurde mit konditionellen Fibronektin Knockout-Mäusen gearbeitet. Die hierfür notwendigen Mauslinien wurden uns aus der Abteilung von Herrn R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt bzw. über die Mutant Mouse Regional Resource Centers (USA) bezogen. Es wurde dabei auf das Cre/loxP-Rekombinasesystem zurückgegriffen, das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt.

Zur Erzeugung der konditionellen Knockout-Mäuse wurden Tiere verwendet, deren Fibronektin-Gen gefloxt war (für engl. „flanked by loxP“). Das Fibronektin-Gen dieser Mäuse war dazu modifi-

ziert worden (Abb. I.9), indem im Exon 1 (vor dem Translations-Startkodon ATG) und zwischen Exon 1 und 2 (also im Intron 1) so genannte loxP-Stellen eingefügt wurden [40]. LoxP-Stellen (für engl. „locus of crossing-over P1“) sind 34 Basenpaare lange Sequenzen, die von dem Enzym Cre Rekombinase erkannt werden (für engl. „causes recombination“) [206]. Dieses Enzym ist in der Lage, einen Gen-Bereich, der sich zwischen zwei loxP-Stellen befindet, herauszuschneiden und die DNA danach wieder zu verbinden. Dabei bleibt an der Stelle, an der zuvor der Gen-Bereich zwischen den loxP-Stellen war, lediglich eine einzelne loxP-Stelle zurück. Das Gen aber ist zerstört, da wichtige Teile entfernt wurden. Um sich diese Eigenschaften von Cre zunutze zu machen, kreuzt man Mäuse, deren Fibronectin-Gen gefloxt ist, mit Mäusen, die das Gen für das Enzym Cre unter der Kontrolle eines gewünschten Promoters tragen, der zell- oder gewebsspezifisch angeschaltet wird.

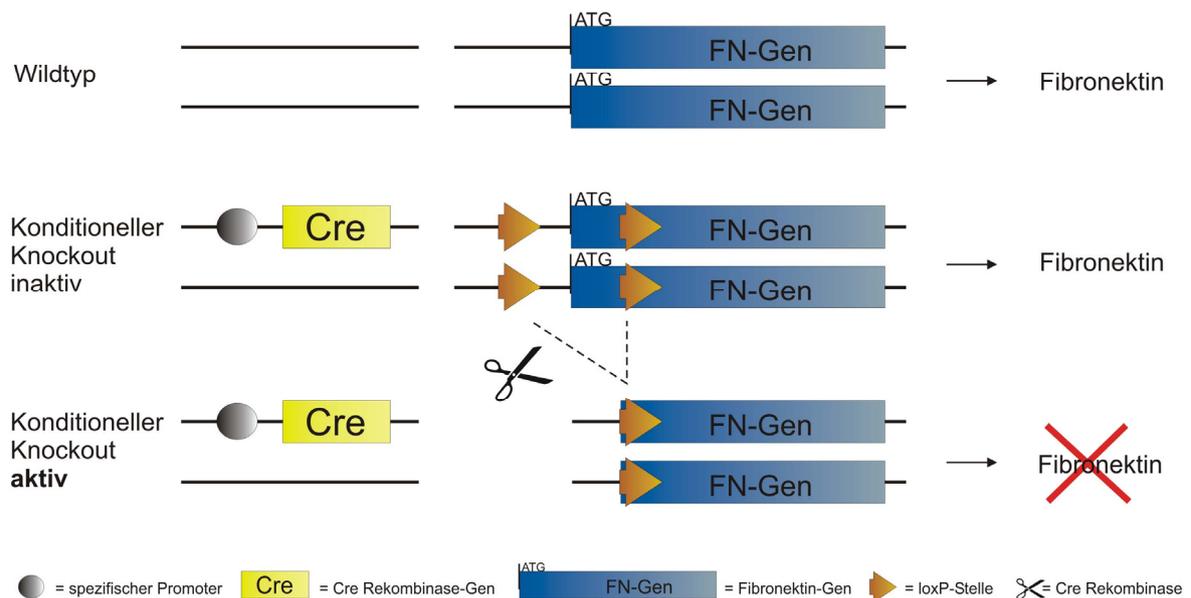


Abbildung I.9: Schema konditioneller Fibronectin Knockout-Mäuse

In einer konditionellen Knockout-Maus kann ein bestimmtes Zielgen zell- oder gewebsspezifisch zerstört werden. Dazu werden z. B. vor und nach dem Translations-Startkodon ATG loxP-Stellen eingefügt, die von dem Enzym Cre Rekombinase erkannt werden. Zusätzlich bringt man in die DNA der Mäuse das Cre Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des gewünschten Promoters ein, so dass das Zielgen ausschließlich in den Zellen zerstört wird, in denen der Promoter aktiv ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei verschiedenen konditionellen Fibronectin Knockout-Mauslinien gearbeitet, deren Eigenschaften im Folgenden kurz dargestellt werden:

ColCre-Linie: Der Col-Promoter besteht aus einem Promoter-Fragment des Gens der Kollagen Typ I α_1 -Kette (s. II.2.1.2.1) und ist ausschließlich in reifen Osteoblasten und Osteozyten aktiv. Beginnt in den konditionellen Fibronectin Knockout-Mäusen, die den Col-Promoter tragen, ein Osteoblast mit der Synthese von Kollagen Typ I, dann wird auch Cre exprimiert und zerschneidet

das Fibronectin-Gen. Die Zelle hat in der Folge ihre Fähigkeit Fibronectin zu produzieren irreversibel verloren.

MxCre-Linie: Der Mx-Promoter (von engl. „myxovirus resistance 1“) bleibt so lange inaktiv, bis er durch die Anwesenheit von Interferon angeschaltet wird (exogen induzierbar, s. II.2.1.2.2) [207]. Er ist zur Ausschaltung des Plasmafibronectins geeignet, da er in den Hepatozyten der Leber aktiviert wird. Jedoch wird er zugleich in weiteren Zelltypen angeschaltet (z. B. den Mesangialzellen der Niere).

AlbCre-Linie: Da das Albumin ein spezifisches Protein der Hepatozyten ist, wirkt der Alb-Promoter (abgekürzt von Albumin) nur in der Leber [208]. Die konditionellen Fibronectin Knockout-Mäuse dieser Linie verlieren dabei sukzessive ihre Fähigkeit Plasmafibronectin zu bilden (s. II.2.1.2.3)

I.4.2. Weitere Mausmodelle

I.4.2.1. Reporter-Mäuse

Der ROSA26R-Mausstamm [209] ist ein Reporter-Stamm, der eingesetzt wird, um die Aktivität und Spezifität eines Promoters zu ermitteln, den man für die Ausschaltung eines Zielgens in konditionellen Knockout-Mäusen verwenden möchte. Das Prinzip ähnelt dem der konditionellen Knockout-Mäuse. Nur wird in diesem Reporter-Stamm in den Zellen, welche die Cre Rekombinase exprimieren, kein Gen ausgeschaltet, sondern das Enzym β -Galaktosidase exprimiert (lacZ-Gen) [210]. Dieses Enzym setzt das Substrat X-Gal in eine Substanz um, die zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Durch diese Farbreaktion lassen sich *ex vivo* Gewebe bzw. Zellen, in denen Cre aktiv war, ermitteln.

I.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es die Rolle des Fibronektins im Knochen und in der diabetischen Niere zu untersuchen.

Für den Knochen gab es zwei grundsätzliche Fragestellungen: 1. Was ist die Aufgabe des Fibronektins der Osteoblasten? 2. Ist das Fibronektin der Leber für die Integrität der Knochenmatrix von Bedeutung? Dazu sollten genetisch veränderte Mäuse eingesetzt werden, bei denen eine spezifische Ausschaltung des Fibronektins in den Osteoblasten bzw. der Leber möglich war.

Die Bedeutung des Fibronektins für die Entstehung der Diabetes-bedingten Nierenerkrankung sollte an einem Mausmodell untersucht werden. Dabei stand vor allem die Frage im Mittelpunkt, ob das Plasmafibronektin aus der Blutzirkulation eine relevante Rolle spielt. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen sollten genetisch veränderte Mäusen eingesetzt werden, bei denen eine Ausschaltung des Fibronektins in der Leber bzw. in der Leber und den Mesangialzellen zugleich möglich war.

Insgesamt sollte diese Arbeit einen Beitrag leisten zum Verständnis des Zusammenspiels des lokal produzierten und des zirkulierenden Fibronektins in einem physiologischen Zusammenhang (im Knochen) sowie in einem Krankheitsmodell (im diabetischen Nierenschaden).

II. Material und Methode

II.1. Laborausstattung und Chemikalien/Bioreagenzien

II.1.1. Verwendete Geräte

Autoklav:	Tuttnauer Systec 5075 EL, Systec
Brutschrank:	Innova CO-170, New Brunswick Scientific
Blotsystem:	Blot Module Kit CE Mark EI0002, Invitrogen
Entwicklungsgerät:	Typ CP1000, Agfa
Blutzuckermessgerät:	FreeStyle Freedom, Abbott
Blutzuckerteststreifen:	FreeStyle Teststreifen, Abbott
ELISA-Messgerät:	SLT Spectra, Labinstruments
Fotometer:	Pharmacia Ultrospec III, GE Healthcare
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB FraC-200, GE Healthcare
Gelsystem DNA:	PerfectBlue 40-1410, Peqlab
Gelsystem Protein:	XCell Sure Lock Mini-Cell EI0002, Invitrogen
Geldokumentation:	Gel Doc 1000, Bio-Rad
Heizblock:	Thermomixer compact, Eppendorf
Kameras:	EOS 350 Digital, Canon (Spiegelreflex) DXC-390 P, Sony (CCD) DS-1QM, Nikon (CCD), Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg TCS-NT, Leica Power HAD, DXC-950P, Sony
Magnetrührer:	Yellow line MSH basic, Roth
µCT:	VivaCT 40, Scanco
Mikroskope:	DM IL, inverses Routinemikroskop, Leica, mit Canon Kamera Stemi 2000-C, Stereomikroskop, Zeiss, mit Canon Kamera Vanox-S, Olympus, mit Sony Kamera (CCD) Eclipse 90i, Nikon, Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg DM-IRBE, konfokales Laserscan Mikroskop (TCS-SP), mit Leica Kamera DM-IRBE, Leica, Routinemikroskop mit Sony Kamera
Mikrotom:	Kryostat, CM 3050, Leica Reichert-Jung Biocut 2035, Leica
Mikrowelle:	MS-1715TU Multiwave, LG Electronics

pH-Meter:	Typ 761 Calimatic, Knick
Plattenwascher:	anthos fluido Typ 24200, ASYS
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P1, GE Healthcare Econo, Bio-Rad
pQCT:	XCT Research SA ⁺ , Stratec Medizintechnik
Säule:	Pharmacia Biotech XK16, GE Healthcare
Sterilbank:	Holten LaminAir 1.2, Thermo
Stickstofftank:	Chronos Biosafe, Messer
Stromversorger:	Standard Power Pack P25, Biometra
Thermocycler:	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems T Personal Thermocycler, Biometra
Trockenschrank:	Sterilisator, Memmert
Ultragefrierschrank:	Innova U725, New Brunswick Scientific
Vortexer:	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen:	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern Feinwaage, ABJ 120-4M, Kern
Wasserbad:	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifugen:	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen Biofuge 15, Heraeus Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo

II.1.2. Herstellerverzeichnis

Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Abcam plc	Cambridge, UK
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen
Antisoma Research Laboratories	London, UK
Agfa HealthCare GmbH	Köln
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Österreich
Axxora Deutschland GmbH	Lörrach
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BD Biosciences	Heidelberg,
Biometra	Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Buehler GmbH	Düsseldorf
Bruker Optik GmbH	Ettlingen
Canon Inc.	Tokyo, Japan

Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Charles River Laboratories	Sulzfeld
Daido Sangyo Co., Ltd	Tokyo, Japan
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dianova mbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach
Eppendorf	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Harlan Sera-Lab	Loughborough, UK
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Knick GmbH + Co. KG	Berlin
Korth Kristalle GmbH	Altenholz (Kiel)
Labinstrumente Deutschland GmbH	Crailsheim
Leica Microsystems	Wetzlar
LG Electronics	Seoul, Korea
Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim
Memmert GmbH + Co KG	Schwabach
Merck Chemicals Ltd.	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach
MorphoSys AbD GmbH	Düsseldorf
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
Nikon	Tokyo, Japan
Olympus America Inc.	Center Valley PA, USA
Pall Life Sciences	Dreieich
PE Applied Biosystems	Waltham MA, USA
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Polyscience Europe GmbH	Eppelheim
Qiagen GmbH	Hilden
Sakura Finetek Germany GmbH	Heppenheim
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	Frankfurt
Scanco Medical AG	Brütisellen, Schweiz
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Stratec Medizintechnik GmbH	Pforzheim
Systemec GmbH	Wettenberg
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA

II.1.3. Puffer, Medien und Reagenzien

α MEM:	#22561, Gibco, Invitrogen
β -Glycerophosphat-Lsg.:	216 mg/ml H_2O_{dd} einwiegen (1 M), sterilfiltrieren Lagerung in Aliquots ($-20^{\circ}C$), 1:200 einsetzen
Beschichtungspuffer (ELISA):	0,78 g Na_2CO_3 / 1,5 g $NaHCO_3$ pH auf 9,6 einstellen, ad 500 ml mit H_2O_d , Lagerung bei $4^{\circ}C$
Blot-Transferpuffer:	3 g Tris / 14,4 g Glycin ad 1 L mit H_2O_d , frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei $4^{\circ}C$
Blot-Blocklösung:	5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T frisch ansetzen oder kurzfristig lagern bei $4^{\circ}C$
Coomassie-Entfärbelösung: (Membranen)	200 ml 2-Propanol / 70 ml Essigsäure ad 1 L mit H_2O_d , Lagerung bei RT
Coomassie-Färbelösung: (Membranen)	400 ml 2-Propanol / 75 ml Essigsäure 2 g Brilliant Blau R250, ad 1 L mit H_2O_d , Lagerung bei RT
Coomassie-Färbelösung: (Protein-Gele)	Imperial Protein Stain (#24615, Pierce, Thermo), Färbung 1 h Entfärben mit H_2O_d für >1 h
Dexamethason-Stocklsg.:	39,2 mg/100 ml H_2O_{dd} einwiegen (10 mM) diese Lösung 1:1000 mit H_2O_{dd} verdünnen (10 μ M), sterilfiltrieren, Lagerung in Aliquots ($-20^{\circ}C$), 1:1000 einsetzen
DPBS:	#14190, Gibco, Invitrogen

Desorptionspuffer (Säule):	0,1 M Glycin / 0,5 M NaCl / in PBS dazu in 100 ml PBS 7,5 g Glycin und 29,2 g NaCl lösen, pH auf 2,5 einstellen, ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei 4°C
DNA-Marker:	100 bp-DNA-Leiter extended, #T835.1, Roth
Elutionspuffer (Säule):	4 M Harnstoff (#U5128, Sigma-Aldrich) / 0,05 M Tris / in PBS dazu in 100 ml PBS 240 g CH ₄ N ₂ O und 6 g Tris lösen, pH auf 7,5 einstellen, ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Equilibrierungspuffer (Säule):	0,01 M Natriumzitat (#S4641, Sigma-Aldrich) und 0,005 M EDTA (#E5134, Sigma-Aldrich) / in PBS dazu in 100 ml PBS 2,94 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ und 1,86 g EDTA lösen, pH auf 7,2 einstellen, ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
FCS:	#P30-3302, Pan Biotech
Kernechtrot-Lösung:	0,1 g Kernechtrot in 100 ml 5% Aluminiumsulfatlösung unter Aufkochen lösen, Lagerung bei RT
Knochenlysepuffer:	4 M Guanidin-HCl / 10 mM EDTA / 50 mM Tris pH einstellen auf 7,4
LacZ-Färbelösung:	10 mM K ₃ (Fe(CN) ₆) / 10 mM K ₄ (Fe(CN) ₆) / 4 mg/ml X-Gal in LacZ-Waschlösung, filtern, Lagerung bei 4°C (dunkel)
LacZ-Waschlösung:	0,2 g Na Deoxycholat / 0,04% NP 40 / 3,8 g EGTA / 1 mM MgCl ₂ pH auf 7,4 einstellen, ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Lichtgrün-Lösung:	0,4 g Lichtgrün / 0,4 ml Essigsäure ad 200 ml mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Lysepuffer (DNA):	100 mM Tris pH 8,5 / 200 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,0 / 0,2% SDS ad 10 ml mit H ₂ O _d , autoklavieren/sterilfiltrieren, Lagerung bei RT
Lysepuffer (Protein):	20 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl / 10% Glycerin / 0,5% Triton X-100 2 mM EDTA / 10 mM NaF / 1 mM Na ₃ VO ₄ , Lagerung bei 4°C

Mowiol (Elvanol):	5 g Mowiol 4-88 Reagent (#475904, Calbiochem, Merck) 20 ml PBS (pH 8) -> ü. N. rotieren lassen bei RT 10 ml Glycerin -> 30 min bei 50°C im Wasserbad schütteln 30 min bei 5000 g zentrifugieren, Lagerung in Aliquots bei -20°C
Natriumthiosulfat-Lsg.:	2,5 g NaS ₂ O ₃ in H ₂ O _d lösen, Lagerung mittelfristig bei RT (dunkel)
NBF (10%):	36,5% Formaldehyd 1:10 in PBS verdünnt, stets frisch ansetzen
Paraformaldehyd-Lsg. (4%):	22,5 ml H ₂ O _d mit 5 µl 10 M NaOH auf 60°C erhitzen, dann 1 g Paraformaldehyd und 2,5 ml 10x PBS dazu abkühlen, pH auf 7,4 einstellen, Lagerung in Aliquots bei -20°C
PBS:	100 ml PBS (10x), ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
PBS (10x):	400 g NaCl / 58 g Na ₂ HPO ₄ / 10 g KH ₂ PO ₄ / 10 g KCl pH auf 7,0 einstellen, ad 5 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
PBS-T:	100 ml PBS (10x) / 0,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05%) ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Penicillin/Streptomycin:	#15140-122, Gibco, Invitrogen
Phosphormolybdän-Lsg.:	8 g Molybdatophosphorsäure / 4 g Orange G ad 200 ml mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Probenpuffer (DNA, 4x):	50% Glycerin in 4x TBE, etwas Bromphenolblau zugeben
Probenpuffer (Protein, 4x):	0,15 ml H ₂ O _d / 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) / 1 ml Glycerin 2 ml 10% SDS / 0,1 ml 1% Bromphenolblau / 0,5 ml β-ME
Protein-Marker:	Precision Plus Protein Standard, unstained (#161-0363, Bio-Rad) Precision Plus Protein Standard, Dual Color (#161-0374, Bio-Rad) PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811, Fermentas)
Säurefuchsin-Lösung:	0,2 g Ponceau Xylidine / 0,1 g Säurefuchsin / 0,6 ml Essigsäure ad 300 ml mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT

Silbernitratlösung:	1,25 g AgNO ₃ in 50 ml H ₂ O _d lösen, Lagerung mittelfristig bei RT (dunkel)
Stopplösung (ELISA):	0,5 M H ₂ SO ₄ , dazu 2,7 ml H ₂ SO ₄ in 97,3 ml H ₂ O _d geben
TBE:	100 ml TBE (10x), ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBE (10x):	108 g Tris / 55,6 g Borsäure / 4,65 g EDTA ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS:	100 ml TBS (10x), ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS-T:	100 ml TBS (10x) / 1 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,1%) ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS (10x):	12 g Tris / 88 g NaCl pH auf 7,5 einstellen, ad 1 L mit H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Trypsin-EDTA:	#25300, Gibco, Invitrogen
Verdauungslösung (OB):	0,025 g Collagenase NB4 (#17454, Serva) / 0,05 g Dispase (#17105-041, Gibco, Invitrogen) / in 25 ml αMEM sterilfiltrieren (erst 0,45 µm, dann 0,22 µm), frisch ansetzen
Vitamin C-Stocklg.:	50 mg/ml H ₂ O _{dd} einwiegen (0,28 M), sterilfiltrieren Lagerung in Aliquots (-20°C), 1:1000 einsetzen
Zitratpuffer (BrdU):	0,26 g Natriumzitat in 1 L H ₂ O _d , pH auf 6 einstellen kurzfristig bei 4°C lagern

II.1.4. Ausgewähltes Verbrauchsmaterial

Dialyseschlauch	Servapor, #44145, Serva
Sterilfilter:	Millex GS, 0,22 µm, MCE-Membran, SLGS033SS, Millipore Millex GV, 0,22 µm, PVDF-Membran, SLGV033RS, Millipore Millex HV, 0,45 µm, PVDF-Membran, SLHV033RS, Millipore

Zellfilter, 100 µm:	Cell Strainer, REF 352360, BD Biosciences
Chamber Slides	Lab-Tek Chamber Slides, #177445, Nunc

II.1.5. Verwendete Antikörper und deren Konzentrationen

II.1.5.1. Primärantikörper

anti-human-FN	anti-human-Fibronectin-HRP-konj.-IgG aus Kaninchen (#P0246, Dako) ELISA 1:500 (als Sekundärantikörper), WB 1:5000
anti-human-FN	anti-human-Fibronectin-IgG aus Kaninchen (F3648, Sigma-Aldrich) ELISA 1:5000
anti-murin-FN	anti-Maus-Fibronectin-IgG aus Kaninchen (#AB2033, Chemicon, Millipore) Schnitte 1:50, WB 1:5000
anti-EDA (FN-3E2)	anti-Fibronectin-EDA-Domäne-IgM aus Maus (#F6140, Sigma-Aldrich) ELISA 1:120, WB 1:500 (Gelatine-aufgereinigt, Konz. 1,2 mg/ml)
anti-EDA (IST-9)	anti-Fibronectin-EDA-Domäne-IgG aus Maus (#GTX26328, Genetex), WB 1:1000
anti-EDB (BC-1)	anti-Fibronectin-EDB-Domäne-IgG aus Maus (Antisoma) ELISA 1:2270, WB (nativ) 1:500
anti-oFN (FDC-6)	anti-onkofötale Fibronectin-IgG aus Maus (Hybridom 9018) ELISA (2 mg/ml) 1:1620, WB (13 mg/ml) 1:10000-1:20000
anti-BrdU	anti-BrdU-IgG aus Schaf (#ab1893, Abcam) Schnitte 1:100
anti-Caspase 3	anti-aktive Caspase 3-IgG aus Kaninchen (#ab32042, Abcam) Schnitte 1:10
anti-Kol I	anti-Kollagen Typ I-IgG aus Kaninchen (#GTX41286, Genetex) Schnitte 1:50-100
anti-Cre	anti-Cre Rekombinase-Biotin-konjugiert-IgG aus Maus (#ab24580, Abcam) Schnitte 1:100
anti-Desmin	anti-Desmin-IgG aus Kaninchen (#DLN-13732, Dianova) Schnitte 1:100
anti-GFAP	anti-„glial fibrillary acid protein“-IgG aus Kaninchen (#DP014, Acris) Schnitte 1:100

anti-Laminin	anti-Laminin-IgG aus Ratte (#MAB1914, Chemicon, Millipore) Schnitte 1:100
anti-vWF	anti-von Willebrand Faktor-IgG aus Kaninchen (Signet #115-01, Axxora)

II.1.5.2. Sekundärantikörper und Streptavidin

anti-Kan-Alexa 555	anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 555-konjugiert aus Ziege (#A21430, Molecular Probes, Invitrogen), Schnitte 1:500-1000
anti-Kan-Cy3	anti-Kaninchen IgG-Cy3-konjugiert aus Ziege (#111-165-144, Dianova) Schnitte 1:500-1000
anti-Kan-HRP	anti-Kaninchen IgG-HRP-konjugiert aus Ziege (#170-6515, Bio-Rad) WB 1:5000
anti-Maus-HRP	anti-Maus IgG-HRP-konjugiert aus Ziege (#170-6516, Bio-Rad) WB 1:5000
anti-Maus-HRP	anti-Maus IgM-HRP-konjugiert aus Ziege (#STAR86P, AbD, MorphoSys) Schnitte 1:250, WB 1:500
anti-Ratte-Biotin	anti-Ratte IgG-Biotin-konjugiert aus Ziege (#112-066-071, Dianova) Schnitte 1:500
anti-Schaf-HRP	anti-Schaf IgG-HRP-konjugiert aus Kaninchen (#313-035-047, Dianova) Schnitte 1:200
Streptavidin-Cy3	Streptavidin-Cy3-konjugiert (#016-160-084, Dianova) Schnitte 1:500

II.2. Labormethoden

II.2.1. Versuchstiere

II.2.1.1. Wildtypische Mäuse

Um die Auswirkungen von Fibronectin-Injektionen auf „Wildtyp“-Mäuse zu untersuchen sowie zur Isolation von Osteoblasten, wurden Mäuse aus zwei Stämmen verwendet (Charles River Laboratories). Dabei handelte es sich um die Mausstämme CD-1 und NMRI.

II.2.1.2. Genetisch veränderte Mauslinien

Mäuse, deren Fibronectin-Gen gefloxt war (FN fl/fl für Fibronectin floxed/floxed), wurden uns von Herrn R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt und dienten als Ausgangslinie für die im Folgenden beschriebenen Mauslinien.

II.2.1.2.1. ColCre-Linie

Um Tiere zu erhalten, deren Fibronectin-Gen spezifisch in Osteoblasten ausgeschaltet wird (Abb. I.9), verwendeten wir genetisch veränderte Mäuse, die das Gen für die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines 2,3 Kilobasen (Kb) langen Fragments des Promoters der Kollagen Typ I α_1 -Kette besaßen [211,212]. Dieser 2,3 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promoter wird zur besseren Lesbarkeit mit Col-Promoter abgekürzt.

Verpaarungen zwischen Mäusen, die Cre unter Kontrolle des Col-Promoters trugen (bezogen über die Mutant Mouse Regional Resource Centers, USA), und den Mäusen, deren Fibronectin-Gen gefloxt war, ergaben zunächst eine heterozygote F1-Generation (Abb. IV.1). Die Tiere der F1-Generation hatten ein normales und ein gefloxtes Allel des Fibronectin-Gens (FN fl/+) und konnten positiv oder negativ für den Col-Promoter sein (ColCre/+ oder +/+). Die Mäuse der F1-Generation wurden weiter untereinander verpaart, so dass letztlich Tiere entstanden, die homozygot gefloxt (FN fl/fl) und entweder positiv (konditionelle Knockouts) oder negativ (Kontrollen) für den Col-Promoter waren.

II.2.1.2.2. MxCre-Linie

Um in Mäusen das Fibronectin in der Leber auszuschalten, arbeiteten wir mit genetisch veränderten Tieren, die das Gen für die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Mx-Promoters trugen (Mäuse bezogen über R. Fässler, MPI für Biochemie, Martinsried).

Um den Mx-Promoter zu aktivieren, verabreichten wir den konditionellen Knockout-Mäusen (MxCre/+ FN fl/fl) und den Kontrollen (+/+ FN fl/fl) im Alter von 4-5 Wochen i. p. die synthetische Doppelstrang RNA plpC (für engl. „polyinosinic-polycytidylic acid“), die in den Mäusen eine Ausschüttung von Interferon induzierte, wodurch der Mx-Promoter angeschaltet wurde [207]. Zu diesem Zweck wurden pro Maus 4x je 250-300 μ g plpC mit einer Wartezeit von 2-3 Tagen zwischen den vier Injektionen verabreicht (üblicherweise Mo/Di/Fr/Mo). Diese Behandlung der Mäuse fand im Alter von 5-6 Wochen statt.

II.2.1.2.3. AlbCre-Linie

Zur Ausschaltung des Plasmafibronektins in Mäusen wurde alternativ noch ein weiterer Promoter verwendet (Mäuse bezogen über R. Fässler, MPI für Biochemie, Martinsried), der Albumin-Promoter (abgekürzt als Alb-Promoter). Der Alb-Promoter wird wie der Col-Promoter während der Entwicklung aktiviert und ist ausschließlich in den Hepatozyten der Leber aktiv [208,213,214].

Tabelle II.1: Überblick über die erzeugten Linien konditioneller Fibronektin-Knockouts

Promoter (Linie)	Col (ColCre)	Mx (MxCre)	Alb (AlbCre)
Ausschaltung	endogen, embryonal (ab Tag 14,5)	exogen (induzierbar), Alter 4-5 Wochen	endogen, etwa ab 2 Monaten
Spezifität	reife Osteoblasten und Osteozyten	Hepatozyten, Mesangial- zellen u. v. m.	Hepatozyten

II.2.1.2.4. ROSA-Linie

Der ROSA26 Reporter Mausstamm [209] ermöglicht eine Charakterisierung von Promotoren, welche die Expression von Cre steuern. Promoter-spezifisch wird das Enzym β -Galaktosidase exprimiert, welches sich anschließend durch eine Färbung in Geweben nachweisen lässt.

Um die Aktivität und Spezifität eines bestimmten Promoters zu bestimmen, verpaart man Mäuse, die Cre unter der Kontrolle des betreffenden Promoters exprimieren (Cre/+) mit dem ROSA26R Stamm (lacZ/lacZ) und untersucht jene Tiere der F1-Generation, die positiv für den Promoter sind (PromoterCre/+ lacZ/+) sowie die Kontrollen (+/+ lacZ/+). Dazu werden die entsprechenden Gewebe entnommen und gefärbt (s. II.2.5.6.2).

II.2.1.3. Den Mäusen verabreichte Injektionen

II.2.1.3.1. Induktion des Mx-Promoters mit plpC

Um den Mx-Promoter zu aktivieren, wurde den Mäusen eine plpC-Lösung injiziert. Dazu wurde das plpC (#P9582, „polyinosinic-polycytidylic acid potassium salt“, Sigma-Aldrich) mit DPBS (#14190, Gibco, Invitrogen) auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml gebracht und sterilfiltriert. Die Lagerung der Lösung erfolgte bis zum Gebrauch in Aliquots bei -20°C.

II.2.1.3.2. Fluoreszenzmarker der Knochenmineralisierung

Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unter Anregung (ca. 495 nm) grün emittiert (ca. 515 nm) und aufgrund seiner starken Affinität zu Kalzium am Ort aktiver Mineralisierung in den Knochen eingebaut wird. Den Versuchstieren wurde am Tag -10 sowie am Tag -3 vor der Tötung (Tag 0) eine Calcein-Lösung injiziert. Hierzu wurden 100 mg Calcein (#C0875, Sigma-Aldrich) in 9 ml Kochsalzlösung (NaCl 0,9% Spüllösung, Braun) und 1 ml 1 M NaCO₃ gelöst. Dann wurden weitere 10 ml Kochsalzlösung zugegeben und die Lösung anschließend sterilfiltriert. Den Mäusen wurden 200 µl pro 30 g Körpergewicht i. p. injiziert (das entsprach 30 mg/Kg Körpergewicht). Die Lösung war bis zu zwei Wochen haltbar (Lagerung dunkel bei 4°C).

In einem Experiment wurde statt des Calceins der Marker Alizarinkomplexon (#05590, Sigma-Aldrich) verabreicht, da dieser Fluoreszenzfarbstoff gelb statt grün emittiert (Anregung 530-560 nm, Emission ca. 580 nm). Das Lösen der Substanz und die verabreichte Dosierung wurden genau wie für das Calcein beschrieben vorgenommen.

II.2.1.3.3. BrdU

Um die Proliferationsrate bestimmter Zellen in ausgewählten Mäusen untersuchen zu können, wurden den Mäusen eine Stunde vor deren Tötung 100 mg BrdU (#B9285, Sigma-Aldrich) pro Kg Körpergewicht injiziert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon. Proliferierende Zellen nehmen es nicht nur auf, sondern bauen es in ihre DNA (bei deren Replikation) ein. Durch Anfertigung von Gewebeschnitten und Behandlung mit einem Antikörper lassen sich so jene Zellen anfärben, die unmittelbar vor der Tötung der Maus in der Replikationsphase waren (also proliferierten).

II.2.1.3.4. Streptozotocin und Insulin (Diabetes-Experiment)

Streptozotocin wirkt toxisch auf die β -Zellen des Pankreas [215]. Zur Induktion eines Diabetes mellitus wurden 8-9 Wochen alten männlichen Tieren der MxCre- und AlbCre-Linie 60 mg Streptozotocin (#S0130, Sigma-Aldrich) pro Kg Körpergewicht intraperitoneal an sechs aufeinander folgenden Tagen verabreicht. Diese Methode ist in der Literatur mehrfach beschrieben [216,217]. Da Streptozotocin in wässriger Lösung sehr schnell zerfällt, wurde jeweils eine frische Lösung (10 mg/ml in 0,05 M Natriumzitat, pH 4,5) hergestellt, sterilfiltriert und innerhalb von 30 min injiziert. Die nicht-diabetischen Kontrollmäuse erhielten eine ebenfalls ans Körpergewicht adjustierte Menge des Puffers ohne Streptozotocin. Mit individuellen Unterschieden waren die Mäuse 1-2 Wochen nach der letzten Streptozotocin-Gabe diabetisch. Durch regelmäßige Kontrolle der Blutzuckerspiegel (1-3x pro Woche) und entsprechende intraperitoneale Injektion (1-4 Units) eines

zinkverzögerten Langzeitinsulins (Insulin glargin, Lantus 100 I. E./ml, Sanofi-Aventis) wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere in etwa auf einem Level von 300 mg/dl konstant gehalten.

II.2.1.4. Tötung der Mäuse und Entnahme von Blut

Die Mäuse wurden mit CO₂ getötet und zahlreiche Proben gesammelt. Als erstes wurde den frisch verstorbenen Tieren Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Zur Gewinnung von Blutplasma wurden je 200 µl Vollblut in eine Microvette 200 K3E (mit Tri-Kalium-EDTA, #20.1288, Sarstedt) abgefüllt und diese direkt mehrmals invertiert. Dann wurden die Blutzellen abzentrifugiert (5000 g, 5 min, RT), der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Gewinnung von Blutserum wurden je 200 µl Vollblut in eine Microvette 200 Z-Gel (mit Gerinnungsaktivator, #20.1291, Sarstedt) gegeben, diese 5 min bei RT stehen gelassen um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten und dann die Blutzellen und der Thrombus abzentrifugiert (10000 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

II.2.2. Zellkultur

II.2.2.1. Murine Osteoblasten

II.2.2.1.1. Isolation primärer Calvaria-Osteoblasten

Um *in vitro* Experimente mit Osteoblasten durchzuführen, wurden Calvaria-Osteoblasten isoliert und kultiviert. Die Isolation erfolgte aus den Schädeldächern neugeborener Mäuse (Alter 0-3 Tage, Mausstamm CD-1 oder ColCre-Linie) [218]. Dazu wurden die Schädel unter sterilen Bedingungen frei präpariert und möglichst von allen Geweberesten befreit. Die Feinsäuberung der Calvariae erfolgte in Petrischalen mit DPBS (mit Pen/Strep) bei RT und die Lagerung bis zum gemeinsamen Verdau in α MEM (mit Pen/Strep) auf Eis. Der Verdau fand mit einer Collagenase- und Dispase-haltigen Lösung statt, wobei für 20 Calvariae 4 ml Verdau-Lösung pro Verdau Schritt ausreichten. Der erste Verdau erfolgte bei 37°C in einem Schüttelwasserbad (100-180 rpm) oder im Heizblock (500 rpm) für 10 min. Die Lösung des ersten Verdau wurde im Anschluss verworfen und frische Verdau-Lösung zugegeben. Wie bereits beschrieben wurde wieder 10 min inkubiert, diesmal die Lösung im Anschluss jedoch nicht verworfen, sondern beiseite gestellt (RT). Zwei weitere Schritte (exakt wie Verdau 2) folgten und die Lösungen aus Verdau 2-4 wurden gepoolt, durch ein Zellsieb gefiltert (100 µm) und die im Filtrat enthaltenen Zellen durch Zentrifugation pelletiert (250 g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in α MEM (mit 10% FCS und Pen/Strep) re-

suspendiert und die Zellen ausplattiert. Sofern möglich erfolgte ein erster Medienwechsel bereits 3-4 Stunden nach der Isolation.

II.2.2.1.2. Kultivierung primärer Calvaria-Osteoblasten

Die Kultivierung der Calvaria-Osteoblasten erfolgte mit α MEM (mit 10% FCS und Pen/Strep) bei 37°C (5% CO₂). Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert. Sobald die Zellen 70-90% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit DPBS gewaschen und durch eine Behandlung mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Behandlung erfolgte bei RT und bis sich die Zellen z. T. abgelöst hatten (Beurteilung unter dem Mikroskop). Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen noch etwas stärker gelockert und dann die Behandlung durch Zugabe von α MEM (mit 10% FCS und Pen/Strep) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (250 g, 5 min, RT) und die Zellen in der entsprechenden Menge α MEM (mit 10% FCS und Pen/Strep) aufgenommen, in Abhängigkeit davon, ob die Kultur weiter expandiert oder die Differenzierung der Zellen eingeleitet werden sollte.

II.2.2.1.3. Differenzierung primärer Calvaria-Osteoblasten

Zur Differenzierung wurden die Osteoblasten in so genannte Chamber Slides (Nunc) ausgebracht. Diese wurden zuvor mit 0,2%iger Gelatine-Lösung beschichtet (1:10 in DPBS verdünnte 2%ige Gelatine-Lösung, #G1393, Sigma-Aldrich). Die Inkubation mit der Gelatine-Lösung erfolgte für 4-24 Stunden bei RT. Im Anschluss wurden die Wells vor der Zellaussaat 3x mit DPBS gewaschen. Sobald die Zellen in den Wells konfluent waren, wurde das Medium auf Differenzierungsmedium umgestellt. Das bedeutete, dem α MEM wurden neben 10% Fibronectin-depletiertem FCS (s. II.2.4.1.2) noch 50 μ g/ml Vitamin C (Endkonzentration 1,4 mM) sowie 1 mg/ml β -Glycerophosphat (Endkonzentration 5 mM) und 0,39 ng/ml Dexamethason (Endkonzentration 10 nM) zugegeben. Die Zugabe der drei Differenzierungsfaktoren erfolgte stets frisch bei jedem Medienwechsel, der alle 2-3 Tage durchgeführt wurde. Hierbei wurden die konditionierten Medien abgenommen und bei -20°C gelagert, damit am Ende jedes Experiments eine Analyse der Osteokalzin- und Fibronectin-Produktion der Zellen erfolgen konnte. Im Zuge der Differenzierung stellten die Osteoblasten ihre Proliferation ein und begannen Kalziumphosphat-haltige Knoten auszubilden, die sich über eine von Kossa-Färbung anfärben ließen.

II.2.2.1.4. Von Kossa-Färbung der Kalziumphosphat-haltigen Knoten

Sobald die differenzierten Osteoblasten die gewünschte Menge Knoten abgelagert hatten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und danach mit eiskaltem Alkohol

(95% Ethanol, 5% 2-Propanol) fixiert (1 h, 4°C). Im Anschluss wurde 2x mit H₂O_d gewaschen und dann 200 µl Silbernitratlösung pro Well addiert. Die Färbung erfolgte unter UV-Licht bei RT für 10-20 min (visuelle Kontrolle der Intensität). Danach wurde mit H₂O_d gewaschen und zur Konservierung 300 µl Natriumthiosulfat-Lösung zugegeben (5 min, RT). Anschließend folgte ein weiterer Waschschritt bevor der Plastikaufsatz der Chamber Slides entfernt und der verbliebene Objektträger mit Mowiol und einem Deckgläschen eingedeckt wurde.

II.2.2.1.5. Immunfluoreszenz-Färbung der Osteoblasten

Zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Osteoblasten wie schon für die von Kossa-Färbung beschrieben auf Chamber Slides kultiviert. Vor der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10% NBF oder 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert (5 min, RT). Danach erfolgte eine Prozedur, die mit der für entkalkte Knochenschnitte im Detail beschriebenen Anleitung identisch war (s. II.2.5.6.3).

II.2.2.2. Kultivierung weiterer Zelltypen

II.2.2.2.1. Hybridoma-Kulturen

Um ausreichende Mengen des Antikörpers FDC-6 zu erhalten, wurde eine FDC-6 exprimierende Hybridom-Kultur erworben (#ATCC-HB-9018 FHCR-1-2813/FDC-6, LGC Promochem). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem speziellen Serum-freien Medium (#12045, Gibco, Invitrogen). Zunächst wurden die Zellen in 75 cm² Flaschen stehend kultiviert und 3x pro Woche frisches Medium in Verhältnis 1:3 zugegeben. Die Zellzahl wurde immer zwischen 1x10⁵ und 1x10⁶ Zellen pro Milliliter gehalten. Sobald erforderlich wurde die Kultur in 175 cm² Flaschen überführt und auf die gleiche Weise bis zu einem Volumen von 200 ml stehend kultiviert. Ab Volumina von mehr als 200 ml erfolgte die Kultivierung liegend bis zu einem Volumen von 300 ml. Ab diesem Maximalvolumen wurden die Zellen ohne weitere Medienzugabe in liegenden Flaschen kultiviert, bis die Zellen abstarben. Im Anschluss an den Tod der Zellen wurden die Medien zentrifugiert (125 g) und der Antikörper aus dem Überstand aufgereinigt. Die Isolation des FDC-6 erfolgte mit T-Gel (#20500, Pierce Thiophilic Adsorbent, Thermo) nach den Angaben des Herstellers.

II.2.3. Nukleinsäure-Methoden

II.2.3.1. Genotypisierung der Mäuse

II.2.3.1.1. DNA-Gewinnung aus Mausgewebe

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ihnen im Alter von etwa drei Wochen ein kleines Stückchen des Schwanzes abgeschnitten und ca. 0,5 mm davon in 92 µl DNA-Lysepuffer und 8 µl Proteinase K-Stocklösung (20 mg/ml in H₂O_d, #03115852001, Roche) gegeben. Der Ansatz wurde für 1-2 Stunden bei 55°C inkubiert und die Lyse durch gelegentliches Vortexen erleichtert. Nach erfolgreicher Lyse des Gewebes wurde die DNA-Lösung für 10 min auf 99°C erhitzt, um die Proteinase K zu zerstören. Dann wurden verbliebene Gewebsreste abzentrifugiert (13000 g, 20 min) und der Überstand zur PCR-Analyse abgenommen.

Um eine Nachgenotypisierung der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde bei der Tötung statt eines Schwanzstückes ein Stückchen Niere entnommen, das auf die gleiche Weise lysiert wurde wie bereits für die Schwänzchen beschrieben.

II.2.3.1.2. PCR-Analyse zur Genotypisierung

Die Genotypisierungs-PCR folgte (für alle Primer) stets dem folgenden Protokoll und wurde mit dem beschriebenen Programm durchgeführt.

Ansatz pro Probe:	15,25 µl H ₂ O _{dd}	1 µl 5'-Primer (25 pmol/µl)
	2,5 µl Puffer rot (siehe Taq)	1 µl 3'-Primer (25 pmol/µl)
	2 µl Enhancer (siehe Taq)	0,25 µl Taq (#01-1030, Peqlab)
	1,5 µl MgCl ₂ (siehe Taq)	0,5 µl DNA-Lysat
	1 µl dNTPs (#20-3012, Peqlab)	= 25 µl pro Ansatz

Programm:	1)	95°C	3 min
	Touch down:	2)	95°C 30 sek
		3)	63°C 30 sek (-1°C/Wiederholung)
		4)	72°C 30 sek -> Schritte 2 bis 4 10x, dann zu 5
	Amplifikationsphase:	5)	95°C 30 sek
		6)	53°C 30 sek
		7)	72°C 30 sek -> Schritte 5-7 35x, dann 8
	8)	72°C	3 min, danach 4°C

II.2.3.1.3. Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen zur Genotypisierung

5'-Fibronektin	5'-TGTCCCATATAAGCCTCTGCT-3'	Produkt 237 Bp ohne loxP
3'-Fibronektin	5'-ACCCCTGAGCATCTTGAGTG-3'	Produkt 279 Bp mit loxP
5'-Col	5'-CAGCTCTCCATCAAGATGGT-3'	Produkt ca. 500 Bp
3'-Cre	5'-ATGTTTAGCTGGCCCAAATG-3'	
5'-Mx	5'-GCAAGCTCAGGCTTTTTTCAC-3'	Produkt ca. 450 Bp
3'-Cre	5'-ATGTTTAGCTGGCCCAAATG-3'	
5'-Alb	5'-TAGTGTGGTTAATGATCTACAG-3'	Produkt ca. 500 Bp
3'-Cre	5'-ATGTTTAGCTGGCCCAAATG-3'	
5'-LacZ (ROSA)	5'-TTACGATGCGCCCATCTACAC-3'	Produkt ca. 520 Bp
3'-LacZ (ROSA)	5'-TTACCCGTAGGTAGTCACGCA-3'	

II.2.3.2. DNA-Isolation aus Zellen und PCR

II.2.3.2.1. DNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation von DNA aus Zellen fand entweder mit dem QIAamp DNA Mini Kit (#51399, Qiagen) nach Herstellerangaben statt oder die Zellen wurden mit dem DNA-Lysepuffer lysiert, der oben beschriebenen Anleitung für Mausgewebe folgend (s. II.2.3.1.1).

II.2.3.2.2. PCR auf genomische DNA kultivierter Osteoblasten

Ansatz pro Probe:	18,75 µl H ₂ O _{dd}	0,5 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
	2,5 µl Puffer blau (siehe Taq)	0,5 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
	1,5 µl MgCl ₂ (siehe Taq)	0,25 µl Taq (#01-1030, Peqlab)
	0,5 µl dNTPs (#20-3012, Peqlab)	0,5 µl DNA Probe

Programm:	1) 94°C 10 min
	2) 94°C 30 sek
	3) 58°C 30 sek
	4) 72°C 2 min -> Schritte 2 bis 4 35x, dann Schritt 5
	5) 72°C 10 min, danach 4°C

II.2.3.2.3. Oligonukleotid-Sequenzen zur PCR auf kultivierte Osteoblasten

Ansätze: Fwd3/Rev1, Fwd1/Rev2 (nested), Fwd1/Rev3 (nested)

FN-DNA-fwd1	5'-AGGGTGTGAGCCGGACAAC-3'
FN-DNA-fwd3	5'-TCGCACCCGCTGCGCTGCA-3'
FN-DNA-rev1	5'-ATTGTCAAAACAGCCAGCTGCGA-3'
FN-DNA-rev2	5'-CAACTGACTTGGTGAGCCTGCA-3'
FN-DNA-rev3	5'-GTAGAATTTGTTAGCGCACTTGAG-3'

II.2.3.3. DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Zur Analyse der Fibronectin-PCR wurden 2%ige Gele verwendet, da das Fragment recht klein war und ein Unterschied von 34 Bp detektierbar sein musste. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose (#15510-027, Invitrogen) durch Aufkochen in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden pro 100 ml Gel 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, #2218.1, Roth) zugegeben und das Gel in einen Schlitten gegossen. Für alle anderen PCRs war ein Agarose-Gehalt von 1% in den Gelen ausreichend. Die PCR-Proben wurden mit der entsprechenden Menge DNA-Probenpuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit TBE-Puffer bei 150 Volt.

II.2.4. Protein-Methoden

II.2.4.1. Fibronectin-Isolation und Markierung

II.2.4.1.1. Fibronectin-Isolation (pFN/oFN) über eine Gelatine-Säule

Aufgrund seiner starken Affinität zu denaturiertem Kollagen, lässt sich Fibronectin über eine Gelatine-Säule aufreinigen [161]. Dazu wurde Gelatine Sepharose 4B (#17-0956-01, Amersham, GE Healthcare) möglichst luftfrei in eine Säule gefüllt und das Gelbett mit 100 ml Equilibrierungspuffer gespült. Wahlweise konnte die Säule dann (für pFN) mit 250 ml humanem Blutplasma (Blutbank, Uniklinik Heidelberg) oder (für oFN) mit 100 ml humaner amniotischer Flüssigkeit (Reste amniotischer Flüssigkeit aus humangenetischen Laboratorien in Heidelberg und Mannheim) beladen werden. Die amniotische Flüssigkeit (Fruchtwasser) wurde dazu vorher gegen Equilibrierungspuffer dialysiert und gefiltert. Nach der Beladung der Säule wurde diese mit 150 ml Equi-

librierungspuffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution mit Elutionspuffer, bei welcher 1 ml-Fraktionen einzeln aufgefangen und fotometrisch gemessen wurden (280 nm). Die Fraktionen mit einem Proteingehalt von mehr als 0,1 mg/ml wurden gepoolt und später aufkonzentriert. Die Säule wurde nach der Elution mit 100 ml Equilibrierungspuffer reequilibriert und optional eine Desorption durchgeführt (100 ml Desorptionspuffer und anschließend 100 ml Equilibrierungspuffer). Die Lagerung der Säule erfolgte in 20% Ethanol bei 4°C.

II.2.4.1.2. Fibronectin-Depletion des FCS

Für die Zellkultur-Experimente war es von Bedeutung, den Kulturen kein exogenes Fibronectin zuzuführen. Daher musste das Fibronectin des fötalen Kälberserums (FCS) aus diesem entfernt werden. Dazu wurde das FCS wie oben beschrieben über die Gelatine-Säule gegeben. Das Fibronectin-freie FCS (der Durchfluss) wurde aufgefangen, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das Fibronectin aus dem FCS wurde eluiert und verworfen.

II.2.4.1.3. Aufkonzentration des isolierten Fibronectins

Das über die Gelatine-Säule aus Blutplasma und Fruchtwasser isolierte und eluierte Fibronectin wurde über Zentrifugation mit Konzentratoren (Macrosep, #OD100C36, Pall) nach Herstellerangaben eingeeengt. Anschließend wurde das aufkonzentrierte Fibronectin ausgiebig gegen PBS dialysiert, um den Harnstoff aus dem Elutionspuffer möglichst vollständig zu entfernen.

II.2.4.1.4. Fluoreszenzmarkierung von Fibronectin

Für die Markierung des Fibronectins mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (#A10235, Molecular Probes, Invitrogen) bzw. Oyster 500 (#OY-500-1-N-1xV, Dianova) verwendet. Die Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Markierung wurden jeweils 1 mg Fibronectin (mit einer Konzentration von 2 mg/ml) eingesetzt. Das markierte Fibronectin wurde vor der Injektion in Mäuse sterilfiltriert.

II.2.4.2. Proteingewinnung aus Zellen

Zur Proteingewinnung wurde Protein-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren (Cocktail Set I, #535142, Calbiochem, Merck) auf die Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Pipette abgekratzt und samt der Lösung entnommen. Die Zelltrüm-

mer wurden durch Zentrifugation pelletiert (20 min, 13000 g, 4°C), das Lysat aliquotiert und bis zu seiner Verwendung bei -20°C eingefroren.

II.2.4.3. Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmengenbestimmungen aus Lysaten wurden mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce (#23235, Thermo) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

II.2.4.4. Protein-Gelelektrophorese

Die Protein-Gelelektrophorese diente der Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrer Größe. Es wurden Fertiggele der Firma Invitrogen benutzt. Je nach Größe des interessierenden Proteins wurden 3-8%ige Tris-Azetat-Gele (NuPAGE Novex, 1 mm Dicke) oder 12%ige Bis-Tris-Gele (NuPAGE Novex, 1 mm Dicke) verwendet. Zur Gelelektrophorese der Tris-Azetat-Gele wurde ein Tris-Azetat-Laufpuffer (NuPAGE, #LA0041), für die Bis-Tris-Gele ein MOPS-Laufpuffer (NuPAGE, #NP0001) eingesetzt. Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Probenpuffer versetzt und für 3 min auf 99°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt. Für native Protein-Gelelektrophoresen wurden ebenfalls die Tris-Azetat-Gele eingesetzt, da diese kein SDS beinhalten. Die Proben wurden jedoch mit einem anderen Probenpuffer gemischt und nicht erhitzt. Als Laufpuffer der nativen Gele wurde die gleiche Lösung verwendet, die auch als Transferpuffer zum Blotten benutzt wurde.

II.2.4.5. Western Blotting

II.2.4.5.1. Protein-Transfer auf eine Membran

Das Western Blotting diente der Überführung in einem Gel aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran. Die Proteine auf der Membran können über immunologische Methoden (Antikörper-Färbungen) detektiert und so charakterisiert werden. Es wurde ein Nassblot-Verfahren verwendet. Das heißt, der Transfer erfolgte in einer mit Puffer gefüllten Kammer. Dazu wurde die Membran zwischen mehreren Schwämmchen und zwischen zwei Filterpapieren so auf das Gel aufgebracht, dass bei ca. 25 Volt (1 h, RT) ein Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran gewährleistet war. Die PVDF-Membran (Amersham Hybond-P, #RPN303F, GE Healthcare) musste vor ihrer Verwendung mit 2-Propanol getränkt und dieser dann mit H₂O_d ausgewaschen werden. Nach dem Blotten wurde die Membran mit einer Ponceau-Lösung (#33427.01, Serva) gefärbt, um

den erfolgreichen Protein-Transfer abzusichern. Die Entfärbung erfolgte mit H_2O_d . Im Anschluss fand die Antikörper-Behandlung der Membran statt.

II.2.4.5.2. Immundetektion von Proteinen nach dem Western Blotting

Nach dem Protein-Transfer auf die PVDF-Membran wurde diese mit Antikörpern behandelt. Dazu wurde der Primärantikörper in entsprechender Konzentration in Blocklösung (5% Milchpulver in TBS-T) gegeben und in einen Folienbeutel eingeschweißt. Die Inkubation fand für mindestens eine Stunde bei RT statt oder ü. N. bei 4°C. Danach wurde die Membran 3x etwa 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in entsprechender Konzentration in Blocklösung eingeschweißt (Inkubation wie Primärantikörper). Nach der zweiten Inkubation wurde wieder gewaschen (s. o.). Zum Schluss fand noch ein letzter Waschschrift mit TBS statt, bevor das Detektionsreagenz Pierce ECL Western Blotting Substrat (#32106, Thermo) nach Herstellerangaben verwendet wurde. CL-X Posure Filme (Pierce #34090, Thermo) wurden durch Auflegen auf die mit Frischhaltefolie abgedeckte Membran belichtet und danach entwickelt. Nach erfolgreicher Immundetektion wurde die Membran für wenige Sekunden in Coomassie-Färbelösung gefärbt und für 1-3 h mit Coomassie-Entfärbelösung (bei RT) entfärbt, getrocknet und aufbewahrt.

II.2.4.6. ELISA

II.2.4.6.1. Gesamt-Fibronectin-ELISA (pFN-ELISA)

Der Gesamt-Fibronectin-ELISA wurde mit Maus-Plasma oder Medienüberständen kultivierter Osteoblasten durchgeführt. Die Methode orientierte sich an einem publizierten Protokoll [54]. Hierzu wurden 96 Well ELISA-Platten (#655061, Greiner) mit 50 µl Primärantikörper-Lösung (anti-human Fibronectin, #F3648, Sigma-Aldrich, Endkonzentration 1,7 µg/ml) pro Well befüllt und die Platte ü. N. bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde anschließend 3x mit PBS-T gewaschen und danach mit 50 µl Blocklösung (3% BSA in PBS-T) pro Well inkubiert (1 h, RT). Nach dem Blocken wurde erneut 3x gewaschen und danach die Standardreihe, Kontrollen und Proben aufgetragen (je 50 µl pro Well). Das Maus-Plasma wurde zu diesem Zweck 1:750 in Verdünnungspuffer (1% BSA in PBS-T) verdünnt. Die Standardreihe wurde mit Maus Plasma Fibronectin (#IMFBN, Dunn) angesetzt (4000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ng/ml). Nach der Inkubation der Proben (2 h, RT) wurde 5x gewaschen und dann 50 µl Sekundärantikörper-Lösung (anti-human Fibronectin-HRP konjugiert, #P0246, Dako, 1:500 in Verdünnungspuffer) pro Well zugegeben und die Platte für 45 min bei RT belassen. Nach erneutem fünfmaligem Waschen kamen pro Well 50 µl TMB (#613544, Calbiochem, Merck) auf die Platte (25 min, RT, dunkel). Durch Zu-

gabe von 50 µl Stopp-Lösung pro Well wurde die Reaktion unmittelbar vor dem fotometrischen Messen (bei 450 nm) der Platte gestoppt.

II.2.4.6.2. EDA-Fibronectin-ELISA (EDA-ELISA)

Der EDA-Fibronectin-ELISA wurde mit Maus-Plasma oder Medienüberständen von Osteoblasten-Kulturen durchgeführt. Die Prozedur entsprach weitestgehend der des Gesamt-Fibronectin-ELISAs. Als Primärantikörper wurde jedoch ein Antikörper gegen die EDA-Domäne des Fibronectins verwendet (#FN-3E2, Endkonzentration 10 µg/ml). Als Standard wurde Fibroblasten-Fibronectin (#341633, Calbiochem, Merck) verwendet (Standardreihe 2000, 1500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,26 ng/ml).

II.2.4.6.3. EDB-Fibronectin-ELISA (EDB-ELISA)

Der EDB-Fibronectin-ELISA wurde mit Maus-Plasma oder Medienüberständen von Osteoblasten-Kulturen durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen die EDB-Domäne des Fibronectins verwendet (BC-1, Endkonzentration 0,363 µg/ml). Als Standard wurde Fibronectin aus amniotischer Flüssigkeit (aFN) verwendet (Standardreihe 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 62,5 ng/ml). Nach Zugabe der Proben wurde die Platte 10 min geschüttelt (450 rpm) und 20 min bei RT sowie weitere 90 min bei 37°C inkubiert.

II.2.4.6.4. Onkofötales Fibronectin-ELISA (oFN-ELISA)

Der oFN-Fibronectin-ELISA wurde mit Maus-Plasma oder Medienüberständen von Osteoblasten-Kulturen durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen die glykosylierte variable Region des Fibronectins verwendet (FDC-6, Endkonzentration 1,7 µg/ml). Als Standard wurde Fibronectin aus amniotischer Flüssigkeit (aFN) verwendet (Standardreihe 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 25 ng/ml).

II.2.4.6.5. Osteokalzin-ELISA

Der Osteokalzin-ELISA mit Maus-Seren oder Medienüberständen von Osteoblasten-Kulturen wurde mittels eines Kits (Mouse Osteocalcin EIA Kit, #BT-470, Biomedical Technologies) den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Dazu wurde das Blutserum 1:10 verdünnt, die Medienüberstände wurden pur oder verdünnt (bis 1:10) verwendet.

II.2.5. Knochenmethoden

II.2.5.1. Radiologische Messungen von Knochendichte und -architektur

II.2.5.1.1. Bestimmung der Knochendichte mittels pQCT

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) ist geeignet um die Knochendichte peripherer Körperteile (z. B. Beine, Arme) zu ermitteln. Kortex und Trabekel können getrennt voneinander betrachtet werden, da eine Art Querschnitt an der ausgewählten Stelle evaluiert wird. Dies wurde *ex vivo* am distalen Femur der Mäuse durchgeführt. Dazu wurden die Beine der Mäuse bei deren Tötung entnommen, grob von Muskelfleisch befreit, in 70% Ethanol fixiert und gelagert (4°C). Für die pQCT-Messungen wurde der Femur von Hüfte und Tibia getrennt, gesäubert und in einem Röhrchen mit 70% Ethanol in der Messapparatur (XCT Research SA⁺, Stratec) positioniert. Projektabhängig wurde die Referenzlinie in den Bereich der Wachstumsfuge oder an den Beginn des Knochens gelegt (Abb. II.1). Dann wurden entweder Schnitte in einem zur Knochenlänge proportionalen Abstand gemessen (Prozentmethode, Mx/AlbCre) oder es wurden mehrere Schnitte in ähnlichen Bereichen gemacht und die Auswahl der auszuwertenden Schnitte erfolgte anhand von Formkriterien, um möglichst immer den gleichen Bereich zu untersuchen (Scanmethode, ColCre). Die unterschiedlichen Messmethoden hatten organisatorische Gründe und beeinflussten die Ergebnisse nicht (sichergestellt durch einen Vergleich von Stichproben). Alle Messungen wurden mit einer Schichtdicke von 0,5 mm, einer äußeren Schwelle von 280 mg/cm³ (Grenze des Knochens zur Umgebung) und maximaler Auflösung (70 Millivoxel) durchgeführt.

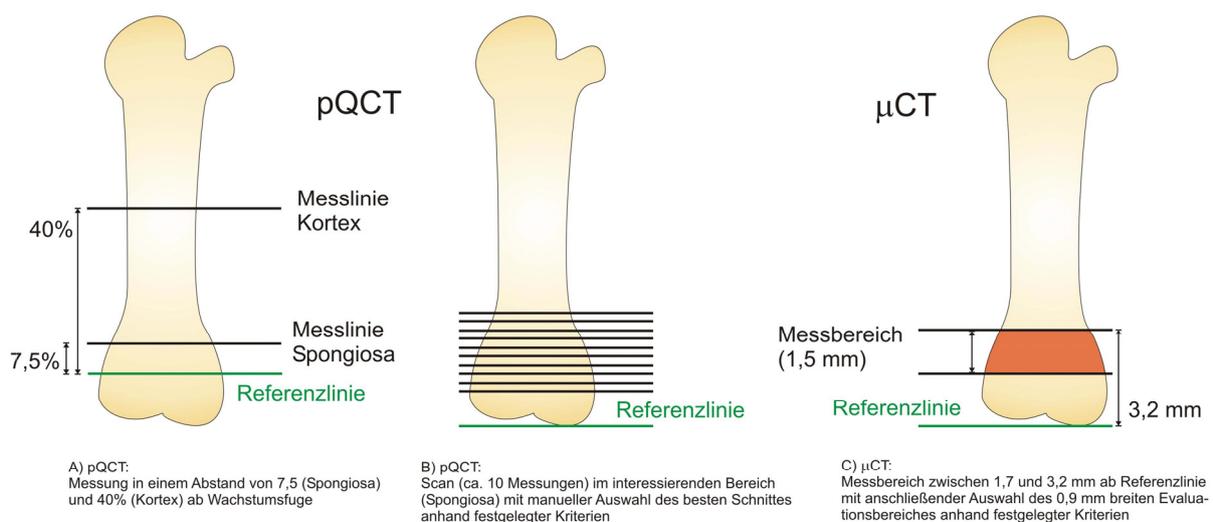


Abbildung II.1: Schema der Messmethode pQCT und μCT

Die pQCT-Messung wurde nach der Prozentmethode (A) oder alternativ nach der Scanmethode (B) durchgeführt. Beide Methoden evaluierten einen ähnlichen Bereich, der auch in der μCT-Messung untersucht wurde (C)

Prozentmethode: Die Referenzlinie wurde knapp unterhalb der Wachstumsfuge angelegt (Abb. II.2). Ausgehend von dieser Referenzlinie wurde eine Messung im Abstand von 7,5% (bezogen auf die individuelle Knochenlänge) durchgeführt. Diese Messung diente der Bestimmung der trabekulären Knochendichte (Spongiosa). Es wurde der Abschälmodus 2 verwendet (innere Schwelle 400 mg/cm^3 , alles darunter zählt als Spongiosa), der die Spongiosa vom kortikalen Rand abtrennte. Eine zweite Messung bei 40% diente zur Bestimmung der kortikalen Knochendichte (hier keine Spongiosa mehr). Die Bestimmung der kortikalen Dichte erfolgte ausschließlich über den Prozentmodus und mit einer Schwelle von 710 mg/cm^3 (alles größer 710 = Kortex).

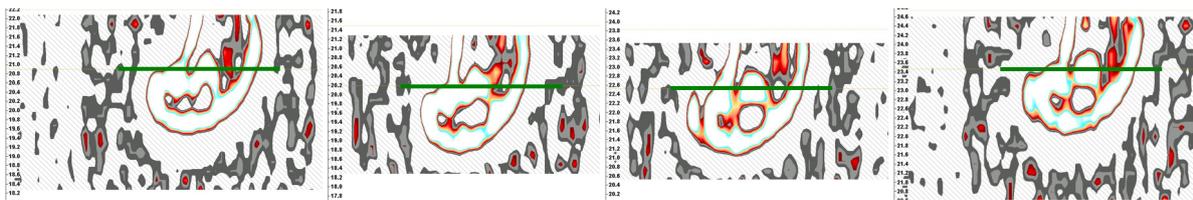


Abbildung II.2: Wahl der Referenzlinie beim Prozentmodus der pQCT-Analyse

Die pQCT-Messungen der MxCre- und AlbCre-Linie wurden im Prozentmodus am linken distalen Femur durchgeführt. Hier sind exemplarisch vier verschiedene Knochen und die jeweilige Lage der gewählten Referenzlinie (grün) knapp unterhalb der Wachstumsfuge gezeigt. Ausgehend von der Referenzlinie wurde bei 7,5 und 50% die Knochendichte gemessen. Die Messlinien sind nicht eingezeichnet, da sie oberhalb der Bildränder liegen.

Scanmethode: Die Auswahl des zu evaluierenden Schnitts erfolgte (ohne Kenntnis des Genotyps) anhand der Kortexform. Der ausgewählte Schnitt wurde mit dem Abschälmodus 20 (50%) ausgewertet (die 50% mit der geringsten Knochendichte wurden als Spongiosa betrachtet).

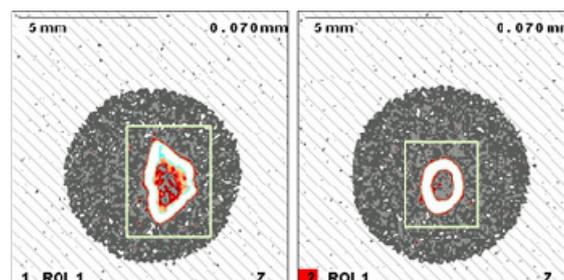


Abbildung II.3: Beispiel einer pQCT-Messung von Spongiosa und Kortex

Das linke Bild zeigt den ausgewählten Schnitt im Bereich der Spongiosa. Das rechte Bild zeigt den Schnitt bei 40% der Knochenlänge. Der Kortex ist hier als Ring zu erkennen, Trabekel im Inneren hingegen fehlen.

II.2.5.1.2. Bestimmung der Ultrastruktur des Knochens mittels μCT

Die Mikro-Computertomographie (μCT) erlaubt es, die Knochenstruktur eines ausgewählten Areals dreidimensional zu erfassen und so neben der Knochenmasse auch die Architektur der Spongiosa zu untersuchen. Die Messungen erfolgten am isolierten Femur, der in einem mit 70% Ethanol befüllten Röhrchen im Gerät (VivaCT 40, Scanco) positioniert wurde. Die Messungen

durften im Labor von Herrn J. A. Gasser (Novartis International AG, Basel, Schweiz) selbst durchgeführt werden. Die Referenzlinie wurde an das distale Femurende gelegt und der Messbereich ausgehend von der Referenzlinie so gewählt, dass der Bereich zwischen 1,7 mm und 3,2 mm gemessen wurde (Abb. II.1). Als untere Schwelle wurde der Wert 330 mg/cm^3 gewählt (Werte über dieser Schwelle galten als Knochen). Die einzelnen Schnitte hatten eine Dicke von $10,5 \text{ }\mu\text{m}$. Aus dem Messbereich wurden nach Formkriterien 86 aufeinander folgende Schnitte gewertet (insgesamt ca. 0,9 mm), damit in allen Knochen ein möglichst ähnlicher, vergleichbarer Bereich berücksichtigt wurde. Die obere Schwelle war bei 1000, Gauß Sigma bei 0,8 und Support bei 1 gewählt. Um die Spongiosa vom Kortex abzugrenzen, wurde mit der zum Gerät gehörenden Software eine manuelle Grenze zwischen Trabekeln und Kortex gezogen, so dass die Spongiosa als zusammenhängender Block dreidimensional betrachtet und ausgewertet werden konnte.

II.2.5.2. Histologische Untersuchungen mineralisierten Knochengewebes

II.2.5.2.1. Einbettung von Knochenproben in Kunststoff

Da Knochen ein sehr hartes Gewebe ist, gibt es zwei mögliche Art und Weisen Knochenschnitte anzufertigen. Die eine Möglichkeit ist, den Knochen zu entkalken, damit er weich und leicht zu schneiden wird. Die andere Möglichkeit ist, den Knochen in ein ähnlich hartes Material einzubetten und mit einem Hartmetallmesser dünne Schnitte anzufertigen. Um solche Schnitte von unseren Proben machen zu können, verwendeten wir die Tibiae ausgewählter Versuchstiere. Die Knochen wurden bei der Tötung der Mäuse entnommen und das Gewebe mit 70% Ethanol fixiert. Die isolierte Tibia wurde dann unter Verwendung eines Kunststoffeинbettungs-Kits („Osteo-bed bone embedding kit“, #17734-1, Polyscience) in ein Kunststoffblöckchen eingeschlossen. Dazu wurden die Knochenproben zuvor entsprechend der Herstellerangaben durch eine graduell aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Die Kunststofflösung bestand aus Methylmethacrylat (MMA), Dibutylphtalat und Benzoylperoxid. Zur Einbettung wurden die Knochen in spezielle Förmchen (PE-Einbettformen, #64708955, Heraeus Kulzer) gegeben, die mit der Kunststofflösung befüllt und luftdicht verschlossen wurden. Die Auspolymerisierung erfolgte bei 34°C (ca. 24 h).

II.2.5.2.2. Anfertigung der Kunststoffschnitte

Die Kunststoffblöckchen wurden für die Schneideprozedur zugesägt, um die verbleibende Kunststoffmenge um die Knochenprobe herum zu minimieren. Die Schnitte wurden mit einem Tischmikrotom angefertigt. Dazu wurde der Kunststoffblock vor und während des Schneidens mit 50% Ethanol benetzt. Der Schnitt wurde in einem Schälchen mit 70% Ethanol auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem feuchten Papierblättchen bedeckt und durch etwas Druck mit einer Hand-

rolle fest angedrückt. Ein zweiter Objektträger wurde darauf gepresst und der Schnitt auf einer warmen Platte getrocknet. Die Objektträger wurden vor ihrer Verwendung mit einem dünnen Film einer Eiweiß-Glycerin-Lösung (#P049.1, Roth) versehen und der Flüssigkeitsanteil des Filmes durch Hitze verdampft.

II.2.5.2.3. Masson-Goldner Färbung der Kunststoffschritte

Das den Knochenschnitt umgebende Plastik wurde durch Azeton entfernt. Dazu wurden die Schritte 3x (10 min, RT) in Azeton inkubiert und anschließend durch eine absteigende Ethanolreihe gewässert (100%, 98%, 80%, 70%, H₂O_d je 3 min). Zuerst wurden die Schritte in Hämatoxylin (nach Gill II, #T864.2, Roth) inkubiert (10 min) und anschließend in Leitungswasser gebläut (10 min). Danach wurde in Säurefuchsin-Lösung (6 min) gefärbt und in H₂O_d und 1% Essigsäure gewaschen, bevor die Schritte in Phosphormolybdän-Lösung (2 min) inkubiert wurden. Im Anschluss folgten drei Waschschrte in 1% Essigsäure, dann eine Färbung in Lichtgrünlösung (5 min), wieder drei Waschschrte in 1% Essigsäure und eine rasche Entwässerung der Schritte durch Behandlung mit unverdünntem Ethanol (2x 3 min). Vor dem permanenten Eindecken der Schritte mit Roti-Histokitt (#6638, Roth) und einem Deckgläschen wurden die Schritte mit einem Xylol-Ersatz-Produkt (Roti-Histol, #6640, Roth) behandelt (2 min).

II.2.5.3. Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenschnitte

Zur histomorphometrischen Untersuchung wurden die Kunststoff-Knochenschnitte wie oben beschrieben nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt und anschließend evaluiert. Vor der Färbung wurden die noch plastizierten Schritte unter Fluoreszenz-Anregung abfotografiert (Nikon Imaging Center, Heidelberg), um die Calcein-Signale derselben Schritte auswerten zu können.

Als primäre Spongiosa wurde der 120 µm breite Bereich direkt unterhalb der Wachstumsfuge betrachtet. Als sekundäre Spongiosa bezeichneten wir den trabekulären Bereich unter der primären Spongiosa bis hin zu einer Grenze in einem Abstand von 2 mm ausgehend von der Wachstumsfuge. Neben der Spongiosa wurde auch der Kortex in diesem Bereich vermessen. Die Auswertung folgte der international anerkannten ASBMR-Nomenklatur [219] (VIII.1.1.5).

II.2.5.4. Infrarot-Spektroskopie an Knochenproben

Die Infrarot-Spektroskopie ist ein Verfahren zur Probenanalyse und durfte selbständig im Forschungszentrum Karlsruhe bei Herrn D. Moss (Institut für Synchrotronstrahlung, ANKA, Eggen-

stein) nach Einführung durch Herrn M. Süpfle durchgeführt werden. Man macht sich bei dieser Analyse die Eigenschaft zunutze, dass jedes Molekül im Infrarot-Spektrum eine individuelle Signatur hinterlässt, also wie ein Fingerabdruck zugeordnet werden kann. Natürlich ist diese Eigenschaft in Mischproben nur eingeschränkt nutzbar, dennoch lassen sich z. B. Verhältnisse zwischen Substanzen errechnen. Um die Knochenproben mittels Infrarot-Spektroskopie zu untersuchen, wurden Knochen-Kunststoffschnitte (1 µm) auf geeignete Objektträger aufgebracht.

Als Messmethode wurde die Transmissions-Spektroskopie gewählt, d. h. die Probe wurde unter einem Mikroskop (Bruker IRSkope II) Infrarot-Strahlung ausgesetzt (Bruker 66vs FTIR Spektrofotometer) und der Teil der Strahlung, der die Probe durchdrang (also nicht absorbiert wurde) mittels eines Detektors gemessen (MCT-Detektor). Die Objektträger durften daher keine Absorption im interessierenden Messbereich aufweisen, um das Signal nicht zu überdecken. Diese Bedingungen wurden von den eingesetzten BaF₂-Fenstern erfüllt (#2540120c, Korth). Die Auflösung lag bei 4 cm⁻¹ (1024 Scans pro Messung). Der Messbereich hatte einen Durchmesser von 20,8 µm und wurde entweder im Zentrum eines ausreichend großen Trabekels oder in der Mitte des Kortex gewählt.

Die Daten wurden zur Analyse einer Grundlinien-Korrektur unterzogen und mit Excel ausgewertet. Dazu wurden die Spektren vor der Grundlinien-Korrektur zunächst normalisiert. Anschließend wurden die folgenden Verhältnisse betrachtet (in nm): 900-1200/1580-1720 (Mineral/Matrix) und 1117/900-1200 (saures Phosphat).

II.2.5.5. Biomechanische Untersuchungen an Knochenproben

II.2.5.5.1. Bestimmung der Mikrohärtigkeit

Um funktionale Aspekte der Knochenproben zu untersuchen, wurde die Mikrohärtigkeit mit einem Vickers Stempel (MicroMet 5104, Buehler) ermittelt. Dazu wurde dieser Stempel so eingesetzt, dass für 10 Sekunden ein Gewicht von 10 Gramm auf die Knochenproben ausgeübt und anschließend der entstandene Abdruck vermessen wurde. Diese Untersuchungen wurden von einem Kooperationspartner (Herrn Y. Bala, Medizinische Fakultät Laennec, Lyon, Frankreich) durchgeführt. Dazu wurden ihm die Kunststoffblöckchen mit den bereits angeschnittenen Knochenproben übermittelt, so dass die Messungen am eingebetteten Knochen sowohl im Bereich des Kortex als auch der Spongiosa durchgeführt werden konnten. Die der Mikrohärtigkeit (kg/mm²) zugrunde liegende Formel ist $H_v = 1854,4 \cdot P \cdot d^{-2}$ (P ist das applizierte Gewicht, d ist die durchschnittliche Länge der zwei Diagonalen des Abdrucks). Pro Probe erfolgten zehn Messungen an verschiedenen Stellen.

II.2.5.6. Untersuchungen an entmineralisierten Knochengeweben

II.2.5.6.1. Entkalkung der Knochenproben

Da durch die Einbettung von Knochenproben in Kunststoff nach der oben beschriebenen Methode Immunfärbungen erschwert waren, wurden ausgewählte Knochen zur Gefriereinbettung entkalkt. Zu diesem Zweck wurden die bei der Tötung entnommenen Knochen zunächst in 10% NBF oder alternativ 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert (2 h, RT) und dann mit einer EDTA-Lösung (5-10% EDTA, pH 7, 4°C) entkalkt. Für einen typischen Knochen (Femur, Tibia) war eine Behandlung über zwei Wochen (Wechsel der Lösung alle 2-3 Tage) ausreichend. Zur Vorbereitung auf die anschließende Gefriereinbettung wurden die Knochen durch eine aufsteigende Saccharose-Reihe (in PBS) gezogen (10% für 1 h, RT / 20% für 1 h, RT / 30% ü. N. bei 4°C). Der entmineralisierte, weiche Knochen konnte dann in einem Kryostat mit Tissue-Tek (O.C.T. Compound, #4583, Sakura) eingebettet und geschnitten werden. Die Schnittdicke lag zumeist bei 5 µm.

II.2.5.6.2. X-Gal-Färbung entkalkter Knochenschnitte

Das Enzym β -Galaktosidase kann das Substrat X-Gal in eine Substanz umwandeln, die unter Anwesenheit von Sauerstoff zu einem unlöslichen blauen Farbstoff oxidiert. Diese Eigenschaft macht man sich nicht nur in der Molekulargenetik (Blau-Weiß-Screening von Bakterienkolonien bei Klonierungen), sondern auch bei der Charakterisierung der Promoter-Spezifität konditioneller Knockout-Mäuse zunutze. Um die Expression von Cre über den zu untersuchenden Promoter zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von Knochen entsprechender Mäuse angefertigt und gefärbt. Dazu wurden die Knochenschnitte 3x in LacZ-Waschlösung (je 5 min, RT) vorbereitet und dann in die LacZ-Färbelösung überführt. Die Färbung fand bei 34°C (48 h) statt. Nach der Färbung wurde in PBS gewaschen und eine Kernfärbung mit Kernechtrot durchgeführt (5 min, RT). Da Kernechtrot wasserlöslich ist, mussten die Schnitte permanent eingedeckt werden (oben bereits für die Masson-Goldner-Färbung genauer beschrieben, s. II.2.5.2.3).

II.2.5.6.3. Immunfluoreszenz-Färbung entkalkter Knochenschnitte

Die Knochen wurden schon vor der Entkalkung fixiert, so dass für die Immunfärbung keine weitere Fixierung erforderlich war. Die Gefrierschnitte wurden mit einer Flüssigkeitsbarriere ummalt (Pap pen, Sangyo), in PBS rehydriert und der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Schnitte gegeben (in PBS mit 5% Normalserum der Spezies, aus welcher der Sekundärantikörper stammte). Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer statt (mind. 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C). Danach wurde mindestens 3x mit PBS gewaschen (je 5 min, RT) und die In-

kubation mit dem Sekundärantikörper angeschlossen (Prozedur entsprechend der des Primärantikörpers). Zumeist (Ausnahme s. u.) war der Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass nach erneutem Waschen der Schnitte (wie zuvor) direkt mit einem wässrigen Medium (Mowiol) und einem Deckgläschen eingedeckt werden konnte. Zur Darstellung der Zellkerne wurde dem Zweitantikörper häufig der fluoreszierende Kernfarbstoff DAPI (#6335.1, Roth) in einer Konzentration von 0,3 µg/ml zugesetzt.

II.2.5.6.4. Chromogene Immunfärbung entkalkter Knochenschnitte

Um die histologische Auswertung zu erleichtern, wurden zwei Primärantikörper im Zusammenhang mit einer chromogenen Darstellung verwendet. Dies war erforderlich, um die einzelnen Zellen besser charakterisieren zu können, und betraf die Färbung gegen BrdU und Caspase-3.

Da BrdU (wie oben beschrieben, s. II.2.1.3.3) in die DNA eingebaut wird, war es erforderlich, die DNA der Zellen in den Gewebeschnitten zu denaturieren, um dem Antikörper eine Bindung zu ermöglichen. Um dies zu erreichen, wurden die Schnitte in Zitratpuffer inkubiert (ü. N. bei 60°C), nach dem Abkühlen auf RT kurz in PBS equilibriert (10 min) und mit dem Primärantikörper behandelt (1 h, RT). Im Anschluss folgte zur Ausschaltung der endogenen Peroxidase eine Behandlung mit H₂O₂ (frisch in PBS verdünnt, Endkonzentration 0,35%, 10 min, RT). Nach Waschen in PBS (3x 5 min) schloss sich eine Behandlung mit dem Sekundärantikörper an (1 h, RT). Der Sekundärantikörper war mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert, so dass eine Farbentwicklung mit dem Vector NovaRed Substrate Kit for Peroxidase (#SK-4800, Linaris) durchgeführt werden konnte. Nach erfolgreicher Farbreaktion wurde eine Kernfärbung (10 Sek) mit Hämatoxylin (nach Gill II, #T864.2, Roth) gemacht. Wie bereits für die Masson-Goldner-Färbung beschrieben (s. II.2.5.2.3) wurde danach gebläut, eine aufsteigende Alkohol-Reihe durchlaufen und die Schnitte permanent eingedeckt.

Bei der Caspase-3-Färbung war keine Denaturierung erforderlich. Die Primärantikörper-Inkubation wurde stets ü. N. (4°C) mit anschließender Inkubation bei RT (2 h) durchgeführt. Der weitere Ablauf entsprach dem für BrdU beschriebenen Protokoll.

II.2.5.7. Herstellung von Knochenlysaten

II.2.5.7.1. Herstellung von Proteinlysaten für Western Blotting

Zur Herstellung von Knochenlysaten wurden ausgewählten Mäusen Knochen (Femur und Tibia) entnommen, gründlich von Muskeln und Geweberesten befreit und nach Abschneiden beider

Knochenenden das Knochenmark mit Kochsalzlösung herausgespült. Die Knochen wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch Bearbeitung der Knochen mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff wurde ein feines Knochenpulver erzeugt und dieses in einen Knochen-Lysepuffer, der mit Proteinase-Inhibitoren versetzt war (Cocktail Set I, #535142, Calbiochem, Merck) aufgenommen. Zur optimalen Lyse wurde der Ansatz für 24 h in einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Da Guanidin-HCl in dem Lysepuffer enthalten war und dieses mit dem Protein-Probenpuffer nicht kompatibel war, wurden 100 µl Lysat mit 95% Ethanol (4°C, ü. N.) gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (13000 g, 20 min, 4°C) pelletiert und das Pellet gewaschen (TBS 1:10 in 95% Ethanol, 2 h, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und dann im Protein-Probenpuffer aufgenommen. Um gleiche Mengen Protein verschiedener Knochenlysat-Proben auf ein Gel aufzutragen, wurde eine Mengenbestimmung im Lysat gemacht und dann vergleichbare Proteinmengen eingesetzt.

II.2.5.7.2. Herstellung von Proteinlysaten für eine Hydroxyprolin-Bestimmung

Da Kollagen Typ I reich an der spezifischen Aminosäure Hydroxyprolin ist, wurde der Kollagengehalt von Knochenproben auf dieser Basis bestimmt. Hierzu wurde Knochenmaterial wie schon für die Herstellung von Knochenlysaten zur Proteinanalyse beschrieben gewonnen und mit flüssigem Stickstoff zermörsert. Zur Entkalkung wurde das Pulver in 0,2 M EDTA-Lösung (pH 7,2) aufgenommen und für 24-48 h auf einem Drehrad inkubiert (4°C). Durch Zentrifugation (13000 g, 20 min, 4°C) wurde das Knochenpulver pelletiert, die EDTA-Lösung entfernt und das Pellet mehrfach mit H₂O_d gewaschen, um möglichst alle EDTA-Reste auszuspülen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 8 M Salzsäure aufgenommen und bei 116°C (12 bis 24 h) hydrolysiert. Die anschließende Hydroxyprolin-Bestimmung erfolgte nach einer Methode, die der Literatur entnommen war [220].

II.2.5.8. Bestimmung des Mineralgehalts des Knochens

II.2.5.8.1. Veraschung der Knochenproben

Zur Bestimmung des Mineralgehalts wurden Knochenproben verascht. Das bedeutet, ausgewählte Proben (Tibia) wurden sorgfältig frei präpariert und vorübergehend eingefroren (flüssiger Stickstoff, dann -80°C). Zur Untersuchung wurden sie auf Alufolie-Stückchen gewogen (Nassgewicht), getrocknet (ca. 120°C, 2-12 h) und anschließend erneut gewogen (Trockengewicht). Um den organischen Knochenanteil zu verbrennen, wurden die Proben schrittweise (+200°C/h) auf eine Temperatur von 600°C gebracht (18 h) und anschließend wieder abgekühlt (-200°C/h). Bei dieser Veraschung blieb der Mineralanteil der Knochenproben zurück, so dass dieser Anteil nach

erneutem Wiegen (Veraschungsgewicht) durch Verrechnung mit dem Nass- bzw. Trockengewicht bestimmt werden konnte.

II.2.6. Nierenmethoden

II.2.6.1. Gefrierschnitte

Zur späteren Anfertigung von Gefrierschnitten wurden bei der Tötung der Tiere des Diabetes-Experiments die Nieren entnommen und nach einer kurzen Behandlung mit kaltem 2-Methylbutan (auch Isopentan genannt) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um die Nieren schneiden zu können, wurden sie später in einem Kryostat mit Tissue-Tek (O.C.T. Compound, #4583, Sakura) eingebettet. Die Schnittdicke lag bei 5 µm. Die Färbung der Schnitte erfolgte wie bereits für den Knochen beschrieben (II.2.5.6.3).

II.2.6.2. Paraffinschnitte

In der Abteilung unseres Kooperationspartners Herrn H.-J. Gröne (DKFZ, Heidelberg) wurden Nierenstücke der Tiere des Diabetes-Experiments in Paraffin eingebettet, Schnitte der Nierenproben angefertigt und PAS (für engl. „periodic acid Schiff“) gefärbt. Bei dieser Färbemethode entsteht ein Farbsignal durch die Reaktion mit nicht-substituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Mukoproteinen, Glykoproteinen, Glykolipiden und Phospholipiden.

II.2.6.3. Beurteilung des GSI

Der GSI (für engl. „glomerular sclerotic index“) der PAS-gefärbten Nierenschnitte wurde mit dem Programm QWin (Leica) ermittelt. Dazu wurden Aufnahmen der Glomeruli gemacht und mit Hilfe des Programms ein Gitter über die Glomeruli gelegt. Für jedes Kreuz dieses Gitters, das sich innerhalb des Glomerulus befand, wurde bestimmt, ob es im Mesangium lokalisiert war oder nicht. Pro Maus wurden 30 Glomeruli evaluiert.

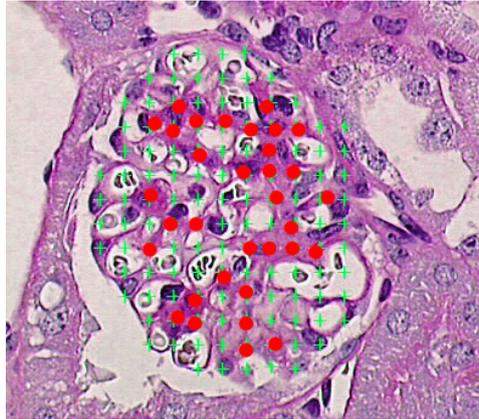


Abbildung II.4: Evaluation des GSI (für engl. „glomerular sclerotic index“)

Über den Glomerulus wird ein Gitter gelegt (grün) und für alle Knotenpunkte bestimmt, ob sie im Mesangium lokalisiert sind (wenn ja, roter Punkt). So erhält man eine Aussage über den prozentualen Anteil des Mesangiums am Kapillarknäuel.

II.2.7. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit dem SPSS statistical Package (Version 11.0, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Dabei wurde der t-Test verwendet. Um die Probenzahl zu erhöhen, wurden die Daten der weiblichen und männlichen Tiere vereint, da der Trend in beiden Gruppen stets in die gleiche Richtung zeigte, also keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennbar waren. Hierzu wurden die Einzelwerte der Weibchen jeweils durch den Mittelwert der Weibchen geteilt (gleiches für die Männchen), da Männchen generell eine etwas höhere Knochendichte (wirkt sich auch auf sekundäre Parameter aus) haben als Weibchen (geschlechtsneutralisierte Betrachtung). Alle Fehlerraten sind als Standardfehler angegeben (SEM für engl. „standard error of the mean“). Die p-Werte beziehen sich stets auf zweiseitige Betrachtungen.

III. Ergebnisse

III.1. Erzeugung der genetisch veränderten Versuchstiere

Für verschiedene Experimente wurden genetisch veränderte Mäuse benötigt, die in bestimmten Zellen oder Geweben kein Fibronektin mehr bilden konnten. Dazu wurden Mäuse, in deren Fibronektin-Gen loxP-Stellen inseriert waren (FN fl/fl), mit Mäusen verkreuzt, die das Gen für das Enzym Cre Rekombinase unter der Kontrolle des gewünschten Promoters (Col, Mx oder Alb) trugen. Die Wurfgröße in allen drei Linien (ColCre, MxCre, AlbCre) war vergleichsweise gering und lag bei durchschnittlich etwa vier Mauswelpen pro Wurf. Um die konditionellen Knockouts und Kontrollen in einem ähnlichen Zeitrahmen zu erhalten, war es daher erforderlich zunächst eine ausreichend große Elterngeneration zu erzeugen. Für die in der vorliegenden Arbeit benötigten etwa 350 Versuchstiere mussten insgesamt über 200 Verpaarungen der Elterngeneration durchgeführt werden, zu deren Erhalt wiederum im Vorfeld mehr als 100 Verpaarungen nötig waren. Die hohe Tierzahl erklärt sich u. a. dadurch, dass für das Diabetes-Experiment (s. III.4) ausschließlich männliche Tiere verwendet wurden. Mäuse sind ab einem Alter von 6-8 Wochen geschlechtsreif. Die Trächtigkeit der Weibchen dauert drei Wochen.

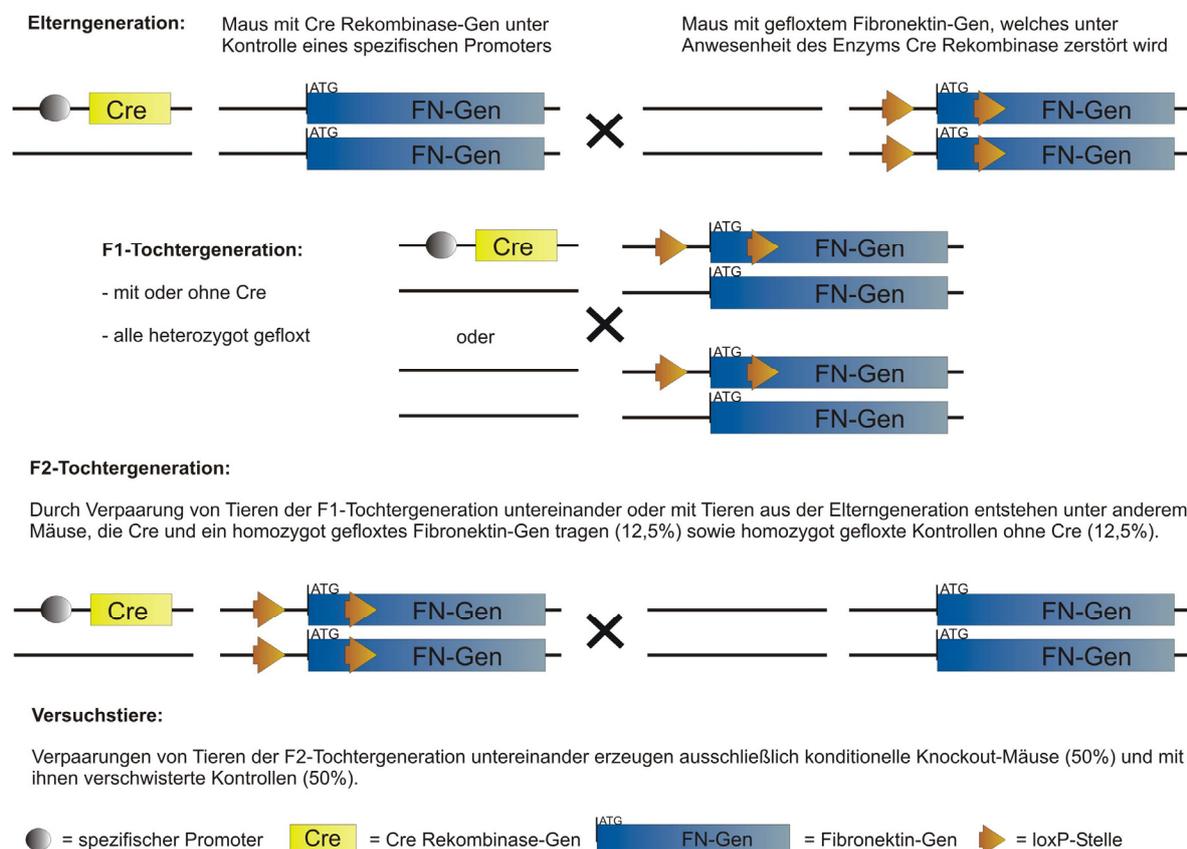


Abbildung IV.1: Verpaarungsschema zur Generierung konditioneller Knockout-Mäuse

III.2. Projekt A: Die Rolle des Osteoblasten-Fibronektins

Im Laufe der Knochenneubildung lagern die Osteoblasten eine Matrix ab (Osteoid), die Fibronektin enthält. Die Osteoblasten sind selbst in der Lage Fibronektin zu produzieren. Um die Rolle des Osteoblasten-spezifischen Fibronektins *in vivo* zu untersuchen wurde mit konditionellen Knock-out-Mäusen gearbeitet. Bei diesen Mäusen war das Fibronektin-Gen spezifisch in den Osteoblasten ausgeschaltet, so dass die knochenbildenden Zellen dieses Protein nicht mehr exprimieren konnten. Zu diesem Zweck fand der Col-Promoter Verwendung (ColCre-Mauslinie).

III.2.1. Nachweis der Spezifität des Col-Promoters

Um die Spezifität des Col-Promoters abzusichern, wurden Tiere, die den Col-Promoter besaßen, mit ROSA26 Reporter Mäusen verpaart [209]. Dieser spezielle Mausstamm trägt ein LacZ-Gen, das jedoch nur unter Anwesenheit von Cre aktiviert wird, so dass jene Zellen, in denen der Col-Promoter aktiv ist, damit beginnen, das Enzym β -Galaktosidase zu exprimieren [210]. Dieses Enzym ist in der Lage das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff umzusetzen. Den zu untersuchenden Tieren wurden die Knochen entnommen, entkalkt, Gefrierschnitte angefertigt und mit X-Gal gefärbt (Abb. III.A1). Das blaue Farbsignal in Osteoblasten und Osteozyten beweist, dass die Cre Rekombinase (ausschließlich) in diesen Zellen aktiv ist. Dies deckt sich mit Untersuchungen anderer Gruppen [221].

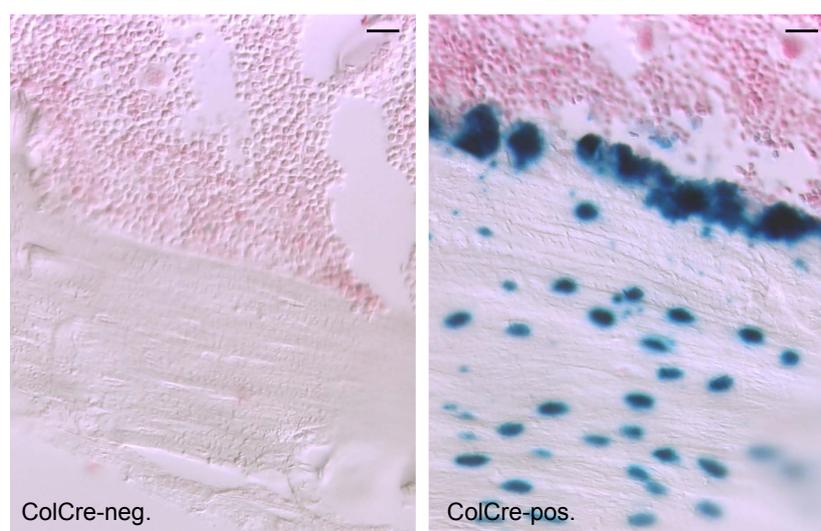


Abbildung III.A1: X-Gal-Färbung von Reporter-Mäusen mit bzw. ohne Col-Promoter
Dargestellt ist die X-Gal-Färbung von Reporter-Mäusen ohne (+/+ LacZ/+) und mit Col-Promoter (ColCre/+ LacZ/+). Im rechten Bild zeigt sich die Aktivität des Promoters durch eine Blaufärbung der Osteoblasten und Osteozyten. Die Balken entsprechen 20 μ m.

III.2.2. Erfolgreiche Ausschaltung über ColCre in Osteoblasten *in vitro*

III.2.2.1. Cre-Färbung kultivierter Osteoblasten

Bevor die konditionellen Osteoblasten-Fibronectin Knockout-Mäuse auf Veränderungen ihrer Knochen untersucht werden konnten, musste zunächst sichergestellt werden, dass das Fibronectin der Osteoblasten durch die Expression von Cre tatsächlich ausgeschaltet wurde.

Zu diesem Zweck wurden aus den konditionellen Knockout-Mäusen (ColCre/+ FN fl/fl) sowie aus Kontrollen (+/+ FN fl/fl) primäre Osteoblasten aus den Schädeldächern neugeborener Mauswelpen isoliert. Um die isolierten Zellen zu Osteoblasten zu differenzieren, wurden sie mit Differenzierungsmedium kultiviert. Der Nachweis der Cre Rekombinase in den konditionellen Knockout-Osteoblasten, nicht aber in den Kontroll-Osteoblasten, erfolgte mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung gegen Cre (Abb. III.A2). Bei den konditionellen Knockout-Osteoblasten zeigte sich eine positive Färbung in zahlreichen Zellkernen der Kulturen (Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI). Diese Cre-positiven Zellen befanden sich im Bereich der Kalziumphosphat-haltigen Knoten, die man als *in vitro* Produkt reifer Osteoblasten betrachtet und die mit einer von Kossa-Färbung erfolgreich schwarz angefärbt werden konnten.

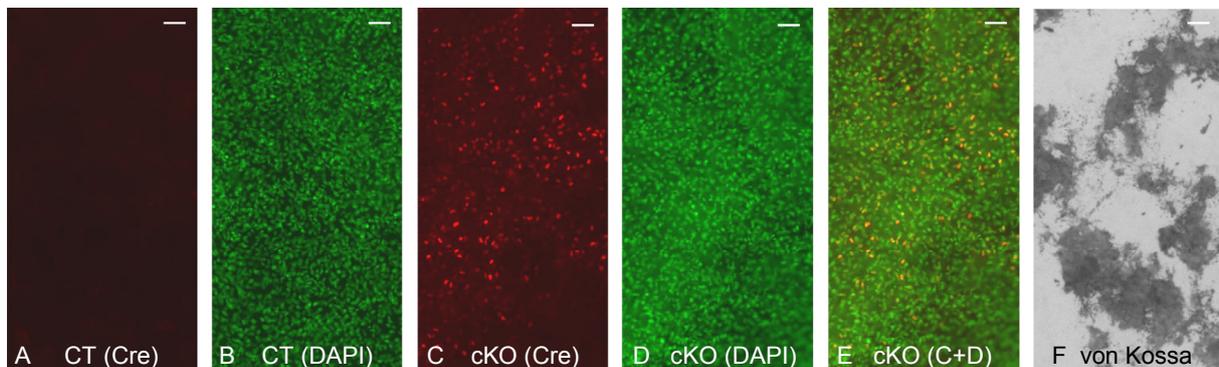


Abbildung III.A2: Anti-Cre-Färbung kultivierter primärer Osteoblasten

Im Gegensatz zu den Kontrollen (CT) (A+B) konnten die aus konditionellen Knockout-Mäusen (cKO) der ColCre-Linie isolierten Osteoblasten nach Kultivierung unter mineralisierenden Bedingungen mit einem Antikörper gegen Cre angefärbt werden (C). Durch eine Gegenfärbung der Kerne mit DAPI (D) ist beim Übereinanderlegen der Bilder erkennbar, dass das Cre-Signal erwartungsgemäß in den Zellkernen lokalisiert ist (E). Die für kultivierte mineralisierende Osteoblasten typischen Knoten konnten mit der von Kossa-Methode angefärbt werden (F). Die Balken entsprechen 50 μm .

III.2.2.2. Isolation genomischer DNA aus den Osteoblasten

Es blieb zu beweisen, dass das Enzym Cre in den Osteoblasten der konditionellen Knockout-Mäuse nicht nur anwesend war, sondern auch das Fibronectin-Gen durch Schnitte im Bereich der loxP-Stellen zerstörte und damit die Expression des Proteins unmöglich machte. Aus diesem Grund wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert und eine PCR mit Primern durchgeführt, die 5'-upstream und 3'-downstream der loxP-Stellen des geflochtenen Fibronectin-Gens gewählt waren (Fwd3/Rev1). Eine nested PCR mit den Primern Fwd1 und Rev2 ergab ein kleineres PCR-Produkt der konditionellen Knockout-Osteoblasten im Vergleich zu den Kontroll-Osteoblasten (Abb. III.A3). Der Größenunterschied der DNA-Fragmente entsprach dem erwarteten Unterschied, der bei Deletion des Genbereichs zwischen den beiden loxP-Stellen entstehen musste. Zur Sicherheit wurden zusätzlich beide Fragmente durch Sequenzierung verifiziert (Genterprise, Mainz). Ein Teil der DNA der konditionellen Knockout-Kulturen war jedoch nicht zerschnitten worden. Dies konnte über eine andere nested PCR mit dem Primer Rev3 (und Fwd1) gezeigt werden, der im Bereich zwischen den loxP-Stellen gewählt war, also nur binden konnte, wenn die DNA nicht zerschnitten worden war. Hier gelang für beide Kulturen der Nachweis mittels PCR (keine Abbildung). Dass nicht die gesamte isolierte DNA der konditionellen Knockout-Osteoblasten zerschnitten war, ließ sich durch kontaminierende Fibroblasten erklären, die bei der Gewinnung primärer Osteoblasten aus Maus-Calvariae stets in geringen Mengen mit isoliert und kultiviert werden. Da der Col-Promoter spezifisch für Osteoblasten ist, wurde Cre in den kontaminierenden Fibroblasten nicht exprimiert und deren Fibronectin-Gen daher nicht ausgeschaltet.

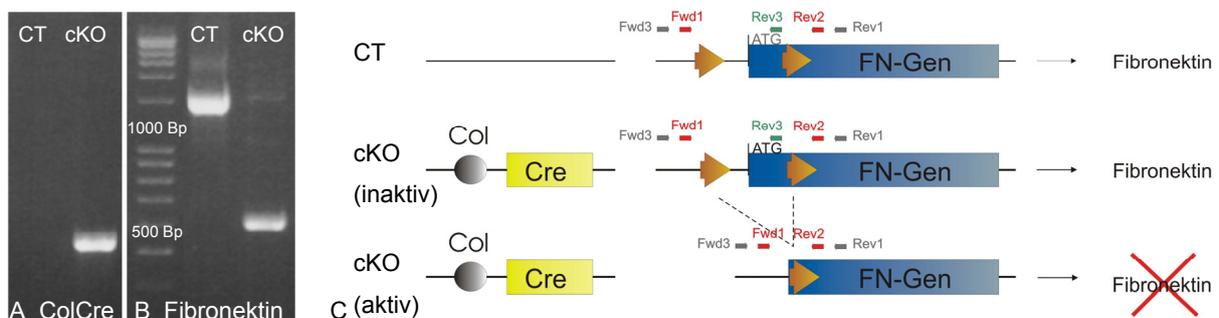


Abbildung III.A3: PCR-Analyse mit aus Osteoblasten isolierter genomischer DNA

Im Gegensatz zur Kontrolle (CT) waren die aus den konditionellen Knockouts (cKO) isolierten Zellen positiv für den Col-Promoter (A). Eine nested PCR mit den Primern Fwd1/Rev2 ergab ein großes Produkt für die CT-Kulturen und ein entsprechend kleineres Produkt für die cKO-Kulturen passend zur Deletion des Fibronectin-Gens (B). Das Schema (C) zeigt die Lage der gewählten Primer.

III.2.2.3. Bestimmung der Fibronectin-Produktion der Osteoblasten

Zur Sicherstellung einer erfolgreichen Ausschaltung des Osteoblasten-Fibronectins in den Kulturen auf Proteinebene, wurden die Medienüberstände auf ihren Osteokalzin- und Fibronectin-

gehalt getestet (mittels ELISA). Da Osteokalzin ein Marker für reife Osteoblasten ist, wurde der Fibronektin Gehalt durch den Osteokalzingehalt dividiert, um die Werte auf die tatsächliche Menge an Osteoblasten in jedem Well zu adjustieren (Abb. III.A4). Die Kulturen der konditionellen Knockouts produzierten signifikant weniger Fibronektin über Osteokalzin (CT $18,3 \pm 4,2$ vs. cKO $7,5 \pm 1,2$ in $\mu\text{g}/\text{ng}$, $n=14/8$, $p<0,05$). Die ColCre-positiven Osteoblasten wurden also tatsächlich ausgeschaltet. Passend zu den Ergebnissen der DNA-Isolation und PCR zeigte sich in den Kulturen der konditionellen Knockout-Osteoblasten ein Rest an Fibronektin, der durch kontaminierende Fibroblasten erklärbar war. Die Anzahl kultivierter Osteoblasten pro Well (widergespiegelt im absoluten Osteokalzingehalt der Medien) war dabei in Kontroll- und konditionellen Knockout-Kulturen im Mittel in etwa gleich (CT $84,4 \pm 14,6$ vs. cKO $88,0 \pm 8,0$ ng/ml, $n=14/8$, $p=0,8$).

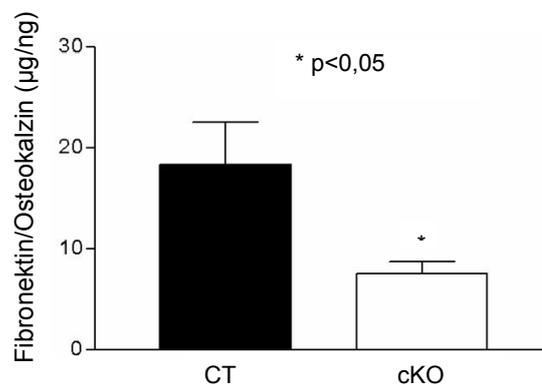


Abbildung III.A4: Bestimmung des Fibronektin Gehalts der Medienüberstände der Osteoblasten. Der Quotient von Fibronektin zu Osteokalzin der Kulturen der konditionellen Knockouts (cKO) ist im Vergleich zu den Kontrollen (CT) signifikant vermindert.

III.2.3. *In vivo* Untersuchungen zum Fibronektin der Osteoblasten

III.2.3.1. Fibronektin Gehalt des Knochens

III.2.3.1.1. Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten

Nachdem die Ausschaltung des Osteoblasten-Fibronektins über *in vitro* Experimente sichergestellt worden war, wurden entkalkte Knochenschnitte von vier Monate alten Mäusen der ColCre-Linie gegen Fibronektin gefärbt. Überraschenderweise ergaben die Färbungen, dass die Fibronektinmenge in der extrazellulären Knochenmatrix der konditionellen Knockout-Mäuse nicht geringer war als in den Kontrollen (Abb. III.A5). Dies widersprach der gängigen Meinung, dass es sich bei dem Fibronektin der Knochenmatrix um das von den Osteoblasten produzierte Fibronektin handelt. Tatsächlich scheint das Osteoblasten-spezifische Fibronektin jedoch höchstens einen Teil dessen auszumachen. Die Suche nach alternativen Quellen des Fibronektins der Knochen-

matrix war Teil eines weiteren Projekts, das weiter unten (s. III.3) genauer beschrieben wird. Zum Vergleich wurden die Knochenschnitte zusätzlich gegen Kollagen Typ I gefärbt, doch konnten hier ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

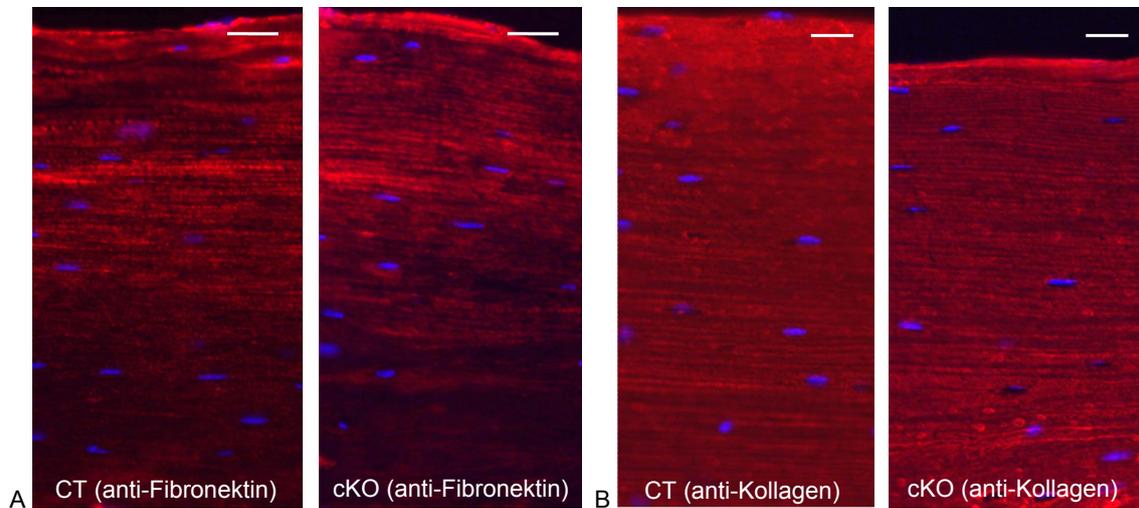


Abbildung III.A5: Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten der ColCre-Linie

Weder die Färbung gegen Fibronectin (A) noch gegen Kollagen Typ I (B) ergab deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollen (CT) und den konditionellen Knockouts (cKO). Die Zellkerne (DAPI) der Osteozyten in der Knochenmatrix sind in blau dargestellt. Die Balken entsprechen 20 μm .

III.2.3.1.2. Fibronectin in Knochenlysaten

Zusätzlich zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden Knochenlysate isolierter Schädeldächer 0-3 Tage alter Mauswelpen über Gelelektrophorese aufgetrennt und über Western Blotting auf Fibronectin untersucht. Auch auf diesem Weg konnte keine deutliche Verminderung des Fibronectin-gehalts des Knochens der konditionellen Knockouts festgestellt werden (Abb. III.A6).

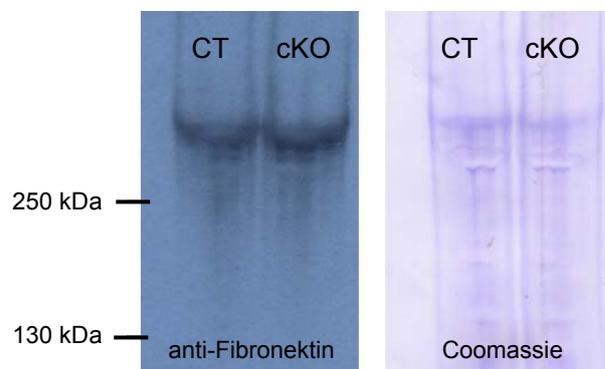


Abbildung III.A6: Western Blotting mit Knochenlysaten der ColCre-Linie anti-Fibronectin-Färbung

Das linke Bild zeigt das Fibronectinsignal der Knochenlysate von Mäusen der ColCre-Linie. Es sind keine Unterschiede des Fibronectingehalts zwischen Kontrollen (CT) und konditionellen Knockouts (cKO) erkennbar. Das rechte Bild zeigt eine Coomassie-Färbung der Membran als ungefähre Auftragskontrolle der applizierten Mengen.

III.2.3.2. Knochendichte und -architektur

III.2.3.2.1. Untersuchung der Knochendichte mittels pQCT

Die Knochendichte (BMD für engl. „bone mineral density“) der Mäuse der ColCre-Linie wurde mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) bestimmt, um zu ermitteln, ob das Fehlen des Osteoblasten-Fibronectins einen Einfluss auf die Knochenmasse hatte (Tab. III.A1). Tatsächlich zeigte sich, dass die trabekuläre Knochendichte der konditionellen Knockouts signifikant vermindert war (Abb. III.A7). Das bedeutet, das Fehlen des Osteoblasten-Fibronectins führte zu einer geringeren Knochenmasse im Bereich der Spongiosa. Dies betraf sowohl heranwachsende Tiere (durchschnittliches Alter 6 Wochen, -10%) als auch ausgewachsene Tiere (4 Monate, -12%).

Da die Messungen *ex vivo* stattfanden, handelte es sich bei diesen Gruppen um zwei separate Experimente, die beide signifikant in dieselbe Richtung weisen. Die konditionellen Knockout-Mäuse waren durchschnittlich etwas leichter, dieser Effekt war aber nicht konsistent signifikant. Die mittleren Femurlängen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. III.A1).

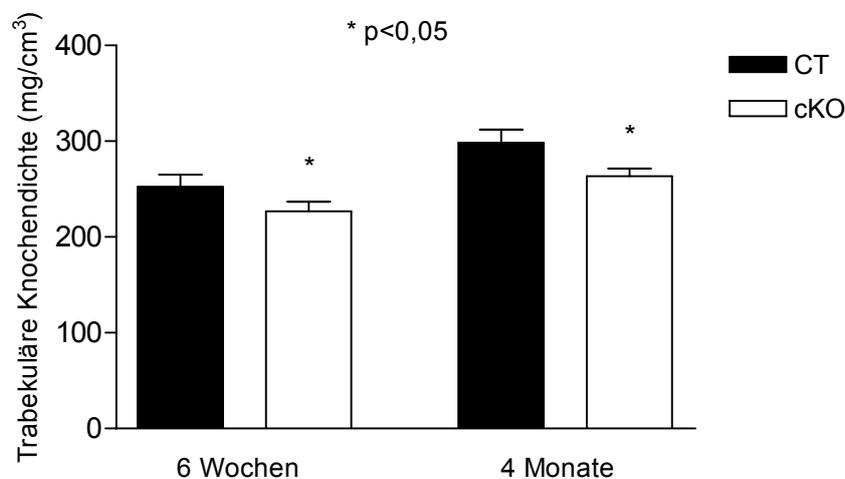


Abbildung III.A7: Trabekuläre Knochendichte der Mäuse der ColCre-Linie

Sowohl in jungen (6 Wochen) als auch in adulten (4 Monate) konditionellen Knockout-Mäusen der ColCre-Linie bewirkte das Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronectins eine signifikant verringerte trabekuläre Knochendichte (6 Wochen -10%, 4 Monate -12%).

Tabelle III.A1: Knochendichte (pQCT) sowie allgemeine Durchschnittsdaten der ColCre-Linie

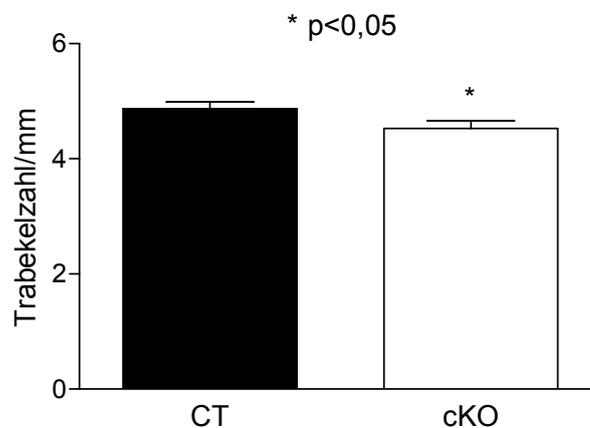
Die trabekuläre Knochendichte der konditionellen Knockouts (cKO) war signifikant vermindert im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (CT). Geschlechtsneutralisierte Betrachtung. BMD = „bone mineral density“.

Gruppe	CT (jung)	cKO (jung)	CT (adult)	cKO (adult)
Alter	6 Wochen	6 Wochen	4 Monate	4 Monate
Tierzahl	26	25	34	25
Gewicht in g	23,4±0,8	22,3±0,8 p=0,1	*33,1±0,9	↓*30,9±1,0 p=0,03
Femurlänge in mm	14,6±0,2	14,3±0,2 p=0,1	16,3±0,0	16,3±0,0 p=1,0
BMD (Spongiosa) in mg/cm ³	*252±13	↓*227±10 p=0,04	*298±14	↓*263±8 p=0,048
BMD (Kortex) in mg/cm ³	1162±13	1137±16 p=0,2	1290±6	1282±9 p=0,3

* p<0,05

III.2.3.2.2. Untersuchung der Knochenarchitektur mittels μ CT

Um die Ursache für die verminderte Knochendichte genauer zu bestimmen, wurden die Knochen der adulten Mäuse der ColCre-Linie (4 Monate) genauer mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) untersucht (Tab. III.A2). Der Anteil von Knochenvolumen (BV für engl. „bone volume“) zu Gewebsvolumen (TV für engl. „tissue volume“) der Spongiosa war in den konditionellen Knockouts zwar vermindert, jedoch knapp vor der Signifikanz ($p=0,07$). Die Anzahl der Trabekel hingegen war signifikant um 7% verringert (Abb. III.A8). Deren durchschnittliche Dicke war zusätzlich auch etwas geringer, jedoch nicht signifikant niedriger.

**Abbildung III.A8:** Ultrastruktur der Knochenproben (μ CT) der ColCre-Linie

Verglichen mit den Kontrollen (CT) hatten die konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) signifikant 7% weniger Trabekel. Dies war die Ursache für die verminderte trabekuläre Knochendichte (vgl. pQCT III.2.3.2.1).

Tabelle III.A2: Daten der Knochen-Ultrastruktur (μ CT) der ColCre-Linie

Im Vergleich zu den Kontrollen (CT) hatten die konditionellen Knockouts (cKO) signifikant weniger Trabekel. Geschlechtsneutralisierte Betrachtung. BV = „bone volume“, TV = „tissue volume“, HA = Hydroxylapatit.

Gruppe	CT	cKO	
Tierzahl	34	25	
BV/TV in mm^3/mm^3	14,7 \pm 1,1	\downarrow 12,2 \pm 0,8	p=0,07
Trabekelzahl in 1/mm	*4,9 \pm 0,1	\downarrow *4,5 \pm 0,1	p=0,04
Trabekeldicke in mm	0,048 \pm 0,001	\downarrow 0,046 \pm 0,001	p=0,1
Dichte des TV in mg HA/ cm^3	258 \pm 12	\downarrow 225 \pm 10	p=0,05

* p<0,05

Es ließ sich somit klar herausstellen, dass die über pQCT ermittelte geringere trabekuläre Knochendichte auf eine geringere Trabekelzahl in den Knochen der konditionellen Knockouts zurückging. Des Weiteren wurde das Ergebnis der pQCT-Analyse durch die Messung der Gesamtdichte des Gewebsvolumens (TV) bestätigt. Bei letzterer handelt es sich um eine zweidimensionale Projektion der Gesamtdichte der Spongiosa auf ihre Fläche (vergleichbar einer DEXA-Messung), die bei den konditionellen Knockout-Mäusen etwa 12% niedriger war (vergleiche 12% beim pQCT, III.2.3.2.1). Die DEXA-Messung ist eine in der Humanmedizin weit verbreitete Methode zur Bestimmung der Knochendichte.

III.2.3.3. Zusammensetzung der Knochen

III.2.3.3.1. Untersuchung der Knochenkomposition mittels Infrarot-Spektroskopie

Um zu bestimmen, ob die Mineralisation des Knochens in Abwesenheit des Osteoblasten-Fibronektins Defekte aufwies, wurden die Knochenproben mittels Infrarot-Spektroskopie auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Weder im Bereich der Spongiosa, noch des Kortex konnten Unterschiede festgestellt werden (Verhältnis Mineral zu Matrix CT 8,57 \pm 1,27 vs. 8,39 \pm 0,34, n=6/6, p=0,9). Die verminderte trabekuläre Knochendichte und Trabekelzahl schienen daher nicht auf einen geringeren Mineralisierungsgrad zurückzugehen.

III.2.3.4. Histomorphometrische Analyse der Knochen

III.2.3.4.1. Statische Histomorphometrie

Zur statischen histomorphometrischen Analyse der Knochen der adulten Mäuse der ColCre-Linie wurden in Kunststoff eingebettete Knochen geschnitten, gefärbt (Masson-Goldner), abfotografiert (NIC, Heidelberg) und am Computer analysiert (ImageJ, Wayne Rasband, NIH).

Bei dieser Untersuchung (geschlechtsneutralisiert, $n=11/11$) stellte sich zunächst überraschend heraus, dass die konditionellen Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen signifikante 44% mehr Osteoblasten besaßen. Dies zeigte sich in den absoluten Zahlen (CT 636 ± 37 vs. cKO 914 ± 66 , $p<0,05$), aber auch korrigiert zur Knochenoberfläche (CT $12,3\pm 0,7$ vs. cKO $17,3\pm 1,4$, $p<0,01$). Der Osteoidgehalt spiegelte diese Gegebenheit ebenfalls wieder. Das bedeutet, bei den konditionellen Knockouts war ein signifikant größerer Teil (26%) der Knochenoberfläche mit Osteoid besetzt (CT $27,6\pm 2,0$ vs. cKO $34,9\pm 0,5$ in %, $p<0,05$). Ähnliches (24%) gilt für Osteoidvolumen zu Knochenvolumen (CT $6,7\pm 1,9$ vs. $8,3\pm 1,7$ in %, $p<0,05$).

Da Osteoid, die von Osteoblasten produzierte, aber noch nicht mineralisierte Matrix darstellt, schienen diese Ergebnisse zunächst im Widerspruch zu der verminderten Knochendichte zu stehen. Schließlich bedeutet mehr Osteoid in den meisten Fällen auch mehr Knochenbildung, also mehr Knochengewebe in der Folge. Dieser Widerspruch ließ sich nicht durch vermehrten Knochenabbau erklären, da die Anzahl der aktiven Osteoklasten sich in beiden Gruppen nicht unterschied. Dies betraf sowohl die absolute Zahl der Osteoklasten (CT $19,5\pm 1,9$ vs. cKO $19,5\pm 1,5$, $p=1,0$) als auch die relativen Zahlen nach der Korrektur zur Knochenoberfläche (CT $0,37\pm 0,04$ vs. cKO $0,36\pm 0,02$, $p=0,71$). Unter Hinzuziehung der Daten aus der dynamischen Histomorphometrie ergab sich jedoch ein umfassenderes Bild (s. III.2.3.4.3).

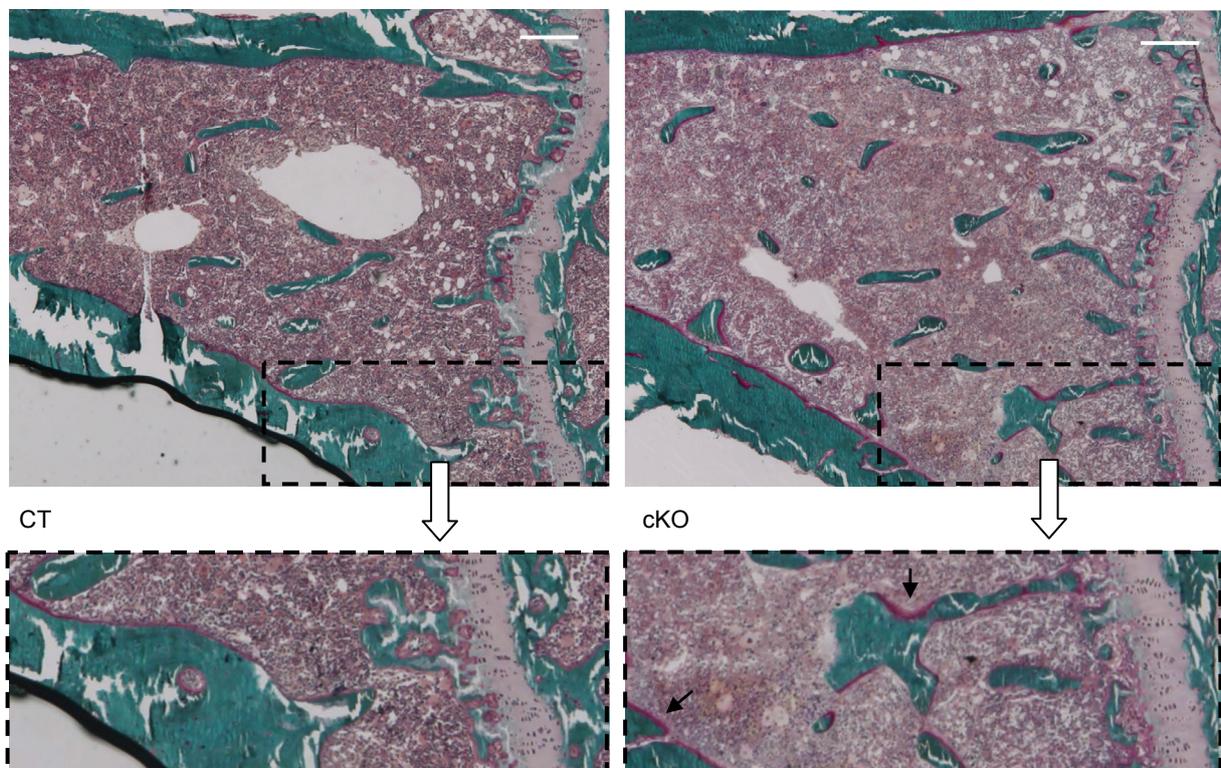


Abbildung III.A9: Masson-Goldner gefärbte Knochenschnitte der ColCre-Linie

Im Vergleich zur Kontrolle (CT) ist im konditionellen Knockout (cKO) schon mit bloßem Auge wesentlich mehr Osteoid (pink) zu erkennen (oben). Zur besseren Sicht wurden Abschnitte der Bilder vergrößert (unten). Der vermehrte Osteoidsaum ist sowohl am Kortex, als auch im Bereich der Trabekel zu finden (Pfeile). Die Balken entsprechen 200 μm .

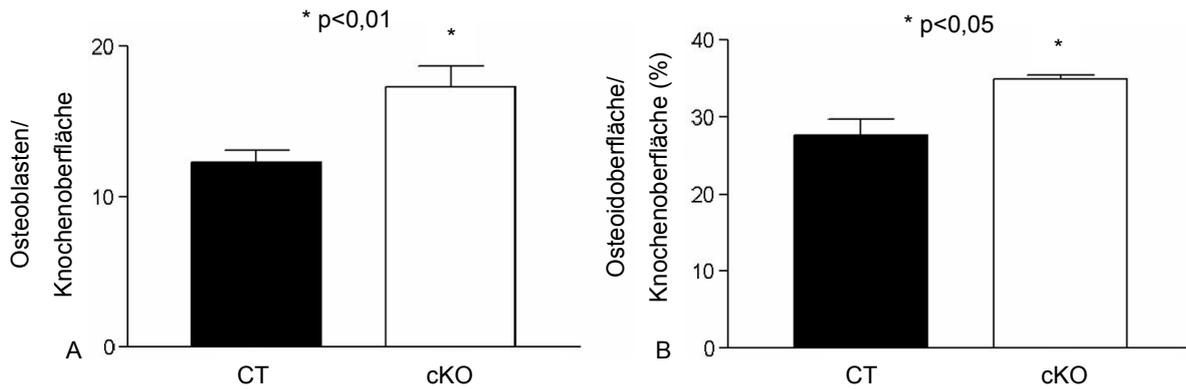


Abbildung III.A10: Statische Histomorphometrie der Knochen der Mäuse der ColCre-Linie

Die statische Histomorphometrie der ColCre-Linie zeigte eine signifikante Erhöhung (41%) der Osteoblastenzahl (A) und der Osteoidoberfläche (26%) (B) der konditionellen Knockouts (cKO) verglichen mit den Kontrollen (CT).

III.2.3.4.2. Dynamische Histomorphometrie

Eine dynamische Histomorphometrie war möglich, da die Mäuse zehn und drei Tage vor ihrer Tötung den fluoreszierenden Mineralisationsmarker Calcein verabreicht bekommen hatten. Da Calcein hochaffin für Kalzium ist, wird es von den Osteoblasten überall dort in den Knochen eingebaut, wo zum Zeitpunkt der Verabreichung aktiv Knochen mineralisiert wird. Dabei können Einzelmarkierungen, aber auch Doppelmarkierungen entstehen. Zu letzteren kommt es dann, wenn zu beiden Zeitpunkten der Calcein-Gabe an derselben Stelle aktiv mineralisiert wurde. Der Abstand zwischen beiden Markierungen ist jener Knochenanteil, der in den sieben Tagen zwischen den beiden Calcein-Gaben kalzifiziert wurde. Die Knochenschnitte wurden zur dynamischen Histomorphometrie vor der Masson-Goldner-Färbung unter Fluoreszenzanregung abfotografiert (NIC, Heidelberg) und die Calcein-Markierungen vermessen (ImageJ, Wayne Rasband, NIH).

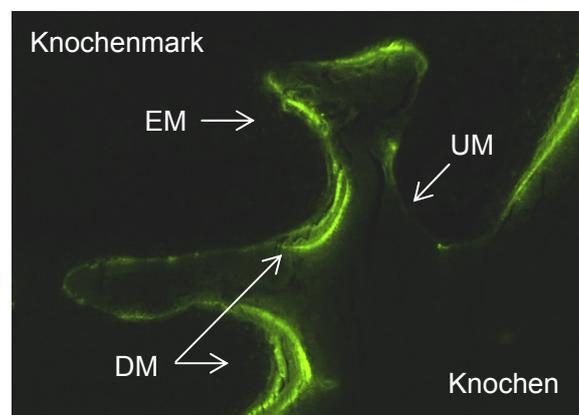


Abbildung III.A11: Beispiel eines Calcein-markierten Knochens einer Maus der ColCre-Linie

Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ließen sich bei den Mäusen, die zehn und drei Tage vor ihrer Tötung den Mineralisationsmarker Calcein erhalten hatten, neben unmarkierten Stellen (UM) auch Bereiche finden, die mit Einzelmarkierungen (EM) oder Doppelmarkierungen (DM) versehen waren.

Die Daten der dynamischen Histomorphometrie ergaben separat betrachtet jedoch keine signifikanten Veränderungen. Dies betraf sowohl die Mineralisierung als „mineralizing surface“ pro „bone surface“ (MS/BS: CT $31,9 \pm 1,8$ vs. cKO $30,5 \pm 1,4$ in %, $n=11/11$, $p=0,5$) als auch die Knochenbildung, die so genannte „bone formation rate“ (BFR: CT $12,6 \pm 1,1$ vs. cKO $10,8 \pm 0,6$ $\text{mm}^3/\mu\text{m}/\text{Tag}$, $n=11/11$, $p=0,2$).

III.2.3.4.3. Kombination von statischer und dynamischer Histomorphometrie

Die Kombination der statischen und der dynamischen Histomorphometrie zeigte, dass die Anzahl der Osteoblasten zwar erhöht, aber die Funktion der Zellen beeinträchtigt war. Dies spiegelten zwei Parameter wieder: Die Aj. AR (für engl. „adjusted apposition rate“) beschreibt die Knochenbildungsaktivität einer Osteoblastengruppe in μm pro Tag. Diese Rate war in den konditionellen Knockout-Mäusen um 34% signifikant vermindert (CT $0,77 \pm 0,04$ vs. cKO $0,51 \pm 0,04$ $\mu\text{m}/\text{Tag}$, $p < 0,01$). Die Osteoblasten der konditionellen Knockouts waren auf zellulärer Ebene also weniger produktiv. Zusätzlich zeigte sich aber auch ein signifikanter Effekt auf die Mineralisationsfähigkeit über die Mlt (für engl. „mineralization lag time“). Letztere stellt die Zeit dar, die von den Osteoblasten benötigt wird, um das abgelagerte Osteoid zu mineralisieren. Da diese Zeit in den konditionellen Knockouts um 58% signifikant verlängert war (CT $8,3 \pm 0,7$ vs. cKO $13,2 \pm 1,0$ Tage, $p < 0,01$), kann man sagen, dass auch die Mineralisierungsleistung der Osteoblasten der konditionellen Knockouts vermindert war (Abb. III.A12).

Zusammenfassend konnte über die statische und dynamische Histomorphometrie die Erkenntnis gewonnen werden, dass das Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronectins zwar zu einer Erhöhung der Osteoblastenzahl führte, die Zellen selbst jedoch funktional beeinträchtigt waren.

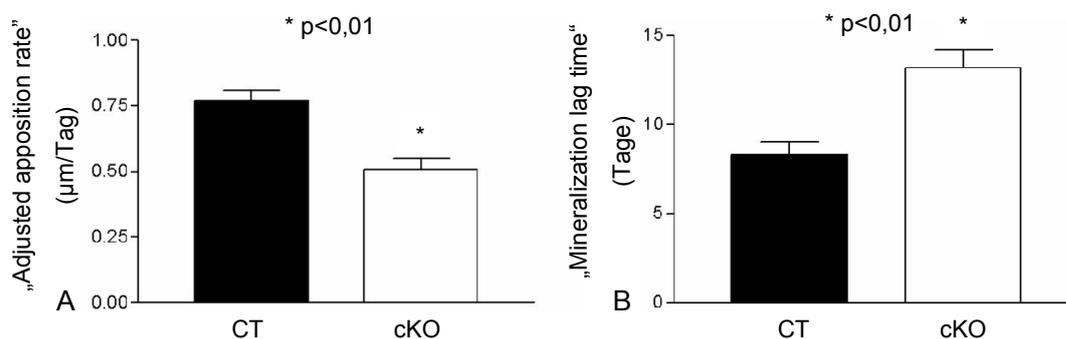


Abbildung III.A12: Kombination statischer und dynamischer Histomorphometrie

Die „adjusted apposition rate“ (Aj. AR) ist die mineralisierende Knochenoberfläche (μm) multipliziert mit der „mineral apposition rate“ (MAR), also dem Abstand zwischen zwei Doppelmarkierungen (μm) dividiert durch die Osteoidoberfläche (μm) pro Tag. Sie war verglichen mit den Kontrollen (CT) in den konditionellen Knockout-Mäusen (cKO) signifikant verringert (34%). Letztere konnten also auf zellulärer Ebene (pro Osteoblasten-Team) weniger Knochen pro Tag bilden (A). Die „mineralization lag time“ (Mlt) wird errechnet, indem die mittlere Osteoiddicke durch die Aj. AR dividiert wird. Hier zeigte sich, dass die Osteoblasten der konditionellen Knockout-Mäuse zur Mineralisation signifikant mehr Zeit benötigten (58%) (B).

III.2.3.4.4. Bestimmung der Raten von Proliferation und Apoptose

Um die Ursache der erhöhten Anzahl an Osteoblasten in den konditionellen Knockout-Mäusen zu ermitteln, wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurde mit den sechs Wochen alten Tieren der ColCre-Linie gearbeitet. Diesen Tieren wurde eine Stunde vor der Tötung BrdU als Proliferationsmarker injiziert. Die entnommenen Knochen wurden fixiert, entkalkt und Gefrierschnitte angefertigt, die mit einem BrdU-spezifischen Antikörper chromogen gefärbt wurden. Bei der Evaluation wurden alle BrdU-positiven Prä-Osteoblasten ausgezählt (Abb. III.A13). Diese sitzen nahe bei den Osteoblasten, haben aber im Gegensatz zu letzteren ihre Teilungsfähigkeit noch nicht aufgegeben [84]. Die Proliferationsraten zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen (CT $6,4 \pm 0,7$ vs. cKO $6,6 \pm 0,7$ in %, $n=8/8$, $p=0,8$).

Zur Bestimmung der Apoptoseraten wurden Gefrierschnitte derselben Schnittserien auch gegen den Apoptosemarker aktive Caspase-3 gefärbt. Die Anzahl der apoptotischen Osteoblasten pro Gesamtzahl der Osteoblasten war jedoch nicht signifikant verändert in den konditionellen Knockouts (CT $6,2 \pm 0,5$ vs. cKO $6,7 \pm 0,3$ in %, $n=9/8$, $p=0,5$).

Dabei ist hervorzuheben, dass die signifikant erhöhte Anzahl der Osteoblasten korrigiert zur Gesamtknochenoberfläche (Abb. III.A14) in diesem Experiment für die Gruppe der heranwachsenden (6 Wochen) konditionellen Knockout-Mäuse bestätigt werden konnte (CT $16,0 \pm 1,1$ vs. cKO $20,8 \pm 1,3$ $n=9/8$, $p=0,01$), obwohl weder die Proliferations- noch die Apoptoserate verändert waren.

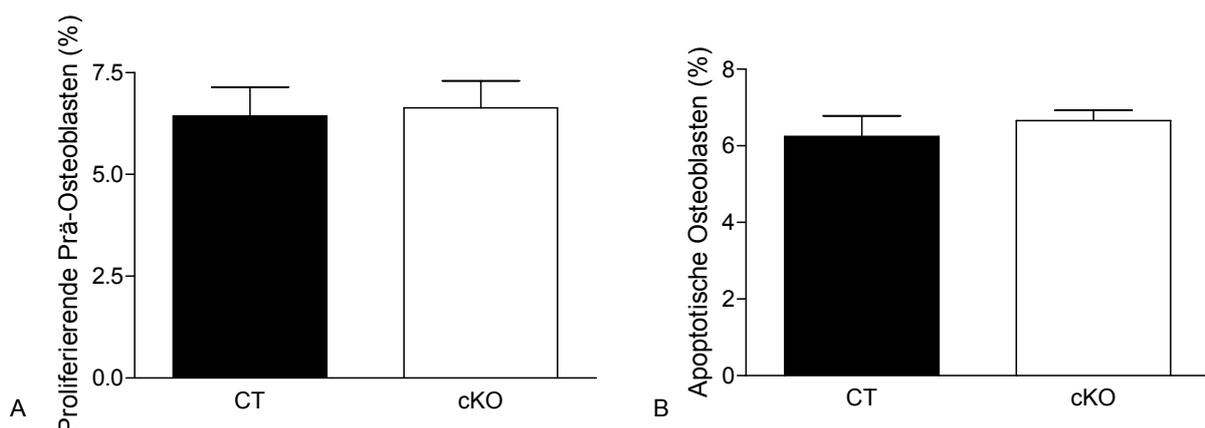


Abbildung III.A13: Proliferations- und Apoptoseraten der ColCre-Linie

Trotz einer signifikant erhöhten Zahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche der 6 Wochen alten konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) im Vergleich zu ihren Kontrollen (CT), konnten weder Unterschiede in der Proliferation der Prä-Osteoblasten (A) noch in der Anzahl apoptotischer Osteoblasten (B) festgestellt werden (in % zur absoluten Anzahl der Osteoblasten).

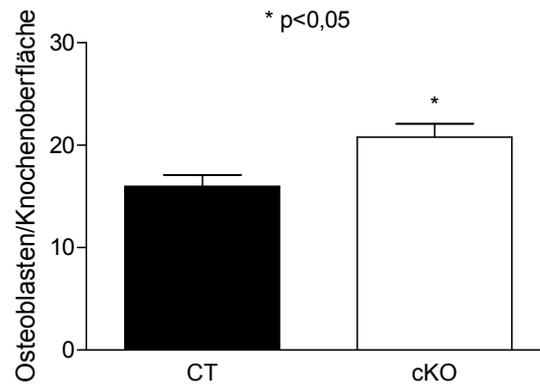


Abbildung III.A14: Erhöhte Osteoblastenzahl auch in jungen Tieren der ColCre-Linie

Für die Bestimmung der Proliferations- und Apoptoseraten der Osteoblasten von Mäusen der ColCre-Linie wurde mit den heranwachsenden Tieren gearbeitet. Auch bei dieser Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Anzahl (+30%) der Osteoblasten festgestellt werden (vgl. Erwachsene, s. IV.2.3.4.1).

Vermutlich ist die Differenzierung der Osteoblasten durch das Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronektins verlangsamt. Dadurch hat sich wahrscheinlich recht frühzeitig ein Gleichgewicht auf einem höheren Niveau eingependelt, das zu einer stabil erhöhten Osteoblastenzahl in heranwachsenden und erwachsenen konditionellen Knockout-Mäusen führte.

III.2.3.4.5. Bestimmung der Osteozytenzahlen der ColCre-Linie

Da ein Osteoblast drei Schicksalswege einschlagen kann (Apoptose, ruhende Deckzelle oder ausdifferenzierter Osteozyt, s. I.2.3.1.3), wurde überprüft, ob die erhöhte Osteoblastenzahl eine direkte Auswirkung auf die Zahl der Osteozyten in der Knochenmatrix hatte. Untersucht wurden hierbei die Knochenschnitte der adulten Tiere der ColCre-Linie. Drei voneinander getrennte Analysen ließen keinen Trend zu einer Erhöhung der Osteozytenzahlen (Osteozyten/mm² Knochen) erkennen (1. Kortex CT 515±10 vs. cKO 564±32, n=6/5, p=0,1; 2. Kortex CT 406±39 vs. cKO 374±23, n=6/6, p=0,5; 3. Trabekel CT 635±51 vs. 559±30, n=12/10, p=0,2). Dies stützte die These, dass das Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronektins deren Differenzierung verlangsamte und sich so ein Gleichgewicht auf einem etwas höheren Niveau einpendelte.

III.2.3.5. Untersuchung der Blutproben mittels ELISA

III.2.3.5.1. Untersuchung des Osteokalzingehalts des Blutes

Das Osteokalzin wird spezifisch von den reifen Osteoblasten sezerniert. Sein Serumspiegel ist daher ein Marker für die Gesamtzahl differenzierter Osteoblasten. Aus diesem Grund wurde das Serum der adulten Mäuse der ColCre-Linie auf seinen Osteokalzingehalt hin untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden

(CT $46,4 \pm 3,9$ vs. cKO $47,1 \pm 6,6$ ng/ml, $n = 15/10$, $p = 0,9$). Da die Anzahl der Osteoblasten in den konditionellen Knockouts jedoch signifikant erhöht war (auch absolut), bestätigte dieser Befund die Annahme, dass die Differenzierung der Osteoblasten bei Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronektins möglicherweise verlangsamt war.

III.2.3.5.2. Untersuchung des Fibronektingehalts des Blutes

Im Hinblick darauf, dass der Fibronektingehalt in der Knochenmatrix der konditionellen Knockout-Mäuse der ColCre-Linie nicht deutlich verringert war (s. III.2.3.1), wurde auch der Fibronektingehalt des Plasmas der adulten Mäuse der ColCre-Linie bestimmt, um eine Art Gegenkompensation als mögliche Ursache zu überprüfen. Die Bestimmung mittels ELISA ergab jedoch keine signifikant veränderten Werte (CT $177 \pm 9,4$ vs. cKO $194 \pm 12,1$ $\mu\text{g/ml}$, $n = 33/23$, $p = 0,2$).

III.3. Projekt B: Die Rolle des Plasmafibronektins der Leber im Knochen

III.3.1. Zirkulierendes Fibronektin gelangt in den Knochen

III.3.1.1. Fibronektin der kranken Leber im Knochen

Im Rahmen einer Humanstudie, die durch *in vitro* Experimente von Doktorandin Frau N. Kawelke und mir erweitert und bereits publiziert wurde [51] (Artikel im Anhang), stellte sich die Frage, ob Fibronektin, das in der Leber gebildet wird, im Knochen eine Rolle spielen kann. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine besondere Isoform des Fibronektins, das onkofötale Fibronektin (oFN), es vermag, in den Knochen zu gelangen. Diese besondere Isoform ist im Blut von Patienten, die an einer chronisch cholestatischen Lebererkrankung, der primären biliären Zirrhose, leiden, signifikant erhöht (Kontrollen $3,0$ vs. Patienten $4,3$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$). Da diese Erkrankung mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht (hepatische Osteodystrophie) und die oFN-Blutlevels der Patienten negativ mit der Menge des im Blut zirkulierenden Osteokalzins korreliert waren ($r = -0,57$, $p < 0,05$), entstand die Hypothese, dass diese besondere Isoform, die von der kranken Leber gebildet wird, sich im Knochen negativ auf die Osteoblasten auswirkt.

Um sicherzustellen, dass onkofötale Fibronectin von außen in den Knochen gelangen kann, wurde oFN-haltiges Fibronectin aus amniotischer Flüssigkeit aufgereinigt, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Oyster 500) und an drei aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal in Mäuse injiziert (insgesamt ca. 2,8 mg mit etwa 26 Molekülen Oyster pro Fibronectin-Dimer) (Abb. III.B1).

Weitere *in vivo* Experimente mit Mäusen sowie *in vitro* Untersuchungen an primären murinen Osteoblasten ergaben, dass für den Knochendichteverlust, welchen Patienten mit primärer biliärer Leberzirrhose erleiden, das onkofötale Fibronectin verantwortlich ist, dass in der kranken Leber gebildet wird [51].

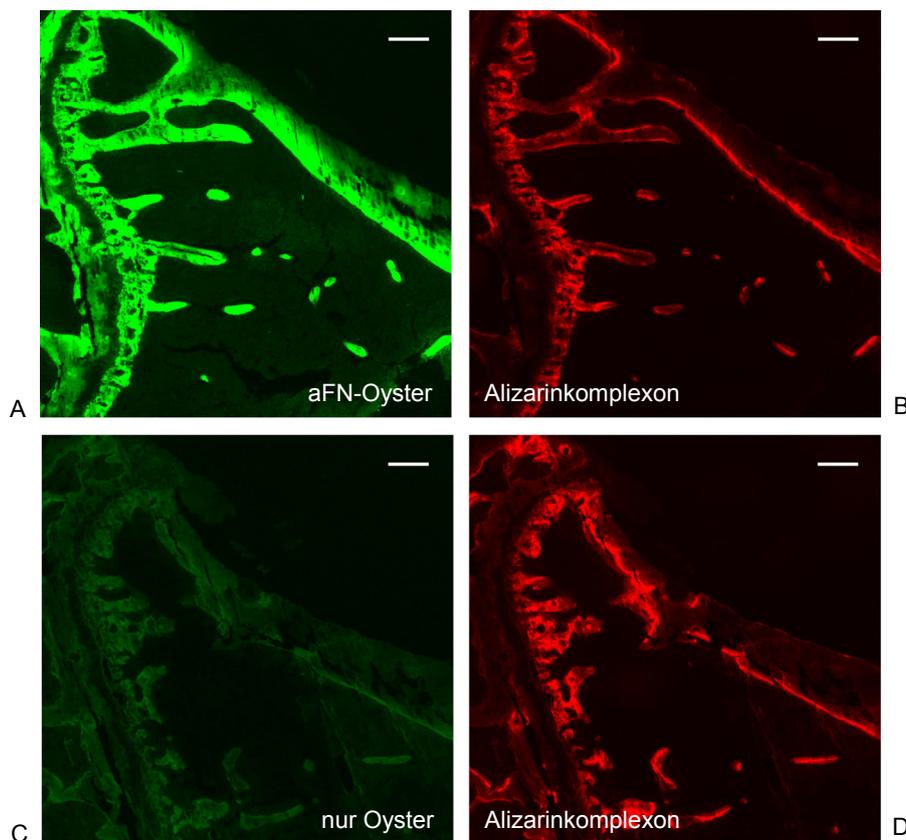


Abbildung III.B1: Markiertes aFN infiltriert große Teile der Knochenmatrix

Intraperitoneal in Mäuse injiziertes fluoreszenzmarkiertes Fibronectin aus amniotischer Flüssigkeit (aFN) erreichte die Knochenmatrix (A). Der Fluoreszenzfarbstoff alleine wurde nicht eingelagert (C). Die Infiltration des Fibronectins war nicht auf den Ort aktiver Mineralisation (Marker Alizarin-Komplexon) begrenzt (B+D). Die Balken entsprechen 200 µm.

III.3.1.2. Plasmafibronektin gelangt in den Knochen

Wie in I.2.6.3 beschrieben ist nicht nur die anfängliche Anwesenheit des Fibronectins für die Bildung einer Kollagenmatrix notwendig, sondern auch dessen kontinuierliche Präsenz ist von Bedeutung. Das Plasmafibronektin, das von den Hepatozyten der Leber gebildet wird, kommt in re-

lativ hohen Mengen im Blut vor (s. I.1), so dass man die Leber für eine kontinuierliche Versorgung des Knochens mit Fibronectin in Betracht ziehen kann. Da sich das Plasmafibronectin vom onkofötalen Fibronectin unterscheidet, wurde das Injektions-Experiment mit aufgereinigtem humanem Plasmafibronectin wiederholt. Das Plasmafibronectin wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Oyster 500) und an drei aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal in Mäuse injiziert (insgesamt ca. 2 mg mit etwa 23 Molekülen Oyster pro Fibronectin-Dimer). Die Kontrollmäuse erhielten nur den Farbstoff, um unspezifische Reaktionen auszuschließen, und als Mineralisationsmarker wurde Alizarinkomplexon verabreicht.

Bei der Tötung wurden neben den Knochen (Tibia, Femur) auch zahlreiche andere Proben entnommen (Blut, Urin, Muskel, Gehirn, Haut, Lunge, Herz, Milz, Vena cava, Aorta, Leber, Niere, Blase, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Pankreas, Auge, Trachea, Zunge, Niere). Die Untersuchung der Knochenproben ergab ein mit dem aFN-Oyster-Versuch übereinstimmendes Bild. Es zeigte sich eine flächige Einlagerung des markierten Fibronectins in großen Teilen der Knochenmatrix (Abb. III.B2). Des Weiteren konnte eine Einlagerung des Fibronectins in der Niere beobachtet werden, worauf in Projekt C (III.4 Fibronectin in der diabetischen Nephropathie) genauer eingegangen wird.

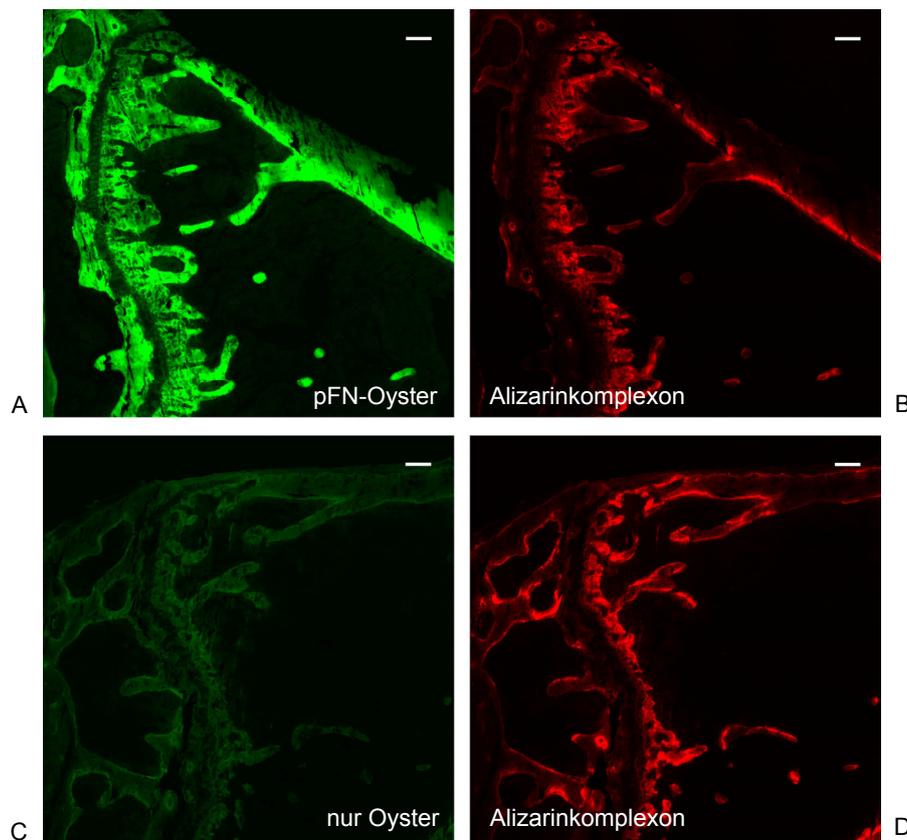


Abbildung III.B2: Markiertes pFN infiltriert große Teile der Knochenmatrix

Intraperitoneal in Mäuse injiziertes fluoreszenzmarkiertes Plasmafibronectin (pFN) erreichte die Knochenmatrix (A). Der Fluoreszenzfarbstoff alleine wurde nicht eingelagert (C). Die Infiltration des Fibronectins war nicht auf den Ort aktiver Mineralisation (Marker Alizarinkomplexon) begrenzt (B+D). Die Balken entsprechen 125 µm.

III.3.2. Effekt der Ausschaltung des Plasmafibronektins in Mäusen

III.3.2.1. Erfolgreiche Ausschaltung über den Mx- und den Alb-Promoter

III.3.2.1.1. Beweis der Ausschaltung des Plasmafibronektins über ELISA

Die Rolle des Plasmafibronektins für den Knochen sollte mit Hilfe konditioneller Knockout-Mäuse untersucht werden. Da das Plasmafibronektin als lösliche Fibronektin-Isoform im Blut zu finden ist, konnte der Ausschaltungsgrad anhand des Fibronektingehalts des Plasmas erfasst werden. Dazu wurden die murinen Plasmaproben mittels eines pFN-ELISAs untersucht.

Es ließ sich ein Ausschaltungsgrad von mehr als 95% für beide Linien feststellen (Abb. III.B3). Die Ausschaltung über den Mx-Promoter (CT $157,1 \pm 12,8$ vs. cKO $4,6 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$, $n=7/26$, $p<0,001$) war generell noch etwas besser als über den Alb-Promoter (CT $131 \pm 8,1$ vs. cKO $6,2 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$, $n=7/41$, $p<0,001$), dieses sogar signifikant (Mx $4,6 \pm 0,2$ vs. Alb $6,2 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$, $n=26/41$, $p<0,01$). Es ist zu unterstreichen, dass die Ausschaltung über den Alb-Promoter spezifischer ist, aber erst im Alter von 8-12 Wochen stattfindet. Die Ausschaltung über den Mx-Promoter hingegen ist zuverlässiger und wurde bereits im Alter von 4-5 Wochen induziert.

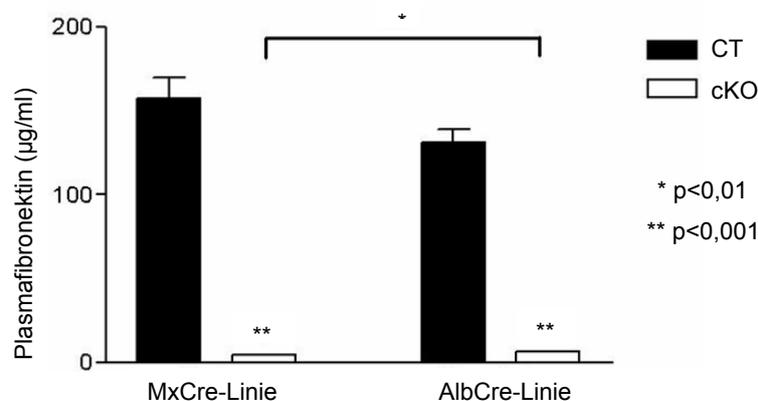


Abbildung III.B3: Erfolgreiche Fibronektin-Ausschaltung über Mx/Alb-Promoter (ELISA)

Die konditionellen Knockout-Mäuse hatten signifikant weniger Plasmafibronektin (pFN) in ihrem Blut. Dabei war die Ausschaltung über den Mx-Promoter (2,9% Rest-pFN) signifikant besser als über den Alb-Promoter (4,7%).

III.3.2.1.2. Beweis der Ausschaltung des Plasmafibronektins über Western Blotting

Zusätzlich zur ELISA-Analyse wurden auch Plasmaproben (je 1 μl) der Mäuse der MxCre- und AlbCre-Linie über Protein-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Plasmafibronektingehalt mittels der Methode des Western Blottings betrachtet. Der Unterschied zwischen konditionellen Knockout-Mäusen und Kontrollen war dabei ebenfalls deutlich zu sehen (Abb. III.B4).

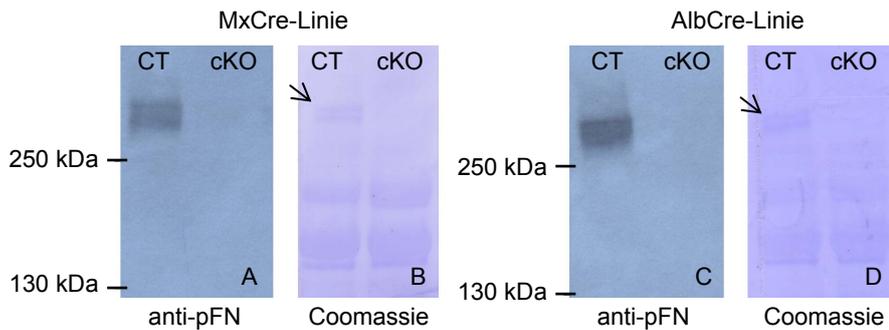


Abbildung III.B4: Erfolgreiche Fibronectin-Ausschaltung über Mx/Alb-Promoter (WB)

Bei beiden Linien (A+C) zeigte sich im Western Blotting im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (CT) ein deutlich reduziertes Fibronectin-Signal in den Plasmaproben der konditionellen Knockouts (cKO). Die Coomassie-Färbung der Membranen (B+D) diente als Mengenauftragskontrolle (je 1 μ l Plasma). Bei genauem Hinsehen ist sogar die für Plasmafibronectin typische Doppelbande bei den Kontrollen (Pfeile), nicht aber in den Laufspuren der konditionellen Knockout-Mäuse zu erkennen.

III.3.2.2. Untersuchung des Fibronectingehalts des Knochens

III.3.2.2.1. Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten

Nachdem die Ausschaltung des Plasmafibronectins in beiden Linien (MxCre und AlbCre) über ELISA und Western Blotting nachgewiesen worden war, wurden entkalkte Knochenschnitte mittels eines Antikörpers gegen Fibronectin gefärbt. Insbesondere bei den konditionellen Knockout-Mäusen der MxCre-Linie zeigte sich ein deutlich geringeres Signal in der extrazellulären Knochenmatrix (Abb. III.B5). Zum Vergleich wurden die Knochenschnitte auch gegen Kollagen Typ I gefärbt, doch konnten hier keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.

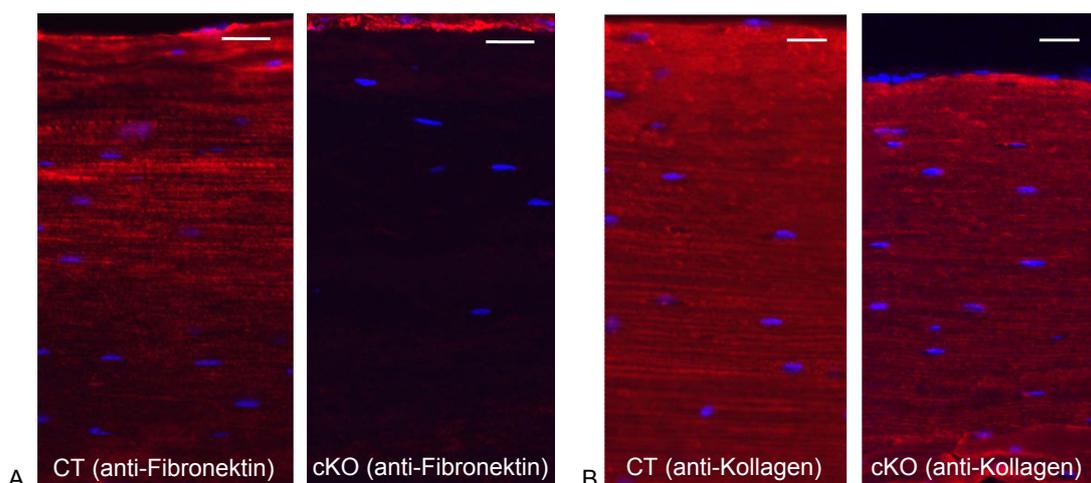


Abbildung III.B5: Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenschnitten der MxCre-Linie

Die Färbung gegen Fibronectin (A) zeigte einen deutlich reduzierten Fibronectingehalt der extrazellulären Knochenmatrix der konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) im Vergleich zu den Kontrollen (CT). Bezüglich des Kollagens Typ I waren jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen (B). Die Zellkerne (DAPI) der Osteozyten in der Knochenmatrix sind in blau dargestellt. Die Balken entsprechen 20 μ m.

III.3.2.2. Untersuchung von Knochenlysaten mittels Western Blotting

Zusätzlich zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden Knochenlysate von Röhrenknochen (Femur, Tibia) angefertigt, nachdem die Knochen zuvor gründlich von Muskeln und Geweberesten befreit und das Knochenmark herausgespült worden war. Die Knochenlysate wurden über eine Proteingelelektrophorese aufgetrennt und der Fibronektin Gehalt mittels Western Blotting analysiert (Abb. IV.B6). Tatsächlich konnte der Befund der Immunfluoreszenz-Färbung für die Tiere der MxCre-Linie bestätigt werden. Erneut war ein wesentlich geringerer Fibronektinanteil in den Proben der konditionellen Knockout-Mäuse nachweisbar. Die Resultate der AlbCre-Linie waren weniger deutlich, vermutlich aufgrund der späteren und weniger effizienten Ausschaltung durch den Alb-Promoter.

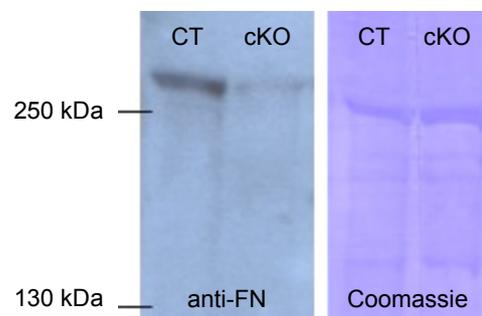


Abbildung III.B6: Western Blotting von Knochenlysaten der MxCre-Linie

Das linke Bild zeigt das Fibronektinsignal der Knochenlysate von Mäusen der MxCre-Linie. Es ist eine deutliche Reduktion des Fibronektin Gehalts der Knochenmatrix der konditionellen Knockouts (cKO) im Vergleich zu den Kontrollen (CT) erkennbar. Das rechte Bild zeigt eine Coomassie-Färbung der Membran als ungefähre Auftragskontrolle der applizierten Mengen.

III.3.2.3. Knochendichte und -architektur

III.3.2.3.1. Untersuchung der Knochendichte mittels pQCT

Die Knochendichte von Mäusen der MxCre- und der AlbCre-Linie wurde mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) bestimmt, um zu ermitteln, ob das Fehlen des Plasmafibronektins einen Einfluss auf die Knochendichte hatte. Bei der AlbCre-Linie wurden nur die weiblichen Tiere in die Auswertung aufgenommen, da es in der Gruppe der männlichen Tiere unverhältnismäßig starke Gewichtsunterschiede gab.

Tatsächlich zeigte sich, dass die trabekuläre Knochendichte der konditionellen Knockouts beider Linien signifikant vermindert war (Abb. III.B7). Konkret führte die Ausschaltung des Plasmafibronektins zu einer geringeren Knochenmasse im Bereich der Spongiosa (Tab. III.B1).

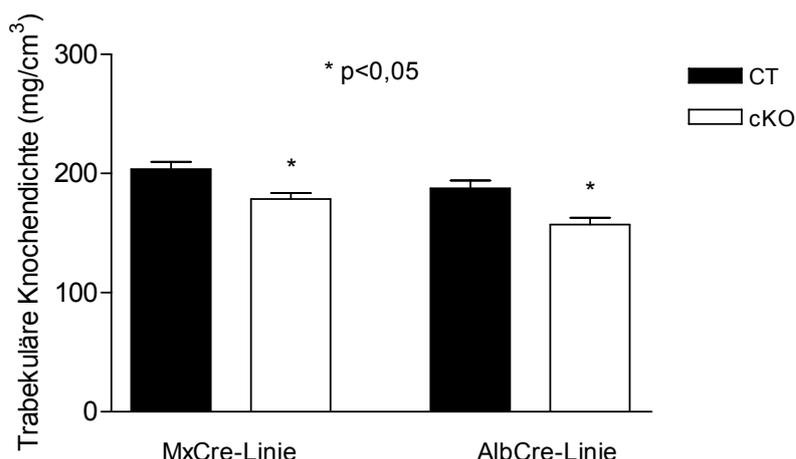


Abbildung III.B7: Trabekuläre Knochendichte der Mäuse der MxCre- und der AlbCre-Linie
Verglichen mit den jeweiligen Kontrollen (CT) ließ sich sowohl in den konditionellen Knockout-Mäusen (cKO) der MxCre- als auch der AlbCre-Linie eine signifikante Verminderung der trabekulären Knochendichte feststellen (MxCre -12%, AlbCre -16%).

Tabelle III.B1: Knochendichte (pQCT) sowie weitere Daten der MxCre- und AlbCre-Linie

Die trabekuläre Knochendichte der konditionellen Knockouts (cKO) war signifikant vermindert im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (CT). Bezüglich des Körpergewichts und der Femurlängen gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen. Geschlechtsneutralisierte Betrachtung. Bei der AlbCre-Linie wurden nur weibliche Mäuse berücksichtigt. BMD = „bone mineral density“.

Gruppe	CT (MxCre)	cKO (MxCre)	CT (AlbCre)	cKO (AlbCre)
Alter	6 Monate	6 Monate	6 Monate	6 Monate
Tierzahl	35	26	18	12
Gewicht in g	34,2±0,8	35,1±1,2 p=0,5	32,5±0,9	33,9±1,3 p=0,4
Femurlänge in mm	16,4±0,1	16,4±0,1 p=0,7	16,7±0,1	16,8±0,2 p=0,7
BMD (Spongiosa) in mg/cm ³	**204±6	↓**179 ±5 p=0,001	**188±6	↓**157±6 p=0,002
BMD (Kortex) in mg/cm ³	1305±4,6	↓1295±4,5 p=0,1	1336±4,5	↓*1316±7,2 p=0,02

* p<0,05 ** p<0,005

III.3.2.3.2. Untersuchung der Knochenarchitektur mittels μ CT

Um die Ursache für die verminderte Knochendichte genauer zu bestimmen, wurden die Knochen der MxCre- und AlbCre-Linie genauer mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) untersucht (Tab. III.B2). Bei den Tieren der AlbCre-Linie wurden für die μ CT-Messung erneut nur die Knochen der weiblichen Tiere vermessen (s. IV.3.2.3.1).

Der Anteil von Knochenvolumen (BV für engl. „bone volume“) zu Gewebsvolumen (TV für engl. „tissue volume“) der Spongiosa (Abb. III.B8) war in den Knochen der konditionellen Knockouts beider Linien signifikant vermindert (MxCre -23%, AlbCre-Weibchen -35%). Die Zahl der Trabekel war ebenfalls in beiden Linien signifikant niedriger (MxCre -9%, AlbCre-Weibchen -13%). Im Gegensatz dazu konnte bezüglich der Trabekeldicke kein Unterschied zwischen konditionellen Knockout-Mäusen und Kontrollen festgestellt werden. Es ließ sich also klar herausstellen, dass die über pQCT ermittelte geringere trabekuläre Knochendichte auf eine geringere Trabekelzahl in den Knochen der konditionellen Knockouts zurückging und die Mikroarchitektur der Mäuse beim Fehlen des Plasmafibronektins deutlich verschlechtert war. Des Weiteren wurde das Ergebnis der pQCT-Analyse über die Gesamtdichte des Gewebsvolumens (TV) bestätigt, einer zwei-dimensionalen Projektion der Gesamtdichte der Spongiosa auf ihre Fläche (vergleichbar einer DEXA-Messung, s. III.2.3.2.2), die bei den konditionellen Knockout-Mäusen signifikant niedriger war (MxCre -16%, AlbCre-Weibchen -27%).

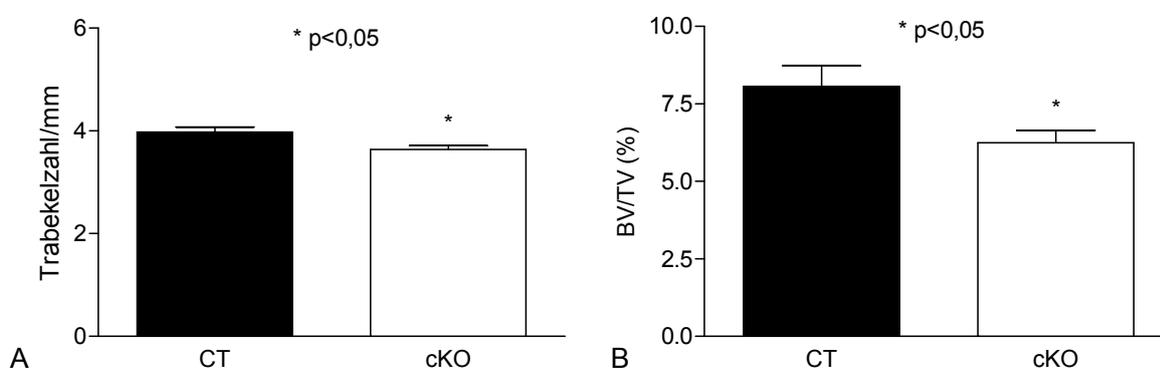


Abbildung III.B8: Ultrastruktur (μ CT) der MxCre-Linie

Verglichen mit den Kontrollen (CT) hatten die konditionellen Knockouts (cKO) signifikant weniger Trabekel (9%) (A) sowie weniger Knochenvolumen (BV) pro Gewebsvolumen (TV) bezogen auf die Spongiosa (23%) (B).

Tabelle III.B2: Daten über die Knochen-Ultrastruktur (μ CT) der MxCre- und AlbCre-Linie

Im Vergleich zu den Kontrollen (CT) hatten die konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) signifikant weniger Trabekel. Geschlechtsneutralisierte Betrachtung. Bei der AlbCre-Linie wurden nur weibliche Mäuse berücksichtigt. BV = „bone volume“, TV = „tissue volume“, HA = Hydroxylapatit.

Gruppe	CT (MxCre)	cKO (MxCre)	CT (AlbCre)	cKO (AlbCre)
Tierzahl	35	26	18	12
BV/TV in mm^3/mm^3	* $8,1 \pm 0,7$	↓* $6,2 \pm 0,4$ p=0,03	* $6,9 \pm 0,8$	↓* $4,5 \pm 0,7$ p=0,04
Trabekelzahl in 1/mm	* $3,98 \pm 0,10$	↓* $3,64 \pm 0,07$ p=0,01	* $3,47 \pm 0,11$	↓* $3,01 \pm 0,16$ p=0,02
Trabekeldicke in mm	$0,042 \pm 0,002$	$0,042 \pm 0,002$ p=0,99	$0,045 \pm 0,001$	$0,044 \pm 0,002$ p=0,8
Dichte des TV in mg/ccm HA	* 179 ± 9	↓* 150 ± 5 p=0,01	* 158 ± 11	↓* 115 ± 11 p=0,01

* p<0,05

III.3.2.4. Zusammensetzung/Eigenschaften der Knochen

III.3.2.4.1. Untersuchung der Knochenkomposition mittels Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie ermöglicht es Verhältnisse zwischen verschiedenen Substanzen in einer Probe zu bestimmen. Dabei absorbiert im Knochen das Phosphat im Bereich 900-1200 nm und das Protein im Bereich 1590-1720 nm. Setzt man Phosphat und Protein zueinander ins Verhältnis, so erhält man das Verhältnis des Minerals zur Matrix. Diese Messungen wurden an der MxCre-Linie mit je sechs Knochenschnitten pro Gruppe und neun Messpunkten pro Probe durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass das Mineral/Matrix-Verhältnis in den konditionellen Knockout-Mäusen signifikant um 12% vermindert war (CT $9,91 \pm 0,32$ vs. cKO $8,76 \pm 0,20$, $p < 0,005$). Das bedeutet, auf einen Protein-Teil kam in den konditionellen Knockouts ein kleinerer Mineral-Teil (Abb. III.B9). Auch enthielt der Knochen der konditionellen Knockout-Mäuse signifikant mehr saures Phosphat (CT $0,0131 \pm 0,0001$ vs. cKO $0,0136 \pm 0,0001$, $p < 0,01$), also eine etwas andere Mineralzusammensetzung im Vergleich zu den Kontrollen (1117 nm zu 900-1200 nm).

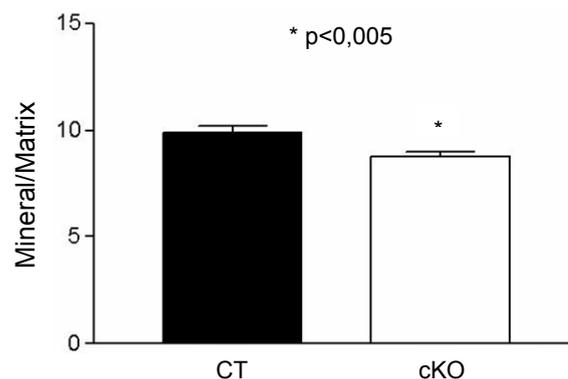


Abbildung III.B9: Infrarot-Spektroskopie mit Proben der MxCre-Linie

Die Analyse der Infrarot-Spektren ergab, dass das Verhältnis von Mineral/Matrix im Vergleich zu den Kontrollen (CT) in den konditionellen Knockouts (cKO) der MxCre-Linie signifikant vermindert war.

III.3.2.4.2. Untersuchung der Mikrohärtigkeit der MxCre-Linie

Zusätzlich zur Infrarot-Spektroskopie wurden ausgewählte Knochen der MxCre-Linie hinsichtlich ihrer biomechanischen Eigenschaften untersucht. Dazu wurden die Knochenproben von einem Kooperationspartner (Y. Bala, Lyon, Frankreich) einer Analyse der Mikrohärtigkeit unterzogen (Abb. III.B10). Dabei zeigte sich, dass die Mikrohärtigkeit der konditionellen Knockout-Mäuse um 3% signifikant erhöht war im Vergleich zu den Kontrollen (CT $69,2 \pm 2,1$ vs. cKO $71,5 \pm 2,5$, $n = 12/12$, $p = 0,04$). Da die Knochenhärtigkeit sowohl durch die Mineraleigenschaften (engl. „stiffness“) als auch durch die Zusammensetzung der Matrix (engl. „resistance to fractures“) beeinflusst wird, die Infra-

rot-Daten jedoch klar gegen erhöhtes Verhältnis des Minerals zur Matrix sprechen, sind die Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften vermutlich durch Unterschiede in der Proteinmatrix zu erklären.

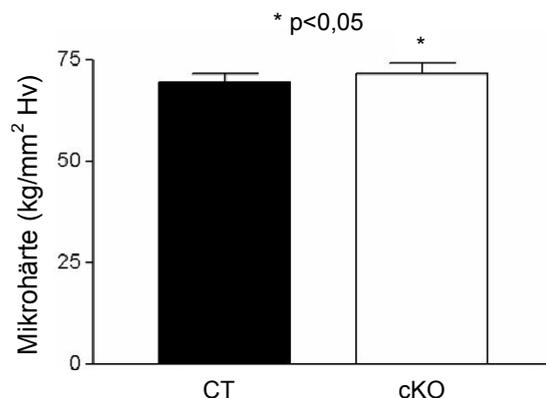


Abbildung III.B10: Analyse der Mikrohärte der Knochenproben der MxCre-Linie

Verglichen mit den Kontrollen (CT) war die Mikrohärte der konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) der MxCre-Linie leicht (3%), aber signifikant erhöht. Vermutlich lag dies an Veränderungen der Proteinmatrix in den Knochen der konditionellen Knockouts.

III.3.2.4.3. Bestimmung des Kollagengehalts der Knochen

Da die Daten aus der Infrarot-Spektroskopie und die Bestimmung der Mikrohärte auf Veränderung der Proteinmatrix des Knochens der konditionellen Knockout-Mäuse hinwiesen, wurden Knochenproben (Femur, gespült) acht Monate alter Mäuse der MxCre- und der AlbCre-Linie entmineralisiert und einer Hydroxyprolin-Bestimmung unterzogen. Weder bei der MxCre-Linie (CT $10,2 \pm 0,6$ vs. cKO $10,0 \pm 0,5$ mg Kollagen/Pellet Nassgewicht, $n=14/16$, $p=0,6$), noch bei der AlbCre-Linie (CT $12,0 \pm 1,2$ vs. cKO $15,0 \pm 2,1$ mg/Pellet, $n=17/12$, $p=0,2$) konnten jedoch signifikante Veränderung bezogen auf die absolute Menge des Kollagens ermittelt werden.

III.3.2.4.4. Bestimmung des Mineralgehalts der Knochen

Neben dem Kollagengehalt wurde auch der Mineralgehalt der Knochen der MxCre- und Alb-Linie gemessen. Dazu wurden die Tibiae der acht Monate alten Mäuse frei präpariert, vorgetrocknet (Trockengewicht) und bei 600°C verascht (Veraschungsgewicht). Durch diese Hitze-Behandlung verblieb nur der Mineralanteil der Proben. Betrachtet wurde der Gewichtsverlust durch die Veraschung ausgehend vom Trockengewicht. Sowohl bei den Proben der MxCre-Linie (CT $33,2 \pm 0,3$ vs. cKO $33,4 \pm 0,3$ in %, $n=14/16$, $p=0,6$) als auch bei den Proben der AlbCre-Linie (CT $35,5 \pm 0,5$ vs. cKO $34,5 \pm 0,5$ in %, $n=17/12$, $p=0,2$) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Aus methodischen Gründen konnten die Ergebnisse der Hydroxyprolin-Bestimmung (Kollagengehalt) und der Veraschung (Mineralgehalt) nicht direkt miteinander ins

Verhältnis gesetzt werden. Die Beurteilung des Verhältnisses von Mineral/Matrix war nur über die Infrarot-Spektroskopie möglich (s. III.3.2.4.1).

III.3.2.5. Histomorphometrische Analyse der Knochen

Die histomorphometrische Analyse wurde mit Mäusen der MxCre-Linie und zehn Proben pro Gruppe durchgeführt. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden. Absolut betrachtet war die Zahl der Osteoblasten in den konditionellen Knockout-Mäusen zwar signifikant erhöht (CT 158 ± 29 vs. cKO 80 ± 10 , $p=0,02$), dieser Parameter muss aber stets zur Knochenoberfläche korrigiert werden und verlor dabei seine Signifikanz ($p=0,18$). Das Fehlen signifikanter Parameter bei der Histomorphometrie könnte daraus resultieren, dass das Plasmafibronektin nur einen kleinen Effekt auf die Knochenzellen ausübt und dieser daher schwer zu erfassen ist.

III.3.2.6. Untersuchung des Osteokalzingehalts des Blutes

Da der Osteokalzin-Serumspiegel als ein Marker differenzierter Osteoblasten gilt, wurde das Serum der Mäuse der MxCre-Linie auf seinen Osteokalzingehalt hin untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (CT $34,8 \pm 4,6$ vs. cKO $23,8 \pm 4,2$ ng/ml, $n=15/12$, $p=0,4$). Somit kann angenommen werden, dass die kleinere Zahl an Osteoblasten (absolut betrachtet) nur einen geringen Effekt auf die Knochenbildung ausübte.

III.3.3. Injektion von Plasmafibronektin in Mäuse

III.3.3.1. Versuchsaufbau des Plasmafibronektin-Injektionsexperiments

Neben der Ausschaltung des Plasmafibronektins (pFN) im Blut der konditionellen Knockouts der Linien MxCre und AlbCre wurde eine umgekehrte Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurden aus humanem Blutplasma größere Mengen Fibronektin aufgereinigt und in mehreren separaten Experimenten über einen Zeitraum von zehn bis fünfzehn Tagen täglich 1-3 mg (Gruppen mit 1, 2 oder 3 mg) pFN intraperitoneal in Mäuse injiziert. Die Kontrolltiere erhielten stattdessen eine Kochsalzlösung (NaCl 0,9% Spüllösung, Braun).

III.3.3.2. Ergebnisse des Plasmafibronektin-Injektionsexperiments

Durch die 15-tägige Injektion von 3 mg Plasmafibronektin (pFN) pro Tag in Mäuse war der pFN-Gehalt in ihrem Blut bei deren Tötung signifikant erhöht (CT 376 ± 65 vs. 3 mg pFN-Tiere 987 ± 114 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$). Dennoch konnten durch die pFN-Injektion keine konsistenten Effekte auf die Knochendichte (pQCT) oder die Knochenzellen (Histomorphometrie) erzeugt werden. Aufgrund begrenzt verfügbarer Mengen an Plasmafibronektin war es jedoch nicht möglich, die Behandlungsdauer bedeutend zu erweitern.

Trotz der kurzen Behandlungsdauer konnten über die Infrarot-Spektroskopie gewisse Veränderungen festgestellt werden. Jene Tiere, die 15 Tage lang täglich 3 mg pFN verabreicht bekommen hatten, zeigten ein erhöhtes Verhältnis des Minerals zur Matrix, ohne jedoch eine Signifikanz zu erreichen (CT $9,06 \pm 0,34$ vs. 3 mg pFN-Tiere $9,86 \pm 0,45$, $n=3/3$ mit je 9 Messungen pro Probe, $p=0,2$). Der Gehalt an saurem Phosphat hingegen war signifikant um 2% verringert (CT $0,0138 \pm 0,0001$ vs. 3 mg pFN-Tiere $0,0134 \pm 0,0001$, $p < 0,05$). Auch wenn diese Daten für sich betrachtet in ihrer Aussagekraft sicherlich begrenzt sind, bleibt doch hervorzuheben, dass die Messungen der Infrarot-Spektroskopie bei pFN-Deletion und pFN-Injektion in gegensätzliche Richtungen verliefen. Es scheint daher, als hätte Plasmafibronektin einen Einfluss auf die Eigenschaften des Minerals und der Matrix im Knochen.

III.4. Projekt C: Fibronektin in der diabetischen Nephropathie

III.4.1. Detektion des Plasmafibronektins in den Glomeruli

Bei der Untersuchung der Lokalisation des injizierten fluoreszenzgekoppelten Plasmafibronektins wurden den Mäusen nicht nur die Knochen, sondern auch zahlreiche weitere Organe entnommen (s. III.3.1.2). Es konnten in diesem Experiment auch in der Niere Fluoreszenzsignale detektiert werden, die sich auf die Glomeruli beschränkten (Abb. III.C1).

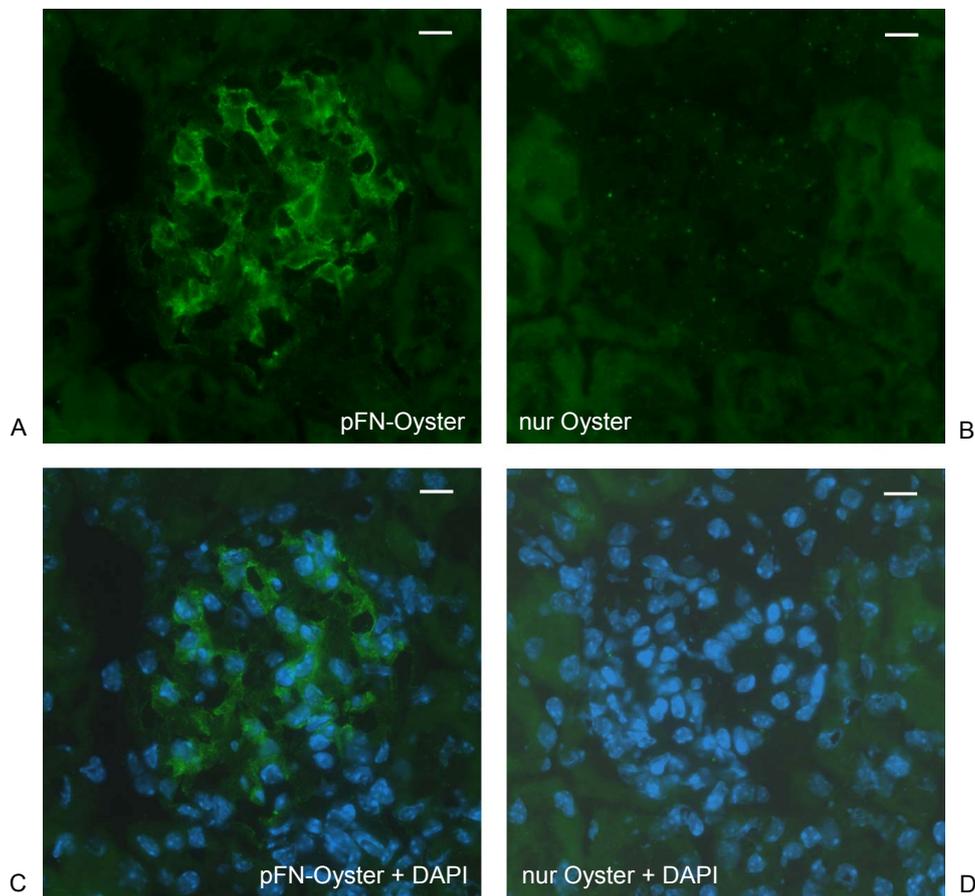


Abbildung III.C1: Fluoreszenzmarkiertes Fibronektin in den Glomeruli der Niere

Nachweis des fluoreszenzmarkierten Plasmafibronektins (pFN-Oyster) in den Glomeruli der Niere (A). Es gab kein Signal bei der Injektion des unkonjugierten Farbstoffs alleine (B). Beide Bilder sind zusätzlich mit ihrer DAPI-Färbung übereinander gelegt dargestellt (C+D). Die Balken entsprechen 10 µm.

Um die Lokalisation des exogenen Fibronektins genauer zu bestimmen, wurden mehrere Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Während keine Übereinstimmung des Fibronektin-Signals

mit den Markern für Endothelzellen (anti-von Willebrand Faktor [222]) und Podozyten (GFAP für engl. „glial fibrillary acidic protein“ [223]) ermittelt werden konnte, zeigte sich eine Überlappung mit den Signalen des Markers für Mesangialzellen (Desmin [224]) und der Mesangialmatrix sowie der Basalmembran (beide beinhalten Laminin [225]) (Abb. III.C2). Das fluoreszenzgekoppelte Plasmafibronektin wurde demnach in die Matrix des Mesangiums eingebaut.

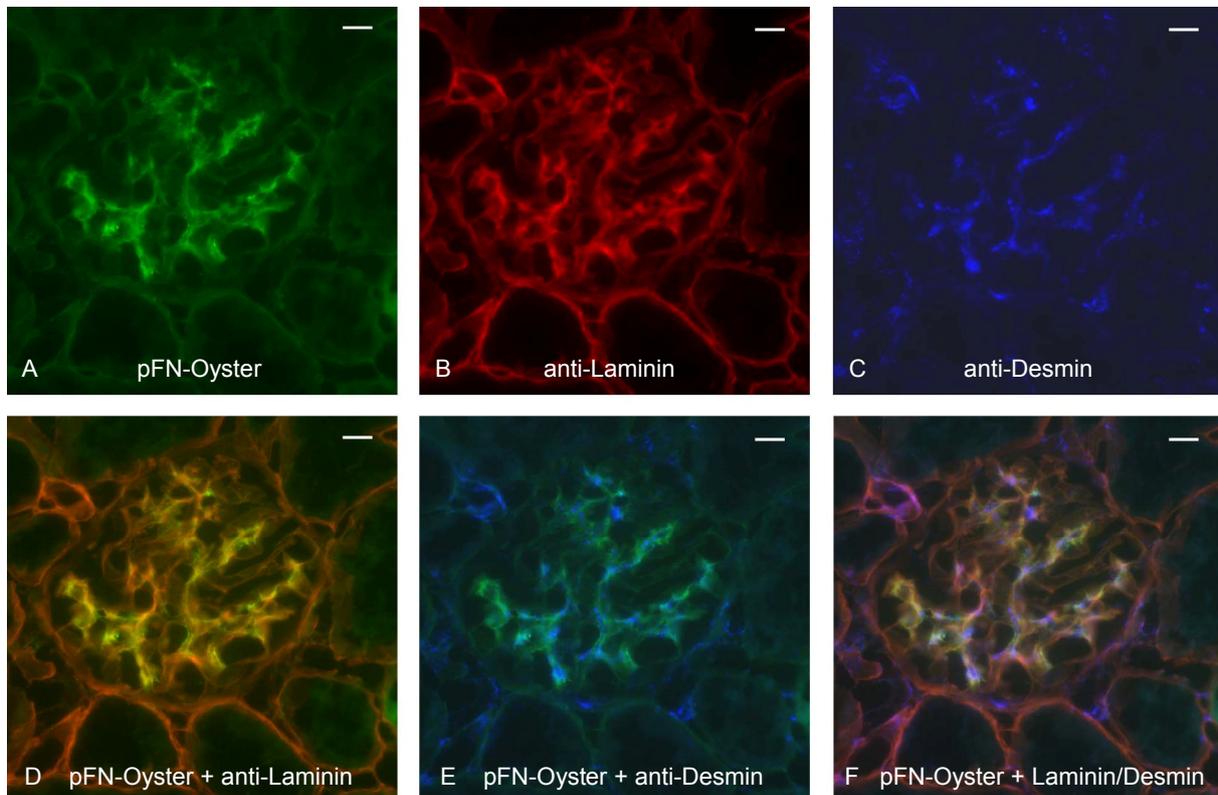


Abbildung III.C2: Lokalisation des Signals des fluoreszierenden Plasmafibronektins

Die Aufnahmen zeigen das Signal des fluoreszenzmarkierten Plasmafibronektins (pFN-Oyster) innerhalb eines Glomerulus (A) sowie die Färbungen desselben Schnittes gegen Laminin (B) und Desmin (C). Um zu zeigen, dass pFN im Bereich der Basalmembran (Marker Laminin) (D) und der Mesangialzellen (Marker Desmin) (E) eingelagert war, wurden die Bilder übereinander gelegt. Bild (F) zeigt alle drei Bilder (A-C) übereinander. Die Balken entsprechen 10 μm .

III.4.2. Induktion eines Diabetes mellitus in Mäusen

Eine der wichtigsten Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus ist die Diabetes-bedingte Nierenerkrankung. Diese ist assoziiert mit einer Expansion des Mesangiums, welche besonders die Matrix betrifft. Die Mesangialmatrix enthält Fibronectin und dessen Menge erhöht sich während des Fortschreitens der Krankheit. Es wurde häufig angenommen, dass es durch die Mesangialzellen produziert wird. Da wir feststellen konnten, dass zirkulierendes Fibronectin in die Matrix eingebaut werden kann, stellte sich die Frage, welcher Anteil des Fibronectins der expandierten

Mesangialmatrix aus der Leber bzw. von den Mesangialzellen stammt. Ziel war es auch zu bestimmen, was für eine Rolle das zirkulierende Fibronectin bei der Entstehung dieser Erkrankung spielt. Zu diesem Zweck wurde die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie nach Induktion eines Diabetes mellitus in konditionellen Knockout-Mäusen untersucht.

Da bislang kein Promoter erhältlich ist, der ausschließlich in den Mesangialzellen der Niere aktiv ist, wurde auf den Mx-Promoter zurückgegriffen, der u. a. zu einer lokalen Expression der Cre Rekombinase in den Glomeruli der Niere führt [226]. Da der Mx-Promoter auch in der Leber angeschaltet wird, konnte so die Rolle des lokalen und des Plasmafibronectins zugleich untersucht werden. Des Weiteren wurde das Experiment mit Mäusen der AlbCre-Linie erweitert. In den konditionellen Knockout-Mäusen dieser Linie kann ausschließlich das Plasmafibronectin nicht mehr gebildet werden. Somit ergab sich die Möglichkeit, die Rolle des Plasmafibronectins alleine sowie in Kombination mit dem lokal produzierten Fibronectin bei der Entstehung einer diabetischen Nephropathie zu untersuchen.

Durch Kreuzung von Mäusen, die Cre unter der Kontrolle des Mx-Promoters trugen, mit einem ROSA26 Reporter Mausstamm [209] konnte bestätigt werden, dass der Mx-Promoter auch in den Mesangialzellen der Glomeruli aktiv ist (Abb. III.C3).

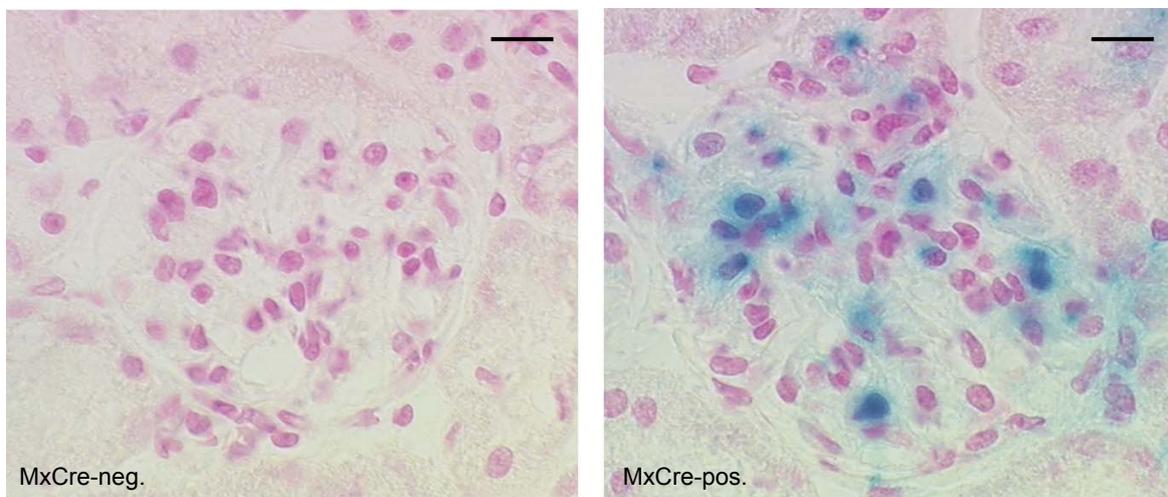


Abbildung III.C3: Der Mx-Promoter ist auch in den Mesangialzellen der Glomeruli aktiv. Während bei der Kontrolle (+/+ LacZ/+) keine Färbung nachweisbar war, zeigte sich in den ROSA26R Mäusen, die Cre unter der Kontrolle des Mx-Promoters trugen (MxCre/+ LacZ/+), dessen Aktivität in den Mesangialzellen der Glomeruli der Niere. Die Balken entsprechen 10 μ m.

III.4.3. Versuchsaufbau, Grunddaten und Resultate

In 8-9 Wochen alten Tieren der Linien MxCre und AlbCre wurde mit Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert. Diese Substanz führt zu einer Schädigung der Langerhansschen Inselzellen [215], die für die Ausschüttung des Hormons Insulin und damit für die Regulation des Blutzuckerspiegels verantwortlich sind [227,228]. Die diabetischen Mäuse sowie nicht-diabetische Wurfgeschwister beider Linien wurden für eine Dauer von 22 Wochen gehalten. Der Blutzuckerspiegel wurde durch individuell adjustierte Insulin-Gabe auf etwa 300 mg/dl eingestellt. Es wurden ausschließlich männliche Tiere für das Projekt verwendet. Am Ende des Experiments (Alter der Tiere zu diesem Zeitpunkt acht Monate) wurden die Tiere getötet. Dabei wurden u. a. Blut, Urin und die Nieren der Tiere entnommen.

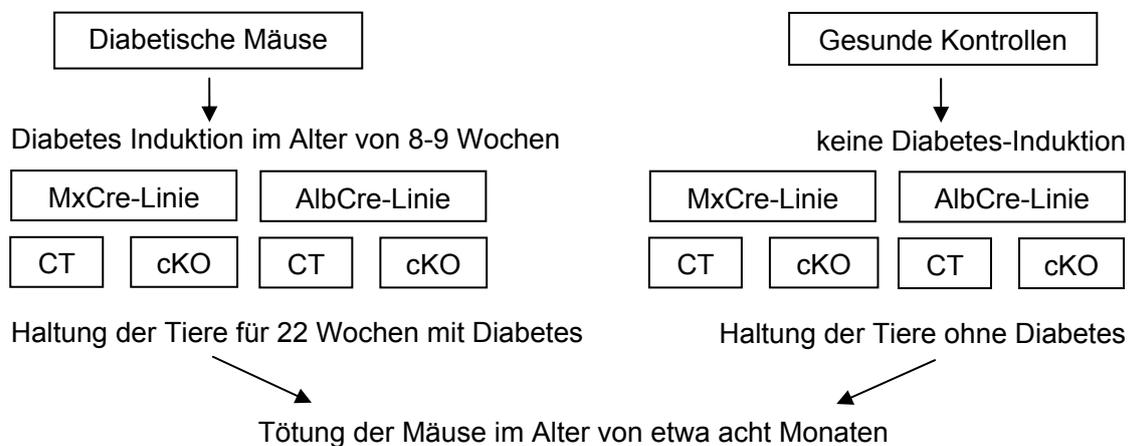


Abbildung III.C4: Schematischer Überblick über das Diabetes-Experiment

In Kontrollen (CT) und konditionellen Knockout-Mäusen (cKO) der Linien MxCre und AlbCre wurde durch Injektion von Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert. Die Tiere wurden für 22 Wochen mit Diabetes gehalten (Diabetiker). Parallel diente ein Teil der Geschwistertiere als nicht-diabetische Kontrollen (Gesunde).

III.4.3.1. Weniger Todesfälle bei den konditionellen Knockouts

Trotz engmaschiger Blutzuckermessungen und entsprechender Versorgung mit Insulin konnte nicht verhindert werden, dass zahlreiche diabetische Tiere im Verlauf des Experimentes verstarben (48%). Nach der Hälfte der Zeit des Experimentes (11 Wochen) waren etwa gleichviel Kontrollen und konditionelle Knockouts der jeweiligen Linie verstorben (MxCre-Linie CT 24% vs. cKO 27%, AlbCre-Linie CT 15% vs. cKO 20%). Nach Ablauf der vollen 22 Wochen zeigten sich hingegen größere Unterschiede in den Todesraten (MxCre CT 64% vs. cKO 54%, AlbCre CT 38% vs. cKO 27%). Dies deutete auf einen Überlebensvorteil der konditionellen Knockouts in der späteren Phase des Diabetes-Experiments (zweite Hälfte) hin.

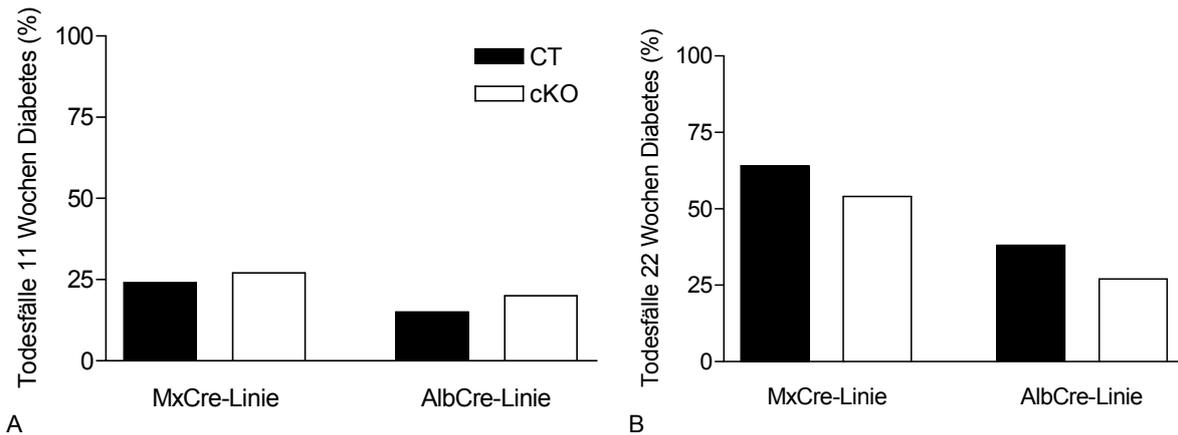


Abbildung III.C5: Weniger Todesfälle bei den konditionellen Knockout-Mäusen im Diabetes-Modell
 Nach der Hälfte des Experiments (11 Wochen) waren etwa gleich viele Diabetiker der Kontrollen (CT) und konditionellen Knockout-Mäusen (cKO) der MxCre- und der AlbCre-Linie verstorben (A). Nach den gesamten 22 Wochen mit Diabetes zeigte sich jedoch ein klarer Überlebensvorteil der konditionellen Knockouts (B).

Die nicht-diabetischen Tiere (Gesunde) hatten geringe Sterberaten ohne bemerkenswerte Unterschiede. Es sind durchschnittlich 6% im Verlauf des Experimentes verstorben (MxCre CT 7% vs. cKO 6%, AlbCre CT 6% vs. cKO 8%). Es bestand demnach kein genereller Überlebensvorteil der konditionellen Knockouts, sondern es schien sich um einen spezifischen Effekt im Diabetes-Modell zu handeln.

III.4.3.2. Grunddaten der diabetischen Mäuse im Vergleich untereinander

Das Gewicht beider Nieren wurde bei der Tötung der Tiere bestimmt. Eine Maus, die eine Hydro-nephrose einer Niere (Wassersackniere) hatte, wurde für diese Evaluation nicht berücksichtigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den diabetischen Kontrollen und den diabetischen konditionellen Knockouts der MxCre- (CT $0,72 \pm 0,03$ vs. cKO $0,72 \pm 0,02$ g, $n=9/11$, $p=1,0$) und der AlbCre-Linie festgestellt werden (CT $0,75 \pm 0,02$ vs. cKO $0,79 \pm 0,03$ g, $n=16/11$, $p=0,2$). Zusätzlich wurde das Nierengewicht zum durchschnittlichen Körpergewicht der letzten Woche vor der Tötung der Mäuse korrigiert. Auch dieser Quotient zeigte keine signifikanten Unterschiede (MxCre CT $29,9 \pm 0,7$ vs. cKO $30,3 \pm 0,9$ g Niere/g Körpergewicht, $p=0,9$), auch wenn er bei den konditionellen Knockouts der AlbCre-Linie im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war (CT $26,9 \pm 0,8$ vs. $29,5 \pm 1,2$ g/g, $p=0,1$).

Um zu bestätigen, dass der Grad des Diabetes in den Gruppen etwa gleich stark ausgeprägt war, wurden die Blutzuckerwerte der letzten 2,5 Wochen vor Tötung der Mäuse gemittelt, ohne dass nennenswerte Unterschiede feststellbar waren (MxCre CT 396 ± 14 vs. cKO 383 ± 15 mg/dl, $n=9/12$, $p=0,6$; AlbCre CT 397 ± 15 vs. 409 ± 13 mg/dl, $n=16/11$, $p=0,6$). Zusätzlich wurden nach der Tötung der Tiere die HbA_{1c}-Werte bestimmt, die ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich wa-

ren (MxCre CT $11,3 \pm 0,6$ vs. cKO $11,2 \pm 0,3$ %, $p=0,8$; AlbCre CT $11,0 \pm 0,4$ vs. cKO $10,7 \pm 0,4$ %, $p=0,6$). Der HbA_{1c} -Wert beschreibt den Grad der Glykierung der Erythrozyten und wird als rück-schauender Langzeitparameter des individuellen Blutzuckerspiegels betrachtet.

Um Urinproben für spätere Untersuchungen zu erhalten, wurde jede Maus ein bis zwei Wochen vor der Tötung für 6 h einzeln in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt und das Volumen des abgesetzten Urins gemessen. Es gab keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Volumina (MxCre CT $13,0 \pm 0,9$ vs. cKO $12,1 \pm 0,9$ ml, $p=0,5$; AlbCre CT $12,4 \pm 0,6$ vs. $14,1 \pm 1,1$ ml, $p=0,2$). Die Dauer von 6 h wurde statt 24 h vorgezogen, da der Allgemeinzustand einiger Tiere schlecht war und die Haltung im Stoffwechsellkäfig einen recht starken Stressfaktor für die Tiere darstellte.

Zur Gewährleistung der erfolgreichen Ausschaltung des Plasmafibronektins (pFN) in den konditionellen Knockout-Mäusen wurde der pFN-Gehalt in ihrem Blut mittels ELISA bestimmt. Die Werte deckten sich in etwa mit den Erfahrungen aus dem Knochenprojekt (s. III.3.2.1.1). Bei der MxCre-Linie konnte ein Ausschaltungsgrad von 96%, bei der AlbCre-Linie von 92% erreicht werden (MxCre CT 412 ± 29 vs. cKO 16 ± 3 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$; AlbCre CT 487 ± 33 vs. cKO 40 ± 4 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$). Erneut war die Ausschaltung über den Mx-Promoter signifikant besser ($p < 0,001$).

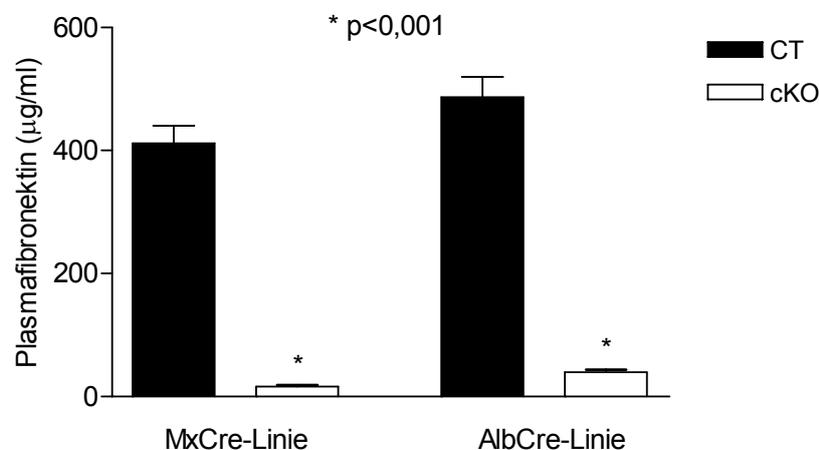


Abbildung III.C6: Ausschaltung des Plasmafibronektins in den konditionellen Knockout-Mäusen

Die Ausschaltung des Plasmafibronektins in den konditionellen Knockout-Mäusen der MxCre- und AlbCre-Linien hatte eine Effizienz von mehr als 92%. Dabei war der Ausschaltungsgrad über den Mx-Promoter erneut signifikant besser (96%) als über den Alb-Promoter (92%).

III.4.3.3. Vergleich der diabetischen und nicht-diabetischen Mäuse miteinander

Die Betrachtung der Diabetiker im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren (Gesunde) der Linien MxCre und AlbCre soll hervorheben, dass die durch den Diabetes mellitus hervorgerufenen Veränderungen sehr stark ausgeprägt waren und dadurch Folgeerkrankungen des Diabetes mel-

litus erwartet werden durften. Alle betrachteten und im Folgenden beschriebenen Aspekte waren hochsignifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$). Das Nierengewicht der diabetischen Tiere war im Vergleich zu den gesunden Tieren erhöht (MxCre +33%, AlbCre +41%) (MxCre Gesunde $0,54 \pm 0,02$ vs. Diabetiker $0,72 \pm 0,02$ in g, $n=30/20$; AlbCre Gesunde $0,54 \pm 0,01$ vs. $0,76 \pm 0,02$ in g, $n=29/27$). Ein erhöhtes Nierengewicht ist typisch für eine diabetische Nephropathie [179] und geht auf eine erhöhte Ablagerung von Proteinen in der renalen Hypertrophie zurück [180]. Besonders stark (MxCre +169%, AlbCre +134%) wurde dieser Effekt durch die Korrektur des absoluten Nierengewichts zum Körpergewicht der Tiere deutlich (MxCre Gesunde $11,2 \pm 0,2$ vs. Diabetiker $30,1 \pm 0,6$; AlbCre Gesunde $11,9 \pm 0,2$ vs. $27,9 \pm 0,7$). Eine erwartungsgemäße Erhöhung des Blutzuckerspiegels (MxCre +221%, AlbCre +265%) konnte bei den Diabetikern festgestellt werden (MxCre Gesunde 121 ± 3 vs. Diabetiker 389 ± 10 in mg/dl, $n=30/21$; AlbCre Gesunde 110 ± 3 vs. Diabetiker 402 ± 10 in mg/dl, $n=29/27$). Der HbA_{1c}-Wert (MxCre +100%, AlbCre +110%) reflektierte diese Gegebenheit (MxCre Gesunde $5,6 \pm 0,1$ vs. Diabetiker $11,2 \pm 0,3$ in %, $n=10/21$; AlbCre Gesunde $5,2 \pm 0,1$ vs. Diabetiker $10,9 \pm 0,3$ in %, $n=18/27$). Besonders stark war das Symptom der Polyurie (MxCre $> +4000\%$, AlbCre $> +2000\%$) bei den Diabetikern ausgeprägt (MxCre Gesunde $0,3 \pm 0,1$ vs. Diabetiker $12,5 \pm 0,6$ in ml, $n=30/20$; AlbCre Gesunde $0,6 \pm 0,1$ vs. $13,1 \pm 0,6$ in ml, $n=29/27$). Aufgrund der massiv erhöhten Urinmengen und des deutlich größeren Gewichts der Nieren der diabetischen Tiere, konnte von einer Schädigung der Nieren ausgegangen werden.

III.4.3.4. Bestimmung der Expansion des Mesangiums

Der Grad der Expansion des Mesangiums wurde durch den GSI (für engl. „glomerular sclerotic index“) zum Ausdruck gebracht. Dazu wurde der Anteil des Mesangiums an den Glomeruli in Nierenschnitten ermittelt. Pro Maus wurden 30 Glomeruli evaluiert.

Die konditionellen Knockout-Mäuse der MxCre-Linie hatten einen 42% geringeren GSI im Vergleich zu ihren diabetischen Kontrollen (CT $43,5 \pm 1,0$ vs. cKO $25,1 \pm 0,6$ %, $n=3/3$, $p < 0,001$). Der Unterschied in der AlbCre-Linie war etwas weniger stark ausgeprägt. Doch auch die spezifische Ausschaltung des Plasmafibronektins alleine in dieser Linie bewirkte bereits eine 29% geringere Ausbreitung des Mesangiums in den Glomeruli (CT $41,0 \pm 0,7$ vs. cKO $29,1 \pm 0,8$ %, $n=3/3$, $p < 0,001$). Die Ausschaltung des Fibronektins in beiden Linien hatte demnach zur Folge, dass zwar eine beginnende diabetische Nephropathie (in Form einer Verbreiterung der Mesangialmatrix) nachgewiesen werden konnte, diese jedoch im Vergleich zu den diabetischen Kontrolltieren deutlich milder ausgeprägt war.

Es ist hervorzuheben, dass in der Mesangialmatrix neben Fibronektin noch einige weitere Proteine wie Kollagen und Laminin [177,229] bei einer Ausbreitung des Mesangiums vermehrt nachgewiesen werden können. Während für zahlreiche Zytokine und Faktoren ein Einfluss auf die

Entstehung einer diabetischen Nephropathie gezeigt wurde, ist weniger darüber bekannt, welchen Einfluss die Extrazellulärmatrix selbst hat. Unsere Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass eine Verminderung des Fibronektins bereits die Entwicklung einer Glomerulosklerose abzuwächen vermag. Dies betrifft sowohl das lokal von den Mesangialzellen produzierte Fibronektin als auch das Plasmafibronektin, das mit der Blutzirkulation in die Niere gelangt.

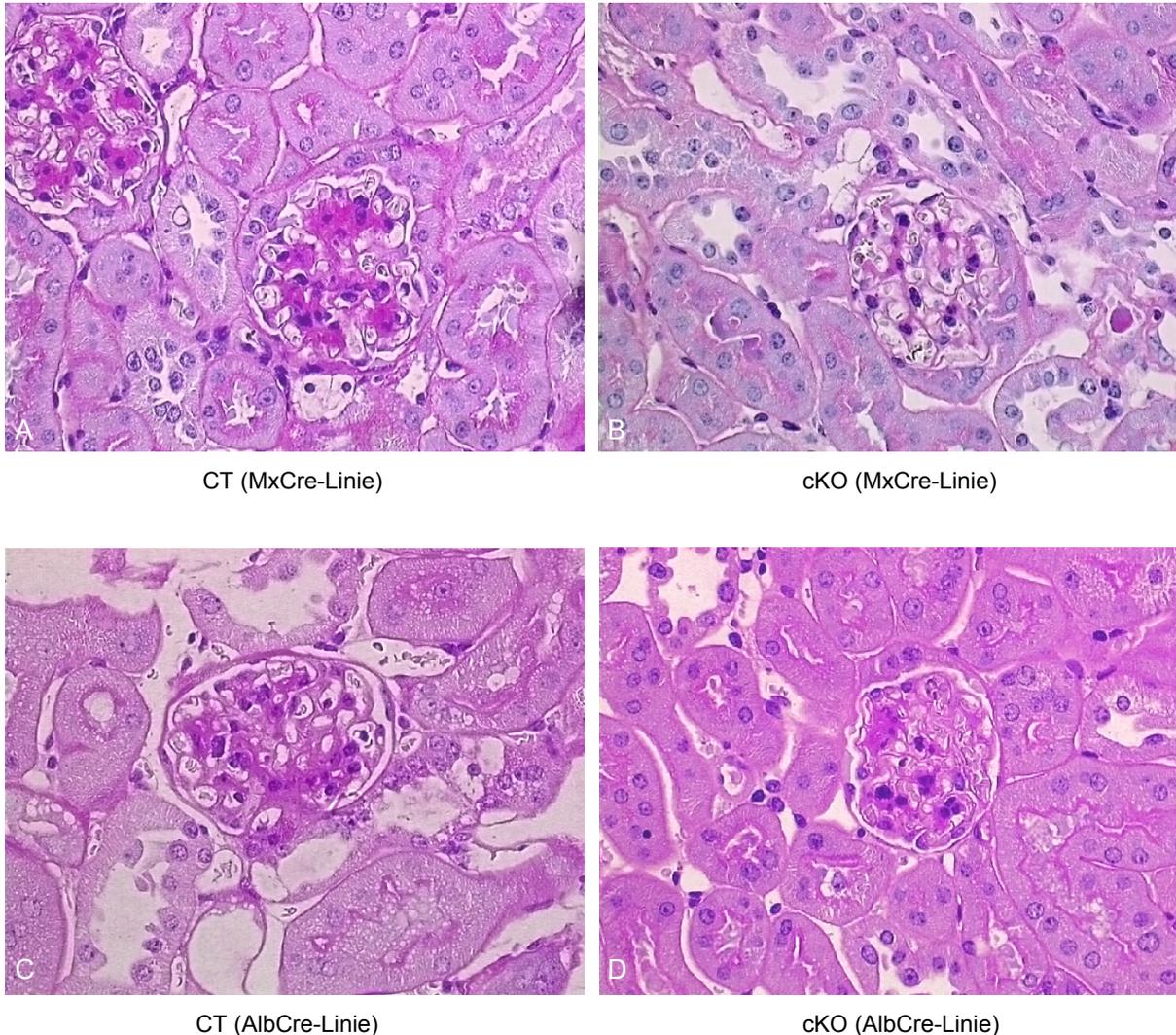


Abbildung III.C7: Geringerer Grad der Expansion des Mesangiums bei den konditionellen Knockouts
Die ausgewählten repräsentativen Glomeruli (PAS-gefärbt) illustrieren, dass die Mesangialmatrix in den Glomeruli der diabetischen konditionellen Knockout-Mäuse (cKO) im Vergleich zu den ebenfalls diabetischen Kontrollen (CT) weniger stark verbreitert ist. Dies ist besonders auffällig bei der MxCre-Linie (A+B), aber auch die Ausschaltung des Plasmafibronektins alleine in der AlbCre-Linie (C+D) hatte bereits einen signifikanten Effekt (s. Text).

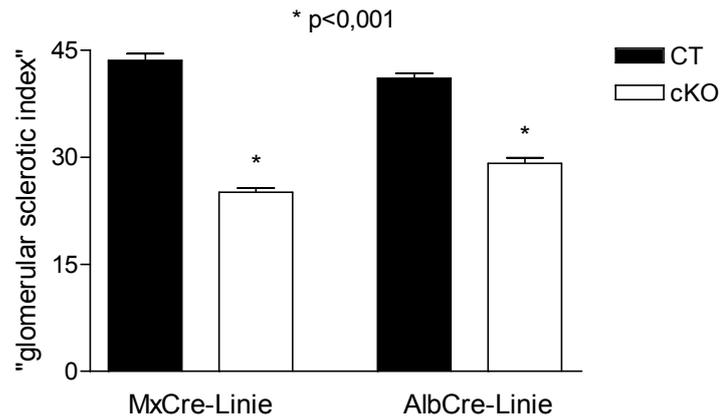


Abbildung III.C8: Geringerer GSI bei den konditionellen Knockouts der Linien MxCre und AlbCre
 Zur Quantifizierung des Grades der Expansion des Mesangiums der diabetischen Tiere wurde der GSI (für engl. „glomerular sclerotic index“) bestimmt. Die konditionellen Knockouts (cKO) der MxCre-Linien hatten im Vergleich zu den Kontrollen eine 42% geringere Ausbreitung des Mesangiums. Bei der AlbCre-Linie waren es -29%, die alleine durch die Abwesenheit des Plasmafibronektins verursacht wurden.

III.4.3.5. Bestimmung des Fibronektinergehalts der Glomeruli

Erste Analysen des Fibronektinergehalts der Glomeruli erfolgten mit Hilfe der konfokalen Laser-scan-Mikroskopie (DM-IRBE, TCS-SP/NT, Leica). Zu diesem Zweck wurden Gewebeschnitte der Nieren gegen Fibronektin gefärbt und die Intensität des Signals im Bereich der Glomeruli evaluiert (Programm LCS, Leica). Dazu wurde die Summe des Signals durch die jeweilige Fläche des Glomerulus dividiert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des Fibronektinergehalts von 31% in den Glomeruli der konditionellen Knockouts (CT 372 ± 25 vs. cKO 256 ± 27 , $n=5/6$, $p=0,01$). Der Fibronektinergehalt der Mesangialmatrix der konditionellen Knockouts der MxCre-Linie war also erwartungsgemäß durch die Ausschaltung des Fibronektins in den Mesangialzellen und der Leber verringert.

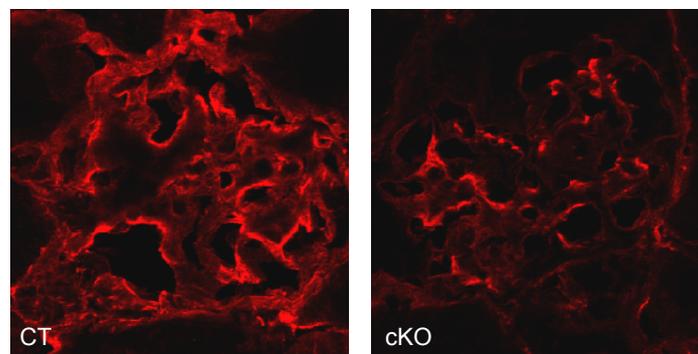


Abbildung III.C9: Weniger Fibronektin im Mesangium der konditionellen Knockouts
 Mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie wurde der Fibronektinergehalt der Glomeruli der diabetischen Tiere der MxCre-Linie bestimmt. Die konditionellen Knockouts (cKO) hatten weniger Fibronektin in den Glomeruli verglichen mit den Kontrollen (CT). Das Fibronektin der Mesangialzellen war also tatsächlich ausgeschaltet.

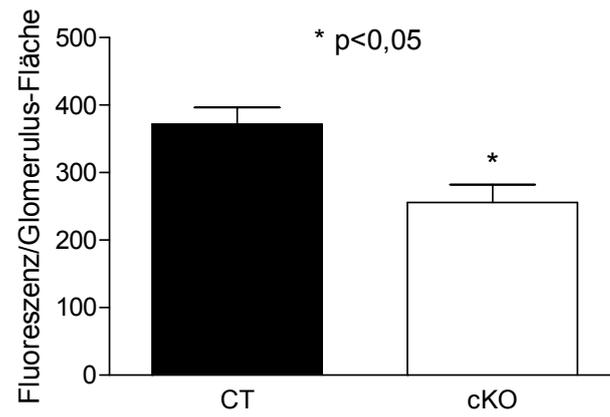


Abbildung III.C10: Verminderter Fibronektin Gehalt der Glomeruli der konditionellen Knockouts
Die Quantifizierung des Fibronektin Gehalts in den Glomeruli der konditionellen Knockouts (cKO) der MxCre-Linie ergab einen signifikant erniedrigten Wert (-31%) im Vergleich zu den Kontrollen (CT).

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Fibronektins im Knochen untersucht. Dabei stellte sich entgegen vorheriger Annahmen heraus, dass es nicht das Fibronektin der Osteoblasten ist, das den Hauptteil des Fibronektins der Knochenmatrix ausmacht. Dennoch ist das Osteoblasten-Fibronektin von Bedeutung für die Funktion dieser Zellen, da die Osteoblasten bei dessen Fehlen weniger effizient arbeiteten. Das zirkulierende Fibronektin ist ebenfalls von Bedeutung für den Knochen, da es in ihn einzudringen vermag und sogar den Hauptteil des Fibronektins der Knochenmatrix ausmacht. Diese Fibronektin-Isoform scheint zwar nur geringe Effekte auf die Knochenzellen auszuüben, beeinflusst aber die Eigenschaften der Matrix, z. B. im Hinblick auf deren Mineralgehalt.

Von diesen Experimenten, die in einem physiologischen Mausmodell erfolgten, ausgehend, sollte die Rolle des Fibronektins zusätzlich auch in einem Krankheitsmodell untersucht werden. Dabei stand im Vordergrund, ob lokal produziertes (zelluläres Fibronektin) bzw. zirkulierendes Fibronektin (Plasmafibronektin) unterschiedliche Einflüsse auf die Entwicklung einer Fibrose mit schwerwiegenden Konsequenzen hat. Es zeigte sich in den Nieren von Mäusen, die längerfristig mit Diabetes mellitus gehalten wurden, dass das Plasmafibronektin für die Entstehung von Folgeschäden eine größere Bedeutung hatte als das lokal produzierte Fibronektin. Die Todesraten der Tiere, die kein Plasmafibronektin mehr hatten, waren dabei niedriger als die der Kontrollen.

Durch diese Untersuchungen wurden zwei neue, zuvor unbekannte Funktionen für das Plasmafibronektin entdeckt, die dessen Rolle von dem lokal produzierten Fibronektin abgrenzten. Im folgenden Text wird nacheinander auf den Knochen und die Niere separat eingegangen.

IV.1. Die Rolle des Fibronektins im Knochen

IV.1.1. Ausschaltung des Fibronektins der Osteoblasten

Da eine komplette Ausschaltung des Fibronektins in Knockout-Mäusen bereits während der Embryonalentwicklung lethal ist, weil durch das Fehlen des Fibronektins u. a. die Ausbildung der Gefäße gestört ist [33,34] (s. I.4.1.1), wurde auf verfügbare konditionelle Knockout-Mäuse zurück-

gegriffen, um die Rolle des Fibronektins im Knochen näher zu untersuchen. Dabei sollte in getrennten Experimenten die Bedeutung des Osteoblasten-Fibronektins bzw. des Plasmafibronektins der Leber in der Maus analysiert werden.

Es existieren mehrere Promotoren, über welche die Deletion eines geflochten Genes in Zellen der Osteoblasten-Linie erreicht werden kann (Abb. IV.1). Für die vorliegende Arbeit wurde der 2,3 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promoter (Col-Promoter) [212] verwendet, um das Osteoblasten-Fibronektin auszuschalten. Im Gegensatz zu verschiedenen in der Literatur beschriebenen Osteokalzin-Promotoren, die z. T. die Cre-Expression nur schwach aktivieren [211] und erst in späten Reifestadien der Osteoblasten aktiviert werden [230], findet die Expression von Fibronektin und Kollagen Typ I bereits in früheren Osteoblasten-Stadien und praktisch simultan statt [90]. Aus diesem Grund erschien die Depletion des Fibronektins in diesem Zeitfenster für das Projekt besonders aussichtsreich. Neben dem von uns verwendeten 2,3 Kb Promoter wurde von anderen Gruppen ein 3,6 Kb $\alpha_1(I)$ Kollagen-Promoter beschrieben, der ebenfalls in Osteoblasten aktiv ist. Allerdings ist dieser weniger spezifisch und aktiviert die Expression von Cre u. a. auch in Fibroblasten, Knorpelzellen sowie in Zellen der Haut und den Sehnen [231,232]. Der von uns verwendete Col-Promoter hingegen führte zu einer stringenten Expression der Cre Rekombinase in reifen Osteoblasten und Osteozyten und erschien damit als am besten geeignet. Die Spezifität des Promoters wurde durch eigene Untersuchungen an ROSA26 Reporter-Mäusen bestätigt.

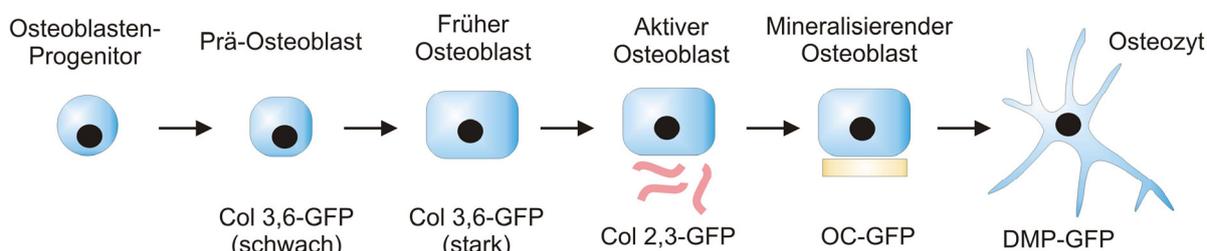


Abbildung IV.1: GFP-Expression in Osteoblasten über verschiedene Promotoren

Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in transgenen Mäusen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren brachte näheren Aufschluss über den Zeitpunkt der Anschaltung dieser Promotoren in der Abstammungslinie der Osteoblasten. Dargestellt sind Promotoren bzw. deren Fragmente, die aus den folgenden Genen abgeleitet sind: Kollagen Typ I (Col 3,6-GFP und Col 2,3-GFP) [233], Osteokalzin (OC-GFP) [234] und Dentin Matrixprotein 1 (DMP-GFP) [235] (Schema in Anlehnung an <http://skeletalbiology.uhc.edu/>).

Der Nachweis der erfolgreichen Ausschaltung des Fibronektins der Osteoblasten erfolgte über *in vitro* Experimente an isolierten primären Calvaria-Osteoblasten aus den konditionellen Knockout-Mäusen der ColCre-Linie. Durch den Nachweis von Osteokalzin in den Kulturmedien sowie der Tatsache, dass die Zellen so genannte Knoten ausbildeten, die histologisch dem Geflechtknochen ähneln [236], bewies, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um Osteoblasten handelte. Es gelang, das Enzym Cre in den Zellkernen nachzuweisen und zu zeigen, dass die DNA der Osteoblasten zerschnitten worden war. Die kultivierten Osteoblasten der konditionellen Knockout-

Mäuse gaben deutlich weniger Fibronectin ins Medium ab, was der endgültige Beweis für eine erfolgreiche Ausschaltung war. Der Nachteil dieses Experiments war, dass bei der Isolation primärer Osteoblasten Kontaminationen mit Fibroblasten unvermeidbar waren. Da in diesen Zellen der verwendete Col-Promoter nicht aktiviert wurde, enthielt das Medium der kultivierten Osteoblasten der konditionellen Knockouts immernoch Fibronectin. Zudem konnte Cre durch den Immunfluoreszenz-Nachweis nur im Bereich der Knoten (also dort, wo Osteoblasten aktiv waren) angefärbt werden, wohingegen die Bereiche zwischen den Knoten (also dort, wo besonders viele Fibroblasten waren) negativ für Cre war. Auf der anderen Seite scheint die erfolgreiche Ausschaltung des Fibronectins in den Osteoblasten gerade deshalb gesichert, weil der Fibronectin/Osteokalzin-Quotient der Medien trotz der Fibroblasten-Kontamination signifikant vermindert war. Das Fibroblasten-Fibronectin in den Kulturen war sicherlich auch der Grund, aus dem die Fibronectin-deletierten Osteoblasten überhaupt in der Lage waren, normale Knoten auszubilden, da Osteoblasten dazu auf die Anwesenheit von Fibronectin angewiesen sind [155].

IV.1.2. Ausschaltung des Fibronectins in der Leber

Zur Ausschaltung des Fibronectins der Leber, wurde alternativ mit zwei verschiedenen Promotoren gearbeitet (Mx und Alb).

Mx-Promoter: Das Gen Mx1 (für engl. „myxovirus resistance 1“) wird in Mäusen über einen Promoter gesteuert, der durch bestimmte Viren, aber auch durch Interferon induziert wird [237]. Durch Gabe von Interferon [238] oder der synthetischen doppelsträngigen RNA plpC (für engl. „polyinosinic-polycytidylic acid“), die wiederum die Ausschüttung des Interferons induziert, wird der Mx-Promoter aktiviert. Eine Bestimmung des erreichbaren Ausschaltungsgrades in verschiedenen Geweben ergab für die Leber 100% [207]. Allerdings ließ sich auch in anderen Geweben ein teilweise hoher Ausschaltungsgrad feststellen: z. B. 94% in der Milz und 8% im Gehirn (dazwischen lagen in abfallender Reihenfolge Zwölffingerdarm, Herz, Lunge, Uterus, Thymus, Niere und Muskel) [207]. Der Nachteil des Mx-Promoters ist demnach dessen geringe Spezifität, die für einen gewissen Ausschaltungsgrad in weiteren Organen neben der Leber verantwortlich ist. Der Vorteil des Mx-Promoters zur Ausschaltung gefloxter Gene in der Leber konditioneller Knockout-Mäuse liegt in der hohen Effizienz, die erreicht wird. Auch kann der Zeitpunkt von außen durch Gabe des plpC bestimmt werden und wurde für die beschriebenen Experimente so gewählt, dass die Ausschaltung des Plasmafibronektins im Alter von 4-5 Wochen erfolgte.

Alb-Promoter: Der Alb-Promoter hingegen ist hochspezifisch für die Leber, da Albumin ausschließlich von den Hepatozyten exprimiert wird. Der Nachteil dieses Promoters ist jedoch, dass er erst recht spät in der Entwicklung der Maus seine maximale Aktivität entfaltet [40,208,213,214]. Das bedeutete, dass über den Alb-Promoter bei den konditionellen Knockout-Mäusen der AlbCre-Linie erst im Alter von etwa 8-12 Wochen eine Ausschaltung des Plasma-

fibronektins erwartet werden konnte. Ein weiterer Nachteil dieses Promoters war, dass der erreichte Ausschaltungsgrad des Plasmafibronektins signifikant schlechter war als der des Mx-Promoters.

Der Nachweis der Deletion des Plasmafibronektins in den Mäusen der MxCre- und der ColCre-Linie erfolgte mittels ELISA und Western Blotting der Blutproben. Dabei wurde ein Ausschaltungsgrad des Plasmafibronektins im Blut von mehr als 95% nachgewiesen, der über den Mx-Promoter signifikant höher war als über den Alb-Promoter. Deshalb erfolgten die meisten Untersuchungen an den Tieren der MxCre-Linie.

IV.1.3. Ursprung des Fibronektins der Knochenmatrix

Obwohl der Hauptanteil der Extrazellulärmatrix des Knochens aus Kollagen Typ I besteht, sind dennoch zahlreiche weitere Proteine detektierbar. Ursprünglich glaubte man, dass die Kollagenmatrix durch Selbstaggregation des Kollagens Typ I entstünde. Später stellte sich jedoch heraus, dass eine Regulation durch Zellen stattfindet, die durch ein Zusammenspiel der Zellen mit Integrinen sowie mit Fibronektin beeinflusst wird [14]. Dabei nimmt Fibronektin eine besondere Rolle ein, da die Ausbildung eines Kollagennetzwerkes vom Vorhandensein einer Fibronektinmatrix abhängig ist [14,163].

Die Ausschaltung des Osteoblasten-spezifischen Fibronektins in Mäusen der ColCre-Linie führte nicht zu einer deutlichen Reduktion des Fibronektins in der extrazellulären Matrix des Knochens. Dies wurde sowohl über Immunfluoreszenz-Färbungen von Knochenschnitten als auch durch ein Western Blotting mit Knochenlysaten überprüft und bestätigt. Der Befund war zunächst überraschend, da die Osteoblasten als knochenbildende Zellen für die Produktion des Osteoids verantwortlich sind (s. I.2.3.1.2). Aus diesem Grund wurde zuvor stets angenommen, dass sie auch den Hauptteil des in der Knochenmatrix nachweisbaren Fibronektins bilden würden.

Als Quelle des Fibronektins der Knochenmatrix wurde stattdessen das Plasmafibronektin der Leber in Betracht gezogen. Durch Injektion fluoreszenzgekoppelten Plasmafibronektins gelang der Nachweis, dass Fibronektin aus dem Blutkreislauf heraus die Knochenmatrix infiltrieren kann. Diese Einlagerung geschah nicht nur an den Stellen, an denen Osteoblasten gerade Matrix produzierten oder mineralisierten, sondern durchzog nahezu den gesamten Knochen. Dies war insofern überraschend, als dass es sich bei der Knochenmatrix um eine sehr kompakte und dichte Struktur handelt und Fibronektin ein recht großes Protein ist. Da die Kontrolltiere des Experiments jedoch den unkonjugierten Farbstoff erhalten hatten, war sichergestellt, dass das Signal von dem fluoreszierenden Fibronektin selbst stammte und nicht etwa von einer unspezifischen

Einlagerung des Farbstoffs. Diese Ergebnisse werden auch durch ein *in vivo* Experiment einer anderen Gruppe gestützt [239], bei dem entmineralisierte Knochenmatrix unter die Haut von Ratten implantiert wurde. Diese Untersuchung ergab, dass sich zirkulierendes Fibronectin in das Implantat einzulagern vermochte.

Die Ausschaltung des Fibronectins über den Mx- bzw. den Alb-Promoter zeigte dann tatsächlich, dass der Fibronectingehalt der Knochenmatrix deutlich reduziert war. Dies wurde über Immunfluoreszenz-Färbungen von Knochenschnitten sowie durch ein Western Blotting mit Knochenlysaten belegt. Die Reduktion in den konditionellen Knockout-Mäusen der AlbCre-Linie war zwar weniger auffällig im Vergleich zu MxCre-Linie, dies ist jedoch durch mehrere Umstände erklärbar. Zum einen war die Fibronectin-Ausschaltung über den Alb-Promoter signifikant schlechter im Vergleich zum Mx-Promoter, zum anderen wurde die Ausschaltung erst später erreicht. Dass auch in den konditionellen Knockout-Mäusen der AlbCre-Linie eine Reduktion des Fibronectins gefunden werden konnte, belegt jedoch, dass mindestens ein Teil des Fibronectins der Knochenmatrix aus der Leber stammen muss. Dies ist insbesondere deswegen relevant, da über *in vitro* Experimente belegt wurde, dass für die Integrität einer Kollagenmatrix eine kontinuierliche Versorgung mit Fibronectin erforderlich ist [169]. Das Plasmafibronectin aus dem Blutkreislauf wäre daher ein idealer Kandidat.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass der Hauptteil des Fibronectins der extrazellulären Matrix des Knochens gar nicht das von den Osteoblasten produzierte Fibronectin ist. Stattdessen gelangt Fibronectin aus der Leber in den Knochen und die Ausschaltung des Plasmafibronectins bewirkt eine deutliche Verminderung der Fibronectinmenge in der Knochenmatrix.

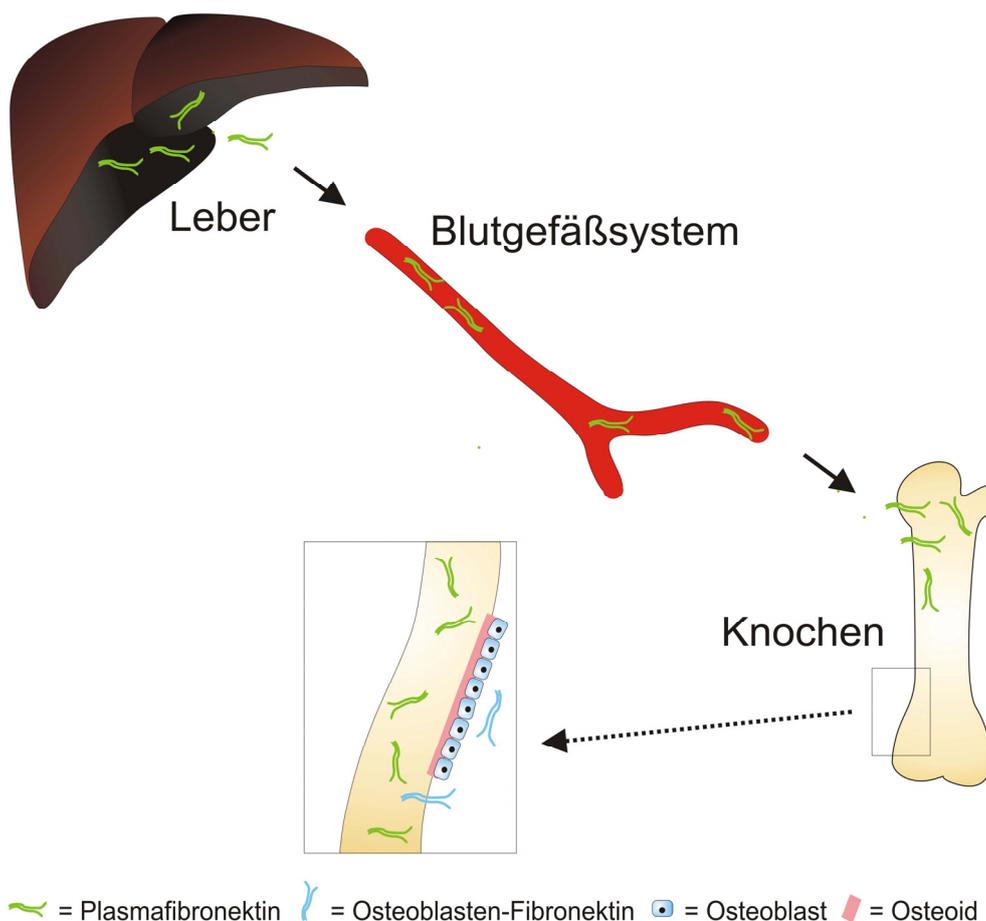


Abbildung IV.2: Fibronektin gelangt von Außen in den Knochen

Das Injektions-Experiment mit fluoreszenzkonjugiertem Fibronektin zeigte, dass Plasmafibronektin von der Leber in den Knochen gelangen kann und dort die Matrix infiltriert. Obwohl die Osteoblasten selbst Fibronektin produzieren, macht dies nicht den Hauptteil des Fibronektins des Knochens aus. Stattdessen scheint die Leber für eine kontinuierliche Versorgung des Knochens mit Fibronektin zu sorgen. Das Osteoblasten-Fibronektin unterscheidet sich jedoch vom Plasmafibronektin und beeinflusst die Funktion der Osteoblasten.

IV.1.4. Bedeutung des Fibronektins für die Knochenzellen

Die Daten der Histomorphometrie ergaben, dass das Fehlen des Osteoblasten-Fibronektins die Anzahl und die Funktion der Osteoblasten in den konditionellen Knockout-Mäusen der ColCre-Linie beeinflusste. So zeigte sich, dass jene Mäuse, deren Osteoblasten kein Fibronektin bilden konnten, eine signifikant erhöhte Anzahl an Osteoblasten besaßen (sowohl absolut als auch korrigiert zur Knochenoberfläche). Dies resultierte in einem signifikant vergrößerten Osteoidsaum (ebenfalls sowohl absolut als auch korrigiert zur Knochenoberfläche). Da jedoch die Trabekelzahl der konditionellen Knockout-Mäuse nicht erhöht, sondern vermindert war, gab es maßgeblich zwei Erklärungen: Entweder einen deutlich erhöhten Knochenabbau durch Osteoklasten (konnte durch die Histomorphometrie widerlegt werden) oder eine funktionelle Störung der Tätigkeit der

Osteoblasten. Tatsächlich waren sowohl die Knochenbildungsaktivität pro Osteoblastengruppe („adjusted apposition rate“) als auch die Zeit, die bis zur Mineralisation des abgelegten Osteoids benötigt wurde („mineralization lag time“) signifikant verändert. Auf zellulärer Ebene waren die Osteoblastenteams weniger aktiv und benötigten mehr Zeit um den Knochen zu mineralisieren. Die Knochenbildungsleistung auf der Ebene des gesamten Knochens betrachtet, war hingegen nicht verändert („bone formation rate“) und auch der Osteokalzingehalt des Blutserums der konditionellen Knockout-Mäuse der ColCre-Linie war vergleichbar zu dem der Kontrolltiere. Vermutlich war die funktionelle Beeinträchtigung der Osteoblasten so eng an deren erhöhte Anzahl gekoppelt, dass der Effekt auf den Gesamtknochen sogar beinahe ausgeglichen wurde. Daher war die Verminderung der Knochendichte vergleichsweise gering ausgefallen.

Es gibt verschiedene mögliche Gründe für die Erhöhung der Osteoblastenzahl in den konditionellen Knockout-Mäusen der ColCre-Linie. Durch Untersuchung der Proliferations- und Apoptoseraten konnte jedoch sowohl ausgeschlossen werden, dass die Prä-Osteoblasten verstärkt proliferierten (reife Osteoblasten sind nicht mehr teilungsfähig [84]), als auch, dass durch das Fehlen des Osteoblasten-Fibronektins die Apoptose der Osteoblasten vermindert war. Eine mögliche Erklärung hingegen wäre eine verlangsamte Differenzierung der Osteoblasten. Diese These wird entscheidend durch die beeinträchtigte Funktion der Fibronektin-deletierten Osteoblasten gestützt. Es scheint denkbar, dass das Osteoblasten-Fibronektin im gesunden Organismus als eine Art autokriner Faktor die Aktivität der Osteoblasten fördert. Das Fehlen des Osteoblastenspezifischen Fibronektins würde dann zu einer Verlangsamung der Funktion führen. Durch unveränderte Proliferations- und Apoptoseraten könnte sich ein Gleichgewicht der Osteoblastenzahl auf einem höheren Niveau einpendeln. Für diese Theorie spricht auch, dass die Osteozytenzahlen nicht signifikant verändert sind. Wäre die Osteoblastenzahl zwar zu einem bestimmten Moment (Zeitpunkt der Tötung) erhöht, aufgrund deren verlangsamter Differenzierung längerfristig betrachtet aber auf einer nur mäßig höheren Ebene, so könnte man kaum eine signifikant erhöhte Anzahl der Osteozyten in der Knochenmatrix erwarten. Interessanterweise scheint es durchaus einen Zusammenhang zwischen der Osteozytenzahl und der Knochenqualität zu geben, denn eine Humanstudie zeigte bei Patientinnen, die spontane Wirbelbrüche erlitten hatten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen 34% weniger Osteozyten pro Knochenfläche [240]. Tatsächlich trat diese Verminderung der Osteozytenzahl sogar in Knochenbereichen auf, die vermutlich noch aus der Kindheit der Patientinnen stammten.

Der Reife-Grad der Osteoblasten lässt sich grob in drei Stufen unterteilen: Proliferation (Prä-Osteoblasten), Produktion der Extrazellulärmatrix (Synthese, Organisation und Reifung der Matrix) und Mineralisierung des Osteoids [90]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die produzierte Matrix selbst einen nennenswerten Einfluss auf die Funktion der Osteoblasten ausübt. Dies kann z. B. durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β (für engl. „transforming growth factor- β) geschehen. TGF- β wird von Zellen als latenter („schlummernder“) Komplex sezerniert. Das

bedeutet, der Wachstumsfaktor selbst ist mit LAP (für engl. „latency-associated propeptide“) und LTBP1 (für engl. „latent TGF- β binding protein-1“) assoziiert und vermag auf diese Weise an Proteine der Extrazellulärmatrix zu binden [241]. Bei einer Abspaltung des Komplexes durch Proteasen wird der Wachstumsfaktor TGF- β frei und kann seine Wirkung auf Zellen entfalten. An der Regulation der Freisetzung des TGF- β aus seinen latenten Komplexen ist z. B. das Protein der Extrazellulärmatrix Fibrillin-1 beteiligt [232]. Fibronectin wird ebenfalls als entscheidend für die Einlagerung des Komplexes in die Extrazellulärmatrix durch Osteoblasten beschrieben [170]. Bislang nur teilweise veröffentlichte [242], aber auf einem Kongress (ASBMR 2007, Hawaii, USA [243]) vorgestellte Daten unterstreichen diese Rolle des Fibronectins. So zeigte sich durch Zellkulturversuche an Osteoblasten, deren Fibronectin-Produktion über ein Adenovirus/Cre-System um 90% reduziert worden waren, dass die behandelten Zellen weniger LTBP1 in die Extrazellulärmatrix eingebauten. Dieser Effekt konnte zumindest partiell durch eine Behandlung der Zellen mit exogenem Fibronectin aufgehoben werden. Auch eine reduzierte Expression der alkalischen Phosphatase (einem Marker sich differenzierender Osteoblasten) konnte durch Zugabe des Fibronectins von außen normalisiert werden.

Eine Überexpression von TGF- β_2 in Osteoblasten führte in Mäusen *in vivo* zu interessanten Effekten. So war die Mineralisierung beeinträchtigt und mehr Osteoid nachweisbar [244]. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen und lässt vermuten, dass durch die Ausschaltung des spezifischen Fibronectins der Osteoblasten eine Dysregulation des TGF- β -Systems entstehen könnte, wodurch dann die Funktion der Osteoblasten beeinträchtigt würde. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung stehen jedoch noch aus. Allerdings muss unterstrichen werden, dass dies nicht die ganze Erklärung sein kann, da in den Mäusen durch die Überexpression des TGF- β_2 in den Osteoblasten auch eine Erhöhung der Osteoklastenzahl und eine Aktivierung der Resorption festgestellt wurde, was bei den Osteoblasten-Fibronectin Knockout-Mäusen nicht der Fall war. Somit ist klar, dass die Fähigkeit des Fibronectins, auf den TGF- β -Gehalt einer Matrix Einfluss zu nehmen [170], einen Teil der über das Fibronectin vermittelten Wirkungen ausmachen könnte, der zusätzlich zu einer direkten Interaktion des Fibronectins von Bedeutung ist. Dies unterstreicht die Bedeutung des Fibronectins für die Matrix. Inwieweit sich die Fibronectin-Isoformen bezüglich der beschriebenen Eigenschaften unterscheiden ist zurzeit noch völlig unklar.

Das Fehlen des Osteoblasten-spezifischen Fibronectins hatte in den konditionellen Knockout-Mäusen der ColCre-Linie einen Effekt auf Osteoblasten gezeigt, obwohl die Menge des Fibronectins in der Knochenmatrix nicht reduziert war. Da das zirkulierende Fibronectin kontinuierlich vorhanden ist und der Effekt auf die Osteoblasten nicht in den Plasmafibronectin defizienten Mäusen auftrat, spricht dies dafür, dass sich jenes Fibronectin, das für eine regelgerechte Funktion der Osteoblasten notwendig ist, vom Plasmafibronectin unterscheidet. Es ist bereits gesichert, dass zumindest eine besondere Fibronectin-Isoform, das onkofötale Fibronectin, einen Effekt auf Osteoblasten ausüben kann. Unsere Experimente im Zusammenhang mit der Entstehung einer

hepatischen Osteodystrophie ergaben [51], dass als Ursache für das erhöhte Frakturrisiko von Patienten, die an primärer biliärer Leberzirrhose leiden, die vermehrte Produktion des onkofötalen Fibronektins der kranken Leber in Frage kommt. Durch *in vitro* und *in vivo* Experimente konnten wir zeigen, dass onkofötale Fibronektin die Funktion der Osteoblasten beeinträchtigt, und für das Knochenverlust bei diesen Patienten verantwortlich ist [51].

Unsere eigenen (noch unpublizierten) Untersuchungen ergaben, dass das Fibronektin der Osteoblasten nicht FDC-6 positiv ist, es sich also nicht um onkofötale Fibronektin handeln kann. Osteoblasten produzieren allerdings EDA- und EDB-haltiges Fibronektin [160], was wir ebenfalls durch eigene Experimente bestätigen konnten. Daher wird der Effekt auf die Osteoblasten in den konditionellen Knockouts der ColCre-Linie wahrscheinlich über die Domänen EDA und EDB vermittelt. Die Interaktion des Fibronektins mit Zellen geschieht oftmals über Integrine. Osteoblasten besitzen u. a. das Integrin $\alpha_4\beta_1$ [150], welches direkt an die EDA-Domäne des Fibronektins binden kann [25]. Zusätzlich vermag EDA aber auch die Bindung des Fibronektins an den Fibronektin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ zu verstärken [26], so dass auch auf diesem indirekten Weg eine Wirkung durch diese Domäne erzeugt werden kann. Außerdem können durch die spleißabhängige Anwesenheit der Module auch zuvor versteckte Bereiche in benachbarten Regionen des Fibronektin-Moleküls exponiert werden, wie es z. B. für EDB belegt ist [55]. Leider liegen bisher keine Erkenntnisse darüber vor, wie sich ein genereller Verlust der Domänen EDA oder EDB auf die Osteoblasten auswirkt, obwohl sowohl eine EDA als auch eine EDB Knockout-Maus existieren [245,246]. Vermutlich würde eine entsprechende Untersuchungen dieser beiden Mäuse, die Antwort auf die Frage liefern, welche der beiden Domänen hauptsächlich verantwortlich ist.

Für verschiedene Faktoren wurde gezeigt, dass sie die Differenzierung der Osteoblasten beeinflussen können und dabei auch *in vitro* einen Effekt haben, z. B. auf die Expression des Fibronektins durch die Osteoblasten. Dies scheint u. a. der Fall zu sein für Parathormon [247], Östrogen [247], Glukokortikoide [248-250], Calcitriol [251] und TGF- β [136]. Die An- oder Abwesenheit eines besonderen Fibronektins könnten die Reaktion der Osteoblasten auf osteogene Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren verändern. So wurde für Fibroblasten *in vitro* dargestellt, dass diese nur dann vermehrt auf PDGF (für engl. „platelet-derived growth factor“) reagieren, sofern sie ausreichend stark an Proteine der Extrazellulärmatrix (wie Fibronektin) angehaftet sind [252].

Es bleibt hervorzuheben, dass die meisten in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an kultivierten Zellen durchgeführt wurden. Der in der vorliegenden Arbeit geschilderte Effekt in den konditionellen Fibronektin Knockout-Mäusen auf die Osteoblasten hingegen ist *in vivo* eingetreten. Dadurch wird die genaue Analyse zwar aufgrund der komplexen Zusammenhänge in einem lebenden Organismus erschwert, die Zellen befanden sich jedoch in ihrer natürlichen Umgebung, daher kann es sich nicht um ein Artefakt handeln. Inwieweit die Wirkung des Osteoblasten-Fibronektins durch die Rolle der Matrix und in der Matrix vorhandene Moleküle, durch einen Ef-

fekt der Isoformen auf Rezeptoren der Osteoblasten (inklusive Integrine) oder durch die Modulation der Produktion verschiedener osteogener Faktoren verursacht wird bedarf noch einiger weiterer Erforschung, zumal es sich auch um ein Zusammenspiel mehrerer beteiligter Faktoren handeln könnte.

Während das Osteoblasten-Fibronectin die Funktion der Osteoblasten beeinflusst, scheint das Plasmafibronectin höchstens einen geringen Effekt auf die Knochenzellen zu haben. Die an den Knochen der Plasmafibronectin defizienten Mäuse der MxCre-Linie durchgeführte histomorphometrische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den konditionellen Knockouts und den Kontrollen. Es zeigten sich z. B. keine Hinweise auf eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten. Dies deckte sich jedoch mit den Erwartungen, da Osteoklasten über das RGD-Motiv an die Knochenoberfläche binden, wäre eine Steigerung der Aktivität durch einen verminderten Fibronectingehalt der Knochenmatrix unwahrscheinlich. Jedoch war auch die Verminderung der Osteoblastenzahlen nur signifikant solange die Zahl nicht zur Knochenoberfläche korrigiert wurde. Da eine Korrektur zur Knochenoberfläche jedoch unumgänglich ist, kann keine klare Aussage getroffen werden, dass die Osteoblasten in den Plasmafibronectin deletierten Mäusen vermindert sind und dies die Ursache für die geringere Knochendichte ist. Das Alter der Mäuse bei ihrer Tötung war 6 Monate. Sollte es sich bei dem Effekt, welcher der verminderten Knochendichte und Trabekelzahl zugrunde liegt, um einen kleinen, aber langfristigen Einfluss auf die Zahl oder Aktivität der Osteoblasten handeln, wäre eine Erfassung bei einer punktuellen Untersuchung wahrscheinlich nicht möglich bzw. nur durch eine Analyse sehr hoher Tierzahlen erfassbar.

In einem umgekehrten Versuchsansatz wurde das Plasmafibronectin nicht ausgeschaltet, sondern addiert. Insgesamt fünf verschiedene Experimente, in denen wildtypischen Mäusen über 10-15 Tage bis zu 3 mg Plasmafibronectin täglich verabreicht wurden führten zwar zu einer Erhöhung der absoluten Osteoblastenzahl, die aber nie eine statistische Signifikanz erreichte. Dies erzwingt jedoch nicht automatisch die Aussage, dass erhöhte Mengen zirkulierenden Plasmafibronectins keinen positiven Einfluss auf die Knochendichte haben können, da der Zeitraum eventuell zu kurz gewählt war, durch die begrenzte Verfügbarkeit des Proteins jedoch nicht bedeutend verlängert hätte werden können.

Zusammengefasst lässt sich festhalten: Sollte das Plasmafibronectin einen Effekt auf die Osteoblasten haben, dann ist dieser Effekt nur klein, insbesondere im Vergleich zu dem des Osteoblasten-spezifischen Fibronectins.

IV.1.5. Bedeutung des Fibronektins für die Knochenkomposition und die biomechanischen Eigenschaften

Die Infrarot-Spektroskopie ermöglicht eine Untersuchung der Mineralisierung des Knochens und stellt diese ins Verhältnis zum Proteingehalt der Matrix [253]. Im Gegensatz zu den Osteoblasten-Fibronectin defizienten Mäusen, bei denen die Infrarot-Spektroskopie keinen Unterschied im Vergleich mit den Kontrollen zeigte, ergaben die Daten der MxCre-Linie, dass in den konditionellen Knockouts auf einen Protein-Teil ein kleinerer Mineral-Teil kam als bei den Kontrollen (geringeres Verhältnis des Minerals zur Matrix). Da diese Methode eine Aussage über die Mineralisierung einer Fläche von nur $20 \mu\text{m}^2$ treffen kann, wird eine Beurteilung der Mineralisierung des Knochens möglich, die unabhängig von seiner dreidimensionalen Struktur ist. Mit anderen Worten kann also mehr über die eigentliche Zusammensetzung der Matrix erfahren werden. Eine geringere Mineralisierung könnte daher zumindest eine Teilerklärung für die geringere Knochendichte der konditionellen Knockout-Mäuse sein, da sich letztere auf der Ebene des gesamten Knochens bewegt. Besonders interessant ist, dass eine „Behandlung“ wildtypischer Mäuse mit Plasmafibronectin über den recht kurzen Zeitraum von 15 Tagen zu einer Erhöhung der Mineralisierung (im Verhältnis zur Matrix betrachtet) führte, die zwar keine statistische Signifikanz erreichte, aber die These unterstreicht, dass das Plasmafibronectin die Mineralisierung der Matrix beeinflusst. Zusätzlich zu dem Effekt auf den Mineralgehalt, wies die Infrarot-Spektroskopie auch auf eine signifikante leichte Veränderung des Minerals in den konditionellen Knockouts hin (größerer Anteil an saurem Phosphat). Dieser Effekt erscheint auch insbesondere deshalb von Bedeutung, da bei jenen wildtypischen Mäusen, die Plasmafibronectin erhalten hatten, das Gegenteil passierte, nämlich der Gehalt an saurem Phosphat signifikant verringert war. Das Plasmafibronectin bzw. dessen Fehlen könnte also einen Einfluss auf die Mineralkomposition des Knochens ausüben und der Fibronektin Gehalt der Knochenmatrix damit in einem direkten Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Minerals stehen.

Um herauszufinden, ob die Veränderungen, die bei der Infrarotmessung der Knochenproben der Plasmafibronectin-defizienten Mäusen ermittelt werden konnten, auch einen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens hatten, wurden die Proben einer Mikroindentation unterzogen. Im Gegensatz zum traditionellen drei Punkt Biegetest, bei dem ein isolierter Knochen (z. B. die Tibia) an beiden Enden aufliegt und dann von oben mit einem Gewicht belastet wird, spielen für die Mikroindentation weder die Knochenlänge, noch die Architektur (z. B. die Kortexdicke) eine Rolle. Stattdessen wird bei letzterer Methode ein definiertes Gewicht direkt auf eine kleine Knochenfläche eines Trabekels oder des Kortex appliziert und anschließend der dadurch entstandene Abdruck vermessen. Die Mikrohärtigkeit beschreibt also den Widerstand des Knochens gegen lokale Deformationen. Die Mikrohärtigkeitsmessung der Knochenproben der MxCre-Linie ergab eine gering, aber signifikant erhöhte Mikrohärtigkeit in den konditionellen Knockouts. Untersuchungen

der Mikrohärtigkeit in einem experimentellen Mausmodell für Osteogenese imperfecta (s. 1.2.5.2) zeigten auch eine signifikante Erhöhung der Härte, die jedoch mit einem erhöhten Mineralisierungsgrad einherging [254]. Die Autoren diskutieren, dass sich dieser erhöhte Mineralisierungsgrad mit der Methode des qBEI (für engl. „quantitative backscattered electron imaging“) ermitteln ließ, sich aber nicht im Veraschungsgewicht der Proben zeigte. Ein Anstieg der Mikrohärtigkeit ist entweder auf eine höhere Mineralisierung (wie bei Osteogenese imperfecta) oder auf Veränderungen der Eigenschaften der Matrixproteine zurückzuführen. Da die Infrarot-Spektroskopie für die Knochen der Plasmafibronektin defizienten Mäuse im Verhältnis zum Protein einen geringeren Mineralisierungsgrad ergab, lässt sich durch die erhöhte Mikrohärtigkeit auf eine Veränderung der Proteinmatrix in Abwesenheit des Plasmafibronektins schließen.

Die Bestimmungen des Kollagengehalts über Hydroxyprolin und die Errechnung des Mineralgehalts nach Veraschung der Knochenproben ergaben keine signifikanten Unterschiede. Diese Befunde stehen jedoch nicht in einem direkten Widerspruch, zumal es nicht möglich war, die beiden Untersuchungen miteinander ins Verhältnis zu setzen. Einer der Gründe aus denen dies nicht gemacht werden durfte ist, dass bei der Aufbereitung der Proben für die Hydroxyprolin-Bestimmung ein Teil jeder Probe durch die Handhabung verloren ging. Für die Messung an sich war dies kein Problem, da jeweils zum Pelletgewicht korrigiert wurde. Jedoch konnte dieses Pelletgewicht prozentual unterschiedlich stark von der ursprünglichen Probe abweichen, so dass eine Verrechnung mit den Ergebnissen der Veraschung unzulässig war. Es gibt nicht zwangsläufig einen Widerspruch dadurch, dass weder die Hydroxyprolin-Bestimmung noch die Veraschung signifikante Unterschiede zutage brachte, da die Variationen und damit die Fehler zwischen den Proben bei diesen beiden Methoden sicherlich deutlich größer sind als bei der sehr zuverlässigen spektroskopischen Analyse, die feinste Unterschiede zu detektieren vermag. Es bleibt zusätzlich hervorzuheben, dass die Hydroxyprolin-Bestimmung nur den Kollagengehalt misst, eine mögliche Kompensation des reduzierten Fibronektinanteils der Matrix z. B. durch andere Proteine als Kollagenen daher gar nicht erfasst werden könnte.

Eine aufschlussreiche Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe befasste sich gewissermaßen mit einer umgekehrten Fragestellung zum Effekt des Plasmafibronektins auf den Knochen [255]. Diese Gruppe konnte durch Injektionen von Parathormon (PTH) die im Blut zirkulierenden Mengen an Fibronektin steigern, sofern Östrogene anwesend waren (Aufhebung des Effektes durch Ovariectomie). Verfolgt man diesen Gedankengang weiter, nämlich dass durch Parathormon erzeugte stimulierende Effekte für den Knochenaufbau gesichert sind, so stellt sich die Frage, ob vermehrte Blutlevels des Parathormons auch zu einer Erhöhung des zirkulierenden Plasmafibronektins führen und dies vielleicht neben der direkten Wirkung des Parathormons auf die Knochenzellen ebenfalls förderlich für den Anstieg der Knochenmineralisierung sein könnte.

IV.1.6. Interpretation der Rolle des Fibronektins im Knochen

Interpretierend lässt sich durch die durchgeführten Experimente festhalten, dass Fibronektin für den Knochen in mehrererlei Hinsicht von Bedeutung ist.

Der Hauptteil des Fibronektins, das in der Knochenmatrix eingelagert ist, stammt nicht von den Osteoblasten. Zwei durchgeführte Experimente weisen darauf hin, dass das Fibronektin der Leber stattdessen als mögliche Quelle in Betracht kommt. Zum einen wurde bewiesen, dass Plasmafibronektin aus dem Blut in den Knochen gelangen kann und die Knochenmatrix zu infiltrieren vermag, zum anderen zeigte sich durch eine Ausschaltung des Plasmafibronektins in Mäusen eine Verringerung des Fibronektin Gehalts des Knochengewebes. Das Plasmafibronektin der Leber scheint für die strukturellen Eigenschaften des Knochens von Bedeutung sein, da dessen Fehlen verschiedene Auswirkungen auf die Knochenkomposition und dessen biomechanische Eigenschaften hat.

Die Rolle des Osteoblasten-Fibronektins hingegen betrifft nicht die Knochenstruktur, sondern die Knochenzellen. Die Ausschaltung des Fibronektins in Osteoblasten beeinflusst die Funktion dieser Zellen negativ, indem vermutlich die Differenzierung der Osteoblasten verlangsamt wird. Da das Osteoblasten-Fibronektin sich vom Plasmafibronektin unterscheidet, indem es die Domänen EDA und EDB enthält, lässt sich festhalten, dass jene Fibronektin-Isoform, die von den Osteoblasten produziert wird, vermutlich als eine Art autokriner Faktor fördernd auf die Funktion und Differenzierung der Zellen wirkt.

Zusätzlich können besondere Isoformen wie das onkofötale Fibronektin, das z. B. durch bestimmte Lebererkrankungen vermehrt ins Blut abgegeben wird, sogar einen negativen Effekt auf die Osteoblasten haben.

Die verschiedenen Isoformen des Fibronektins haben demnach unterschiedliche Auswirkungen auf den Knochen. Für alle Isoformen gemeinsam lässt sich die Aussage treffen, dass Fibronektin sowohl die Komposition und die Eigenschaften des Knochens beeinflusst als auch das Verhalten und die Funktion der Knochenzellen. Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf mögliche Therapien von Knochendefekten in der Humanmedizin auswirken könnten, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

IV.2. Die Rolle des Fibronektins bei der diabetischen Nephropathie

Über die durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Expansion des Mesangiums bei der diabetischen Nephropathie nicht nur durch eine vermehrte Fibronektin-Produktion der Mesangialzellen, sondern auch durch die Einlagerung des aus der Leber stammenden zirkulierenden Fibronektins verursacht wird. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das Plasmafibronektin aus dem Blut das Fortschreiten des Nierenschadens zu beschleunigen vermag.

IV.2.1. Herkunft des Fibronektins der Niere

Fibronektin kommt im Mesangium und der Basalmembran gesunder Glomeruli vor und ist in mehreren Erkrankungen des Glomerulus nachweislich erhöht [256-258]. Es wird vermutet, dass der Hauptteil dieses Fibronektins durch lokale Produktion der Mesangialzellen des Glomerulus zustande kommt [259]. Ein Experiment, in welchem aufgereinigtes humanes Plasmafibronektin in Mäuse injiziert wurde [260], zeigte jedoch, dass dieses sich in bestimmte Gewebe der Mäuse einzulagern vermochte. Zum Nachweis wurde ein Human-spezifisches nicht Maus-reaktives Antiserum gegen Fibronektin verwendet. Die Autoren wiesen das humane Plasmafibronektin u. a. in den Glomeruli der Niere nach. Eine Färbung gegen murines Fibronektin zeigte, dass das Muster des eingelagerten humanen Fibronektins mit dem der Maus identisch war, also von einem physiologischen Prozess ausgegangen werden musste. Das von uns durchgeführte Injektionsexperiment mit fluoreszenzgekoppeltem humanem Plasmafibronektin führte ebenfalls zu einem Signal in den Glomeruli der Niere. Da für dieses Experiment kein Nachweis durch Antikörper erforderlich war und die Kontrollmäuse, die den unkonjugierten Farbstoff erhalten hatten kein Signal zeigten, ist somit gesichert, dass Plasmafibronektin aus dem Blutkreislauf heraus in die Glomeruli gelangen und dort in die Mesangialmatrix eingelagert werden kann. Damit kommt Plasmafibronektin als mögliche Quelle für einen Teil des Fibronektins in den Glomeruli der Niere in Betracht.

Eine besondere Rolle des Fibronektins in den Glomeruli zeigt sich durch eine seltene Erkrankung. Die idiopathische Fibronektin Glomerulopathie ist eine vermutlich autosomal dominant vererbte Krankheit, deren Folgen u. a. eine Proteinurie sowie eine langsam abnehmende Nierenfunktion sind, so dass es letztlich zum Versagen der Nieren kommen kann [261]. Pathologisch lassen sich bei den Patienten in den Glomeruli erhebliche Ablagerungen des Mesangium nachweisen. Möglicherweise spielen Abnormalitäten im Metabolismus des Plasmafibronektins eine schädliche Rolle bei dieser Erkrankung. Für diese These spricht, dass die beiden Proteine Fibo-

nektin und Tenascin (ebenfalls ein Protein der Extrazellulärmatrix) zwar in mehreren Erkrankungen des Glomerulus lokal koexprimiert werden [262], jedoch bei der idiopathischen Fibronektin Glomerulopathie das Fibronektin in den Ablagerungen des Mesangiums nicht mit Tenascin kolo-kalisiert war [261]. Deswegen wurde von den Autoren vorgeschlagen, dass in dieser Erkrankung das Fibronektin aus dem Plasma heraus eingelagert wird. Auch die Tatsache, dass das Fibronektin dieser Ablagerungen nur wenig EDA enthielt [263,264], spricht dafür, dass es sich vermutlich eher um Plasmafibronektin als um zelluläres Fibronektin handelte [261]. Das von uns durchgeführte Injektions-Experiment ergab eine Überlagerung des Fibronektin-Signals mit einer Färbung gegen Laminin, obwohl das markierte Fibronektin nicht lokal produziert worden war, sondern die Glomeruli über die Blutzirkulation erreicht hatte.

Bei Patienten, die an schwerer Proteinurie leiden, ist eine Erhöhung des Plasmafibronektins im Blut nachweisbar [265]. Die Interpretation dieses Befundes ist eine Art Kompensationsversuch der Leber. Da Albumin den Hauptanteil der Proteine des Bluts ausmacht, bei einer Proteinurie aber verhältnismäßig viel des mittelgroßen Proteins (66-67 kDa) über den Urin verloren geht, erscheint es physiologisch sinnvoll die Synthese großer Proteine wie Fibronektin (500 kDa, s. I.1.1.1) heraufzuregulieren, um den kolloidosmotischen Druck aufrechtzuerhalten. Auch werden Fibronektin und Albumin von der Leber in einem festen Verhältnis zueinander produziert [1], so dass die Heraufregulation der Albumin-Produktion auch zu einer Steigerung der Fibronektin-Ausschüttung führt. Anhand unserer Daten ist wahrscheinlich, dass dadurch die Nierenerkrankung weiter vorangetrieben wird.

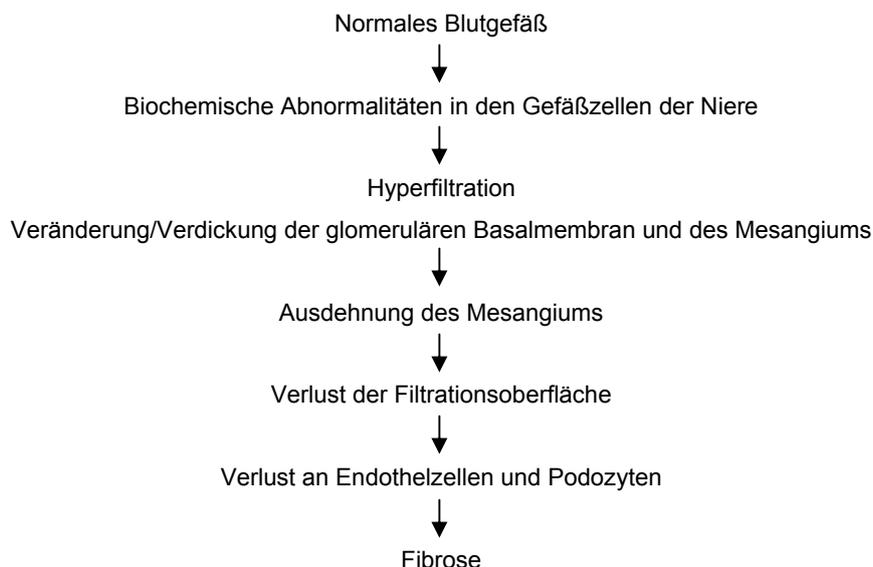


Abbildung IV.3: Schematische Darstellung der Entstehung der diabetischen Nephropathie. Diese Übersicht bezieht sich besonders auf die Entwicklung einer Glomerulosklerose im Zusammenhang mit einer diabetischen Nephropathie (Schema in Anlehnung an [183]).

IV.2.2. Folgen der Diabetes-Induktion

Um die Rolle des Plasmafibronektins bei der Entstehung einer diabetischen Nephropathie herauszuarbeiten und von der Bedeutung des lokal von den Mesangialzellen produzierten Fibronektins abzugrenzen, wurde in konditionellen Fibronektin Knockout-Mäusen ein Diabetes mellitus induziert. Die Versuchstiere stammten aus den Mauslinien MxCre und AlbCre. Die Ausschaltung des Fibronektin-Gens über den Alb-Promoter bewirkte eine spezifische Deletion des Plasmafibronektins. Die AlbCre-Linie schien daher bestens geeignet um den Effekt des Plasmafibronektin bei der Entstehung einer diabetischen Nephropathie zu untersuchen. Für den Mx-Promoter ist bekannt, dass er in Zellen des Glomerulus aktiviert wird [226]. Eigene Untersuchungen mit dem ROSA26 Reporter-Mausstamm bestätigten, dass Mx die Expression der Cre Rekombinase in den Mesangialzellen aktiviert. Demnach wird in den konditionellen Knockout-Mäusen der MxCre-Linie sowohl das Plasmafibronektin als auch das lokal von den Mesangialzellen produzierte Fibronektin ausgeschaltet. Die Induktion eines Diabetes mellitus in beiden Linien ermöglichte daher die Untersuchung der Rolle des Plasmafibronektins alleine sowie in Kombination mit dem lokal durch die Mesangialzellen produzierten Fibronektin bei der Entwicklung der Diabetes-bedingten Nierenerkrankung.

Die humane diabetische Nephropathie zeichnet sich u. a. durch eine Verdickung der Basalmembranen des Glomerulus sowie durch eine Ausdehnung der Mesangialmatrix mit vermehrter Proliferation der Mesangialzellen aus [266]. Nicht alle Kennzeichen der humanen diabetischen Nephropathie können in Mäusen durch Induktion einer Hyperglykämie erzeugt werden [267], insbesondere, da zwischen den in der Forschung verwendeten Inzuchtstämmen Unterschiede in der Ausprägung dieser Nierenerkrankung vorkommen [181]. In der Zwischenzeit (Jahr 2007) wurde ein Modell an CD-1 Mäusen vorgestellt, das (verglichen mit C57Bl/6-Mäusen) mehr typische Zeichen einer humanen diabetischen Nephropathie erzeugen kann [268]. Die Umstellung auf dieses Modell hätte jedoch 8-10 Rückkreuzungen auf einem CD-1-Hintergrund benötigt und eine Gesamtzeit von mindestens 96 bis 120 (12 mal 8 bis 10) Wochen in Anspruch genommen. In Anbetracht dessen, dass unsere Mäuse trotz des C57Bl/6-Hintergrunds eine Nephropathie entwickelten (z. B. eine Expansion des Mesangiums), erwies sich unsere Entscheidung diesen Extraschritt nicht durchzulaufen als richtig. Der Inzuchtstamm C57Bl/6 wird zwar als vergleichsweise resistent gegen renale Schädigungen betrachtet, dennoch konnten auch durch die Arbeit anderer Gruppen an Mäusen mit diesem Hintergrund bereits zahlreiche Erkenntnisse im Hinblick auf die diabetische Nephropathie gewonnen werden, die auch einen Einfluss auf die Humanmedizin nehmen könnten [269]. Da die diabetische Nephropathie eine Spätfolge des Diabetes mellitus ist, wird für das Mausmodell eine Haltung der Tiere unter Glykämie für 3-8 Monate empfohlen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experiment erfolgte eine Haltung der Tiere nach Manifestation eines Diabetes mellitus für 22 Wochen (ca. 5 Monate).

Der Erfolg der Ausschaltung des Plasmafibronektins in den konditionellen Knockout-Mäusen der MxCre- und der AlbCre-Linie wurde über einen Fibronektin-ELISA mit Blutproben sichergestellt. Der erreichte Ausschaltungsgrad in der MxCre-Linie (96%) war erwartungsgemäß signifikant besser als in der AlbCre-Linie (92%). Zusätzlich wurde durch eine quantitative Analyse von gegen Fibronektin gefärbten Nierenschnitten gezeigt, dass der Fibronektin Gehalt der Glomeruli der konditionellen Knockout-Mäuse der MxCre-Linie im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert war. Es darf also davon ausgegangen werden, dass die Ausschaltung des Fibronektins auch in den Mesangialzellen erfolgreich war.

Der HbA_{1c}-Wert beschreibt den Anteil der Erythrozyten, die nicht-enzymatisch glykiert sind und ist damit ein Marker für eine längerfristige rückblickende Beurteilung der Blutzuckerspiegel eines Patienten. Zur Messung des HbA_{1c}-Wertes der Mäuse wurde eine Affinitätschromatographie mit dem Micromat II (Bio-Rad) durchgeführt. Da humane Erythrozyten eine Lebensdauer von etwa 120 Tagen haben, sagt die Anzahl der glykierten roten Blutkörperchen in Prozent etwas über den Blutzuckerspiegel eines Menschen in den letzten 2-3 Monaten vor der Probennahme aus [270]. Der für den gesunden Menschen als Referenz betrachtete Bereich ist 4-6%. Die Lebenszeit der Erythrozyten in der Maus wird uneinheitlich als etwa 40-60 Tage beschrieben [271-274]. Bei Mäusen kann man daher davon ausgehen, dass der HbA_{1c}-Wert den Blutzuckerspiegel der letzten zwei Wochen reflektiert [275]. Es waren weder die mittleren Blutzuckerspiegel noch die HbA_{1c}-Werte nennenswert unterschiedlich zwischen den diabetischen konditionellen Knockout-Mäusen und den diabetischen Kontrollen der MxCre- und AlbCre-Linie. Daher kann sicher ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte bezüglich der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie auf einen unterschiedlich starken Ausprägungsgrad des Diabetes mellitus zurückgehen.

Der Fokus unserer bisherigen Untersuchungen lag vorwiegend auf der Ausdehnung der mesangialen Matrix, da diese besonders gut mit einer verminderten Nierenfunktion korreliert [276]. Die Expansion des Mesangiums korreliert ebenfalls negativ mit der Kapillarfläche, die für die Filtration des Primärharns zuständig ist [183]. Bei beiden verwendeten Mauslinien stellte sich heraus, dass durch die konditionelle Ausschaltung des Fibronektins die Ausdehnung des Mesangiums signifikant geringer war als in den ebenfalls diabetischen Kontrolltieren. Es ist zu betonen, dass der Unterschied bei den konditionellen Knockout-Mäusen der AlbCre-Linie verglichen mit ihren Kontrollen bei 29% lag. In der MxCre-Linie war der Unterschied mit 42% zwar noch deutlicher, die Differenz beider Werte lag jedoch lediglich bei 13%. Diese Ergebnisse stellen die Rolle des Plasmafibronektins in den Vordergrund. Zwar kann der erreichte Ausschaltungsgrad über den Mx-Promoter in den Mesangialzellen nicht absolut ermittelt werden und es ist daher nicht gesichert, ob die Produktion des lokalen Fibronektins mit einer ähnlichen Effizienz erreicht wurde wie die des Plasmafibronektins, dies hebt jedoch die Bedeutung des Plasmafibronektins nur noch stärker

heraus, da im Blut der konditionellen Knockout-Mäusen der MxCre-Linie noch weniger Plasmafibronektin vorhanden war als in der AlbCre-Linie.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die konditionellen Knockout-Mäuse eine geringere Sterberate zeigten als die diabetischen Kontrollen. Bei der MxCre-Linie starben 16%, bei der AlbCre-Linie 29% weniger konditionelle Knockouts als Kontrollen. Obwohl die Todesfälle der verschiedenen Tiere (insgesamt 44 Todesfälle bei den Diabetikern) sicherlich keine einheitlichen Ursachen hatten, spricht die Gesamtheit des Ergebnisses jedoch für einen Überlebensvorteil durch weniger Plasmafibronektin. Die Zusammenhänge sind dabei unklar, könnten aber durchaus darauf hinweisen, dass die Plasmafibronektin defizienten diabetischen Mäuse ein geringeres Risiko hatten an Folgeerkrankungen des Diabetes zu sterben. In der MxCre-Linie sind insgesamt mehr diabetische Tiere gestorben als in der AlbCre-Linie (MxCre 30 Tote = 59% vs. AlbCre 14 Tote = 34%). Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin begründet, dass die Tiere der AlbCre-Linie bei Induktion des Diabetes eine Woche älter (9 Wochen) waren im Vergleich zu denen der MxCre-Linie (8 Wochen). Dies ließ sich aus organisatorischen Gründen nicht vermeiden, da zur Generierung der Versuchstiergeneration mehr als 100 Verpaarungen nötig waren (es wurden nur männliche Tiere für das Experiment eingesetzt). Die Induktion eines Diabetes mellitus über Streptozotocin wird mit zunehmendem Alter der Tiere etwas besser vertragen. In Anbetracht der Länge des Experiments (22 Wochen mit Diabetes) sollte die Induktion des Diabetes aber auch nicht zu lange hinausgezögert werden (das Alter der Mäuse bei Tötung war 8 Monate).

IV.2.3. Interpretation der Rolle des Fibronektins in der diabetischen Nephropathie

Da das Fibronektin im Blut wenig EDA, EDB und oFN enthält [51], stellt sich die Frage, ob die Art des Fibronektins für die Expansion des Mesangiums in einer diabetischen Nephropathie ausschlaggebend ist. Eine Studie an Patienten mit Nierenerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen brachte Erkenntnisse über das Vorkommen des Fibronektins in der Niere [277]. In den gesunden Kontrollen konnte Fibronektin in den Glomeruli in der Mesangialmatrix und der interstiellen Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden. Dieses Fibronektin enthielt geringe Mengen EDA, jedoch kein EDB und kein onkofötale Fibronektin. Für Patienten mit Glomerulosklerose zeigte sich hingegen ein signifikant höherer Gehalt der mesangialen Matrix an Fibronektin insgesamt, EDA-positivem und EDB-positivem Fibronektin sowie an onkofötalem Fibronektin, was auf einen hohen Anteil an lokal produziertem zellulärem Fibronektin hindeutet. Durch eine weitere Studie an Patienten mit diabetischer Nephropathie stellte sich heraus, dass diese jedoch auch erhöhte Mengen EDB-positiven Fibronektins in ihrem Blut hatten [278]. Auch die Untersuchung

des Gehalts der EDA-positiven Fibronectin-Isoform im Blut diabetischer Patienten durch eine andere Gruppe ergab eine Erhöhung [54], dies wurde jedoch nicht im Hinblick auf eine mögliche Nierenerkrankung der Patienten analysiert.

Einige dieser Ergebnisse legen nahe, dass die verschiedenen Fibronectin-Isoformen für die Entstehung einer Glomerulosklerose unterschiedliche Rollen spielen könnten. Dies wird durch unsere Untersuchungen an der MxCre-Linie ebenfalls gestützt, da hier die Ausschaltung des Plasmafibronectins und des Fibronectins der Mesangialzellen zugleich die Ausdehnung des Mesangiums im Vergleich zu den Kontrollen beinahe halbierte. Da die Ausschaltung des Plasmafibronectins alleine in der AlbCre-Linie aber bereits eine Verminderung der Expansion der Mesangialmatrix um etwa ein Drittel bewirkte, scheinen die verschiedenen Isoformen des Fibronectins nicht die Hauptrolle zu spielen. Ob die diabetischen Kontrolltiere verglichen mit den nicht-diabetischen Kontrollen vermehrt EDA, EDB und onkofötales Fibronectin in ihrem Blut hatten, muss noch untersucht werden.

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, inwieweit die Menge des Fibronectins, das sich aus dem Blut heraus in den Glomeruli einlagerte, entscheidend war, ob erhöhte Mengen zirkulierender EDA- bzw. EDB-haltiger Isoformen eine Rolle spielten oder ob der Effekt dadurch zustande kam, dass das Plasmafibronectin besonders stark der nicht-enzymatischen Glykierung ausgesetzt war und dadurch in den diabetischen Kontrollmäusen die Expansion des Mesangiums vorangetrieben wurde.

IV.2.4. Ausblick

Es gibt eine riesige Menge an Publikationen, die sich mit der Rolle der Zellen des Glomerulus sowie den möglichen Einflüssen zahlreicher Zytokine bei der diabetischen Nephropathie beschäftigen. Den Matrixproteinen wird dabei häufig eine sekundäre Bedeutung zugeschrieben, indem das vermehrte Vorhandensein der Extrazellulärmatrix als eine Folge zellulärer Effekte betrachtet wird. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch *in vivo* an einem Mausmodell, dass das Matrixprotein Fibronectin selbst an der Expansion des Mesangiums beteiligt ist. Vermutlich ist die Erkrankung also eine Folge von Interaktionen zwischen den Zellen und der Matrix, wobei beide Vertreter das Fortschreiten des Prozesses vorantreiben können. Ein therapeutischer Nutzen dieser Untersuchung könnte darin bestehen, zumindest einen Teil des Effekts des Plasmafibronectins zu blockieren, um in Patienten, die an der diabetischen Nierenerkrankung leiden, das Fortschreiten der Nephropathie aufzuhalten (z. B. durch Antikörper oder Antagonisten). Dies wäre jedoch eine recht unspezifische Behandlung, die möglicherweise zu zahlreichen Nebeneffekten führen könnte. Daher sollte die Rolle des Fibronectins zukünftig noch genauer untersucht werden.

Fibronektine binden maßgeblich über Integrine an Zellen und die Mesangialzellen exprimieren nachweislich die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ [279-283]. Somit sind sie in der Lage mit Fibronektin zumindest über das RGD-Motiv zu interagieren. Um die Wirkung des Fibronektins besser verstehen zu können ist es daher wichtig, die Wechselwirkung zwischen dem Matrixprotein und den Zellen genauer zu untersuchen. Dazu steht uns für den nächsten Schritt ein weiteres Mausmodell zur Verfügung [284,285].

Bei dieser Mauslinie ist die RGD-Sequenz des Fibronektins durch eine nicht-funktionale RGE-Sequenz ausgetauscht worden [285]. Dieser Austausch ist in homozygot transgenen Tieren lethal. Daher wird diese Linie von uns heterozygot gehalten, es ist also nur eines der zwei Fibronektin-Allele mutiert. Durch Verkreuzungen mit Mäusen, deren Fibronektin-Gen gefloxt war, entstand jedoch eine Linie, in welcher das nicht-mutierte zweite Fibronektin-Allel über Cre ausgeschaltet werden kann. Besitzen diese Tiere zusätzlich das Cre-Gen unter der Kontrolle des Mx- (bzw. des Alb-Promoters), so könnten die Hepatozyten und die Mesangialzellen zwar noch Fibronektin produzieren, dessen RGD-Motiv wäre aber nicht mehr funktionell. Eine Induktion eines Diabetes mellitus nach einem Modell, das dem in der vorliegenden Arbeit entspricht, könnte die Rolle der RGD-Sequenz und somit der RGD-bindenden Integrine bei der Entstehung einer diabetischen Nephropathie näher charakterisieren.

Sollte es durch dieses Experimente gelingen, die Interaktionen zwischen dem Fibronektin und den Mesangialzellen weiter zu entschlüsseln und dabei sogar einen bestimmten Rezeptor auszumachen, über den der Hauptteil der Wirkung vermittelt wird, so hätte man eventuell ein Werkzeug in der Hand, das man sich für eine Behandlung diabetischer Patienten zunutze machen könnte, um beispielsweise die Entstehung oder das Fortschreiten einer Nephropathie zu bekämpfen.

V. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle des Fibronektins im Knochen sowie in der diabetischen Nephropathie.

Fibronectin im Knochen: Es war bekannt, dass Osteoblasten für ihre Differenzierung *in vitro* Fibronectin benötigen, dass Fibronectin für die Ausbildung einer Kollagenmatrix erforderlich ist und für die Matrixintegrität eine kontinuierliche Fibronectin-Versorgung gewährleistet sein muss. Um die Rolle des Fibronektins im Knochen, dessen Matrix zu 90% aus Kollagen besteht, näher zu untersuchen, wurde das Fibronectin der Osteoblasten spezifisch über das Cre/loxP-System in Mäusen ausgeschaltet. Dies führte zu einer erhöhten Anzahl an Osteoblasten, deren Fähigkeit die Matrix zu mineralisieren jedoch beeinträchtigt war. Dennoch zeigte sich kein Einfluss auf die Eigenschaften der Knochenmatrix. Insbesondere war der Fibronektin Gehalt nicht vermindert, entgegen der allgemeinen Annahme, dass die Osteoblasten die Produzenten des Fibronektins der Knochenmatrix seien. Im Gegensatz dazu stellte sich durch Untersuchungen an anderen genetisch veränderten Mäusen heraus, dass eine Ausschaltung des Plasmafibronektins im Blut zu einer deutlichen Verringerung des Fibronektin Gehalts des Knochens sowie zu einer Verminderung des Mineralgehalts bezogen auf die Proteinmenge führte. Auch die Komposition des Minerals war verändert. Da es jedoch keinen nennenswerten Effekt auf die Knochenzellen gab, lässt sich schlussfolgern, dass die Osteoblasten-spezifische Fibronectin-Isoform für eine regelgerechte Funktion der Osteoblasten notwendig ist, während das von der Leber produzierte Plasmafibronectin die Zusammensetzung der Knochenmatrix beeinflusst.

Fibronectin in der diabetischen Niere: Mit der diabetischen Nephropathie geht eine Ausdehnung des Mesangiums in den Glomeruli einher, die mit dem Ausmaß des Nierenschadens korreliert ist. Fibronectin ist ein Bestandteil dieses expandierten Mesangiums. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass injiziertes Fibronectin durch die Blutzirkulation in die Niere gelangt und in der Mesangialmatrix der Glomeruli eingelagert wird. Daher wurden in konditionellen Knockout-Mäusen das Plasmafibronectin bzw. das Fibronectin der Mesangialzellen und das Plasmafibronectin zugleich ausgeschaltet. In diesen Mäusen wurde ein Diabetes mellitus induziert und die Tiere für 22 Wochen mit Diabetes gehalten. Die Ausschaltung des Fibronektins hatte eine geringere Ausbreitung der Mesangialmatrix sowie eine geringere Mortalität der Tiere zur Folge. Interessanterweise schien das Plasmafibronectin alleine bereits grob ein Drittel der Ausdehnung des Mesangiums zu verursachen. Die kombinierte Ausschaltung von zirkulierendem und lokalem Fibronectin vermochte die Expansion der Mesangialmatrix sogar beinahe zu halbieren.

Zusammengefasst zeigten sich neue Rollen eines traditionellen Proteins der Extrazellulärmatrix in physiologischen und pathologischen Zuständen. Einige dieser Aspekte demonstrieren die große Bedeutung der Fibronectin-Produktion durch die Leber.

VI. Summary

This PhD thesis discusses the role of fibronectin in bone and in diabetic nephropathy.

Fibronectin in bone: *In vitro* experiments have shown that fibronectin is required for osteoblast differentiation, that its initial presence is required for collagen assembly to take place, and that its continuous presence is required for the integrity of the collagenous matrix. Bone matrix consists of 90% collagen. In order to elucidate the function of fibronectin in bone we first deleted fibronectin conditionally in the osteoblasts using the cre-loxP-system in genetically manipulated mice. This resulted in an increase in the number of osteoblasts, which were unable to mineralize the matrix adequately. The properties of the matrix, including fibronectin content in the matrix were not affected however. This was unexpected because it has always been assumed that fibronectin in the bone originates from the osteoblasts. In contrast, deletion of fibronectin in the circulation of genetically manipulated mice resulted in a clear decrease in the amount of fibronectin in the bone matrix. This was associated with a decrease in the mineralization of the matrix (adjusted to protein content). The mineral composition seemed to be affected too. However, there was no effect whatsoever on bone cells. In conclusion, fibronectin production by the osteoblasts is required for osteoblasts to function adequately, while fibronectin originating from the liver affects the composition of the bone matrix.

Fibronectin in the diabetic kidney: Diabetic nephropathy leads to the expansion of the mesangium in the glomeruli. This expansion correlates with the severity of kidney injury. Fibronectin is a component of the expanded mesangium. Preliminary data had shown that injected labelled fibronectin reaches the kidney through the blood stream, and becomes incorporated in the mesangial matrix in mice. Therefore fibronectin was deleted in the circulation in one line of genetically manipulated mice and in both the circulation and the mesangium in a second line of mice. Diabetes mellitus was induced, and mice were kept diabetic for 22 weeks. Deletion of fibronectin resulted in less mesangial expansion which was associated with a decrease in mortality. Interestingly, circulating fibronectin by itself seemed to account for a third of the mesangial expansion, while the deletion of both circulating and locally produced fibronectin led to a decrease in mesangial expansion by almost 50%.

In summary, new roles were ascribed to a traditional extra cellular matrix protein in both physiologic and pathologic states. Some of these roles point to the importance of the production of fibronectin by the liver.

VII. Literaturverzeichnis

1. Hynes RO (ed.): **Fibronectins**: Springer-Verlag, New York; 1990.
2. Mosher DF (ed.): **Biology of Extracellular Matrix: Fibronectin**: Academic Press, California; 1989.
3. **Tamkun JW, Hynes RO**: Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 1983, **258**(7):4641-4647.
4. **Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P, Sottrup-Jensen L, Magnusson S**: Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983, **80**(1):137-141.
5. **Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE**: Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983, **80**(11):3218-3222.
6. **Pankov R, Yamada KM**: Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 20):3861-3863.
7. **Vibe-Pedersen K, Kornblihtt AR, Baralle FE**: Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *The EMBO journal* 1984, **3**(11):2511-2516.
8. **Gutman A, Kornblihtt AR**: Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(20):7179-7182.
9. **Schwarzbauer JE, Spencer CS, Wilson CL**: Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants. *The Journal of cell biology* 1989, **109**(6 Pt 2):3445-3453.
10. **Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE**: Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *The EMBO journal* 1985, **4**(7):1755-1759.
11. **Mosesson MW, Chen AB, Huseby RM**: The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features. *Biochimica et biophysica acta* 1975, **386**(2):509-524.
12. **Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG, Spiro RG**: Comparative studies on amniotic fluid and plasma fibronectins. *The Biochemical journal* 1981, **193**(1):295-299.
13. **Olden K, Pratt RM, Yamada KM**: Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(7):3343-3347.
14. **Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S**: Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(40):37377-37381.
15. **Katagiri YU, Murakami M, Mori K, Iizuka J, Hara T, Tanaka K, Jia WY, Chambers AF, Uede T**: Non-RGD domains of osteopontin promote cell adhesion without involving alpha v integrins. *Journal of cellular biochemistry* 1996, **62**(1):123-131.
16. **Ruoslahti E, Pierschbacher MD**: Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* 1986, **44**(4):517-518.
17. **Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresch DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP**: Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(9):4916-4922.
18. **Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L**: Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 1997, **2**:d126-146.
19. **Aota S, Nomizu M, Yamada KM**: The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(40):24756-24761.
20. **Humphries MJ, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K, Yamada KM**: Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. *The Journal of cell biology* 1988, **106**(4):1289-1297.
21. **Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ**: The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(23):15075-15079.

22. **Mould AP, Wheldon LA, Komoriya A, Wayner EA, Yamada KM, Humphries MJ:** Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. *The Journal of biological chemistry* 1990, **265**(7):4020-4024.
23. **Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, Humphries MJ:** The CS5 peptide is a second site in the IIIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(6):3579-3585.
24. **Xia P, Culp LA:** Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain EDa (EIIIA) and its neighboring type III repeats: oncogene-dependent regulation. *Experimental cell research* 1994, **213**(1):253-265.
25. **Liao YF, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Sheppard D, Van De Water L:** The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(17):14467-14474.
26. **Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K:** Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *The Journal of cell biology* 1997, **139**(1):295-307.
27. **Manabe R, Oh-e N, Sekiguchi K:** Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(9):5919-5924.
28. **Woods A, Longley RL, Tumova S, Couchman JR:** Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics* 2000, **374**(1):66-72.
29. **Jalkanen S, Jalkanen M:** Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *The Journal of cell biology* 1992, **116**(3):817-825.
30. **Zetter BR, Martin GR:** Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978, **75**(5):2324-2328.
31. **Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH:** Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *The Journal of cell biology* 1988, **106**(4):1331-1348.
32. **Peters JH, Hynes RO:** Fibronectin isoform distribution in the mouse. I. The alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments show widespread codistribution in the developing mouse embryo. *Cell adhesion and communication* 1996, **4**(2):103-125.
33. **George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO:** Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development (Cambridge, England)* 1993, **119**(4):1079-1091.
34. **Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO:** Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn* 1996, **207**(2):145-156.
35. **Grinnell F, Billingham RE, Burgess L:** Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *The Journal of investigative dermatology* 1981, **76**(3):181-189.
36. **Ni H, Yuen PS, Papalia JM, Trevithick JE, Sakai T, Fassler R, Hynes RO, Wagner DD:** Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(5):2415-2419.
37. **Mosher DF:** Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *The Journal of biological chemistry* 1975, **250**(16):6614-6621.
38. **Grinnell F, Phan TV:** Deposition of fibronectin on material surfaces exposed to plasma: quantitative and biological studies. *Journal of cellular physiology* 1983, **116**(3):289-296.
39. **Takashima A, Billingham RE, Grinnell F:** Activation of rabbit keratinocyte fibronectin receptor function in vivo during wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 1986, **86**(5):585-590.
40. **Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R:** Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nature medicine* 2001, **7**(3):324-330.
41. **Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C et al:** Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994, **13**(4):1017-1030.

42. **Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E:** The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(13):6161-6165.
43. **Paul JI, Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Hynes RO:** Cell-type-specific fibronectin subunits generated by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 1986, **261**(26):12258-12265.
44. **Wilson CL, Schwarzbauer JE:** The alternatively spliced V region contributes to the differential incorporation of plasma and cellular fibronectins into fibrin clots. *The Journal of cell biology* 1992, **119**(4):923-933.
45. **Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell LE, Zardi L, Virtanen I:** Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *Journal of cell science* 1987, **88** (Pt 4):419-430.
46. **Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K:** Dereglulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(18):10331-10334.
47. **Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, Van de Water L:** Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *The American journal of pathology* 1993, **142**(3):793-801.
48. **Borsi L, Castellani P, Risso AM, Leprini A, Zardi L:** Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS letters* 1990, **261**(1):175-178.
49. **Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd:** The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(13):10229-10233.
50. **Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE:** Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *The EMBO journal* 1984, **3**(1):221-226.
51. **Kawelke N, Bentmann A, Hackl N, Hager HD, Feick P, Geursen A, Singer MV, Nakchbandi IA:** An Isoform of Fibronectin Mediates Bone Loss in Patients with Primary Biliary Cirrhosis by Suppressing Bone Formation. *J Bone Miner Res* 2008.
52. **Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, Koono M:** Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF-beta1. *International journal of cancer* 1999, **82**(3):449-458.
53. **Sato S, Kitade H, Hiramatsu Y, Kwon AH, Takahashi H, Sekiguchi K, Uehara M, Oda M, Yanagimoto Y, Miyashita K et al:** Increased extra domain-A containing fibronectin and hepatic dysfunction during septic response: an in vivo and in vitro study. *Shock (Augusta, Ga)* 2000, **13**(6):492-496.
54. **Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R:** Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes care* 2001, **24**(2):323-327.
55. **Carnemolla B, Leprini A, Allemanni G, Saginati M, Zardi L:** The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(34):24689-24692.
56. **Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D:** Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 1996, **429**(6):311-322.
57. **Magnuson VL, Young M, Schattenberg DG, Mancini MA, Chen DL, Steffensen B, Klebe RJ:** The alternative splicing of fibronectin pre-mRNA is altered during aging and in response to growth factors. *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(22):14654-14662.
58. **Barone MV, Henchcliffe C, Baralle FE, Paoletta G:** Cell type specific trans-acting factors are involved in alternative splicing of human fibronectin pre-mRNA. *The EMBO journal* 1989, **8**(4):1079-1085.
59. **Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO:** Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *The Journal of cell biology* 1989, **109**(2):903-914.
60. **Hashimoto-Uoshima M, Yan YZ, Schneider G, Aukhil I:** The alternatively spliced domains EIIIB and EIIIA of human fibronectin affect cell adhesion and spreading. *Journal of cell science* 1997, **110** (Pt 18):2271-2280.
61. **Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO:** Retroviral expression of alternatively spliced forms of rat fibronectin. *The Journal of cell biology* 1990, **110**(3):833-847.
62. **Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L:** The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *International journal of cancer* 1994, **59**(5):612-618.

63. **Berndorff D, Borkowski S, Sieger S, Rother A, Friebe M, Viti F, Hilger CS, Cyr JE, Dinkelborg LM:** Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(19 Pt 2):7053s-7063s.
64. **Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L et al:** Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2003, **9**(2):571-579.
65. **Matsuura H, Hakomori S:** The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**(19):6517-6521.
66. **Matsuura H, Takio K, Titani K, Greene T, Levery SB, Salyan ME, Hakomori S:** The oncofetal structure of human fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6. Unique structural requirement for the antigenic specificity provided by a glycosylhexapeptide. *The Journal of biological chemistry* 1988, **263**(7):3314-3322.
67. **Matsuura H, Greene T, Hakomori S:** An alpha-N-acetylgalactosaminylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(18):10472-10476.
68. **Krusius T, Fukuda M, Dell A, Ruoslahti E:** Structure of the carbohydrate units of human amniotic fluid fibronectin. *The Journal of biological chemistry* 1985, **260**(7):4110-4116.
69. **Dunn PA, Feinberg RF:** Oncofetal fibronectin: new insight into the physiology of implantation and labor. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1996, **25**(9):753-757.
70. **Revah A, Hannah ME, Sue AQAK:** Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth: an overview. *American journal of perinatology* 1998, **15**(11):613-621.
71. **Cooke AM:** Osteoporosis. *Lancet* 1955, **268**(6870):877-882; contd.
72. **Arnett T:** Regulation of bone cell function by acid-base balance. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2003, **62**(2):511-520.
73. **Hadjidakis DJ, Androulakis, II:** Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, **1092**:385-396.
74. **Quelch KJ, Melick RA, Bingham PJ, Mercuri SM:** Chemical composition of human bone. *Archives of oral biology* 1983, **28**(8):665-674.
75. **Robey PG, Boskey AL:** Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone. In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ASBMR, Washington, D. C. 2006, **6**:12-19.
76. **Robey PG, Boskey AL:** The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds.) Osteoporosis. Academic Press, San Diego. 1996:95-183.
77. **Brodsky B, Persikov AV:** Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry* 2005, **70**:301-339.
78. **Kypreos KE, Birk D, Trinkaus-Randall V, Hartmann DJ, Sonenshein GE:** Type V collagen regulates the assembly of collagen fibrils in cultures of bovine vascular smooth muscle cells. *Journal of cellular biochemistry* 2000, **80**(1):146-155.
79. **Eppell SJ, Tong W, Katz JL, Kuhn L, Glimcher MJ:** Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy. *J Orthop Res* 2001, **19**(6):1027-1034.
80. **Landis WJ:** The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 1995, **16**(5):533-544.
81. **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG:** Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2001, **19**(3):180-192.
82. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M et al:** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, **418**(6893):41-49.
83. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 1999, **284**(5411):143-147.
84. **Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE:** Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 1999, **74**(4):616-627.
85. **Aubin JE, Lian JB, Stein GS:** Bone Formation: Maturation and Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells. In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ASBMR, Washington, D. C. 2006, **6**:20-29.
86. **Ducy P, Schinke T, Karsenty G:** The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science (New York, NY)* 2000, **289**(5484):1501-1504.

87. **Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C et al:** Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996, **382**(6590):448-452.
88. **Weinreb M, Shinar D, Rodan GA:** Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 1990, **5**(8):831-842.
89. **Evans JF, Yeh JK, Aloia JF:** Osteoblast-like cells of the hypophysectomized rat: a model of aberrant osteoblast development. *American journal of physiology* 2000, **278**(5):E832-838.
90. **Stein GS, Lian JB:** Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews* 1993, **14**(4):424-442.
91. **Ruffoni D, Fratzi P, Roschger P, Klaushofer K, Weinkamer R:** The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. *Bone* 2007, **40**(5):1308-1319.
92. **Akkus O, Polyakova-Akkus A, Adar F, Schaffler MB:** Aging of microstructural compartments in human compact bone. *J Bone Miner Res* 2003, **18**(6):1012-1019.
93. **Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC:** Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(10):1492-1501.
94. **Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE:** Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006, **235**(1):176-190.
95. **Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH:** Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon—a proposal. *Journal of biomechanics* 2003, **36**(10):1453-1459.
96. **Turner CH, Robling AG, Duncan RL, Burr DB:** Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcified tissue international* 2002, **70**(6):435-442.
97. **Bonewald LF:** Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell metabolism* 2007, **5**(6):410-411.
98. **Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K:** Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism* 2007, **5**(6):464-475.
99. **Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS:** The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 1998, **13**(8):1243-1250.
100. **Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB:** Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 2002, **17**(5):907-914.
101. **Heaney RP:** Is the paradigm shifting? *Bone* 2003, **33**(4):457-465.
102. **Parfitt AM:** What is bone mineralization? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003, **88**(10):5043.
103. **Teitelbaum SL:** Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, NY)* 2000, **289**(5484):1504-1508.
104. **Inui T, Ishibashi O, Inaoka T, Origane Y, Kumegawa M, Kokubo T, Yamamura T:** Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(13):8109-8112.
105. **Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi H, Hakeda Y, Kumegawa M:** Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(21):15006-15009.
106. **Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L:** Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy research and technique* 2003, **61**(6):504-513.
107. **Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S:** Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *Journal of chromatography* 2002, **781**(1-2):345-358.
108. **Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K:** High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *The Journal of cell biology* 1994, **124**(6):1091-1102.
109. **Davies J, Warwick J, Totty N, Philp R, Helfrich M, Horton M:** The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *The Journal of cell biology* 1989, **109**(4 Pt 1):1817-1826.
110. **Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A:** Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991, **64**(4):693-702.
111. **Ross FP:** Osteoclast Biology and Bone Resorption. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. ASBMR, Washington, D. C. 2006, **6**:30-35.
112. **Boyce BF, Xing L:** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy* 2007, **9 Suppl 1**:S1.

113. **Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I et al:** Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(7):3540-3545.
114. **Hodge JM, Kirkland MA, Nicholson GC:** Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 2007, **102**(3):759-768.
115. **Karsenty G, Wagner EF:** Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell* 2002, **2**(4):389-406.
116. **Pixley FJ, Stanley ER:** CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology* 2004, **14**(11):628-638.
117. **Jerosch J, Bader A, Uhr G:** Knochen. Curasan Taschenatlas Spezial. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2002.
118. **Roodman GD:** Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology* 1999, **27**(8):1229-1241.
119. **Teitelbaum SL, Ross FP:** Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews* 2003, **4**(8):638-649.
120. **Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ:** Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental cell research* 1988, **175**(2):266-276.
121. **Turner RT, Sibonga JD:** Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health* 2001, **25**(4):276-281.
122. **Manolagas SC:** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews* 2000, **21**(2):115-137.
123. **Hillam RA, Skerry TM:** Inhibition of bone resorption and stimulation of formation by mechanical loading of the modeling rat ulna in vivo. *J Bone Miner Res* 1995, **10**(5):683-689.
124. **Bikle DD, Halloran BP:** The response of bone to unloading. *Journal of bone and mineral metabolism* 1999, **17**(4):233-244.
125. **Hillsley MV, Frangos JA:** Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnology and bioengineering* 1994, **43**(7):573-581.
126. **Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ:** Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(14):9576-9588.
127. **Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG:** Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials* 2007, **13**:1-10.
128. **Bianco P, Gehron Robey P:** Marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(12):1663-1668.
129. **Mainil-Varlet P:** Bone pathology in experimental osteoporosis: A review. *Journal of Orthopaedic Science* 1997, **2**:185-190.
130. **Nunamaker DM:** Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research* 1998(355 Suppl):S56-65.
131. **Kilborn SH, Trudel G, Uthoff H:** Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science* 2002, **41**(5):21-26.
132. **Judex S, Donahue LR, Rubin C:** Genetic predisposition to low bone mass is paralleled by an enhanced sensitivity to signals anabolic to the skeleton. *Faseb J* 2002, **16**(10):1280-1282.
133. **Holick MF:** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition* 2004, **80**(6 Suppl):1678S-1688S.
134. **Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R:** Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocrine reviews* 1993, **14**(6):690-709.
135. **Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R:** Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(12):8836-8840.
136. **Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB:** TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *Journal of cellular physiology* 1994, **160**(2):323-335.
137. **Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W:** Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine reviews* 2005, **26**(6):743-774.

138. **Seibel MJ**: Biochemical markers of bone metabolism in the assessment of osteoporosis: useful or not? *Journal of endocrinological investigation* 2003, **26**(5):464-471.
139. **Rizzoli R, Poser J, Burgi U**: Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism: clinical and experimental* 1986, **35**(1):71-74.
140. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *Southern medical journal* 2001, **94**(6):569-573.
141. **Kannus P, Palvanen M, Niemi S, Parkkari J, Jarvinen M**: Epidemiology of osteoporotic pelvic fractures in elderly people in Finland: sharp increase in 1970-1997 and alarming projections for the new millennium. *Osteoporos Int* 2000, **11**(5):443-448.
142. **Lips P**: Epidemiology and predictors of fractures associated with osteoporosis. *The American journal of medicine* 1997, **103**(2A):3S-8S; discussion 8S-11S.
143. **Zuckerman JD**: Hip fracture. *The New England journal of medicine* 1996, **334**(23):1519-1525.
144. **Leonard MB, Shults J, Elliott DM, Stallings VA, Zemel BS**: Interpretation of whole body dual energy X-ray absorptiometry measures in children: comparison with peripheral quantitative computed tomography. *Bone* 2004, **34**(6):1044-1052.
145. **Burr DB**: Osteoporosis and fracture risk: bone matrix quality. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2002, **2**(6):525-526.
146. **Isaia G, Di Stefano M, Roggia C, Ardisson P, Rosina F**: Bone disorders in cholestatic liver diseases. *Forum (Genoa, Italy)* 1998, **8**(1):28-38.
147. **Byers PH**: Brittle bones - fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 1990, **6**(9):293-300.
148. **Moursi AM, Globus RK, Damsky CH**: Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *Journal of cell science* 1997, **110** (Pt 18):2187-2196.
149. **Clover J, Dodds RA, Gowen M**: Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *Journal of cell science* 1992, **103** (Pt 1):267-271.
150. **Grzesik WJ, Robey PG**: Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994, **9**(4):487-496.
151. **Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R**: Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 1993, **8**(5):527-533.
152. **Hultenby K, Reinholt FP, Heinegard D**: Distribution of integrin subunits on rat metaphyseal osteoclasts and osteoblasts. *European journal of cell biology* 1993, **62**(1):86-93.
153. **Moyano JV, Carnemolla B, Dominguez-Jimenez C, Garcia-Gila M, Albar JP, Sanchez-Aparicio P, Leprini A, Querze G, Zardi L, Garcia-Pardo A**: Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(40):24832-24836.
154. **Weiss RE, Reddi AH**: Role of fibronectin in collagenous matrix-induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo. *Experimental cell research* 1981, **133**(2):247-254.
155. **Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, Globus RK**: Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *Journal of cell science* 1996, **109** (Pt 6):1369-1380.
156. **Globus RK, Doty SB, Lull JC, Holmuhamedov E, Humphries MJ, Damsky CH**: Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *Journal of cell science* 1998, **111** (Pt 10):1385-1393.
157. **Weiss RE, Reddi AH**: Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. *The Journal of cell biology* 1981, **88**(3):630-636.
158. **Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT**: Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(33):30177-30182.
159. **Carter DH, Sloan P, Aaron JE**: Immunolocalization of collagen types I and III, tenascin, and fibronectin in intramembranous bone. *J Histochem Cytochem* 1991, **39**(5):599-606.
160. **Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Rosenhahn J, Exner U, Battmann A, Schnettler R, Kosmehl H**: Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone. *Bone* 2004, **35**(6):1334-1345.
161. **Engvall E, Ruoslahti E**: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *International journal of cancer* 1977, **20**(1):1-5.
162. **Leikina E, Merts MV, Kuznetsova N, Leikin S**: Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(3):1314-1318.

163. **McDonald JA, Kelley DG, Broekelmann TJ:** Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *The Journal of cell biology* 1982, **92**(2):485-492.
164. **Mosher DF, Schad PE:** Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *The Journal of clinical investigation* 1979, **64**(3):781-787.
165. **Li S, Van Den Diepstraten C, D'Souza SJ, Chan BM, Pickering JG:** Vascular smooth muscle cells orchestrate the assembly of type I collagen via alpha2beta1 integrin, RhoA, and fibronectin polymerization. *The American journal of pathology* 2003, **163**(3):1045-1056.
166. **Dzamba BJ, Wu H, Jaenisch R, Peters DM:** Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. *The Journal of cell biology* 1993, **121**(5):1165-1172.
167. **Chernousov MA, Stahl RC, Carey DJ:** Schwann cells use a novel collagen-dependent mechanism for fibronectin fibril assembly. *Journal of cell science* 1998, **111 (Pt 18)**:2763-2777.
168. **Furcht LT, Smith D, Wendelschafer-Crabb G, Mosher DF, Foidart JM:** Fibronectin presence in native collagen fibrils of human fibroblasts: immunoperoxidase and immunoferritin localization. *J Histochem Cytochem* 1980, **28**(12):1319-1333.
169. **Sottile J, Hocking DC:** Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell* 2002, **13**(10):3546-3559.
170. **Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, Humphries MJ, Kielty CM:** Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(19):18871-18880.
171. **Takahara H, Shirato I, Asanuma K, Yamashita M, Takeda Y, Tomino Y:** Tensin is expressed in glomerular mesangial cells and is related to their attachment to surrounding extracellular matrix. *J Histochem Cytochem* 2004, **52**(5):683-691.
172. **Courtoy PJ, Kanwar YS, Hynes RO, Farquhar MG:** Fibronectin localization in the rat glomerulus. *The Journal of cell biology* 1980, **87**(3 Pt 1):691-696.
173. **Courtoy PJ, Timpl R, Farquhar MG:** Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem* 1982, **30**(9):874-886.
174. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2003, **26 Suppl 1**:S5-20.
175. **Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW:** Nephropathy in diabetes. *Diabetes care* 2004, **27 Suppl 1**:S79-83.
176. USRDS: the United States Renal Data System. *Am J Kidney Dis* 2003, **42**(6 Suppl 5):1-230.
177. **Alsaad KO, Herzenberg AM:** Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. *Journal of clinical pathology* 2007, **60**(1):18-26.
178. **Ziyadeh FN, Goldfarb S:** The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney international* 1991, **39**(3):464-475.
179. Friedman EA (ed.): **Diabetic Nephropathy: Impact of Comorbidity:** Current Medicine, Inc., Philadelphia; 1999.
180. **Olbricht CJ, Geissinger B:** Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats: role of proteolytic lysosomal enzymes. *Kidney international* 1992, **41**(4):966-972.
181. **Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K:** Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(1):27-45.
182. **Dolan V, Hensey C, Brady HR:** Diabetic nephropathy: renal development gone awry? *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2003, **18**(2):75-84.
183. **Kahn CR, Weir G:** Joslin's Diabetes Mellitus. Lea & Febiger, Philadelphia. 1994, **13**.
184. **Lee CS, Mauer SM, Brown DM, Sutherland DE, Michael AF, Najarian JS:** Renal transplantation in diabetes mellitus in rats. *The Journal of experimental medicine* 1974, **139**(4):793-800.
185. **Mauer SM, Steffes MW, Sutherland DE, Najarian S, Michael AF, Brown DM:** Studies of the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation. *Diabetes* 1975, **24**(3):280-285.
186. **Rasch R:** Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. The mesangial regions. *Diabetologia* 1979, **17**(4):243-248.
187. **Rasch R:** Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. *Diabetologia* 1979, **16**(5):319-324.
188. **Rasch R:** Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Kidney size and glomerular volume. *Diabetologia* 1979, **16**(2):125-128.

189. **Mauer SM, Goetz FC, McHugh LE, Sutherland DE, Barbosa J, Najarian JS, Steffes MW:** Long-term study of normal kidneys transplanted into patients with type I diabetes. *Diabetes* 1989, **38**(4):516-523.
190. **Brownlee M, Pongor S, Cerami A:** Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen. Role in the in situ formation of immune complexes. *The Journal of experimental medicine* 1983, **158**(5):1739-1744.
191. **Brownlee M, Vlassara H, Cerami A:** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of internal medicine* 1984, **101**(4):527-537.
192. **Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, Cooper ME:** The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *Faseb J* 2003, **17**(12):1762-1764.
193. **Cohen MP, Saini R, Klepser H, Vasanthi LG:** Fibronectin binding to glomerular basement membrane is altered in diabetes. *Diabetes* 1987, **36**(6):758-763.
194. **Cohen MP, Wu VY, Cohen JA:** Glycated albumin stimulates fibronectin and collagen IV production by glomerular endothelial cells under normoglycemic conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 1997, **239**(1):91-94.
195. **Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M:** Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews* 2003, **83**(1):253-307.
196. **Pawluczyk IZ, Harris KP:** Cytokine interactions promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney international* 1998, **54**(1):62-70.
197. **Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Glass WF, 2nd, Kreisberg JI:** High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *The American journal of pathology* 1990, **136**(6):1339-1348.
198. **Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL:** Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation* 1997, **100**(1):115-126.
199. **Araki S, Ng DP, Krolewski B, Wyrwicz L, Rogus JJ, Canani L, Makita Y, Haneda M, Warram JH, Krolewski AS:** Identification of a common risk haplotype for diabetic nephropathy at the protein kinase C-beta1 (PRKCB1) gene locus. *J Am Soc Nephrol* 2003, **14**(8):2015-2024.
200. **Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC:** Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 2000, **49**(4):655-661.
201. **Ishida T, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R:** Stretch-induced overproduction of fibronectin in mesangial cells is mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase. *Diabetes* 1999, **48**(3):595-602.
202. **Cortes P, Zhao X, Riser BL, Narins RG:** Role of glomerular mechanical strain in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney international* 1997, **51**(1):57-68.
203. **Shui HA, Ka SM, Lin JC, Lee JH, Jin JS, Lin YF, Sheu LF, Chen A:** Fibronectin in blood invokes the development of focal segmental glomerulosclerosis in mouse model. *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(7):1794-1802.
204. **Francis SE, Goh KL, Hoidalva-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D, Hynes RO:** Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002, **22**(6):927-933.
205. **Yang JT, Rayburn H, Hynes RO:** Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development (Cambridge, England)* 1993, **119**(4):1093-1105.
206. **Nagy A:** Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000, **26**(2):99-109.
207. **Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K:** Inducible gene targeting in mice. *Science (New York, NY)* 1995, **269**(5229):1427-1429.
208. **Postic C, Magnuson MA:** DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis* 2000, **26**(2):149-150.
209. **Soriano P:** Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* 1999, **21**(1):70-71.
210. **Schmidt A, Tief K, Foletti A, Hunziker A, Penna D, Hummler E, Beermann F:** lacZ transgenic mice to monitor gene expression in embryo and adult. *Brain research* 1998, **3**(1):54-60.

211. **Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G:** Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 2002, **224**(2):245-251.
212. **Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B:** Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *The Journal of cell biology* 1995, **129**(5):1421-1432.
213. **Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA:** Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(1):305-315.
214. **Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL, Palmiter RD:** An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes & development* 1987, **1**(3):268-276.
215. **Leiter EH:** Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(2):630-634.
216. **Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, Corat MA, Zeier M, Blessing E, Oh J et al:** Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nature medicine* 2007, **13**(11):1349-1358.
217. **Kanetsuna Y, Takahashi K, Nagata M, Gannon MA, Breyer MD, Harris RC, Takahashi T:** Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *The American journal of pathology* 2007, **170**(5):1473-1484.
218. **Carpenter TO, Moltz KC, Ellis B, Andreoli M, McCarthy TL, Centrella M, Bryan D, Gundberg CM:** Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and Hyp mice. *Endocrinology* 1998, **139**(1):35-43.
219. **Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR:** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987, **2**(6):595-610.
220. **Stegemann H:** [Microdetermination of hydroxyproline with chloramine-T and p-dimethylaminobenzaldehyde.]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 1958, **311**(1-3):41-45.
221. **Chung DJ, Castro CH, Watkins M, Stains JP, Chung MY, Szejnfeld VL, Willecke K, Theis M, Civitelli R:** Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 20):4187-4198.
222. **Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohshiro K, Yamamoto T:** Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell and tissue research* 2001, **304**(3):339-349.
223. **Buniatian G, Traub P, Albinus M, Beckers G, Buchmann A, Gebhardt R, Osswald H:** The immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein in mesangial cells and podocytes of the glomeruli of rat kidney in vivo and in culture. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 1998, **90**(1):53-61.
224. **Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T, Ohno T:** The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001, **12**(7):1401-1409.
225. **Eklom P, Miettinen M, Rapola J, Foidart JM:** Demonstration of laminin, a basement membrane glycoprotein, in routinely processed formalin-fixed human tissues. *Histochemistry* 1982, **75**(3):301-307.
226. **Schneider A, Zhang Y, Guan Y, Davis LS, Breyer MD:** Differential, inducible gene targeting in renal epithelia, vascular endothelium, and viscera of Mx1Cre mice. *American journal of physiology* 2003, **284**(2):F411-417.
227. **Elayat AA, el-Naggar MM, Tahir M:** An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *Journal of anatomy* 1995, **186** (Pt 3):629-637.
228. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001, **414**(6865):799-806.
229. **Schena FP, Gesualdo L:** Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005, **16** Suppl 1:S30-33.
230. **Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A et al:** Osteoblast-specific knockout of the insulin-like

- growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(46):44005-44012.
231. **Liu F, Woitge HW, Braut A, Kronenberg MS, Lichtler AC, Mina M, Kream BE:** Expression and activity of osteoblast-targeted Cre recombinase transgenes in murine skeletal tissues. *The International journal of developmental biology* 2004, **48**(7):645-653.
232. **Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC, Rowe DW:** Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res* 2001, **16**(7):1228-1236.
233. **Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, Braut A, Bellizzi J, Mina M, Rowe DW:** Histological analysis of GFP expression in murine bone. *J Histochem Cytochem* 2005, **53**(5):593-602.
234. **Bilic-Curcic I, Kronenberg M, Jiang X, Bellizzi J, Mina M, Marijanovic I, Gardiner EM, Rowe DW:** Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz. *Genesis* 2005, **43**(2):87-98.
235. **Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW:** Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone* 2004, **35**(1):74-82.
236. **Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME:** Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcified tissue international* 1986, **38**(3):143-154.
237. **Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi M, Weissmann C:** Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Molecular and cellular biology* 1988, **8**(8):3065-3079.
238. **Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG:** Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Molecular and cellular biology* 1986, **6**(12):4770-4774.
239. **Weiss RE, Reddi AH:** Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**(4):2074-2078.
240. **Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM:** Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *J Bone Miner Res* 2003, **18**(9):1657-1663.
241. **Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J:** Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2004, **41**(3):233-264.
242. **Dallas SL:** Dynamics of bone extracellular matrix assembly and mineralization. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2006, **6**(4):370-371.
243. **Chen Q, Zhao J, Dallas MR, Fässler R, Peters DM, Dallas SL:** Fibronectin plays a role in osteoblast differentiation which may be mediated via regulation of BMP activity. *J Bone Miner Res* 2006, **21**(S1):s13.
244. **Erlebacher A, Derynck R:** Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *The Journal of cell biology* 1996, **132**(1-2):195-210.
245. **Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y, Manabe R, Mizuno-Horikawa Y, Sato M, Kuriyama K, Yasui N, Sekiguchi K:** Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer research* 2002, **62**(19):5603-5610.
246. **Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE:** Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *The Journal of cell biology* 2003, **162**(1):149-160.
247. **Eielson C, Kaplan D, Mitnick MA, Paliwal I, Insogna K:** Estrogen modulates parathyroid hormone-induced fibronectin production in human and rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1994, **135**(4):1639-1644.
248. **Gronowicz GA, DeRome ME, McCarthy MB:** Glucocorticoids inhibit fibronectin synthesis and messenger ribonucleic acid levels in cultured fetal rat parietal bones. *Endocrinology* 1991, **128**(2):1107-1114.
249. **Gronowicz GA, McCarthy MB:** Glucocorticoids inhibit the attachment of osteoblasts to bone extracellular matrix proteins and decrease beta 1-integrin levels. *Endocrinology* 1995, **136**(2):598-608.
250. **Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB:** Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *Journal of cellular biochemistry* 1992, **50**(4):425-440.
251. **Franceschi RT, Linson CJ, Peter TC, Romano PR:** Regulation of cellular adhesion and fibronectin synthesis by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *The Journal of biological chemistry* 1987, **262**(9):4165-4171.

252. **Schwartz MA, Lechene C:** Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the Na⁺/H⁺ antiporter by platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(13):6138-6141.
253. **Carden A, Morris MD:** Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of biomedical optics* 2000, **5**(3):259-268.
254. **Grabner B, Landis WJ, Roschger P, Rinnerthaler S, Peterlik H, Klaushofer K, Fratzl P:** Age- and genotype-dependence of bone material properties in the osteogenesis imperfecta murine model (oim). *Bone* 2001, **29**(5):453-457.
255. **Sun BH, Mitnick M, Eielson C, Yao GQ, Paliwal I, Insogna K:** Parathyroid hormone increases circulating levels of fibronectin in vivo: modulating effect of ovariectomy. *Endocrinology* 1997, **138**(9):3918-3924.
256. **Altunkova I, Minkova V, Belovezhov N:** Role of fibronectin in immune glomerulonephritis. *Nephron* 1993, **63**(4):438-444.
257. **Buyukbabani N, Droz D:** Distribution of the extracellular matrix components in human glomerular lesions. *The Journal of pathology* 1994, **172**(2):199-207.
258. **Oomura A, Nakamura T, Arakawa M, Ooshima A, Isemura M:** Alterations in the extracellular matrix components in human glomerular diseases. *Virchows Archiv* 1989, **415**(2):151-159.
259. **Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E:** Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney international* 1990, **37**(2):689-695.
260. **Oh E, Pierschbacher M, Ruoslahti E:** Deposition of plasma fibronectin in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, **78**(5):3218-3221.
261. **Strom EH, Banfi G, Krapf R, Abt AB, Mazzucco G, Monga G, Gloor F, Neuweiler J, Riess R, Stosiek P et al:** Glomerulopathy associated with predominant fibronectin deposits: a newly recognized hereditary disease. *Kidney international* 1995, **48**(1):163-170.
262. **Assad L, Schwartz MM, Virtanen I, Gould VE:** Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993, **63**(5):307-316.
263. **Borsi L, Carnemolla B, Castellani P, Rosellini C, Vecchio D, Allemanni G, Chang SE, Taylor-Papadimitriou J, Pande H, Zardi L:** Monoclonal antibodies in the analysis of fibronectin isoforms generated by alternative splicing of mRNA precursors in normal and transformed human cells. *The Journal of cell biology* 1987, **104**(3):595-600.
264. **Mazzucco G, Maran E, Rollino C, Monga G:** Glomerulonephritis with organized deposits: a mesangiopathic, not immune complex-mediated disease? A pathologic study of two cases in the same family. *Human pathology* 1992, **23**(1):63-68.
265. **Cosio FG, Bakaletz AP:** Abnormal plasma fibronectin levels in patients with proteinuria. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1984, **104**(6):867-872.
266. **Mauer SM, Lane P, Hattori M, Fioretto P, Steffes MW:** Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus and type I membranoproliferative glomerulonephritis in humans. *J Am Soc Nephrol* 1992, **2**(10 Suppl):S181-184.
267. **Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, Coffman TM, Fogo A, Harris RC, Heilig CW, Sharma K:** Diabetic nephropathy: of mice and men. *Advances in chronic kidney disease* 2005, **12**(2):128-145.
268. **Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R:** Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* 2007, **56**(7):1825-1833.
269. **Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ:** Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. *Nephron* 2006, **104**(2):e57-62.
270. **Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan DM, Peterson CM:** Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes care* 2004, **27** Suppl 1:S91-93.
271. **Dubuc PU, Scott BK, Peterson CM:** Sex differences in glycosylated hemoglobin in diabetic and non-diabetic C57BL/6 mice. *Diabetes research and clinical practice* 1993, **21**(2-3):95-101.
272. **Khandelwal S, Saxena RK:** Age-dependent increase in green autofluorescence of blood erythrocytes. *Journal of biosciences* 2007, **32**(6):1139-1145.
273. **Singer JA, Jennings LK, Jackson CW, Dockter ME, Morrison M, Walker WS:** Erythrocyte homeostasis: antibody-mediated recognition of the senescent state by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(15):5498-5501.
274. **Van Putten LM:** The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo. *Blood* 1958, **13**(8):789-794.

275. **Dan K, Fujita H, Seto Y, Kato R:** Relation between stable glycated hemoglobin A1C and plasma glucose levels in diabetes-model mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 1997, **46**(2):135-140.
276. **Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC:** Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *The Journal of clinical investigation* 1984, **74**(4):1143-1155.
277. **Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ, de Heer E, Bruijn JA:** Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *The Journal of pathology* 2001, **193**(2):256-262.
278. **Khan ZA, Farhangkhoei H, Mahon JL, Bere L, Gonder JR, Chan BM, Uniyal S, Chakrabarti S:** Endothelins: regulators of extracellular matrix protein production in diabetes. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2006, **231**(6):1022-1029.
279. **Bieritz B, Spessotto P, Colombatti A, Jahn A, Prols F, Hartner A:** Role of alpha8 integrin in mesangial cell adhesion, migration, and proliferation. *Kidney international* 2003, **64**(1):119-127.
280. **Fischer EG:** Glomerular mesangial cell adhesion to fibrinogen is mediated by alphavbeta3 integrin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2004, **82**(5):597-601.
281. **Kagami S, Kondo S:** Beta1-integrins and glomerular injury. *J Med Invest* 2004, **51**(1-2):1-13.
282. **Ruiz-Torres MP, Lopez-Ongil S, Griera M, Diez-Marques ML, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D:** The accumulation of extracellular matrix in the kidney: consequences on cellular function. *Journal of nephrology* 2005, **18**(3):334-340.
283. **Yoon S, Gingras D, Bendayan M:** Alterations of vitronectin and its receptor alpha(v) integrin in the rat renal glomerular wall during diabetes. *Am J Kidney Dis* 2001, **38**(6):1298-1306.
284. **Brakebusch C, Grose R, Quondamatteo F, Ramirez A, Jorcano JL, Pirro A, Svensson M, Herken R, Sasaki T, Timpl R et al:** Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *The EMBO journal* 2000, **19**(15):3990-4003.
285. **Takahashi S, Leiss M, Moser M, Ohashi T, Kitao T, Heckmann D, Pfeifer A, Kessler H, Takagi J, Erickson HP et al:** The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *The Journal of cell biology* 2007, **178**(1):167-178.

VIII. Anhang

VIII.1.1.1. Abkürzungscode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

VIII.1.1.2. Abkürzungscode der Nukleotide

A = Adenin T = Thymin G = Guanin C = Cytosin

VIII.1.1.3. Genetischer Standardcode

Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure
TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys
TTC	Phe	TCC	Ser	TAC	Tyr	TGC	Cys
TTA	Leu	TCA	Ser	TAA	Stop	TGA	Stop
TTG	Leu	TCG	Ser	TAG	Stop	TGG	Trp
CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg
CTC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CTA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CTG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser
ATC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
ATA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
ATG	Met / Start	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly
GTC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GTA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GTG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

VIII.1.1.4. Histomorphometrie nach der ASBMR Nomenklatur

Verwendete Einheiten und Formeln bei der histomorphometrischen Analyse [219].

BV	„bone volume“	
BS	„bone surface“	
OV	„osteoid volume“	
OS	„osteoid surface“	
O.Th	„osteoid thickness“	
N.Ob	„osteoblast number“	
N.Oc	„osteoclast number“	
dLS	„double labeled surface“	
sLS	„single labeled surface“	
Ir.L.Th	„inter label thickness“	
Ir.L.t	„inter label time“	
MS	„mineralizing surface“	$dLS+sLS/2$
MAR	„mineral apposition rate“	$Ir.L.Th/Ir.L.t$
Aj.AR	„adjusted apposition rate“	$MAR*MS/OS$
BFR	„bone formation rate“	$MAR*MS$
Mlt	„mineralization lag time“	$O.Th/Aj. AR$

Lebenslauf*

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Danksagungen*

*personenbezogene Angaben sind aus Datenschutzgründen aus dieser elektronischen Version entfernt worden

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den

Anke Bentmann

Isoform of Fibronectin Mediates Bone Loss in Patients With Primary Biliary Cirrhosis by Suppressing Bone Formation

Nina Kawelke,^{1,2,3} Anke Bentmann,^{1,2,3} Norman Hackl,² Hans-Dieter Hager,⁴ Peter Feick,⁵ Anne Geursen,⁵ Manfred V Singer,⁵ and Inaam A Nakchbandi^{2,3}

ABSTRACT: Osteoporosis is a major cause of morbidity and decreased quality of life in patients with chronic cholestatic liver disease. It is established that this osteoporosis results from decreased bone formation, but the mechanisms for the interaction between liver and bone remain elusive. The aim of this study was to test the hypothesis that an increase in the production of cellular fibronectins during liver disease may result in decreased osteoblast-mediated mineralization and thus explain the decrease in bone formation. We performed a prospective cross-sectional study in patients with primary biliary cirrhosis and matched controls, followed by experiments on human and mouse osteoblasts in culture and injections in mice *in vivo*. In patients with primary biliary cirrhosis, the oncofetal domain of fibronectin correlated significantly with the decrease in osteocalcin, a marker of bone formation ($r = -0.57, p < 0.05$). *In vitro*, amniotic fluid fibronectin (aFN) containing mainly the oncofetal domain and EIIIA domain resulted in decreased osteoblast-mediated mineralization in human osteoblasts (69% decrease at 100 $\mu\text{g/ml}$; $p < 0.01$) and mouse osteoblasts (71% decrease; $p < 0.05$). Removing the EIIIA domain from aFN similarly suppressed mineralization by osteoblasts (78% decrease; $p < 0.05$). Injection of labeled aFN in mice showed that it infiltrates the bone, and its administration over 10 days resulted in decreased trabecular BMD (17% drop; $p < 0.05$), mineralizing surface (30% drop; $p < 0.005$), and number of osteoblasts (45% drop; $p < 0.05$). Increased production of a fibronectin isoform containing the oncofetal domain and its release in the circulation in patients with primary biliary cirrhosis is at least partially responsible for the decrease in bone formation seen in these patients. This establishes that a molecule that has thus far been viewed as an extracellular matrix protein exerts hormone-like actions.

J Bone Miner Res 2008;23:1278–1286. Published online on March 17, 2008; doi: 10.1359/JBMR.080313

Key words: primary biliary cirrhosis, fibronectin, osteoblast, bone loss, bone formation

INTRODUCTION

CHRONIC LIVER DISEASE can severely affect bone formation resulting in a disease entity called hepatic osteodystrophy. This is a clinically important problem, because patients affected with a chronic liver disease experience a 2-fold increase in fractures, resulting in considerable morbidity.^(1–4)

The pathogenesis of hepatic osteodystrophy is still unknown. Although the liver plays an essential role in the conversion of vitamin D to 25(OH)D, several studies^(5,6) showed normal 25(OH)D levels in patients with chronic cholestatic liver disease (without cirrhosis). In addition, 25(OH)D substitution failed to show a significant improvement in BMD in these patients.⁽⁶⁾ Bilirubin has also been suggested as a mediator of bone injury in liver disease.⁽⁷⁾ However, because patients with congenital enzyme defects associated with bilirubin elevations do not show extensive bone disease, the role of bilirubin seems to be rather limited.⁽⁷⁾

Other potential mediators/contributors of hepatic osteodystrophy include secondary hyperparathyroidism (whose role is limited to patients with vitamin D deficiency^(5,8)), increased bone resorption (which is most likely caused by the postmenopausal status of many of the affected patients and to hypogonadism in men^(9,10)), and IGF-I (which is diminished in advanced liver disease, but whose role is probably limited^(11,12)).

Bone histomorphometry studies have shown that the diminished BMD associated with chronic cholestatic liver disease results from decreased bone formation. An additional finding in clinical studies is a decrease in circulating blood levels of osteocalcin, a marker of bone formation.^(8,13,14) Altered serum levels of most liver proteins, however, fail to correlate with the severity of the hepatic osteodystrophy.^(3,10)

Plasma fibronectin (pFN) is produced by the liver,⁽¹⁵⁾ and patients with liver disease exhibit altered fibronectin (FN) production.^(16,17) FNs are made up of a large number of isoforms defined by the presence or absence of one or more of three alternatively spliced domains (extradomain-

The authors state that they have no conflicts of interest.

¹These authors contributed equally to this work; ²Max-Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany; ³Institute for Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁴Institute for Human Genetics, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁵Department of Medicine II, University of Heidelberg at Mannheim, Mannheim, Germany.

A, EIIIA; extradomain-B, EIIIB; and the variable domain [also called type III connecting-strand or IIICS]). pFN itself is a dimeric FN that lacks both the EIIIA and EIIIB domains and contains the IIICS domain in only one of its two chains.⁽¹⁸⁾ The stellate cells (also known as the fat-storing cells or Ito cells), which produce most of the extracellular matrix in the liver, do not produce FN under physiological conditions. When the stellate cells are exposed to the cytotoxic carbon tetrachloride (CCl₄) in vitro, however, these cells induce the production of FN containing the variable region as well as the EIIIA and EIIIB domains.⁽¹⁹⁾ Some of the FN produced by the activated stellate cells is glycosylated on a threonine residue (residue 33 of the variable region) and was termed oncofetal fibronectin (oFN) by Matsuura et al.⁽²⁰⁾

FN is critical for the differentiation of osteoblasts in vitro.^(21,22) Inhibiting the interaction between FN and its receptor(s) on the osteoblast with polyclonal FN antibodies resulted in diminished mineralization by the osteoblasts in the nodule formation assay.⁽²¹⁾ Furthermore, work by Chen et al.⁽²³⁾ has also shown the importance of FN in mineralization by osteoblasts because fibroblasts lacking FN could be differentiated to osteoblasts, but these cells failed to mineralize unless FN was added. The effect of the isoforms of FN on the differentiation of or mineralization by osteoblasts is unknown.

A relationship between FN isoforms and hepatic osteodystrophy has not been examined. To begin to address this question, we conducted a prospective cross-sectional study in humans followed by in vitro experiments on osteoblasts and in vivo experiments in mice. Our aim was to determine whether an increase in the production of FN isoforms in patients with primary biliary cirrhosis (PBC) could explain the decrease in bone formation seen in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Patients with PBC were enrolled. Because of a possible role of bilirubin in suppressing osteoblasts in vitro,⁽⁷⁾ only patients with normal bilirubin levels were enrolled. All 19 patients contacted agreed to participate. Alpha-feto protein levels were found to be normal. After enrollment, two vitamin D-deficient patients were excluded. Patients were matched with controls. The study was approved by the Ethics Committee II of The University of Heidelberg at Mannheim. All subjects gave informed, written consent.

Measurements

Alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltransferase, total bilirubin, and albumin were measured in our clinical laboratory. 25(OH)D and 1,25(OH)₂D were measured in a commercial laboratory (Limbach, Germany).⁽²⁴⁾ Intact PTH(1-84) was measured by immunoradiometric assay (IRMA; Nichols). Human osteocalcin was measured by two-antibody radioimmunoassay (RIA; Nordic Biosciences). Procollagen N-terminal peptide (PINP) was measured by RIA (Orion). Crosslaps (C-telopeptide of

type-I collagen [CTX]) were measured by RIA (Osteometer). N-telopeptide of type-I collagen (NTX) was measured by ELISA (Ostex).

FN assays were performed using ELISA. Commercial kits used in the original patients were human pFN (Biomedical Technologies) and oFN (Adeza). oFN in amniotic fluid FN (aFN) and in mice, mouse-pFN, EIIIA,⁽²⁵⁾ and EIIIB were measured by ELISA as described for EIIIA.⁽²⁵⁾ The antibodies used were FDC-6 (purified from HB-9018; ATCC), anti-human FN and FN-3E2 (Sigma), and BC1 (Antisoma). In our laboratory, the intra-assay and inter-assay CVs were 8% and 10% for human pFN, 12.5% and 10.6% for mouse pFN, 12% and 10.3% for oFN, 11.9% and 6.4% for EIIIA, and 6.3% and 10% for EIIIB, respectively. Human pFN standard was isolated from outdated human plasma, and FNs from amniotic fluid from midterm pregnancy were isolated as described.⁽²⁶⁾ The three isoforms used to establish standards were purified using the appropriate antibodies coupled to columns. aFN lacking EIIIA was made by applying aFN to an IST-9 column (to bind EIIIA), collecting the flow-through, and repeating the procedure three times.

Studies in cultured cells

Human osteoblasts (Biowhittaker/Cambrex) were cultured in osteoblast growth medium not containing antibiotics. Newborn mouse osteoblasts were isolated from calvariae subjected to serial digestions in 0.1% collagenase-NB4 (Serva) and 0.2% dispase (Gibco). Cells from digestions 2–4 were cultured in α -MEM with 10% fibronectin-depleted FCS containing 50 IU/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. Proliferation was quantified using a colorimetric assay (Roche) after 24 h of treatment. Once confluent, mineralization was induced with 5 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid, and 200 ng/ml hydrocortisone-21-hemisuccinate (human cells) or 10 nM dexamethasone (mouse cells). Mineralization inducers and either aFN or pFN were added with each medium change every 2–3 days. Nodules stained with von Kossa⁽²¹⁾ after 14–16 days were quantified using ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Measurements were reproducible between two observers in three wells. Mouse osteocalcin in conditioned media and cell lysates was measured using ELISA (Biomedical Technologies). Cell layers were lysed in 0.1 M glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, and 0.1% Triton-X. ALP assay was performed by a colorimetric method using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate and *p*-nitrophenol as standard as described except for the use of ZnCl₂ in the substrate solution.⁽²⁷⁾ Results were adjusted to total protein (BCA-kit; Pierce). RT-PCR was performed as described.⁽²⁸⁾ The osteocalcin primers used were 5'-AAGCAGGAGGGCAATAAGGT, 3'-AGCTGCTGTGACATCCATAC. GAPDH was used as a control. All samples were collected at the end of the experiments.

Studies in mice

One milligram of aFN was labeled with Oyster-500 on 3 days (days 1–3; Denovo-Biolabels) and injected intraperitoneally in 11- to 12-wk-old CD1 male mice (Charles

TABLE 1. CLINICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUP

Characteristic	Normal range	Patients	Controls	p
Age (yr)		55 ± 3	55 ± 3	0.96
Sex (female, male)		15 F, 2 M	15 F, 2 M	
BMI (kg/m ²)		24.5 ± 1.1	23.7 ± 1.0	0.61
Years since menopause		6 ± 2	6 ± 2	0.93
S-calcium (mM)	2.10–2.55	2.28 ± 0.02	2.29 ± 0.02	0.73
PTH (pg/liter)	10–65	35 ± 3	38 ± 2	0.47
25(OH)D ₃ (ng/ml)	30–70	30 ± 3	29 ± 3	0.70
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/ml)	35–80	40 ± 1	43 ± 2	0.24
ALAT (U/liter)	F 5–19 M 5–23	32 ± 5	15 ± 1	<0.01
ASAT (U/liter)	F 5–15 M 5–18	22 ± 3	13 ± 0.4	<0.01
Albumin (g/liter)	35–52	35.8 ± 0.9	41.2 ± 0.6	<0.001
ALP (U/liter)	F <160 M <180	340 ± 75	115 ± 6	<0.01
γ-GT (U/liter)	F 4–18 M 6–26	71 ± 13	9 ± 1	<0.001
Bilirubin (mg/dl)	0.20–1.40	0.52 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.12

Results are expressed as mean ± SE.

F, female; M, male; BMI, body mass index; ALAT, alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyltransferase.

River). On day 0, 30 mg/kg alizarin-complexone (Fluka) was administered. On day 5, bones were fixed in 70% ethanol, embedded in polymethylmethacrylate, and photographed in the Nikon Imaging Center (University of Heidelberg). Pictures were processed using ImageJ. To determine the effect of aFN injection on bone, five 12-wk-old CD1 male mice were injected daily with 1 mg aFN intraperitoneally. Ten controls received 0.9% NaCl. On days 1 and 7, calcein (30 mg/kg; Sigma) was injected. The experiment was repeated in C57BL/6 mice. pQCT of the distal femur was performed with XCT Research SA (StraTec Medizintechnik). Trabecular BMD was measured at 9% of the bone length below the growth plate using peel-mode 20. Unstained 3-μm sections of the proximal tibia were used for dynamic histomorphometry and Masson-Goldner-stained sections for static histomorphometry. Histomorphometric analysis was performed according to the standards set forth by the ASBMR.⁽²⁹⁾ The following parameters were examined: single and double labeled surface (sLS, dLS), distance between labels, mineralizing surface (MS = dLS + ½sLS, mm), mineral apposition rate (MAR = distance between labels/7 days, μm/d), bone formation rate (BFR = [MS × MAR]/BS × 365/1000, mm/yr), bone surface (BS, mm), osteoid surface (OS, mm), osteoblast number (Ob.N.), osteoclast surface (Oc.S., mm), osteoclast number (Oc.N.), and osteoid thickness (O.Th., μm). Secondary parameters were BV/TV (%), OS/BS (%), MS/BS (%), Ob.N./BS (number/mm), Oc.N./BS (number/mm), Ob.S./Ob.N. (μm), Oc.S./Oc.N. (μm), Oc.S./BS (%), adjusted apposition rate (Aj.AR = MAR × MS/OS; μm/d), and mineralization lag time (Mlt = O.Th./Aj.AR, days). Measurements were performed by a person blinded to the treatments. The studies in mice were performed in compliance with the principles of care and use of animals and were approved by the animal protection committee of the University of Heidelberg.

Statistical analyses

SPSS was used (version 15.0). Comparisons were performed using Student's *t*-test or Wilcoxon test as appropriate.

Bivariate correlations were assessed using Pearson's *r*. Results are expressed as mean ± SE.

RESULTS

Clinical and biochemical characteristics of the study group

The clinical and biochemical characteristics of the study group are shown in Table 1. Seventeen patients with PBC were included. The mean duration of disease since diagnosis was 8 ± 2 yr, with a range of 1–26 yr since diagnosis. Using the Mayo prognosis model for PBC patients,⁽³⁰⁾ the 5-yr survival rate was estimated at 89 ± 4%, suggesting a good prognosis and increasing the clinical relevance of our findings. There were no significant differences between patients and controls. Biochemical markers of hepatic injury were abnormal in the patients. As shown in Table 1, albumin levels were significantly lower in the patients compared with the controls, even though the mean was still within the normal range in both groups.

Markers of bone turnover

As shown in Table 2, none of the markers were significantly different between patients and controls. There was only a tendency toward lower values of markers of bone formation (lower osteocalcin and PINP) in the patients and a tendency for higher values of S-CTX and S-NTX (both markers of bone resorption). The use of collagen-related markers of bone turnover is, however, of limited use in patients with PBC because they seem to reflect the severity of liver fibrosis rather than bone turnover.⁽³¹⁾

Fibronectin isoform profiles in the study group and relationship to markers of bone formation

Both FN containing the oncofetal domain and FN containing the EIIIA domain were significantly higher in the patients, but the FN containing the EIIIB domain was not

TABLE 2. CIRCULATING LEVELS OF MARKERS OF BONE TURNOVER

Substance	Normal range	Patients	Controls	<i>p</i>
Osteocalcin (pg/ml)	F 4.9–30.5 M 9.5–48.3	20.3 ± 2.1	23.8 ± 2.4	0.28
PINP (μg/liter)	F 19–84 M 20–76	40 ± 3	45 ± 5	0.47
S-CTX (ng/ml)	F 0.45 (0.13–0.72) M 0.29 (0.28–0.62)	0.66 ± 0.26	0.44 ± 0.06	0.42
S-NTX (nM BCE)	F 7.7–19.3 M 8.1–24.8	12.2 ± 1.1	12.0 ± 0.8	0.77

Results are expressed as means ± SE.

F, female; M, males; PINP, procollagen N-terminal peptide; S-CTX, serum cross-laps; S-NTX, serum N-telopeptide of type-I collagen.

statistically different between both groups, even though a trend for a higher value in the patients was seen ($p = 0.08$; Table 3).

Circulating levels of oFN correlated significantly with the decline in osteocalcin in the blood in the whole group ($r = -0.42$, $p < 0.05$) and in the patients ($r = -0.57$, $p < 0.05$; Fig. 1), but not in the control subjects. In other words, at the same time the diseased liver produces more oFN, there is a concomitant decrease in osteocalcin. oFN correlated with PINP in only the patients ($r = -0.42$, $p < 0.05$). Neither EIIIA nor EIIIB correlated with osteocalcin or PINP, suggesting that only oFN contributes to the decreased osteocalcin and PINP levels in the patients.

Amniotic fluid fibronectin infiltrates the bone

To test whether fibronectin known to contain oFN and EIIIA can be transferred from the circulation into the bones and affect bone formation there, we labeled 1 mg aFN using Oyster-500 fluorescent dye and injected it in mice on 3 consecutive days. On the fifth day, the mouse was killed. The bone showed infiltration by the dye (Fig. 2A), which was not limited to areas of new bone formation, because pretreating with alizarin complexone (which causes accumulation of dye at sites of new mineralization) showed a different staining pattern (Fig. 2B).

Characterization of amniotic fluid fibronectin

To characterize the effect of oFN in vitro and in vivo, we sought to obtain large amounts of oFN. FN was isolated from amniotic fluid and from supernatant of Huh-7 cells (Hepatoma cell line).^(20,32) The supernatant from cell culture failed to provide adequate amounts (1 mg FN/liter), whereas amniotic fluid provided 20 mg/liter. aFN contained 26% EIIIA FN, 7% EIIIB FN, and 61% FN recognized by the FDC-6 antibody (oFN). Fifty percent of the oFN also contained the EIIIA domain. Attempts at purification of aFN to yield only oFN lacking EIIIA and EIIIB resulted in loss of large amounts of oFN (>90% in two attempts), without complete removal of EIIIB because of the poor binding to the antibody recognizing EIIIB. Because of the lack of a significant increase in EIIIB in patients, in the absence of any correlation with either osteocalcin or PINP in patients, and to proceed with the experiments below, we used aFN and aFN lacking EIIIA.

Amniotic fluid fibronectin inhibits mineralization by osteoblasts

We next sought to establish a causal relationship between oFN and osteoblast function. aFN in increasing concentra-

tions added to osteoblasts in mineralizing media resulted in a decrease in the area of nodules formed, as evidenced by von Kossa staining at all doses used, with significant inhibition already detected at the lowest dose (10 μg/ml; $n = 5$; $p < 0.05$) and maximal inhibition at 100 μg/ml ($p < 0.01$), resulting in suppression of mineralization by 69% ($n = 5$, $p < 0.01$; Fig. 3A).

Experiments were repeated in mouse osteoblasts starting at lower doses (0, 2, 5, 10, 25, 50, and 100 μg/ml). Similarly to human osteoblasts, aFN in increasing doses resulted in a decrease in mineralization already at a dose of 5 μg/ml ($p < 0.05$), with maximal inhibition at 100 μg/ml (71% decrease; $p < 0.05$), whereas plasma fibronectin failed to induce a similar change ($p =$ not significant; Figs. 3B and 3C). Osteocalcin mRNA expression decreased markedly in response to increasing doses of aFN but not in response to pFN (Fig. 3D). In parallel, osteocalcin in the supernatant decreased from 48.0 ± 5.5 to 2.7 ± 0.9 ng/ml in response to aFN ($p < 0.05$) but not in response to pFN (57.0 ± 10.8 versus 43.8 ± 8.6 , $p =$ not significant), suggesting a concomitant effect of aFN on mineralization by and differentiation of the osteoblasts (Fig. 3E). Osteocalcin levels in the supernatant showed a significant decrease between 2 and 5 μg/ml of added aFN ($p < 0.05$). Cell-expressed ALP levels also diminished in response to aFN (93% decrease; $p < 0.05$) but not in response to pFN ($p =$ not significant; Fig. 3F). Similarly to aFN, aFN lacking EIIIA was able to inhibit mineralization (78% decrease in mineralization at 100 μg/ml; $p < 0.05$; Fig. 3G). No negative effect of aFN on the proliferation of osteoblasts could be detected by BrdU incorporation at all doses tested in the presence or absence of EIIIA (100 μg/ml: 0.89 ± 0.13-fold induction for aFN and 1.02 ± 0.07-fold induction for aFN lacking EIIIA; $p =$ not significant).

aFN administered intraperitoneally causes bone loss that is caused by decreased bone formation and not increased bone resorption

Mice were injected with 1 mg aFN/mouse/d for 10 days. Circulating levels of oFN 24 h after the last injection were 40% higher compared with controls (control mice: 0.051 ± 0.003 versus 0.071 ± 0.011 μg/ml in treated mice; $n = 10$ controls and 5 experimental mice; $p < 0.01$; the oFN levels in mice are lower than in humans because the domain in mice recognized by the antibody differs slightly from the domain in humans, and the standard used is the human standard resulting in an underestimation of the real circulating levels of oFN in mice),⁽¹⁸⁾ whereas circulating levels of total FN were 20% higher (216 ± 6 μg/ml in controls and 260 ± 8

TABLE 3. CIRCULATING LEVELS OF FN ISOFORMS

Substance	Normal range	Patients	Controls	P-values
Total fibronectin (mg/liter)	200–400	181 ± 26	209 ± 23	0.43
Oncofetal fibronectin (mg/liter)	Unknown	4.3 ± 0.6	3.0 ± 0.2	<0.05
EIIIA fibronectin (mg/liter)	Unknown	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	<0.05
EIIIB fibronectin (mg/liter)	Unknown	49.4 ± 10.6	27.2 ± 4.6	0.08

Results are expressed as means ± SE.

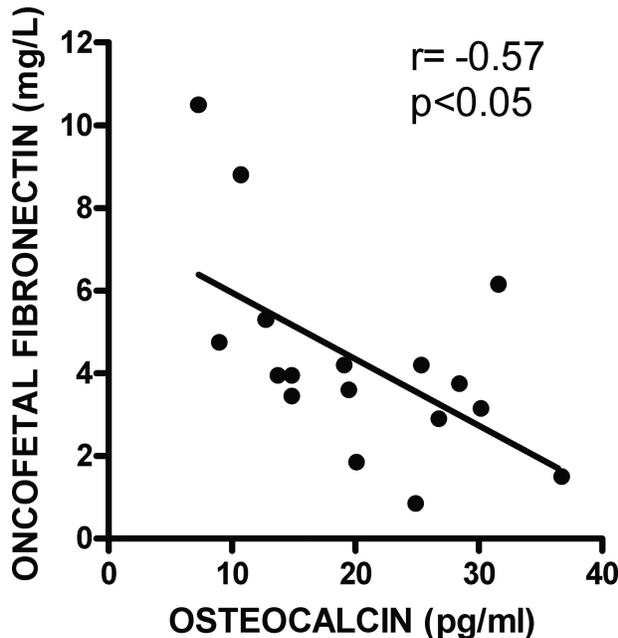


FIG. 1. Oncofetal fibronectin correlates with the decrease in osteocalcin in the patients.

µg/ml in injected mice, $p < 0.005$). Trabecular BMD decreased 17% (control mice: 220.0 ± 12.3 versus 187.0 ± 16.1 mg/cm³ in experimental mice; $p < 0.05$; Fig. 4A) In comparison, using this method of measurement showed a 36% decrease in trabecular BMD 4 wk after ovariectomy.

Mineralizing surface dropped by 30% (MS/BS: 44.7 ± 3.1 in controls versus $31.2 \pm 1.6\%$, $p < 0.005$), and bone formation rate by 60% (BFR/BS: 1.16 ± 0.12 in controls versus 0.47 ± 0.4 mm²/mm/yr; $p < 0.0005$; Fig. 4B). There was also a significant drop in the number of osteoblasts corrected to bone surface (Ob.N./mm BS: 18.2 ± 1.4 in controls versus 10.0 ± 0.8 in experimental mice; 45% decrease; $p < 0.05$; Fig. 4C). Concomitantly, there was a slight nonsignificant drop in the number of osteoclasts corrected to bone surface (Oc.N./mm BS: 0.70 ± 0.06 in controls versus 0.60 ± 0.04 in experimental mice; $p =$ not significant), suggesting that the decrease in BMD was not caused by increased bone resorption. Repeating the experiment in C57BL/6 mice confirmed these findings. In particular, osteoblast number to bone surface decreased significantly (Ob.N./mm BS: $22 \pm 2\%$ versus 14 ± 3 , 36% decrease; $p < 0.05$; Fig. 4C).

DISCUSSION

The principal findings of this study are as follows: (1) Fibronectin containing the oFN domain is elevated in pa-

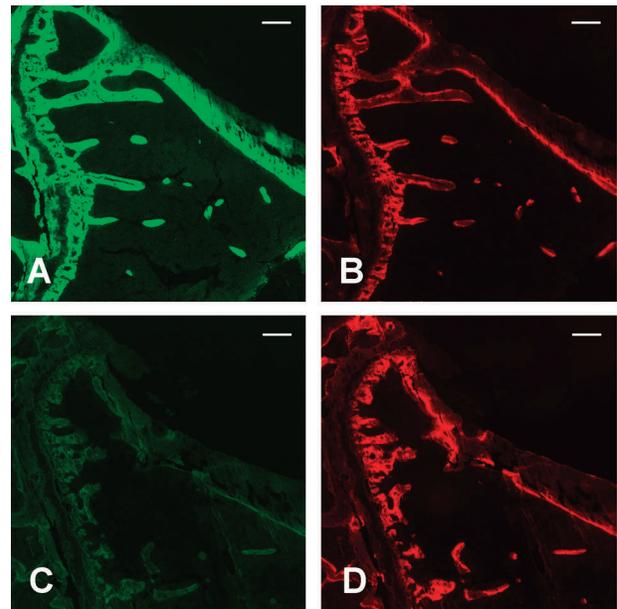


FIG. 2. (A) Oyster-500-labeled aFN infiltrates the bone. Shown are longitudinal sections of tibia laid sideward with the proximal head shown partially on the left of each picture. (B) The infiltration is not limited to areas of active mineralization marked with alizarin complexone. (C and D) Control bone injected with Oyster-500 and alizarin complexone. (C) Autofluorescence of bone, but no infiltration of the bone by the green fluorescence is seen (compared with A; bars represent 200 µm).

tients with PBC and correlates negatively with osteocalcin, a marker of bone formation. (2) aFN containing mainly the oFN and EIIIA domains inhibits osteoblast differentiation in vitro without a significant effect on their proliferation. Removing fibronectin containing the EIIIA domain leads to the same effect. (3) Injection of fibronectin containing oFN in mice results in decreased trabecular bone density, mineralizing surface, and osteoblast numbers. Therefore, an elevation in FN containing the oFN domain in patients with PBC at least partially results in the decrease in bone formation seen in these patients.

Our finding that circulating levels of FN isoforms are increased in patients with liver disease is consistent with a report of Sato et al.,⁽³³⁾ who found higher levels of EIIIA FN in patients with liver cirrhosis than in controls. In our study, we found higher levels of two of the three isoforms (oFN and EIIIA) in the patients with PBC compared with controls, whereas EIIIB FN was not statistically significantly higher. This is also in line with the data by Xu et al.⁽¹⁹⁾ that showed that stellate cells stimulated in vivo with

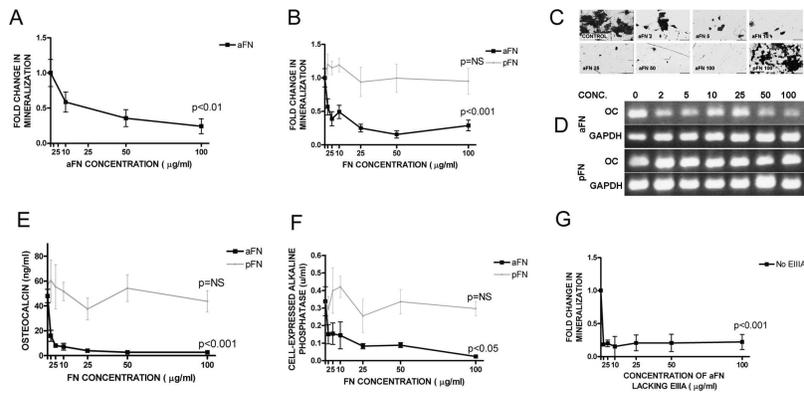


FIG. 3. aFN results in a significant decrease in osteoblast-induced mineralization in human osteoblasts (A), and in murine osteoblasts as evidenced by von Kossa staining (B and C), where the black line represents aFN and the gray line represents pFN in the graph; scale bars in the pictures represent 500 μm . (D) Decrease in osteocalcin (OC) mRNA expression in response to increasing concentrations of aFN but not pFN in the media. Osteocalcin levels in the supernatant (E) and cell-expressed alkaline phosphatase (F) of mouse osteoblasts decrease with increasing doses of aFN (in black), but not with increasing doses of pFN (in gray). Mineralization by murine osteoblasts using aFN lacking the EIIIA domain decreases with increasing doses of aFN lacking EIIIA (G).

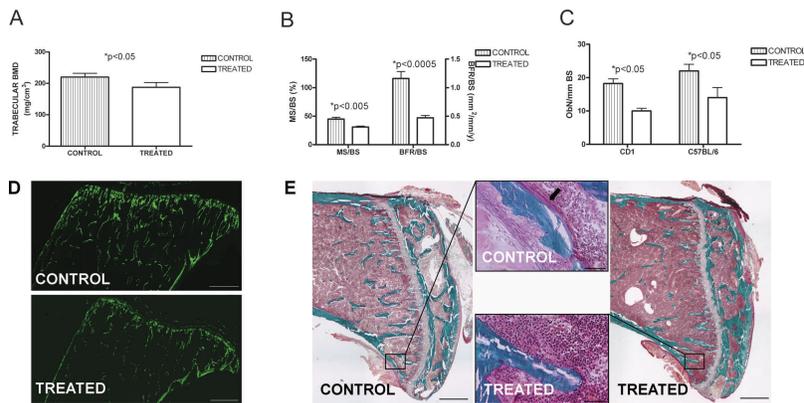


FIG. 4. Injection of aFN in CD1 mice results in decreased trabecular BMD (A) and decreased parameters of bone formation (B). Static histomorphometry shows a drop in osteoblast number adjusted to bone surface (Ob.N./BS) (C) in two genetic backgrounds (CD1 and C57BL/6). (D) Decreased calcein labeling in aFN-treated mice. Scale bar = 500 μm . (E) Osteoid (in pink, black arrow) and the overlying active osteoblasts are more readily seen in control mice. Scale bar = 500 μm . Inset scale bar = 50 μm .

CCl₄ fail to induce the production of EIIB FN. The significant increase in oFN and EIIA containing fibronectin in the patients is presumably caused by the activation of the stellate cells. This increase did not affect the amount of total fibronectin circulating in the blood, because the bulk of the circulating fibronectin consists of plasma fibronectin (up to 90%) produced by the hepatocytes, and plasma fibronectin may decrease somewhat in association with the decrease in albumin seen in these patients (Table 1).⁽³⁴⁾

Our choice to examine our working hypothesis in patients with PBC was influenced by several factors. First, it presented the most homogeneous group possible. Furthermore, it has been shown that this bone loss does not result from vitamin D deficiency.^(5,6) Decreased osteoblastic function was implicated by bone histomorphometry studies that consistently showed a decrease in bone formation rather than an increase in bone resorption.^(8,9,14,35,36) Several studies also reported a decrease of osteocalcin in the blood of these patients.^(31,35,37) Osteocalcin is synthesized exclu-

sively by mature osteoblasts during late differentiation and mineralization, and thus, can serve as a marker of the maturation of osteoblasts and bone formation.^(38,39) Some of osteocalcin is incorporated in the matrix where it binds hydroxyapatite, and the remainder is released in the bloodstream. Diminished carboxylation of the molecule results in diminished binding and an increase in the amount released in the circulation.^(40,41) Because carboxylation is dependent on vitamin K and liver diseases tend to be associated with vitamin K deficiency, there probably is a decrease in carboxylation of osteocalcin.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ This could explain the absence of a significant decrease in circulating levels of osteocalcin in the blood of patients compared with controls. Bone-specific ALP (BSALP) has been proposed as a better marker in recent years. However, use of two commercially available assays showed a significant elevation of BSALP in patients compared with controls with a correlation of >0.80 with the elevation in total ALP ($p < 0.001$; unpublished data) and >0.60 with the elevation in γ -GT seen in these

patients ($p < 0.001$; unpublished data), which speaks against its specificity in this setting. The findings of the correlation between oFn and osteocalcin in PBC patients is in contrast to patients with chronic hepatitis C, in whom no such correlation could be found ($r = -0.005$, $p = 0.97$, $n = 51$; unpublished data). This is probably because of the difference in the pathogenesis of bone disease. Unlike PBC, hepatitis C is associated with increased osteocalcin levels.⁽⁴⁵⁾ Furthermore, bone resorption is presumably stimulated in chronic hepatitis C by increased interleukin-8 and soluble TNF receptor p55 levels.^(46–49)

The injection of labeled aFN in mice showed that this large molecule (~480 kDa) is able to infiltrate the entire bone matrix. Data showing that albumin (68 kDa) and α 2-HS-glycoprotein (64 kDa)^(50,51) also infiltrate the bone support the notion that large molecules can infiltrate bone and affect bone cell behavior.

The in vitro data failed to show a significant difference between the added concentration of 2 and 5 μ g/ml in the nodule formation assay. Osteocalcin levels in the media, on the other hand, showed a significant drop from 2–5 μ g/ml. Most importantly, however, injection of aFN clearly resulted in a significant decrease in the number of osteoblasts in the treated mice, associated with a moderate increase in circulating levels of oFN, which is almost equivalent to that seen in our patients (40% increase in mice and 43% increase in patients). This supports the conclusion that the oFN elevation in humans from 3.0 to 4.3 μ g/ml may be the mediator of decreased bone formation in PBC.

Obtaining FN containing only one of the three domains in amounts enough to perform the required experiments presented considerable difficulties. After looking into several options, the use of midterm amniotic fluid was deemed the best option. Adding to these difficulties, we are currently unable to isolate enough FN lacking the EIIIB domain because of the poor binding of the EIIIB antibody. Despite these limiting factors, we were able to obtain enough material to shed some light on the contribution of the three domains examined. Our data showed a relationship between the increase in FN containing the oFN domain and markers of bone formation. In addition, there are a number of findings that speak against the role of either the EIIIA domain or the EIIIB domain in mediating the effect of the isolated FN on osteoblasts. First, the EIIIA domain does not correlate with either osteocalcin or PINP in the patients, and second, aFN containing EIIIA has the same effect as aFN lacking EIIIA in vitro. Note that at low doses, the effect seems to be significantly larger in the aFN lacking EIIIA, because the actual concentration of the oFN domain added is higher in the absence of EIIIA ($p < 0.05$ when the range of 2–25 μ g of added FN is examined). Similarly, the EIIIB domain does not correlate with either osteocalcin or PINP in the patients and fails to increase significantly in the mice injected with aFN and experiencing a drop in both BMD and osteoblast numbers. This speaks against an effect of EIIIB on bone in vivo. Together, these data support the conclusion that a FN containing the oFN domain is responsible for the effects seen.

pFN and the oFN-containing isoform differ in several aspects. The oFN-containing isoform contains two variable

regions as opposed to one only in pFN.⁽¹⁸⁾ Furthermore, the oFN-containing FN has a higher degree of glycosylation, including glycosylation in the proline-rich variable region rendering oFN more resistant to proteolysis.⁽¹⁸⁾ These characteristics of oFN may help explain some of our findings. Whereas injection of aFN is expected to cause a similar elevation in both circulating oFN and total FN, we found instead a higher degree of elevation in circulating oFN (40% increase) than total fibronectin (20%) after injection of 1 mg/d/mouse of aFN. Furthermore, the injection of 1 mg pFN resulted in a 2-fold increase in circulating total FN (unpublished data), whereas 1 mg aFN did not. This suggests that aFN injected intraperitoneally is less likely than pFN to get into the circulation, but once there, oFN is more protected against proteolysis.

Fibronectins are recognized by a variety of integrins. Most integrins bind through the RGD sequence, whereas to date, only α 4 β 1-integrin binds mainly to the LDV domain located in the variable region. Because integrin- α 4 β 1 is expressed on osteoblasts, oFN, which contains the variable region, may exert its effect on osteoblasts through interaction with integrin- α 4 β 1.^(52,53) The glycosylation could further enhance the binding to α 4 β 1-integrin or alternatively decrease α 4 β 1-integrin interaction with osteoblasts. Either effect on α 4 β 1-integrin could indirectly affect binding to α 5 β 1-integrin. Determining how oFN exerts its effects on osteoblasts needs to be examined.

Our study has some limitations. The number of subjects was relatively small. We did not examine BMD in our cohort as we did in mice and therefore cannot establish the presence of a correlation between oFN elevation and a possible decrease in BMD in humans. This would be best established, however, in a longitudinal study correlating changes in BMD over time with the levels of circulating oFN. On the other hand, the correlation between oFN and osteocalcin in the clinical study is supported by our results in vitro and our findings in mice in vivo. In addition, all results are in line with an effect of a fibronectin isoform containing the oFN domain on decreased bone formation.

In summary, our clinical study and in vitro and in vivo experiments all corroborate the conclusion that an FN isoform is at least in part responsible for the decrease in bone formation seen in patients with PBC. Thus, a molecule that has been viewed as an extracellular matrix protein seems to behave in a manner similar to a hormone. Further studies along these lines are thus warranted. If confirmed in a larger prospective longitudinal study, the use of oFN as a marker for future bone loss in patients with chronic cholestatic liver disease may prove useful in focusing therapeutic interventions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Reinhard Fässler for support and invaluable input, Stefan Meuer for support, Karl Insogna and Caren Gundberg for helpful discussions, William Horne for careful reading of the manuscript, Adeza Biomedical for antibody and buffer, and Antisoma PLC for antibody and standards. This work was supported by the Max-Planck Society (NK, AB, NH, and IAN), the University of Heidel-

berg (NK, AB, and IAN), and the research fund of the Medical Faculty of Mannheim (PF and MVS).

REFERENCES

1. Camisasca M, Albisetti W, Grandinetti G, Parodi M, Battezzati P, Bertolini E, Crosignani A, Zermiani P, Zuin M, Podda M 1991 Bone disease in primary biliary cirrhosis: A large scale prevalence study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **3**:S26.
2. Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Roche J, Posen S 1990 Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. *Gut* **31**:82–87.
3. Hay JE 1995 Bone disease in cholestatic liver disease. *Gastroenterology* **108**:276–283.
4. Stellon AJ, Davies A, Compston J, Williams R 1985 Osteoporosis in chronic cholestatic liver disease. *Q J Med* **57**:783–790.
5. Stellon AJ, Webb A, Compston J, Williams R 1986 Lack of osteomalacia in chronic cholestatic liver disease. *Bone* **7**:181–185.
6. Diamond T, Stiel D, Mason R, Lissner D, Bikle D, Wilson S, Posen S 1989 Serum vitamin D metabolites are not responsible for low turnover osteoporosis in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* **69**:1234–1239.
7. Janes CH, Dickson ER, Okazaki R, Bonde S, McDonagh AF, Riggs BL 1995 Role of hyperbilirubinemia in the impairment of osteoblast proliferation associated with cholestatic jaundice. *J Clin Invest* **95**:2581–2586.
8. Diamond TH, Stiel D, Lunzer M, McDowall D, Eckstein RP, Posen S 1989 Hepatic osteodystrophy. Static and dynamic bone histomorphometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* **96**:213–221.
9. Guanabens N, Pares A, Marinoso L, Brancos MA, Piera C, Serrano S, Rivera F, Rodes J 1990 Factors influencing the development of metabolic bone disease in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* **85**:1356–1362.
10. Leslie WD, Bernstein CN, Leboff MS 2003 AGA technical review on osteoporosis in hepatic disorders. *Gastroenterology* **125**:941–966.
11. Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Mugaerza B, Picardi A, Santidrian S, Prieto J 1998 Osteopenia in rats with liver cirrhosis: Beneficial effects of IGF-I treatment. *J Hepatol* **28**:122–131.
12. Sjogren K, Jansson JO, Isaksson OG, Ohlsson C 2002 A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I. *Endocrine* **19**:249–256.
13. Compston JE, Thompson RP 1977 Intestinal absorption of 25-hydroxyvitamin D and osteomalacia in primary biliary cirrhosis. *Lancet* **1**:721–724.
14. Hodgson SF, Dickson ER, Eastell R, Eriksen EF, Bryant SC, Riggs BL 1993 Rates of cancellous bone remodeling and turnover in osteopenia associated with primary biliary cirrhosis. *Bone* **14**:819–827.
15. Sakai T, Johnson K, Murozono M, Sakai K, Magnuson M, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson H, Fassler R 2001 Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* **7**:324–330.
16. Hynes R 1990 Distribution of fibronectins in vivo: Plasma. In: Rich A (ed.) *Fibronectins*. Springer, New York, NY, USA, pp. 27–30.
17. Sato S, Kitade H, Hiramatsu Y, Kwon AH, Takahashi H, Sekiguchi K, Uehara M, Oda M, Yanagimoto Y, Miyashita K, Sakashita E, Kamiyama Y 2000 Increased extra domain-A containing fibronectin and hepatic dysfunction during septic response: An in vivo and in vitro study. *Shock* **13**:492–496.
18. Hynes R 1990 Structure of fibronectins. In: Rich A (ed.) *Fibronectins*. Springer, New York, NY, USA, pp. 113–175.
19. Xu G, Niki T, Virtanen I, Rogiers V, De Bleser P, Geerts A 1997 Gene expression and synthesis of fibronectin isoforms in rat hepatic stellate cells. Comparison with liver parenchymal cells and skin fibroblasts. *J Pathol* **183**:90–98.
20. Matsuura H, Takio K, Titani K, Greene T, Levery SB, Salyan ME, Hakomori S 1988 The oncofetal structure of human fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6. Unique structural requirement for the antigenic specificity provided by a glycosylhexapeptide. *J Biol Chem* **263**:3314–3322.
21. Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, Globus RK 1996 Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* **109**:1369–1380.
22. Moursi AM, Globus RK, Damsky CH 1997 Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci* **110**:2187–2196.
23. Chen Q, Zhao J, Dallas MR, Fassler R, Peters DM, Dallas SL 2006 Fibronectin plays a role in osteoblast differentiation which may be mediated via regulation of BMP activity. *J Bone Miner Res* **21**:S13.
24. Bothe V, Schmidt-Gayk H 1990 Competitive protein-binding assay for the diagnosis of hyper- and hypovitaminosis D. In: Schmidt-Gayk H, Armbruster F, Bouillon R (eds.) *Calcium Regulating Hormones, Vitamin D Metabolites, and Cyclic AMP*. Springer, Berlin, Germany, pp. 258–279.
25. Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R 2001 Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care* **24**:323–327.
26. Akiyama SK 1999 Extracellular matrix. In: Bonifacino JS, Dasso M, Horford JB, Lipincott-Schwartz J, Yamada KM (eds.) *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley and Sons, New York, NY, USA, S2, pp. 10.5.1–10.5.13.
27. Bessey O, Lowry O, Brock M 1946 A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* **166**:173–176.
28. Rickard D, Kassem M, Hefferan T, Sarkar G, Spelsberg T, Riggs B 1996 Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* **11**:312–324.
29. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **2**:595–610.
30. Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A 1989 Prognosis in primary biliary cirrhosis: Model for decision making. *Hepatology* **10**:1–7.
31. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J 1998 Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* **13**:731–738.
32. Matsuura H, Hakomori S 1985 The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: Its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:6517–6521.
33. Sato S, Hiramatsu Y, Kitade H, Kwon AH, Matsui K, Miyashita K, Sakashita E, Sekiguchi K, Takahashi H, Kamiyama Y 1999 Different responses to surgical stress between extra domain A+ and plasma fibronectins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:225–229.
34. Hynes R 1990 Expression of fibronectins by cells in culture: Hepatocytes. In: Rich A (ed.) *Fibronectins*. Springer, New York, NY, USA, pp. 73–76.
35. Hodgson S, Dickson E, Wahner H, Johnson K, Mann K, Riggs B 1985 Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med* **103**:855–860.
36. Stellon AJ, Webb A, Compston J, Williams R 1987 Low bone turnover state in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **7**:137–142.
37. Fonseca V, Epstein O, Gill DS, Menon RK, Thomas M, McIntyre N, Dandona P 1987 Hyperparathyroidism and low serum osteocalcin despite vitamin D replacement in primary biliary cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* **64**:873–877.

38. Boguslawski G, Hale LV, Yu XP, Miles RR, Onyia JE, Santerre RF, Chandrasekhar S 2000 Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J Biol Chem* **275**:999–1006.
39. Ducy P, Karsenty G 1996 Skeletal Gla proteins: Gene structure, regulation of expression, and function. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds.) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 183–195.
40. Lian JB, Gundberg CM 1988 Osteocalcin. *Biochemical considerations and clinical applications*. *Clin Orthop Relat Res* **226**:267–291.
41. Menon RK, Gill DS, Thomas M, Kernoff PB, Dandona P 1987 Impaired carboxylation of osteocalcin in warfarin-treated patients. *J Clin Endocrinol Metab* **64**:59–61.
42. Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Mizuno Y, Kaneki M, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H 1992 Vitamin K2 modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:814–820.
43. Newman P, Bonello F, Wierzbicki AS, Lumb P, Savidge GF, Shearer MJ 2002 The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: Role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Bone Miner Res* **17**:426–433.
44. Rabinovitz M, Shapiro J, Lian J, Block GD, Merkel IS, Van Thiel DH 1992 Vitamin D and osteocalcin levels in liver transplant recipients. Is osteocalcin a reliable marker of bone turnover in such cases? *J Hepatol* **16**:50–55.
45. Gallego-Rojo FJ, Gonzalez-Calvin JL, Munoz-Torres M, Mundi JL, Fernandez-Perez R, Rodrigo-Moreno D 1998 Bone mineral density, serum insulin-like growth factor I, and bone turnover markers in viral cirrhosis. *Hepatology* **28**:695–699.
46. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR 2001 Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* **75**:6209–6211.
47. Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG 2004 Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:4325–4330.
48. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharyya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ 2005 Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res* **65**:11001–11009.
49. Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hufner M 2003 Cytokines, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone diseases. *J Bone Miner Res* **18**:529–538.
50. Triffitt JT, Gebauer U, Ashton BA, Owen ME, Reynolds JJ 1976 Origin of plasma alpha2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* **262**:226–227.
51. McKee MD, Farach-Carson MC, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A 1993 Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HS-glycoprotein) proteins in rat bone. *J Bone Miner Res* **8**:485–496.
52. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L 1997 Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* **2**:d126–d146.
53. Grzesik W, Robey P 1994 Bone matrix RGD glycoproteins: Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* **9**:487–496.

Address reprint requests to:

Inaam Nakchbandi, MD

University of Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 305 2 OG

Raum 210

69120 Heidelberg, Germany

E-mail: inaam.nakchbandi@urz.uni-heidelberg.de

Received in original form October 10, 2007; revised form February 8, 2008; accepted March 12, 2008.