

**Untersuchungen zu der Rolle der extrazellulären Matrix bei Fibrose und bei
Tumoren**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**

Matthäus Vasel

geboren am 02.07.1980 in Regensburg

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2012

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

Kawelke N., **Vasel M.**, Sens C., von Au A., Dooley S., Nakchbandi I.A.. Fibronectin Protects from Excessive Liver Fibrosis by Modulating the Availability of and Responsiveness of Stellate Cells to Active TGF- β . PLoS One. 2011;6(11):e28181. Epub 2011 Nov 28.

Tagungsbeiträge:

- 10/2009** Hackl N., von Au A., **Vasel M.**, Tiwari S., Cecchini M. G., Nakchbandi I. A.
Vortrag „The Role of Fibronectin in the Bone Marrow Metastatic Niches”
CABS, Arlington Virginia, USA *The IX International Meeting on Cancer Induced Bone Disease*
- 09/2010** von Au A., **Vasel M.**, Cecchini M., Nakchbandi I.A.
Vortrag „The role of fibronectin originating from different sources on breast cancer metastasis development and bone remodeling.“
CABS, Sheffield, UK *The XI International Meeting on Cancer Induced Bone Disease*
- 10/2010** von Au A., Hoffmann C., **Vasel M.**, Cecchini M., Nakchbandi I.A.
Poster „Differential role of fibronectin originating from different sources in the bone marrow on metastasis formation.“
ASBMR, Toronto, CA *The American Society for Bone and Mineral Research 32st Annual Meeting*
- 10/2010** von Au A., **Vasel M.**, Nakchbandi I.A.
Poster „The development of bone metastatic lesions is modified by circulating Fibronectin.“
ASBMR, Toronto, CA *The American Society for Bone and Mineral Research 32st Annual Meeting*
- 03/2011** **Vasel M.**, von Au A., Nakchbandi I.A.
Vortrag „Die Bildung eines Hämatoms im Knochen ist nicht mit einer Erhöhung der Osteologie, Metastasierungsrate assoziiert.“
Fürth
- 03/2011** von Au A., **Vasel M.**, Glüer, C.-C., Tiwari S., Nakchbandi, I.A.
Vortrag „Zirkulierendes Fibronectin ist für das Tumorwachstum unerlässlich“
Osteologie, Fürth

- 03/2011** von Au A., **Vasel M.**, Glüer,C.-C., Tiwari S., Nakchbandi, I.A.
 Vortrag „Osteoprotegerin beeinträchtigt das Wachstum von Knochenmetastasen
 Osteologie, durch seine duale Rolle.“
 Fürth
- 04/2011** Kawelke N., **Vasel M.**, Nakchbandi I.A.
 Poster „Fibronectin in the liver modifies severity of liver fibrosis“
 EASL, *The International Liver Congress™ 2011*
 Berlin
- 03/2012** **Vasel M.**, Kawelke, N., Rosznagl S., Nakchbandi, I.A.
 Poster „Die kombinierte Gabe von PTH und Zoledronsäure beeinflusst das
 Osteooncologie, Knochenmarkmilieu und erleichtert die Einnistung von Tumorzellen“
 Tübingen
- 03/2012** **Vasel M.**, von Au A., Nakchbandi, I.A.
 Poster „Blutgerinnsel führen weder zu einer verstärkten Ansiedelung zirkulieren
 Osteooncologie, der Tumorzellen, noch beeinflussen sie deren spätere Einnistung oder das
 Tübingen Tumorwachstum“
- 03/2012** **Vasel M.**, Kawelke, N., Nakchbandi, I.A.
 Vortrag „Die Kombination von PTH und Zoledronsäure verstärkt die Einwanderung
 Osteologie, von Tumorzellen in das Knochenmark“
 Basel
- Auszeichnung** **Reiseunterstützung für das Young Investigator Symposium**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....X-XII

I. Einleitung 1

I.1. Die extrazelluläre Matrix 1

I.1.1. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix..... 2

I.1.2. Interaktionen der extrazellulären Matrix 2

I.1.2.1. Die Rolle des Fibronektins 3

I.1.2.1.1. Die Struktur des Fibronektins..... 3

I.1.2.1.2. Die Interaktionen des Fibronektins 4

I.1.2.1.3. Die Aufgaben des Fibronektins..... 5

I.1.2.1.3.1. Der Aufbau eines Fibronektinnetzwerks als Grundlage für die Bildung einer funktionalen extrazellulären Matrix 5

I.1.2.1.3.2. Die Rolle des Fibronektins bei der Embryogenese 6

I.1.2.1.3.3. Die Rolle des Fibronektins bei der Proliferation und der Apoptose..... 6

I.1.2.1.3.4. Die Rolle des Fibronektins bei der Adhäsion und der Migration 6

I.1.2.1.4. Fibronektin bei pathologischen Veränderungen 7

I.1.2.1.4.1. Die Rolle des Fibronektins bei der Gerinnungskaskade und während der Wundheilung..... 7

I.1.2.1.4.2. Die Rolle des Fibronektins bei Tumorerkrankungen 8

I.1.2.1.4.3. Die Rolle des Fibronektins bei Fibrose..... 11

I.2. Das Leberfibrosemodell12

I.2.1. Der Aufbau der Leber 12

I.2.2. Die Funktionen der Leber 12

I.2.3. Die Histologie der Leberläppchen 13

I.2.4. Ursachen, Klinik und Verlauf einer Leberfibrose..... 14

I.2.5. Histologische Veränderungen während einer Leberfibrose..... 14

I.2.5.1. Veränderungen der extrazellulären Matrix..... 15

I.2.5.2. Die Rolle verschiedener Zelltypen bei Leberfibrose 16

I.2.5.2.1. Die Hepatozyten..... 16

I.2.5.2.2. Die Kupferzellen und andere inflammatorische Zellen..... 17

I.2.5.2.3. Die hepatischen Stellatezellen..... 17

I.2.5.3. TGF- β 1 als wichtigster Mediator der Leberfibrose 17

I.2.5.4. Auswirkungen der histologischen Veränderungen im Bereich der Sinusoide.. 18

I.2.5.5. Fibronektin bei der Leberfibrose 19

I.3. Das Tumormodell.....	21
I.3.1. Bedeutung, Anatomie und Zusammensetzung des Knochens.....	21
I.3.1.1. Die Anatomie des Knochens.....	21
I.3.1.2. Die Zellen des Knochens.....	21
I.3.1.3. Das Knochenremodeling.....	22
I.3.1.4. Das RANK/RANKL/OPG System.....	23
I.3.2. Die Stammzellnische im Knochenmark.....	24
I.3.2.1. Begriffsbestimmung.....	24
I.3.2.2. Die hämatopoetische und mesenchymale Stammzellnische.....	25
I.3.2.3. Die klinische Relevanz der Stammzellnischen.....	26
I.3.2.4. Die Einnistung.....	27
I.3.2.4.1. Definition.....	27
I.3.2.4.2. Die Einnistung in den Knochen.....	27
I.3.2.5. Der Einfluss von Zytokinen auf den Prozess der Einnistung.....	28
I.3.2.6. Die Mikroumgebung eines Blutgerinnsels.....	28
I.3.3. Knochenmodulierende Substanzen.....	29
I.3.3.1. Das Parathormon.....	29
I.3.3.1.1. Osteoanabolische Wirkung des Parathormons.....	29
I.3.3.1.2. Osteokatabolische Wirkung des Parathormons.....	30
I.3.3.2. Die Zoledronsäure.....	30
I.3.3.3. Einfluss von Parathormon und Zoledronsäure auf die hämatopoetische und mesenchymale Stammzellnische.....	30
I.4. Zielsetzung der Arbeit.....	31
II. Material und Methoden.....	32
II.1. Materialien.....	32
II.1.1. Herstellerverzeichnis.....	32
II.1.2. Geräte.....	34
II.1.3. Verbrauchsmaterial.....	35
II.1.4. Chemikalien.....	36
II.1.5. Puffer, Medien und Reagenzien.....	38
II.1.6. Antikörper, Enzyme und synthetische Oligonukleotide.....	42
II.1.6.1. Antikörper.....	42
II.1.6.1.1. Primärantikörper.....	42
II.1.6.1.2. Sekundärantikörper.....	42
II.1.6.2. Enzyme.....	43

II.1.6.3. Oligonukleotide.....	43
II.2. Zellkultur	44
II.2.1. Kultivierung der Zellen.....	44
II.2.2. Zählung der Zellen.....	44
II.2.3. Kryokonservierung der Zellen in gasförmigem Stickstoff.....	45
II.2.4. Überprüfung auf Kontaminationen – Mycoplasmentest.....	45
II.2.4.1. PCR Programm	45
II.2.4.2. PCR Ansatz.....	46
II.3. Methoden im Leberprojekt	47
II.3.1. Die Mausmodelle im Leberprojekt.....	47
II.3.2. Die Induktion einer Leberfibrose	47
II.3.2.1. Die Induktion einer Leberfibrose mit Dimethylnitrosamin (DMN)	47
II.3.2.2. Die Induktion einer Leberfibrose mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)	48
II.3.3. Die Peptide	48
II.3.3.1. Struktur der Peptide	48
II.3.3.2. Die Applikation der Peptide.....	50
II.3.3.2.1. Die Applikation der Peptide <i>in vivo</i>	50
II.3.3.2.2. Die Applikation der Peptide <i>in vitro</i>	50
II.3.4. Töten der Mäuse und Probenentnahme	50
II.3.5. Nachweismethoden der Fibrose.....	51
II.3.5.1. Bestimmung des Kollagengehalts der Leber	51
II.3.5.2. Färbungen von Matrix und Matrixkomponenten in Lebergefrierschnitten	52
II.3.5.2.1. Anfertigung von Lebergefrierschnitten	52
II.3.5.2.2. Färbung mit Picro-Sirius-Rot.....	52
II.3.5.2.3. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	53
II.3.6. Evaluierung des Gesundheitszustandes der Tiere	53
II.3.6.1. Gewicht.....	53
II.3.6.2. Albuminwert.....	53
II.3.7. Analyse und Quantifizierung von Proteinen	53
II.3.7.1. Herstellung von Gewebelysaten	53
II.3.7.2. Quantifizierung von Proteinkonzentrationen	54
II.3.8. Zellexperimentelle Methoden im Leberprojekt	54
II.3.8.1. Isolierung primärer hepatischen Stellatezellen aus Mäuselebern	54
II.3.8.1.1. Kultivierung der Zellen	55
II.3.8.1.1.1. Kultivierung der primären hepatischen Stellatezellen	55
II.3.8.1.1.2. Kultivierung der Lungenepithelzellen des Mink (MLEC).....	55
II.3.8.2. Herstellung von Matrixlysaten aus hepatischen Stellatezellen.....	55

II.3.8.3.	ELISA zum Nachweis von Fibronectin in Zelllysaten	56
II.3.8.4.	Luziferase Versuch zum Nachweis des Gesamt TGF- β aus Leberlysaten.....	57
II.4.	Methoden im Tumorprojekt.....	58
II.4.1.	Die Mausmodelle im Tumorprojekt.....	58
II.4.1.1.	Athymische, immundefiziente Nacktmäuse	58
II.4.1.1.1.	Konditionelle Knockout-Mäuse,	58
II.4.1.1.2.	AlbCre-Mäuse	59
II.4.1.1.3.	MxCre-Mäuse.....	59
II.4.1.1.4.	ColCre-Mäuse	59
II.4.1.1.5.	AlbCre/eGFP-Mäuse.....	59
II.4.1.1.6.	MxCre/eGFP-Mäuse	60
II.4.1.1.7.	DelCre/eGFP-Mäuse.....	60
II.4.2.	Eingriffe bei Versuchstieren und deren Handhabung	60
II.4.2.1.	Injektionen	60
II.4.2.1.1.	Induktion des Mx-Promotors	60
II.4.2.1.2.	Anästhesie der Tiere	60
II.4.2.1.2.1.	Anästhesie vor der intrakardialen Injektion	60
II.4.2.1.2.2.	Anästhesie vor der intratibialen Bohrung	60
II.4.2.1.3.	Luziferin Applikation.....	61
II.4.2.1.4.	Schmerztherapie	61
II.4.2.1.5.	Parathormon und Zoledronsäureinjektionen	61
II.4.2.1.5.1.	Parathormoninjektion.....	61
II.4.2.1.5.2.	Zoledronsäureinjektion	61
II.4.2.1.6.	Calceininjektionen	61
II.4.2.1.7.	Xenotransplantat Einnistungs- und Metastasierungsmodell	62
II.4.2.1.8.	Xenotransplantat Einnistungs- und Metastasierungsmodell bei Hämatombildung.....	62
II.4.2.1.8.1.	Hämatominduktion.....	62
II.4.2.1.8.2.	Biolumineszenzmessungen	63
II.4.2.1.8.3.	Radiographie der Mausskelette.....	63
II.4.2.1.8.4.	Ermittlung der Knochendichte mittels peripherer quantitativer Computertomographie	63
II.4.2.1.9.	Xenotransplantat Einnistungsmodell bei Anwendung pharmakologischer Modifikationen.....	64
II.4.2.2.	Tötung der Tiere und Probenentnahme.....	64
II.4.2.3.	Versuchstierhaltung.....	64
II.4.3.	Molekularbiologische, biochemische und immunologische Methoden	64
II.4.3.1.	PCR zur Ermittlung des Genotyps der Mäuse.....	64

II.4.3.1.1.	DNA Isolation zur Bestimmung des Genotyps	64
II.4.3.1.2.	PCR Programm.....	65
II.4.3.1.3.	PCR Ansatz.....	65
II.4.3.1.4.	Sequenzen der PCR Primer	65
II.4.3.1.5.	Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA Fragmente	66
II.4.3.2.	ELISA zur Ermittlung des Gesamtfibronektingehalts im Plasma der Mäuse ...	66
II.4.3.3.	DNA-Isolation aus murinem Gewebe.....	66
II.4.3.4.	RNA-Isolation aus murinem Gewebe.....	67
II.4.3.5.	Reverse Transkription der RNA	67
II.4.3.6.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	67
II.4.3.6.1.	QPCR Programm	67
II.4.3.6.2.	QPCR Ansatz	68
II.4.3.6.3.	Sequenzen der qPCR Primer	68
II.4.3.7.	Detektion humaner Zellen in murinem Gewebe mit Hilfe der qPCR	69
II.4.3.8.	Analyse der Zytokinumgebung mit Hilfe eines Multiplex Versuchs	69
II.4.3.9.	Analyse der Zytokinumgebung mit Hilfe von qPCR.....	69
II.4.3.10.	CD45 Depletion des Knochenmarks, der Milz und der Leber	69
II.4.4.	Zellexperimentelle Methoden im Tumorprojekt.....	70
II.4.4.1.	Zelllinien	70
II.4.4.1.1.	MDA-MB-231/luc ⁺	70
II.4.4.1.2.	PC-3M-Pro4/luc ⁺	71
II.4.4.2.	Primärzellen.....	71
II.4.4.2.1.	Endothelzellen.....	71
II.4.4.2.2.	Knochenmarkzellen.....	72
II.4.4.2.3.	Nk-Zellen	72
II.4.4.2.4.	Makrophagen	73
II.4.4.3.	Untersuchungen in den Zelllinien.....	73
II.4.4.3.1.	Vorbereitung der Zellen für die intrakardiale Injektion.....	73
II.4.4.3.2.	Adhäsions Versuche	73
II.4.4.3.2.1.	Versuche zur Klärung der Adhäsion auf Matrixkomponenten	73
II.4.4.3.2.2.	Versuche zur Klärung der Adhäsion auf Zellen	74
II.4.4.4.	Chromfreisetzungstest	74
II.4.4.4.1.	⁵¹ Cr Markierung der Zielzellen	75
II.4.4.4.2.	Nk-Zell abhängige Zellyse.....	75
II.4.4.5.	Cytochrom-C-Versuch.....	76
II.4.5.	Färbungen	76
II.4.5.1.	Immunfluoreszenzfärbungen.....	76
II.4.5.1.1.	Entkalkifizierung des Knochens.....	76
II.4.5.1.2.	Anfertigung von Gefrierschnitten des Knochens	76

II.4.5.1.3.	Färbung der Gefrierschnitte	77
II.4.5.2.	Histologische Untersuchungen des Knochens	77
II.4.5.2.1.	Einbettung des Knochens in Kunststoff	77
II.4.5.2.2.	Schneiden des in Kunststoff eingebetteten Knochens	77
II.4.5.2.3.	Calcein Färbungen	77
II.4.5.2.4.	Färbung von Knochenschnitten nach Masson-Goldner	77
II.4.5.2.5.	Histomorphometrische Analyse	78
II.4.5.3.	Färbungen für die Durchflusszytometrie	79
II.4.6.	Statistische Auswertung	79
III.	Ergebnisse	80
III.1.	Effekt der Inhibierung der Bildung einer Fibronektinmatrix	80
III.1.1.	Fibroseinduktion	80
III.1.1.1.	Wahl der Methode zur Induktion einer Fibrose	80
III.1.1.1.1.	Bestimmung des Kollagengehalts der Leber	81
III.1.1.1.2.	Histologische Bestätigung der Entwicklung einer Leberfibrose	82
III.1.2.	Untersuchungen zu den Effekten des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose	83
III.1.2.1.	<i>In vivo</i> Untersuchungen zu den Effekten des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose	83
III.1.2.1.1.	Auswirkungen des Peptids pUR4b auf den Kollagengehalt der Matrix	83
III.1.2.1.1.1.	Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge bei Applikation während der Fibrosebildungsphase	84
III.1.2.1.1.2.	Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge bei Applikation nach der Fibrosebildungsphase	86
III.1.2.1.2.	Untersuchung der Matrixzusammensetzung der Leber	87
III.1.2.1.2.1.	Histologische Ausbreitung der Leberfibrose	87
III.1.2.1.2.2.	Entzündliche Zellen in der Leber	89
III.1.2.1.2.3.	Aktivierte hepatische Stellatzellen der Leber	91
III.1.2.1.3.	Auswirkungen des Peptids pUR4b auf den Allgemeinzustand der Tiere	92
III.1.2.1.3.1.	Das Gewicht der Tiere	93
III.1.2.1.3.1.1.	Gewichtsentwicklung der Tiere, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden	93
III.1.2.1.3.1.2.	Gewichtsentwicklung der Tiere, die nach der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden	94
III.1.2.1.3.2.	Die Albuminwerte im Serum	94
III.1.2.1.4.	Auswirkungen der Gabe des Peptids pUR4b auf das Zytokin TGF- β	95
III.1.2.2.	<i>In vitro</i> Untersuchungen zu den Auswirkungen des Peptids pUR4b bei Leberfibrose	97

III.1.2.2.1. Isolation und Kultivierung der hepatischen Stellatezellen	97
III.1.2.2.2. Der Einfluss von pUR4b auf die Fibronectinproduktion der kultivierten hepatischen Stellatezellen	98
III.1.2.2.3. Die Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Fibronectinmatrix kultivierter hepatischer Stellatezellen	99
III.1.3. Bestätigung der Ergebnisse in einem Modell mit CCl ₄ induzierter Fibrose	100
III.1.3.1. Auswirkungen der Gabe des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge	101
III.1.3.2. Immunfluoreszenzuntersuchungen	102
III.1.3.2.1. Die aktivierten hepatischen Stellatezellen	102
III.1.3.2.2. Die entzündlichen Zellen	103
III.2. Die Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere des Matrixproteins Fibronectin bei der Tumorentstehung	106
III.2.1. Detektion sich einnistender Tumorzellen im Knochenmark	106
III.2.2. Ausschaltung des Fibronectins in Mäusen unterschiedlicher Genotypen	109
III.2.2.1. Einnistungsverhalten von MDA Zellen	115
III.2.2.1.1. Auswirkungen der Ausschaltung von Fibronectin in verschiedenen Geweben der Maus auf das Einnistungsverhalten von MDA Zellen	115
III.2.2.1.2. Auswirkungen der Ausschaltung von endogenem Fibronectin der MDA Zellen auf das Einnistungsverhalten von MDA Zellen	117
III.2.2.1.2.1. Adhäsionsverhalten der MDA-CT und der MDA-KD Zelllinie auf Matrixkomponenten	118
III.2.2.1.2.2. Adhäsionsverhalten der MDA-CT und der MDA-KD Zelllinie auf Zellen	119
III.2.2.1.2.3. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von eCadherin	120
III.2.2.1.2.4. Einnistung der Tumorzellen in verschiedene Organe direkt im Anschluss an die intrakardiale Injektion	121
III.2.2.1.2.5. <i>In vivo</i> Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der Tumorzelllinien an verschiedenen Organen und deren Immunzellen mit Durchflusszytometrie und qPCR	122
III.2.2.1.3. Untersuchungen zu der Rolle der Immunzellen	125
III.2.2.1.3.1. Einfluss der natürlichen Killerzellen (Nk-Zellen)	125
III.2.2.1.3.2. Untersuchungen zur Rolle der Phagozytose durch Makrophagen	126
III.2.3. Krankheitsbedingte Modifikationen der extrazellulären Matrix und deren Einfluss auf das Einnistungsverhalten	127
III.2.3.1. Induktion eines Hämatoms	127
III.2.3.2. Einfluss eines Hämatoms auf das Einnistungsverhalten von Tumorzellen	128
III.2.3.3. Einfluss eines Hämatoms auf die Entwicklung und das Wachstum von Tumorerläsionen	129
III.2.3.3.1. Einfluss eines Hämatoms auf die Anzahl und Lokalisation von Tumoren	129

III.2.3.3.2. Einfluss eines Hämatoms auf die Gesamttumorlast und die Größe der Einzeltumore	130
III.2.3.3.3. Einfluss eines Hämatoms auf das Wachstum von Tumoren.....	131
III.2.3.3.4. Radiologische Untersuchungen der Tumorentwicklung	132
III.2.4. Pharmakologische Modifikationen	133
III.2.4.1. Untersuchung des Einnistungsverhaltens mit Alu basierter qPCR	134
III.2.4.2. Untersuchung am Knochen.....	134
III.2.4.2.1. Radiographische Untersuchung der Knochen	134
III.2.4.2.2. Untersuchung der Knochendichte mit pQCT	135
III.2.4.2.3. Histomorphometrische Untersuchung der Knochen.....	137
III.2.4.2.3.1. Dynamische Histomorphometrie	137
III.2.4.2.3.2. Statische Histomorphometrie	139
III.2.4.2.4. Untersuchung der lokalen Umgebung des Knochenmarks	140
III.2.4.2.5. Untersuchung der Zytokinumgebung auf RNA Ebene mit qPCR.....	142
IV. Diskussion.....	144
IV.1. Die Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere des Matrixproteins Fibronectin bei der Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose.....	145
IV.1.1. Verschiedene Modelle der Leberfibrose	145
IV.1.2. Effekte des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose <i>in vivo</i>	146
IV.1.2.1. Effekte des Peptids pUR4b auf die Matrixbildung der Leber.....	146
IV.1.2.2. Effekte des Peptids pUR4b auf den Gesundheitszustand der Tiere	147
IV.1.2.3. Effekte des Peptids pUR4b auf unterschiedliche Zellen in der Leber	148
IV.1.2.3.1. Effekte des Peptids pUR4b auf die entzündlichen Zellen	148
IV.1.2.3.2. Einfluss des Peptids pUR4b auf die hepatischen Stellatezellen <i>in vivo</i>	149
IV.1.2.3.3. Einfluss des Peptids PUR4b auf die Bildung einer Fibronectinmatrix durch hepatische Stellatezellen <i>in vitro</i>	150
IV.1.2.3.4. Effekte des Peptids pUR4b auf das Zytokin TGF- β	150
IV.1.3. Mögliche pharmakologische Nutzung des Peptids pUR4b.....	152
IV.2. Der Einfluss der extrazellulären Matrix bei der Einnistung von Tumorzellen in die Stammzellnische im Knochen	153
IV.2.1. Das Metastasierungsmodell.....	153
IV.2.2. Applikation der Tumorzellen.....	154
IV.2.3. Detektion der eingenisteten Tumorzellen	154
IV.2.4. Lokalisation der Tumorzellen im Knochen	155

IV.2.5.	Der Einfluss der Ausschaltung des Fibronektins in verschiedenen Zelltypen und Organen auf die Einnistung von Tumorzellen	155
IV.2.6.	Einfluss des zellendogenen Fibronektins auf die Einnistung von Tumorzellen..	157
IV.2.7.	Der Einfluss eines Hämatoms auf die Einnistung von Tumorzellen und die Entwicklung von Tumorläsionen	160
IV.2.7.1.	Die Hämatominduktion.....	161
IV.2.7.2.	Der Einfluss eines Hämatoms auf die Einnistung von Tumorzellen.....	161
IV.2.7.3.	Der Einfluss eines Hämatoms auf das Tumorwachstum.....	162
IV.2.7.4.	Bestätigung der Biolumineszenzdaten durch eine radiographische Analyse.	162
IV.2.8.	Der Einfluss einer pharmakologischen Modifikation der osteoblastischen Nische auf die Einnistung von Tumorzellen.....	163
IV.2.8.1.	Die Lokalisation der eingestieteten Zellen im Knochen.....	163
IV.2.8.2.	Effekt des Parathormons auf die Einnistung von Tumorzellen.....	164
IV.2.8.3.	Effekt der Zoledronsäurebehandlung auf die Einnistung von Tumorzellen....	165
IV.2.8.4.	Effekt der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure auf die Einnistung von Tumorzellen	166
IV.2.8.4.1.	Die Auswirkungen der kombinierten Gabe von PTH und ZOL auf die Fibronektin- und Zytokinumgebung des Knochenmarks.....	167
IV.2.8.4.2.	Der Einfluss der Zytokinumgebung des Knochenmarks auf die Einnistung von Tumorzellen	168
IV.2.8.4.3.	Mögliche Gründe für eine veränderte Zytokinumgebung	170
V.	Zusammenfassung	173
VI.	Summary	175
VII.	Literaturverzeichnis	176
VIII.	Anhang	195
	Lebenslauf.....	194
	Danksagung.....	196
	Versicherung.....	197

Abkürzungen:

IIICS:	Type III connecting segment [engl.]
α -SMA:	Alpha smooth muscle actin [engl.]
α -MEM:	Advanced minimum essential medium [engl.]
Abb.:	Abbildung
abs.:	Absolut
Alb.:	Albumin
Aj.AR:	Adjusted apposition rate [engl.], angepasste Ablagerungsrate
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2 [engl.]
BFR:	Bone formation rate [engl.], Knochenbildungsrate
BMD:	Bone mineral density [engl.], Knochendichte
BMP:	Bone morphogenetic protein [engl.]
BMP-2:	Bone morphogenetic protein 2 [engl.]
BMU:	Basic multicellular units [engl.]
BSA:	Bovine serum albumin [engl.], Albumin aus Rinderserum
BS:	Bone surface [engl.], Knochenoberfläche
BrdU:	Bromdesoxyuridin
bzw.:	Beziehungsweise
ca.:	Circa [lat.], ungefähr
CCL2:	C-C motif ligand 2 [engl.], auch MCP-1
CCL5:	C-C motif ligand 5 [engl.], auch RANTES
CTC:	Circulating tumor cell [engl.], zirkulierende Tumorzelle
qPCR:	Quantitative real time polymerase chain reaction [engl.], quantitative Polymerase Kettenreaktion
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium [engl.]
DNA:	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure, DNS
doc:	Deoxycholate [engl.], Deoxycholat
doc sol:	Deoxycholate soluble [engl.], löslich in Deoxycholat
doc insol:	Deoxycholate insoluble [engl.], unlöslich in Deoxycholat
ECM:	Extracellular matrix [engl.], extrazelluläre Matrix
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent assay [engl.]
engl.:	Englisch
FACS:	Flow associated cell sorting [engl.], Durchflusscytometrie
FGF:	Fibroblast growth factor [engl.], Fibroblasten Wachstumsfaktor
FN:	Fibronektin
FPPS:	Farnesyl Diphosphat Synthase
FUD:	Functional upstream domain [engl.], funktionelle stromaufwärts gelegene Domäne
G-CSF:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor [engl.]

GRO:	Growth-regulated oncogene [engl.]
h:	Hora [lat.], Stunde
HA:	Hyaluronic acid [engl.], Hyaluronsäure
HSC:	Hematopoietic stem cell [engl.], hämatopoetische Stammzelle
IBF:	Interfakultäre biomedizinische Forschungseinrichtung
IGF:	Insulinlike growth factors [engl.]
IL-10:	Interleukin 10
IL-12:	Interleukin 12
IMDM:	Iscove's Modified Dulbecco's Medium [engl.]
i.p.:	Intraperitoneal
KC:	Keratinocyte chemoattractant [engl.]
LAP:	Latency associated protein [engl.]
lat.:	Lateinisch
LTBP:	Latent TGF- β binding protein [engl.]
Lsg.:	Lösung
M-CSF:	Macrophage colony-stimulating factor [engl.]
MCP-1:	Monocyte chemotactic protein 1 [engl.], auch CCL2
MFI:	Mean Fluorescence Intensity [engl.], Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP:	Matrix-Metalloprotease
mRNA:	Messenger ribonucleic acid [engl.], Boten RNA
MSC:	Mesenchymal stem cell [engl.], mesenchymale Stammzelle
NCAM:	Neural cell adhesion molecule [engl.]
NF- κ B:	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells [engl.]
Nk-Zellen:	Natürliche Killerzellen
OPG:	Osteoprotegerin
PI3-K:	Phosphatidylinositol 3-kinase [engl.]
PKB:	Protein kinase B [engl.], auch Akt genannt
PLVAP:	Plasmalemma vesicle associated protein [engl.]
pQCT:	Periphere quantitative Computertomographie
PTEN:	Phosphatase with tensin homology [engl.]
PTH:	Parathormon
RANK:	Receptor activator of nuclear factor kappa-B [engl.]
RANKL:	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand [engl.]
RANTES:	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted [engl.], auch CCL5
RLU:	Relative light unit [engl.], relative Lichteinheiten
RNA:	Ribonucleic acid [engl.], Ribonukleinsäure, RNS
ROS:	Reactive oxygen species [engl.], reaktive Sauerstoffspezies
s.c.:	Subcutan

SDF-1:	Stromal derived growth factor [engl.]
SPARC:	Secreted protein acidic and rich in cysteine [engl.], Osteonektin
SPF:	Spezifiziert pathogen frei
TGF- β :	Transforming growth factor beta [engl.]
TRAP:	Tartrate-resistant acid phosphatase [engl.], Tartratresistente saure Phosphatase
vs.:	Versus
ZOL:	Zoledronsäure

I. Einleitung

I.1. Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM, extracellular matrix [engl.]) unterliegt allen Epithelien und Endothelien und umgibt alle Bindegewebe. Hierdurch unterstützt sie alle Gewebe, Organe und auch den Gesamtorganismus mechanisch und gibt ihm physische Stärke [1]. Die ECM wurde vor einigen Jahren noch als natürlich vorkommendes extrazelluläres Substrat definiert, auf dem Zellen *in vivo* migrieren, proliferieren und sich differenzieren [2]. Schon damals war bekannt, dass die Aufgabe der extrazellulären Matrix darin bestand, die Adhäsion zu vermitteln, mit deren Hilfe die normale Zytoarchitektur verschiedener Gewebe beibehalten wird, und räumliche Verhältnisse unterschiedlicher Zelltypen zueinander zu definieren. Inzwischen ist die Vorstellung überholt, dass die extrazelluläre Matrix ausschließlich ein unterstützendes Material ist, welches von Zellen produziert wird, um auf oder in diesem Gerüst zu residieren. Weiterhin gültig ist, dass die extrazelluläre Matrix die physische Mikroumgebung der Zellen bildet und als Substrat für die Zellverankerung und als Gerüst für Gewebe dient. Darüber hinaus leitet sie die Migration der Zellen während der Embryogenese und der Wundheilung, übernimmt weitere Schlüsselrollen in der Morphogenese von Gewebe und ist für die Signalübermittlung von der Umgebung zu den Zellen verantwortlich [3]. Interaktionen zwischen der extrazellulären Matrix und den umgebenden Zellen lösen viele verschiedene Antworten aus, die für die Regulation der Genexpression, des Verhaltens und des Schicksals der Zellen von entscheidender Bedeutung sind [4-8].

Die extrazelluläre Matrix spielt demnach bei der Adhäsion, der Proliferation, der Migration, dem Überleben [9] und der Differenzierung der Zellen eine wichtige Rolle (siehe Abb.I.1.). Darüber hinaus reguliert sie die Angiogenese [10], dient als Wasserspeicher [11] und als Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren [12, 13].

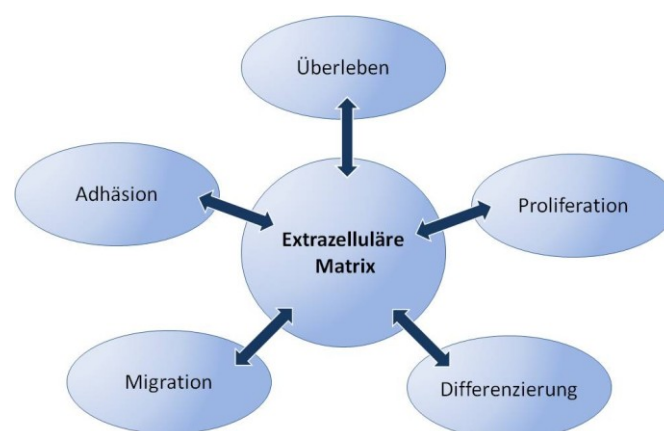


Abb.I.1. **Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen.** Die Zellen interagieren mit verschiedenen spezifischen Komponenten der extrazellulären Matrix. Hierdurch werden Adhäsion, Überleben, Proliferation, Differenzierung und Migration der Zellen beeinflusst. Die Zellen selbst beeinflussen durch Umbau und Neubildung die extrazelluläre Matrix. Abbildung in Anlehnung an [9].

I.1.1. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix weist eine hohe räumliche und funktionelle Differenzierung auf. Außer der interstitiellen Matrix existieren viele verschiedene Typen der extrazellulären Matrix, so z.B. eine kalzifizierte Form in Knochen und Zähnen, eine faserartige Form in Sehnen, eine durchsichtige Art in der Hornhaut und eine membranartige Form als Basalmembran (die Abgrenzung zwischen Bindegewebe und Epithelschicht).

In ihrem Aufbau besteht die extrazelluläre Matrix aus zwei Bereichen: der Basalmembran, einer flächenartigen komprimierten Matrixschicht bestehend aus *lamina lucida* und *lamina densa* und der interstitiellen Matrix (auch Stroma), die ein zellumgebendes faseriges poröses Netzwerk bildet. Die Grundstruktur beider Bereiche ist in den meisten Organen durch Kollagen definiert, das von einer Vielzahl von Stromazellen, hauptsächlich Fibroblasten, produziert und abgegeben wird. Dieses Kollagengerüst kann in der Zusammensetzung der Kollagene und deren dreidimensionaler Architektur sehr unterschiedlich sein. An diesem Gerüst adhären Glykoproteine wie Fibronectin, Laminin, Tenascin, Polysaccharide wie Hyaluronsäure und Proteoglykane wie Perlekan und Heparinsulfat und interagieren durch Matrixrezeptoren, in erster Linie Integrinen, mit den Zellen in oder an der extrazellulären Matrix [14, 15]. Die extrazelluläre Matrix ist trotz ihrer Gerüstfunktion nicht statisch, sondern unterliegt ständigen Umbauprozessen. Der Abbau wird durch Proteasen, in erster Linie den Matrix-Metalloproteasen (MMP) bewerkstelligt und der Aufbau erfolgt durch die Synthese und Ablagerung von ECM Komponenten [16]. Darüber hinaus ist die ECM ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Flüssigkeiten und ein wesentlicher Regulator in der Organisation von Geweben, zellulären Mikroumgebungen und Stammzellnischen [17]. Sogar das Immunsystem kann von der ECM beeinflusst werden. So fördern z.B. die Interaktionen zwischen Hyaluronsäure und regulatorischen T-Zellen über CD44 die funktionelle Unterdrückung der Proliferation von Responder-T-Zellen [18].

I.1.2. Interaktionen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix interagiert mit den Zellen über deren Zelloberflächenrezeptoren, die entweder Integrin- [19] oder nicht-Integrin Rezeptoren [20] sein können. Die ECM kann hierdurch die intrazelluläre Signaltransduktion und die Genexpression beeinflussen [21]. Integrine enthalten eine alpha- und eine beta- Untereinheit, die die Plasmamembran durchspannen und in kurzen zytoplastischen Domänen enden, die vermutlich die intrazelluläre Signalübertragung vermitteln [22]. Sie sind am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt, ermöglichen das Anheften der Zellen an diese und beeinflussen die Zellmigration entlang der ECM. Desweiteren bestimmen sie im Zusammenspiel mit Rezeptoren für lösliche Faktoren das Schicksal von Zellen, welches das Überleben, die Proliferation und Differenzierung einschließt [23]. In verschiedenen ECM Glykoproteinen (z.B. Fibronectin und Laminin) wurden viele Bindedomänen für Zellen, weitere Glykoproteine, Glukosaminoglykane und Glykolipide nachgewiesen [24]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll jedoch vornehmlich auf die Rolle des Fibronectins eingegangen werden.

I.1.2.1. Die Rolle des Fibronektins

Fibronectin (FN) ist ein ubiquitäres extrazelluläres Matrix-Glykoprotein-Dimer mit einer Größe von ca. 500kDa [25], welches in fast allen Geweben, auf Zelloberflächen, im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten vorkommt [26]. Es kann sowohl in einer löslichen Form im Plasma (in der Konzentration 300µg/ml) als auch in einer unlöslichen Variante in der extrazellulären Matrix vorliegen [27]. Die lösliche Form, das Plasmafibronectin wird von den Hepatozyten der Leber produziert, die unlösliche Form, das zelluläre Fibronectin wird hauptsächlich von Fibroblasten, aber auch einer Vielzahl anderer Zellen (wie z.B. Endo- und Epithelzellen, Osteoblasten, Myoblasten, Granulozyten und Makrophagen) gebildet [28].

I.1.2.1.1. Die Struktur des Fibronektins

Das Fibronectin-Dimer formt sich durch ein Paar antiparalleler Disulfid Bindungen am C Terminus der Monomere [29, 30]. Jedes der Monomere besteht aus drei Typen sich wiederholender homologer Sequenzen, die als Typ I, Typ II und Typ III Module bekannt sind. Fibronectin enthält 12 Typ I Module, zwei Typ II Module und 15-17 Typ III Module, die zusammen ca. 90% der Fibronectinsequenz ausmachen [25] (siehe Abb.1.2). In jedem Typ I und Typ II Modul bilden sich zwei intramolekulare Disulfidbrücken, um die gefaltete Struktur zu stabilisieren. Typ III Module sind siebensträngige β -Faltblattstrukturen, denen stabilisierende Disulfide fehlen [27, 31]. Daher können sie sich entfalten, hierdurch die Gesamtfibronectinlänge vergrößern und versteckte Bindungsstellen im Protein freilegen [32-34]. Es existieren 12 verschiedene Isoformen des Fibronektins in Mäusen (20 in Menschen), die jedoch alle von einem einzigen Gen codiert werden [17, 25, 35]. Sie werden posttranskriptional durch alternatives Spleißen der mRNA (messenger ribonucleic acid [engl.], Boten Ribonukleinsäure, RNS) gebildet, indem drei Regionen der Fibronectin mRNA variiert werden. Die Einheiten der Typ III Module EDA und EDB können je entweder vollständig entfernt werden, oder in der mRNA und somit im Protein verbleiben. Die variable Region, auch IIIICS (type III connecting segment [engl.]) genannt, besteht aus drei Abschnitten, die an- oder abwesend sein können, so dass ihre Größe variiert. Sie kann auch vollständig abwesend sein, muss aber in mindestens einem der beiden Fibronectin Monomere vorhanden sein, um die Bildung von Fibronectin Dimeren zu ermöglichen [36].

len Adhäsionen zugeschrieben [48]. Der Hyaluronsäure-Rezeptor (CD44) bindet an Fibronectin [48, 49] und es ist wahrscheinlich, dass Zellen über weitere, noch unbekannte Motive Kontakt mit Fibronectin aufnehmen.

I.1.2.1.3. Die Aufgaben des Fibronectins

Fibronectin erfüllt durch Interaktion mit sich selbst und anderen Zellen eine Vielzahl verschiedener Aufgaben. Diese reichen von der Mitwirkung an der Bildung der ECM über die Beteiligung an der Embryogenese bis hin zur Beeinflussung des Verhaltens einzelner Zellen.

I.1.2.1.3.1. Der Aufbau eines Fibronectinnetzwerks als Grundlage für die Bildung einer funktionalen extrazellulären Matrix

Bereits der Name des Fibronectins (fibra, Faser; nectere, verknüpfen [lat.]), der früher im Deutschen auch „Zellkleber“ lautete, weist auf die Funktion des ca. 500kDa großen Glykoproteins hin. Es kann mit einer Vielzahl von Bindungspartnern interagieren, vermittelt eine Reihe zellulärer Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und ist für Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von großer Bedeutung [37, 50]. Viele Matrixproteine wie z.B. Kollagen, Fibrillin, Fibulin, *latent TGF- β binding protein* (LTBP) und Tenascin-C benötigen Fibronectin für ihren Einbau in die extrazelluläre Matrix [51-55]. Einige dieser Proteine interagieren direkt mit Fibronectinfibrillen, andere scheinen die Fibronectinmatrix als Gerüst zu nutzen, an dem sie unabhängige Fasern ablagern [17].

Der Aufbau eines fibrillären Netzwerkes erfolgt durch Interaktion des Fibronectins mit weiteren Fibronectin-Molekülen. Es wird verstärkt durch den Einbau von zirkulierendem löslichen Plasmafibronectin, welches in das Gewebe diffundiert [56, 57]. Da im Blutstrom eine versehentliche Umwandlung von größeren Mengen löslichen Fibronectins in unlösliche Aggregate verheerende Konsequenzen hätte, ist die Bildung und Ablagerung von Fibronectin Fibrillen ein stark regulierter zellgesteuerter Prozess [58]. Dieser ist von einer Reihe verschiedener Ereignisse reguliert, in die das Aktin-Zytoskelett und Integrinrezeptoren involviert sind [59]. Hierbei bindet hauptsächlich Integrin $\alpha_5\beta_1$ Fibronectin an die Zelloberfläche, und fördert dort, wahrscheinlich durch die Induktion einer Formationsveränderung, die Polymerisation des Fibronectins [60, 61]. In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Fibronectin Fragmente, die die $\alpha_5\beta_1$ bindende Domäne enthielten, oder Antikörper gegen diese Domäne bzw. gegen $\alpha_5\beta_1$ Integrin, die Fibronectin Matrix Bildung verhinderten. Daher geht man von einer wesentlichen Rolle von $\alpha_5\beta_1$ Integrin bei der Bildung der Fibronectin Matrix aus [62-64]. *In vivo* Experimente in Mäusen zeigten jedoch, dass trotz einer konditionellen Ausschaltung von $\alpha_5\beta_1$ Integrinrezeptor noch Fibronectin Fibrillen gebildet werden konnten [65, 66]. Dies liegt daran, dass auch andere Integrine (z.B. $\alpha_v\beta_3$), wenngleich mit geringerer Effizienz, die Fibronectinmatrix Bildung unterstützen und auch noch unbekannte, nicht-Integrin Rezeptoren, bei dieser anfänglichen Zelloberflächenbindung eine Rolle spielen könnten [67, 68].

I.1.2.1.3.2. Die Rolle des Fibronektins bei der Embryogenese

Fibronectin hat für den Organismus eine lebenswichtige Bedeutung. Mäuse, bei denen Fibronectin ausgeschaltet wurde und die daher nicht in der Lage sind Fibronectin zu produzieren, versterben am Tag 8,5 *in utero*. Dies ist in erster Linie auf schwere mesodermale, vaskuläre und neuronale Schädigungen zurückzuführen [69]. In der Fibronectinmatrix sind Informationen über die Position eingepreßt, die zur richtungsabhängigen Migration des Mesoderms beitragen [70, 71]. Diese könnten eine wichtige Aufgabe bei der Erhaltung der rechtslinks Asymmetrie des Embryos haben [72]. Bei Hühnerembryonen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Fibronectin zur Entwicklung zweier voneinander getrennten Herzen auf sowohl der rechten als auch der linken Seite des Embryos führt, da die korrekte Positionierung entlang der embryonalen Mittellinie beeinträchtigt ist [73]. Aufgrund der Fehlbildung der Basalmembran, wird die Entstehung des vaskulären Systems im Dottersack durch Endothelzellen gestört [74].

I.1.2.1.3.3. Die Rolle des Fibronektins bei der Proliferation und der Apoptose

Die Bindung von Fibronectin an Integrin Rezeptoren dient nicht ausschließlich zur Bildung eines Fibronectin Netzwerkes, sondern übernimmt auch wesentliche Aufgaben bei der Signaltransduktion in das Innere der Zellen. Hierdurch können unter anderem Proliferation, Zellmigration und Apoptose reguliert werden [75, 76]. Es wurde gezeigt, dass Fibronectin einen proliferationsfördernden Effekt auf verschiedene Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen [77], Brustepithelzellen [78], Osteoblasten [79], T-Zellen [80], Karzinomzellen [81] und Bronchialepithelzellen [77] ausübt. Darüber hinaus wird Zellwachstum durch einen Mechanismus stimuliert, der die Polymerisation von Fibronectin in die extrazelluläre Matrix benötigt [82].

Am Beispiel von Bronchialepithelzellen konnte gezeigt werden, dass Fibronectin durch Bindung an den $\alpha_5\beta_1$ Rezeptor die Phosphorylierung von PKB (protein kinase B [engl.], auch Akt genannt), einem stromabwärts liegendem Signal von PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase [engl.]), aktiviert, die DNA (Desoxyribonucleic acid [engl.], Desoxyribonukleinsäure, DNS) Bindung von NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells [engl.]) und damit die p65 Protein Expression erhöht. Hierdurch wird die Expression von c-Myc und cyclin D1 erhöht und die von p21 und PTEN (phosphatase with tensin homology [engl.]) vermindert, wodurch eine Erhöhung der Proliferation und eine Verminderung der Apoptose herbeigeführt wird [77]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Bindung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins an Fibronectin die Apoptose von CHO- Zellen (chinese hamster ovary [engl.]) verhindert, wobei dieser Effekt mit einer erhöhten Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 [engl.]) in Zusammenhang gebracht wird [83].

I.1.2.1.3.4. Die Rolle des Fibronektins bei der Adhäsion und der Migration

Auch die Adhäsion und Migration verschiedener Zelltypen wird von Fibronectin beeinflusst. Wahrscheinlich stellt Fibronectin eine Matrix für die Anheftung migrierender Zellen zur Verfügung.

Es wurde in verschiedenen Versuchen gezeigt, dass Fibronectin die Bewegung von Epithelzellen erhöhen kann [84, 85]. Weiterhin beeinflusste die Anwesenheit von Fibronectin im Kollagen Substrat die adhäsiven und migratorischen Eigenschaften von T-Lymphozyten *in vitro* [86].

Insbesondere im Zusammenhang mit Tumorzellen spielt die Beeinflussung der Adhäsion und Migration durch Fibronectin eine wichtige Rolle. Daher wird auf diesen Aspekt in Abschnitt I.1.2.1.4.2 etwas detaillierter eingegangen.

I.1.2.1.4. Fibronectin bei pathologischen Veränderungen

Fibronectin wird mit zahlreichen Krankheiten assoziiert. Bei fibrotischen Krankheiten, Keloiden und hypertrophischen Narben findet sich defekte oder überschüssige Fibronectin Matrix [87, 88]. Viele Tumorarten sind mit erhöhter Fibronectinexpression assoziiert und auch in der Wundheilung spielt Fibronectin eine wichtige Rolle.

I.1.2.1.4.1. Die Rolle des Fibronectins bei der Gerinnungskaskade und während der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein sehr komplexer und dynamischer Prozess, der exakt koordinierte Zellbewegungen, ECM Ablagerung und Degradation sowie Veränderungen der Genexpression und der Signaltransduktion der Zellen benötigt [89]. Fibronectin ist während des gesamten Prozesses an den Stellen des verletzten Gewebes anwesend. Vermutlich werden bereits während des Prozesses der Verletzung, bei der Zerstörung der extrazellulären Matrix, durch die Freisetzung von ECM Fragmenten, Monozyten chemotaktisch angelockt [90]. Es wurde nämlich gezeigt, dass Monozyten von Fibronectinfragmenten, die die Zellbindedomäne (RGD Sequenz) enthalten, angezogen werden [91, 92].

Während der Blutgerinnung wird Fibronectin zur Bildung eines Gerinnsels (thrombus [gr.]) benötigt und ist neben Thrombozyten, Leukozyten und Fibrin eine Hauptkomponente dieser provisorischen Matrix [93, 94]. Der Thrombus hat in erster Linie die Aufgabe, die Integrität der Gefäße wiederherzustellen und dient darüber hinaus als temporäres Gerüst für die anschließenden Heilungsprozesse. Der Blutgerinnungsfaktor XIIIa katalysiert die Verknüpfung von löslichem Fibronectin mit dem Fibrin Thrombus [29, 95] und vermittelt darüber hinaus die kovalente Bindung zwischen zellulärem Fibronectin und Fibrin [59, 95, 96], wodurch eine Matrix entsteht, die der Migration und Adhäsion weiterer Zellen dienen kann [66, 97, 98]. Es wurde gezeigt, dass Fibronectin für die Migration von Zellen in die Blutgerinnsel von großer Bedeutung ist, da Zellen nicht in der Lage waren in fibronectinfreie Blutgerinnsel einzuwandern [99]. Im weiteren Verlauf der Wundheilung wird Fibronectin von Fibroblasten (die jetzt Myofibroblasten genannt werden), Endothelzellen und Makrophagen [100] produziert und aneinandergesetzt um Granulationsgewebe zu bilden [37, 101]. Gegen Ende der Wundheilung wird Fibronectin durch Kollagen ersetzt, und verbleibt in nur noch geringen Mengen [59]. Hierbei kann Fibronectin mit Kollagen verknüpft

sein und diese Reaktion ist wahrscheinlich von großer Bedeutung für die Kollagen Fibrillogenese [96].

I.1.2.1.4.2. Die Rolle des Fibronektins bei Tumorerkrankungen

Unter einem Tumor (tumor [lat.], Geschwulst, Schwellung, umgangssprachlich auch „Krebs“ genannt) versteht man eine räumlich begrenzte Zunahme von Gewebe, die aus abnorm starkem Zellwachstum resultiert [102]. Somit kann mit dem Begriff Tumor auch ein Ödem, eine Entzündung, eine Zyste oder ein Geschwulst bezeichnet werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird ausschließlich von bösartigen (malignen) Tumoren die Rede sein. Sie unterscheiden sich von gutartigen (benignen) Tumoren durch invasives destruierendes Wachstum in umgebendes Gewebe und die Fähigkeit, fernab des Primärtumors, oftmals auch in anderen Organen, Streuherde zu bilden. Diesen Prozess, bei dem sich Zellen vom Primärtumor absondern um in den Kreislauf zu gelangen und daraufhin andere Körperregionen zu befallen, bezeichnet man als Metastasierung [103]. Während der Metastasierung durchlaufen die Tumorzellen eine Reihe aufeinanderfolgender Schritte, in denen sie sich durch zellphysiologische Veränderungen immer wieder an neue Mikroumgebungen anpassen müssen (siehe Abb.1.3).

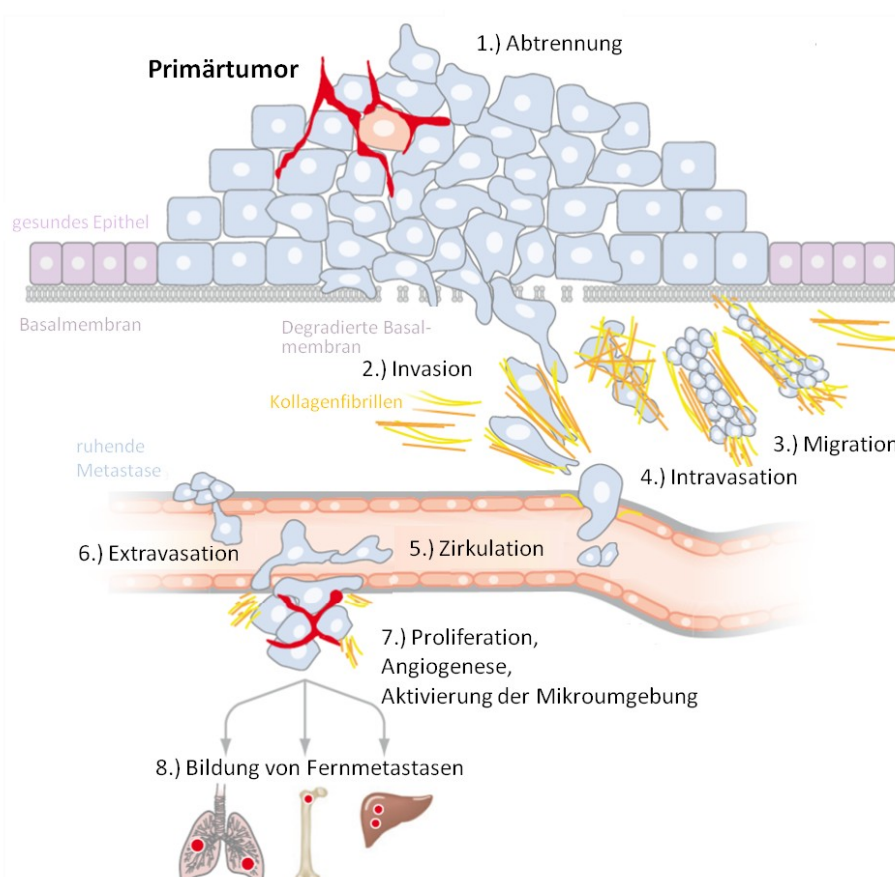


Abb.1.3. **Schematische Übersicht über den Metastasierungsprozess.** Nach Lösung aus dem Zellkollektiv (1) und Degradierung der Basalmembran, dringen die Tumorzellen in das umliegende Stroma ein (2), migrieren (3), durchdringen Blut oder Lymphgefäße (4) und werden mit Blut oder Lymphe transportiert (5), bis sie in den Kapillaren eines fernen Organs adhären, aus den Gefäßen auswandern (6) und Fernmetastasen bilden (7,8). Abbildung in Anlehnung an [104].

Im Metastasierungsprozess ist Fibronektin wahrscheinlich in jedem der einzelnen Schritte involviert, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Ablösung aus dem Zellkollektiv (Abb.I.3.: 1.):

Zunächst müssen die Tumorzellen in der Lage sein, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen. Hierbei verlieren die Zellen Zelladhäsionsmoleküle [105, 106] und umgehen apoptotische Signale, die durch den Kontaktverlust zu den benachbarten Zellen (anoikis, Heimatlosigkeit [gr.]) und der extrazellulären Matrix [107] und dem Verlust der zytoskelettalen Architektur (amorphose, a, ohne; morphose, Gestaltung [gr.]) [108] hervorgerufen werden. Da Fibronectin die Regulation der Zelladhäsion beeinflusst [109, 110], durch Interaktion mit Zellen Signaltransduktionswege initiieren kann, die die Apoptose regulieren [77, 83, 111], und einen Einfluss auf *Anoikis* hat [112], ist eine Beteiligung des Fibronectins bei der Ablösung der Zellen aus dem Kollektiv wahrscheinlich.

Invasion und Migration (Abb.I.3.: 2., 3.):

Nachdem sich die Zellen aus dem Zellkollektiv abgetrennt haben, müssen sie, in einem als Invasion bezeichneten Prozess, an der Basalmembran adhären, diese teilweise durch proteolytischen Verdau durchdringen, daraufhin durch die Membran migrieren und sich in der extrazellulären Matrix ausbreiten [109]. Die Interaktion zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix ist von entscheidender Bedeutung für die Adhäsion und auch die Migration von Zellen. Die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix ist eine Voraussetzung für das spätere Durchdringen der Matrix [113]. Obwohl verschiedene Tumorzellarten Matrix-Metalloproteasen (MMP) produzieren und sezernieren können, um die Basalmembran zu durchdringen, stimulieren sie meist umliegende Stromazellen dazu, MMPs abzugeben [113, 114]. Die Bindung von Fibronectin an das Integrin $\alpha_5\beta_1$ initiiert Expression und Sekretion der Matrix-Metalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 [113, 115]. Diese Enzyme degradieren die vaskuläre Basalmembran und ermöglichen dadurch die Migration und Invasion von Zellen [116]. Die Degradation der extrazellulären Matrix wird als eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Invasion durch Tumorzellen gesehen [117, 118]. Es konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$, welches von verschiedenen Tumorzellen, darunter auch Brustkrebszellen, exprimiert wird, durch die Bindung an verschiedene Matrixproteine, wie z.B. Fibronectin, die Adhäsion von Zellen an die Matrix erleichtert [119] und zu einem aggressiven metastatischen Verhalten führt. Durch die Inhibierung der Integrinbindung mit spezifischen Antikörpern oder Peptiden mit RGD Sequenz konnte dieses Verhalten unterdrückt werden [120-123]. Weiterhin fördert das α_5 Integrin die Migration von MDA-MB-231 Zellen in Richtung des Fibronectins des Zielorgans [109].

Intravasation (Abb.I.3.: 4.):

Um über weitere Entfernungen zu migrieren, dringen die Tumorzellen während des Prozesses der Intravasation (intra, innerhalb; vas, Gefäß [lat.]) in die Blut- oder Lymphgefäße ein. Auch hierbei müssen die Tumorzellen wie bei der Invasion (s.o.) zunächst an die Stromazellen der Gefäße adhären und anschließend die Basalmembran (nicht bei lymphatischen Gefäßen, denn diese besitzen keine Basalmembran) degradieren, um daraufhin in den Blut- bzw. Lymphkreislauf

zu gelangen. Diese Prozesse verlaufen annähernd analog zu denen in der oben beschriebenen Invasion [104]; auch die Beteiligung des Fibronektins in diesen Prozessen verhält sich in ähnlicher Weise wie oben beschrieben. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird speziell auf den Blutkreislauf eingegangen, da die Migration der Tumorzellen über die Lymphgefäße in den in dieser Arbeit untersuchten Modellen keine Relevanz hat.

Zirkulation, Extravasation (Abb.I.3.: 5., 6.):

Nach dem Eindringen der Tumorzellen in die Blutzirkulation sind sie den Abwehrmechanismen des Immunsystems und großen mechanischen Belastungen wie z.B. Scherkräften ausgesetzt [104]. Hierdurch sind nur weniger als 1% der Tumorzellen die in den Blutkreislauf gelangen in der Lage Metastasen zu bilden [124]. Einige Tumorzellen bilden Aggregate mit Leuko- und/oder Thrombozyten [125, 126] oder mit anderen Tumorzellen [127, 128]. Diese dienen vermutlich dazu, sich vor den im Blutkreislauf auftretenden Scherkräften zu schützen und die Adhäsion und Extravasation (extra, außerhalb; vas, Gefäß [lat.]; Austreten der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf) im Zielorgan zu erleichtern, da diese Aggregate in kleinen Kapillaren steckenbleiben können [129]. Eine andere Hypothese, warum nur so wenige Zellen den Blutstrom überleben, besagt, dass nur eine kleine Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTC, circulating tumor cells [engl.]), sogenannte Tumorstammzellen ein adäquates Integrinprofil haben, um am Zielorgan zu adhären. Es gibt Arbeiten, die vermuten, dass Fibronektin einen Adhäsionsgradienten bereitstellt, der wichtig für die Extravasation der Tumorzellen ist [130].

Proliferation, Angiogenese, Aktivierung der Mikroumgebung und Bildung von Fernmetastasen (Abb.I.3 7., 8.):

Letztendlich bilden die Tumorzellen in der neuen Umgebung durch Proliferation, Angiogenese (angeion, Gefäß; genesis, Entstehung [gr.]) und einen Umbau der Mikroumgebung Fernmetastasen [131] oder verbleiben in einem Ruhezustand (dormancy [engl.]). Das weitere Tumorstadium über eine Größe von 1mm^3 hinaus ist von der Entwicklung eines neuen Gefäßsystems abhängig [108, 132], das benötigt wird um den gewachsenen Tumor zu versorgen. In diesen Prozess sind in erster Linie Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) involviert, indem diese durch proteolytische Degradation den Weg für die Migration von Endothelzellen zur Bildung neuer Blutgefäße ebnet. Auch hierbei ist Fibronektin, wie bereits bei der Invasion beschrieben, an der Expression und Sekretion dieser Proteasen beteiligt.

Im Allgemeinen konnte bei einer Vielzahl verschiedener Tumorarten eine erhöhte Fibronektin Expression gezeigt werden, die mit einem invasiven, stark metastatischen Phänotyp assoziiert werden konnte [133-135]. Bei malignen Melanomzellen konnte nachgewiesen werden, dass diese ihr Invasions- und Metastasierungspotenzial durch den Aufbau einer fibronektinreichen und somit promigratorischen Matrix erhöhen [136]. Andere Studien zeigen, dass Fibronektin wichtig für die Invasion, Beweglichkeit und Ausbreitung von Plattenepithelkarzinomzellen ist [137]. Weiterhin

konnte in Experimenten gezeigt werden, dass sowohl die Gabe von Antikörpern gegen α_5 als auch gegen β_3 Integrin eine Metastasenbildung nach intravenöser Injektion von MDA-MB-231 Zellen verhinderte [138]. All diese Ergebnisse weisen auf die essentielle Rolle des Fibronektins im Metastasierungsprozess hin.

Metastasen sind von einem Zusammenspiel zwischen bestimmten Tumorzellen und spezifischen Organen abhängig [139]. In Abschnitt I.2.2.3 wird diese Thematik im Zusammenhang mit Brustkrebszellen diskutiert.

Die Entwicklung eines Tumors geht mit grundlegenden Änderungen in der Verteilung und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix einher [140]. Viele Tumore induzieren einen Umbau der extrazellulären Matrix und verändern die Regulation verschiedener Matrixproteine [141]. Abgesehen von der Fehlregulation des Zellzyklus ist eine Disregulation der Interaktion zwischen Tumorzellen und der umliegenden extrazellulären Matrix eine der wenigen Gemeinsamkeiten, die viele verschiedene Tumore miteinander teilen [142].

I.1.2.1.4.3. Die Rolle des Fibronektins bei Fibrose

Auch bei anderen Krankheitsmodellen sind Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix in die Pathogenese involviert. Eine Fibrose resultiert aus verstärkter Synthese oder verstärktem Umbau der extrazellulären Matrix, was zu einer anormalen Anlagerung von fibrillären Kollagenen (in erster Linie Kollagen Typ I) führt [143]. Somit kann eine Fibrose als Ergebnis einer Reihe von longitudinalen ECM Veränderungen gesehen werden [144]. Sie wird oftmals als anormale Form der Wundheilung beschrieben, in der die Bildung einer provisorischen Matrix (siehe I.1.2.1.4.1) voranschreitet statt sich wieder aufzulösen. Dieser Prozess führt zu Störungen der normalen Gewebearchitektur und Funktion [145]. Analog zur Beteiligung des Fibronektins (siehe I.1.2.1.4.1) bei der Wundheilung, ist Fibronektin auch bei Fibrose involviert. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass zwei Fibronektin Isoformen die Schwere der Fibrose in Hepatitis C Patienten widerspiegeln [146].

I.2. Das Leberfibrosemodell

Da im Folgenden auf einen pathologischen Zustand der Leber eingegangen wird, soll zunächst eine kurze Übersicht über den Aufbau, die Funktion und die Bedeutung der Leber gegeben werden.

I.2.1. Der Aufbau der Leber

Die Leber ist die größte Drüse im menschlichen (und auch murinem) Körper und wird von einer dichten Bindegewebskapsel, der Glisson-Kapsel umgeben. Die Leber übernimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel, bildet verschiedene Bluteiweiße, Abwehrstoffe und Galle und speichert Vitamine und Nährstoffe, die sie nach und nach an den Blutkreislauf abgibt [147]. Darüber hinaus baut sie Gifte ab, bevor diese in den weiteren Blutkreislauf gelangen. Das Organ unterteilt sich in mehrere Leberlappen, deren Anzahl zwischen verschiedenen Spezies variiert. In der Mitte der Leber befindet sich an ihrer Unterseite (*facies visceralis*) die Leberpforte (*porta hepatis*), die sich aus drei Strukturen, nämlich der Leberarterie (*arteria hepatica*), der Pfortader (*vena portae*) und dem Gallengang (*ductus choledochus*) zusammensetzt. Je weiter diese drei Strukturen in das Innere des Organes eindringen, desto stärker verästeln sie sich und desto feiner werden sie. Arterien und Venen dienen dem Transport von Blut durch das Organ und dessen Versorgung mit Sauerstoff.

Das Blut aus Magen, Dick- und Dünndarm, Milz und Bauchspeicheldrüse läuft in der Pfortader zusammen und wird in die Leber transportiert. Dieses Blut ist sauerstoffarm, nährstoffreich und führt auch Abbauprodukte mit sich. Sauerstoffreiches Blut hingegen führt die Leberarterie mit sich [148, 149]. In den Sinusoiden treffen das sauerstoffreiche Blut aus der Leberarterie und das nährstoffreiche Blut aus der Pfortader und kann dort von den Leberzellen (Hepatozyten, *hepar* [gr.], Leber) verstoffwechselt werden. Von den Sinusoiden aus wird das Blut über die Zentralvene abtransportiert und verlässt das Organ über die Lebervene (*vena hepatica*). Die Gallengänge hingegen sind für den Transport der Galle aus der Leber verantwortlich.

I.2.2. Die Funktionen der Leber

Wie bereits erwähnt übernimmt die Leber eine zentrale Rolle im Stoffwechsel. Hier ist sie auf der einen Seite für die Energieversorgung des Organismus zuständig, indem sie die Nährstoffe aufnimmt und verwertet, und auf der anderen Seite für die Biosynthese und Entsorgung verschiedener Stoffe verantwortlich [150].

Die Leber ist an der Regulierung des Glukose-, Fett und Eiweißstoffwechsels beteiligt und fungiert als Glukostat, indem sie Zucker als Glykogen speichert, und ihn bei Bedarf vor allem für das Gehirn und die Erythrozyten wieder freisetzt (Glykogenese) [151]. Die Leber kann auch selbst

Glukose bilden (Glykoneogenese), indem sie Proteine und Fette abbaut und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle im Aminosäurekatabolismus.

Die Leber baut sowohl endogene Substanzen (wie z.B. Serumproteine und Hormone) als auch exogene und toxische Substanzen ab [152]. Sie synthetisiert eine Vielzahl an Plasmaproteinen (wie z.B. Albumin) und hält sie im Gleichgewicht, indem sie diese auch wieder abbaut. Auch Gerinnungsfaktoren wie Prothrombin und Fibrinogen sowie Protein C und S und Antithrombin werden von der Leber gebildet. Darüber hinaus wirkt sie auch pH-regulierend, indem sie überschüssiges basisches Ammoniak in Harnstoff umbaut, der ausgeschieden wird. Auch für das Hormonsystem ist die Leber von Bedeutung, da hier sowohl zirkulierende glanduläre Hormone durch Abbau inaktiviert werden, als auch Hormone und Mediatorsubstanzen synthetisiert werden. Letztendlich übernimmt die Leber noch eine wesentliche Aufgabe für den Blutkreislauf, indem sie als aktiver und passiver Blutspeicher wirkt und produziert Gallenflüssigkeit, die im Dünndarm zur Fettabsorption benötigt wird [150].

I.2.3. Die Histologie der Leberläppchen

Die Leber ist aus einer Vielzahl von Leberläppchen (*lobuli hepatici*) aufgebaut, die durch Bindegewebe voneinander abgegrenzt werden. Sie haben eine Größe von ca. 1-2 mm und im Querschnitt eine sechseckige Form, in deren Mitte sich die Zentralvene befindet und die an ihren Eckpunkten mit je zwei weiteren Leberläppchen zusammenstoßen [153]. An diesen Eckpunkten, die periportale Trias (auch Periportalfeld oder Glisson-Trias) genannt werden, befindet sich je ein kleiner Gallengang, eine Portalvene und eine Arterie, die die Leberläppchen mit Blut versorgen und die Galle abführen [154]. Das Blut fließt vom Periportalfeld durch die Lebersinusoiden (*vena intralobularis*), an den strangförmig angeordneten Hepatozyten (Leberzellbalken) vorbei zur Zentralvene, die sich mit anderen Zentralvenen zu immer größeren Gefäßen vereinigt und letztendlich als Lebervene die Leber verlässt (siehe Abb.I.4.).

Da die Lebersinusoiden mit einem unterbrochenen, fenestrierten Endothel ausgekleidet sind, können mit dem Blut transportierte Stoffe aus den Gefäßen in den Dissé-Raum gelangen [155]. Dieser ist ein schmaler Raum, der sich zwischen den Wänden der Sinusoiden und den Hepatozyten befindet (siehe Abb.I.4.). Hier nehmen die Leberzellen über ihre durch Mikrovilli vergrößerte Oberfläche Nähr- und Abfallstoffe für die weitere Verarbeitung aus dem Blut auf. In dem Endothel der Sinusoiden befinden sich die Makrophagen der Leber, die sogenannten Kupfferzellen und innerhalb des Dissé-Raums befinden sich die lipidspeichernden hepatischen Stellatezellen (auch Sternzellen, Ito-zellen) [156].

Darüber hinaus findet sich in den Leberläppchen ein System von Gallenkapillaren, welches nicht mit den Lebersinusoiden verbunden ist. Die Gallenkapillaren besitzen keine Zellwand, sondern nutzen die Zellmembranen benachbarter Leberzellen. Der Gallenfluss verläuft in entgegengesetz-

ter Richtung des Blutflusses, nämlich von der zentralen Region der Leberläppchen zum Periportalfeld und wird von dort aus in immer größer werdenden Gallengängen über den *ductus choledochus* aus der Leber geführt.

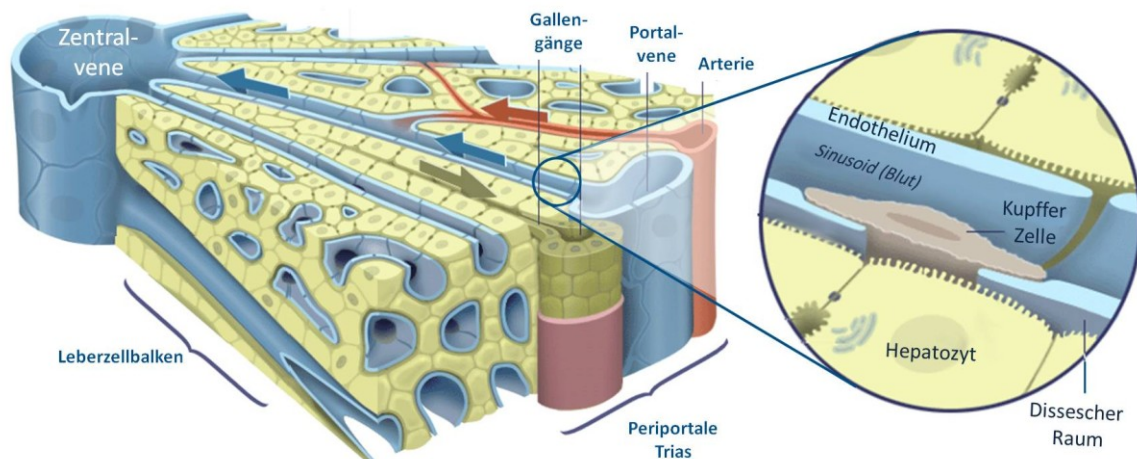


Abb.I.4. **Schematische Abbildung des Aufbaus eines Leberläppchens.** Dargestellt sind ein kleiner Ausschnitt eines Leberläppchens mit den periportalen Trias, der Zentralvene und einem vergrößerten Ausschnitt, der den Blutstrom in den Sinusoiden der Leber verdeutlichen soll. Abbildung verändert nach [157].

I.2.4. Ursachen, Klinik und Verlauf einer Leberfibrose

Die Ursachen einer Leberfibrose sind vielfältig und reichen von Viralerkrankungen (z.B. Hepatitis B oder C), Autoimmunerkrankungen, über Chemikalien induzierte bis hin zu cholestatischen und metabolischen Erkrankungen [158]. Die Diagnose der an Fibrose erkrankten Menschen gestaltet sich jedoch noch als schwierig, da es in den anfänglichen Stadien außer einer Biopsieentnahme wenige Diagnosemarker gibt und bis zu 40% der Patienten asymptomatisch sind (und das zum Teil über ein Jahrzehnt auch bleiben). Die anfänglichen Stadien der Krankheit sind noch reversibel [159]. Bei 20-40% [160] der erkrankten Patienten entwickelt sich jedoch eine Leberfibrose zum schwereren und nicht mehr reversiblen Stadium der Leberzirrhose [161]. Diese kann als Endstadium der Fibrose des hepatischen Parenchyms betrachtet werden, in dem durch die Knotenbildung des vernarbten Gewebes die Leberfunktion verändert ist. Sobald Komplikationen wie Aszites, Varizenblutung oder Enzephalopathie auftreten, ist eine voranschreitende Verschlechterung unausweichlich. Diese Patienten haben eine 50%ige Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten 5 Jahre zu versterben und ca. 70% dieser Todesfälle sind direkte Folgen der Lebererkrankung.

I.2.5. Histologische Veränderungen während einer Leberfibrose

Die Leberfibrose ist eine „Vernarbung“ der Leber, die als Folge chronischer Lebererkrankungen auftritt. Sie ist das Resultat der Schädigung von Parenchymzellen unterschiedlicher Ätiologien und den darauf folgenden Entzündungsreaktionen [162]. Sie zeichnet sich durch die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine aus. Da besonders die Bereiche der Lebersinusoiden durch struktu-

relle und funktionelle Veränderungen betroffen sind, wird im Folgenden in erster Linie auf diesen Bereich der Leber eingegangen.

I.2.5.1. Veränderungen der extrazellulären Matrix

Obwohl sich die gesunde Leber in erster Linie aus Parenchymzellen und nur wenig fibrillärem Gewebe (weniger als 3% der relative Fläche) [163] aufbaut, spielt die extrazelluläre Matrix sowohl in der Physiologie als auch der Pathologie der Leber eine wichtige Rolle [164, 165]. Die extrazelluläre Matrix der Leber besteht in erster Linie aus Fibronektin und Kollagen Typ I, wobei auch geringere Mengen Typ III, IV, V und VI vorkommen [165]. In der Leber ist die extrazelluläre Matrix auf die Glisson-Kapsel (*tunica fibrosa*), die Portalbereiche, die Zentralvenen und die Wände der Sinusoiden beschränkt.

Da die ECM in der Leber einen Teil der direkten Grenze zwischen dem Parenchym und dem Blutfluss darstellt, ziehen sowohl qualitative als auch quantitative Veränderungen der ECM viele unmittelbare und schädliche Folgen nach sich [166]. Die Sinusoide der Leber besitzen große Fenestrierungen (bis zu 300nm), die bis zu 40% der Sinusoidoberfläche ausmachen, haben Lücken zwischen den Endothelzellen, keine Basalmembran und sind daher sehr permeabel. So kann ein bidirektionaler Austausch von Makromolekülen zwischen den Sinusoiden und den Leberzellen, die auch von keiner Basalmembran umgeben sind, stattfinden [167]. Alle Moleküle, die zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten ausgetauscht werden, müssen den Dissé-Raum durchqueren. Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix in diesem Raum ist Fibronektin. Dieses bildet granuläre und fibrillöse Strukturen auf der Oberfläche der Hepatozytenmikrovilli, bedeckt Kollagen Typ I Fasern, die mit anderen Fasern oder Filamenten gemischt sind, und steht in Kontakt mit den Endothelzellen [168]. Es scheint, dass Fibronektin zusätzlich zu seinen mannigfaltigen Aufgaben die Zelloberflächen der Endothel- und Leberzellen über die Kollagen Typ I Fibrillen verbindet und somit die verschiedenen Elemente des Leberläppchens zu einer Einheit zusammenfügt [168].

Eine fibrotische Leber enthält die gleichen extrazellulären Matixkomponenten wie eine gesunde, jedoch sind diese bei der Fibrose um das drei bis zehnfache erhöht [162, 169-171]. Das Anfangsstadium einer Fibrose kennzeichnet sich durch eine verstärkte Ablagerung von Fibronektin im Dissé-Raum im Bereich der Zentralvene. Dieses wird durch die Leberzellen gebildet und dehnt sich nach und nach in Richtung der Periportalfelder aus. Im Anschluss wird Kollagen Typ I ausgehend von den Zentralvenen in Richtung der Periportalfelder verstärkt angelagert, das wahrscheinlich durch Hepatozyten und Stellatezellen gebildet wird. Auch diese Ablagerung beginnt im Bereich der Zentralvene und dehnt sich beim Fortschreiten in Richtung der Periportalfelder aus. Die Tatsache, dass die Anlagerung des Kollagens der Anlagerung des Fibronektins nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich folgt, scheint darauf hinzuweisen, dass Fibronektin bei der Organisation der extrazellulären Matrix im Dissé-Raum eine tragende Rolle spielt [165].

Im weiteren Verlauf werden in erster Linie Kollagen Typ I und III verstärkt abgelagert, aber auch andere Matrixkomponenten, wie weiteres Fibronectin und Laminin [172]. Hierbei führt die chronische Schädigung der Hepatozyten zur Stimulierung inflammatorischer Zellen, die daraufhin zusammen mit den Hepatozyten profibrogene Zytokine abgeben, die zur Aktivierung und damit Transformation von hepatischen Stellatezellen zu einem myofibroblastischen Phänotyp führen [156]. Auch andere extrazelluläre Matrix produzierende Zellen, wie z.B. Fibroblasten und Myofibroblasten werden aktiviert und entwickeln sich zu einem Phänotypen, der durch gesteigerte Proliferation, Beweglichkeit, Kontraktilität und vor allem die gesteigerte Synthese von ECM Komponenten charakterisiert werden kann [173]. Im Zusammenspiel sind diese Zellen für die verstärkte Ablagerung der extrazellulären Matrix im Dissé-Raum verantwortlich, wobei die hepatischen Stellatezellen hierbei eine tragende Rolle spielen, auf die im Abschnitt I.2.5.2.3. genauer eingegangen wird.

I.2.5.2. Die Rolle verschiedener Zelltypen bei Leberfibrose

Das hepatische Parenchym ist vorwiegend aus Hepatozyten aufgebaut (ca. 80%), jedoch sind auch nicht parenchymale Zellen in der Leber vorhanden und erfüllen dort wichtige Aufgaben [174]. Einhergehend mit den Umgestaltungen in der Matrixarchitektur verändern sich auch die Phänotypen der sinusoidalen Zellen und die Lücken zwischen den Endothelzellen gehen als Folge verloren [175].

I.2.5.2.1. Die Hepatozyten

Hepatozyten sind Zellen, die auf toxische Reagenzien reagieren. Die setzen bei nicht reversiblen Schädigungen ROS (reactive oxygen species [engl.], reaktive Sauerstoffspezies) und verschiedene andere fibrogene Vermittler frei, induzieren dadurch Apoptose und leiten eine Immunantwort ein [156, 176]. Das Absterben der Hepatozyten durch Apoptose kann entweder über den Todesrezeptor vermittelten Signalweg oder über den intrinsischen Organellen-abhängigen Signalweg stattfinden. Der intrinsische Signalweg wird durch die lysosomale Permeabilisierung und die Abgabe von Cathepsin B ins Zytoplasma hervorgerufen, was zur Schädigung der Mitochondrien und damit zum Zelltod führt [156]. Die Freisetzung lysosomaler Enzyme führt unter anderem zur Freisetzung von Zytokinen aus der extrazellulären Matrix. Die Apoptose der Hepatozyten wird aber normalerweise in erster Linie durch den Todesrezeptorsignalweg vermittelt (wobei beide Signalwege nicht vollständig unabhängig voneinander agieren), der die Aktivierung durch Fas (Fas/CD95) oder TNF (TNFR-1) benötigt. Zytokine führen zusammen mit Apoptosekörpern zur Aktivierung der Kupferzellen [177] und der Anlockung von inflammatorischen Zellen (Granulo-, Lympho- und Monozyten).

I.2.5.2.2. Die Kupfferzellen und andere inflammatorische Zellen

Die Kupfferzellen nehmen die Apoptosekörper auf und produzieren hierdurch vermehrt Fas/CD95 oder TNFR-1, wodurch die Apoptose durch positive Rückkopplung verstärkt wird [178]. Die verstärkte Expression von Fas/CD95 und TNFR-1, die proinflammatorische Aktivität besitzen, führt zusätzlich zu einer Verstärkung der inflammatorischer Zytokine wie z.B. TGF- β 1 (tumor growth factor beta 1 [engl.], im Weiteren auch als TGF- β bezeichnet), und der Rekrutierung neutrophiler Zellen [179]. Darüber hinaus aktivieren geschädigte Hepatozyten und Kupfferzellen hepatische Stellate- und andere kollagenproduzierende Zellen, die die Rekrutierung inflammatorischer Zellen zusätzlich induzieren [180].

I.2.5.2.3. Die hepatischen Stellatezellen

Die hepatischen Stellatezellen sind wichtige Zellen für den Fibrosierungsprozess [161]. Sie liegen in dem Dissé-Raum und stehen dort in engem Kontakt mit Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen. Die Stellatezellen haben in ihrem Zytoplasma zahlreiche Lipidvesikel eingelagert, in denen sie Vitamin A speichern [181]. Darüber hinaus produzieren sie Vimentin, Desmin, α -SMA (alpha smooth muscle actin [engl.]), NCAM (neural cell adhesion molecule [engl.]), Nestin, GFAP (glial fibrillary acidic protein [engl.]) und Synaptopodin [182].

Sie können durch Interaktionen mit Kupfferzellen, Thrombozyten und Hepatozyten aktiviert werden und transdifferenzieren zu vesikelarmen Myofibroblasten. Diese zeichnen sich durch eine gesteigerte Proliferation [183] und einen fibrogenen, kontraktilen, inflammatorischen und migratorischen Phänotyp aus. Durch die Zytokine TGF- β , Angiotensin oder Leptin wird die Expression von Kollagen Typ I und III und des *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1 [engl.]) verstärkt [180], der die Apoptose aktivierter Stellatezellen verhindert [184]. Aktivierte Stellatezellen produzieren fibrotische Matrix nicht nur durch ihre vergrößerte Anzahl, die der verstärkten Proliferation folgt, sondern auch durch verstärkte Matrixproduktion der Einzelzellen [185]. Diese geben im aktivierten Zustand Entzündungszytokine (wie z.B. TGF- β , monocyte chemotactic protein 1: MCP-1, chemokine ligand 5: CCL5, Interleukin 10: IL-10, Interleukin 8: IL-8) ab und sind für die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen verantwortlich, die die Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten initialisieren [180, 186]. Weiterhin führt die Aktivierung zu einer verstärkten Produktion von α -SMA, die zu einer Kontraktion der Stellatezellen führt [187], welche wiederum die Kontraktion der Sinusoide [188] und deren Verlust der Poren zwischen den Endothelzellen zur Folge hat (siehe Abb.1.5.).

I.2.5.3. TGF- β 1 als wichtigster Mediator der Leberfibrose

TGF- β ist ein Zytokin das viele verschiedene Zellfunktionen wie z.B. Zellzyklus, Differenzierung, Migration und Adhäsion reguliert. Es wird in der Leber von Hepatozyten, Kupfferzellen und Myofibroblasten gebildet und wird zusammen mit einem nicht kovalent gebundenen Protein (LAP, latency associated protein [engl.]) in einem inaktiven Komplex sezerniert [298]. Dieser Komplex

bindet an ein weiteres Protein (LTBP, latent TGF- β binding protein [engl.]) und wird durch dieses an der extrazellulären Matrix befestigt [189]. LTBP-s sind Komponenten der extrazellulären Matrix, die für die Sekretion und Lagerung von latentem TGF- β verantwortlich sind [190, 191]. Es gibt vier LTBP-s (1-4), von denen LTBP-1, -3 und -4 Komplexe mit TGF- β bilden, LTBP-2 hingegen scheint nicht an TGF- β zu binden [52, 190, 192]. Für die Bildung dieser Komplexe ist ein Fibronektinnetzwerk von entscheidender Bedeutung. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigten, dass kultivierte Fibroblasten ohne Fibronektinnetzwerk nicht in der Lage sind den LTBP Komplex in die Matrix zu integrieren und zu erhalten [52, 193]. Proteasen wie Plasmin, Thrombospondin-1 oder Cathepsin D können das TGF- β durch Proteolyse aus dem Komplex lösen und es dadurch aktivieren.

Neben anderen nicht so entscheidenden Faktoren wie z.B. TNF- α [180], CTGF [194], spielt TGF- β die wichtigste Rolle als Mediator der Leberfibrose [195, 196]. *In vivo* Experimente zeigten, dass TGF- β Knockout-Mäuse eine geringere Kollagenmenge bei Fibrose als gesunde Kontrolltiere aufwiesen [161]. TGF- β stimuliert die Matrixsynthese, vermindert den Matrixabbau, initiiert die Apoptose der Hepatozyten und regt die Transformation der hepatischen Stellatezellen zu Myofibroblasten an [156]. Da TGF- β von Endothelzellen und Kupfferzellen, aber auch von Stellatezellen selbst produziert wird, wird die Produktion von Kollagen als Folge der Aktivierung der Stellatezellen sowohl durch auto- als auch parakrine Mechanismen gesteuert [197]. Dies führt zu einem Teufelskreis, in dem sich die Zellen selbst aktivieren.

I.2.5.4. Auswirkungen der histologischen Veränderungen im Bereich der Sinusoide

Die Apoptose der Hepatozyten und die anschließende Aktivierung und Stimulation inflammatorischer Zellen führt zu nachweisbaren Veränderungen im Bereich der Sinusoide. Die Aktivierung der hepatischen Stellatezellen führt neben deren Transformation zu dem Schließen der Zwischenräume zwischen den Endothelzellen und der exzessiven Anlagerung von extrazellulärer Matrix (siehe Abb.1.5.). Hieraus resultiert ein gestörter Stoffaustausch zwischen den Sinusoiden und dem Dissé-Raum [175]. Die Hepatozyten werden als Folge dieser Umbauvorgänge weiter geschädigt und verlieren ihre Mikrovilli. Hierdurch wird die Austauschoberfläche der Hepatozyten vermindert und die metabolische Leistungsfähigkeit des Organs verringert sich. Durch den verstärkten Aufbau von Narbengewebe können Blut und die Gallenflüssigkeit im Stadium einer Fibrose nur noch erschwert zirkulieren, oder sogar gestaut werden. Da das Blut die Leber nur noch langsam durchfließen kann und folglich an der Pfortader gestaut (Pfortaderhochdruck) wird, kann es zur Bildung neuer, anormaler Blutgefäßverbindungen kommen [198]. Indem das Blut hierdurch direkt in andere Organe gelangen kann, ohne zuvor die Leber durchfließen zu haben, kommt es als Folge mangelnder Entgiftung und der höheren Gallekonzentration zu Komplikationen. Hierzu gehören z.B. Flüssigkeitsansammlungen im Bauch (Aszites), hepatische Enzephalopathie, Gelbsucht, Leberkrebs oder im schlimmsten Fall Organversagen und Tod.

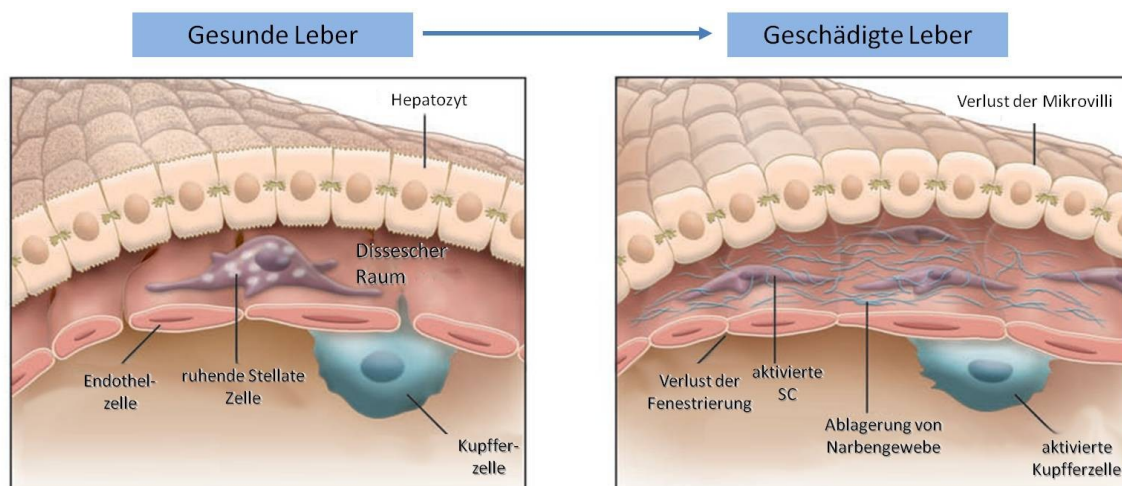


Abb.1.5. **Veränderungen der Sinusoide der Leber bei der Entstehung einer Leberfibrose.** Die Verletzung der Hepatozyten führt zur Rekrutierung und Stimulation von inflammatorischen Zellen und der Stimulation lokaler inflammatorischer Zellen (der Kupferzellen). Die hepatischen Stellatezellen (SC) werden daraufhin aktiviert, transformieren sich zu einem Myofibroblast ähnlichen Phänotyp und produzieren Komponente der extrazellulären Matrix (Narbengewebe). Diese führt zum Verlust der endothelialen Fenestrierung und beeinträchtigt die Funktion der Hepatozyten, die daraufhin ihre Mikrovilli verlieren. Abbildung modifiziert nach [199, 200].

1.2.5.5. Fibronektin bei der Leberfibrose

Eine gesunde Leber produziert in ihren Hepatozyten lösliches pFN und gibt dieses an die Blutzirkulation ab. Zelluläres Fibronektin hingegen befindet sich nur in geringen Mengen im Dissé-Raum [168, 201].

Bereits in den frühen Stadien der Fibrose spielt Fibronektin eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Neusynthese von einer Spleißvariante (EIIIA) des zellulären Fibronektins die Aktivierung der Stellatezellen stimuliert [202] und damit den Fibrosierungsprozess beschleunigt. Das Fibronektinnetzwerk selbst scheint auch bei der Aktivierung der Stellatezellen beteiligt zu sein. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass die Gabe eines Peptids, das die integrinvermittelte Adhäsion an Fibronektin verhinderte, die Aktivierung der hepatischen Stellatezellen verminderte [203]. Die aktivierten hepatischen Stellatezellen sezernieren Fibronektin und bauen es in das fibrotische Gewebe ein [204, 205]. Die Fibronektin Matrix scheint weiterhin über Integrin und die Proteine PI3k sowie Bcl-2 vermittelte Prozesse die Apoptose der Stellatezellen zu vermindern [206].

Somit scheint auch Fibronektin an einem Teufelskreis der Fibrogenese beizutragen, indem es die hepatischen Stellatezellen aktiviert, die im Zuge darauf mehr Fibronektin produzieren, was wiederum die Apoptose der hepatischen Stellatezellen vermindert. Arbeiten aus unserer Gruppe zeigten, dass die konditionelle Ausschaltung des Fibronektins der Hepatozyten, Endothel- und hepatischen Stellatezellen zu einer erhöhten Kollagenproduktion führt, die auf eine erhöhte Aktivierung der hepatischen Stellatezellen und eine Erhöhung des aktiven TGF- β zurückgeführt werden kann [193]. Diese Untersuchungen zeigten somit, dass eine Verminderung des normal exprimierten Fibronektins zu einer Verstärkung der Fibrose führen kann. Anhand der eingangs beschriebenen

Daten, die zeigen, dass die Bildung einer Fibronectinmatrix *in vitro* für die Bildung einer Kollagenmatrix benötigt wird, stellte sich die Frage, ob die Anwendung eines Peptids, welches die Bildung von Fibronectin- und Kollagenfibrillen verhindert, ohne die Gesamtmenge des Fibronectins zu beeinflussen, die Bildung einer Fibrose verhindern kann.

I.3. Das Tumormodell

Da in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell ein knochensuchender Klon der Brustkrebstumorzelllinie MDA-MB-231 benutzt wurde und sich demzufolge resultierende Tumore im Knochen bildeten, soll dieses Organ zunächst etwas genauer betrachtet werden.

I.3.1. Bedeutung, Anatomie und Zusammensetzung des Knochens

Das Endoskelett der Wirbeltiere (vertebrata [lat.]) setzt sich aus einer Vielzahl einzelner Knochen (os [lat.]) zusammen und hat verschiedene Aufgaben zu erfüllen. Es muss den Körper stützen, Ansatzstellen und Hebel für Muskeln stellen und innere Organe schützen. Hierzu sollte der Knochen zwar fest und hart, aber zugleich auch leicht und elastisch sein. Diese Eigenschaften werden durch die spezielle Anatomie des Knochens gewährleistet. Weiterhin beherbergt der Knochen das Knochenmark, welches für die Blutbildung verantwortlich ist, und dient darüber hinaus als Kalzium- und Phosphatspeicher und somit auch als Puffer für das Säure Base Gleichgewicht des Blutes [207, 208].

I.3.1.1. Die Anatomie des Knochens

Der Knochen wird von einer eng anliegenden Bindegewebshaut, dem Periost umgeben. Im Querschnitt betrachtet wird er strukturiert durch eine äußere Schicht, dem Kortex (auch substantia compacta, Kortikalis oder Rindenschicht genannt), der eine innere Schicht, die Spongiosa (auch Schwammknochen) umgibt. Diese besteht aus einem feinen Gerüst engmaschiger Trabekel (Knochenbälkchen), welche horizontal und vertikal miteinander verbunden sind und somit schwamm- oder wabenartig erscheinen. Diese Struktur ist für die Eigenschaften des Knochens, nämlich maximale Festigkeit bei minimalem Gewicht zu verbinden, verantwortlich. Man unterscheidet beim Knochenwachstum zwischen primärer und sekundärer Spongiosa. Der besonders starken Umbauprozessen ausgesetzte Bereich direkt unterhalb des Knorpels wird hierbei als primäre Spongiosa [209], und die darunter liegenden Trabekelbereiche als sekundäre Spongiosa bezeichnet. Obwohl das menschliche Skelett zu etwa 80% aus Kortex und etwa 20% aus Spongiosa besteht, hat diese jedoch den Hauptanteil der Knochenoberfläche, wodurch die meiste metabolische Aktivität in diesem trabekulären Bereich stattfindet [210].

I.3.1.2. Die Zellen des Knochens

Zellen der Osteoblastenzelllinie sind eine Gruppe von Zellen, die mesenchymale Vorläuferzellen, Präosteoblasten, Osteoblasten (auch reife Osteoblasten genannt), Knochenbelegzellen (bone-lining cells [engl.]) und Osteozyten umfassen [211].

Osteoblasten sind spezialisierte Stromazellen, die ausschließlich für die Bildung, Ablagerung und Mineralisierung von Knochengewebe zuständig sind [212]. Vor allem die reifen Osteoblasten bilden Kalziumphosphatkristalle (in erster Linie Hydroxylapatit) und verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen Typ I und Proteoglykane [213]. Hinter (räumlich, von dem Endosteum aus betrachtet) den reifen Osteoblasten befinden sich Prä-Osteoblasten, die zu Osteoblasten heranreifen können [214].

Osteoblasten können sich nach erfolgter Knochenneubildung entweder in abgeflachte Knochenbelegzellen umwandeln, die der neugebildeten Knochensubstanz aufliegen oder werden in die Knochensubstanz als Osteozyten eingebaut, die durch lange Zellfortsätze miteinander verbunden sind und 90-95% aller Knochenzellen im adulten Skelett ausmachen [215]. Man geht davon aus, dass zu den Aufgaben der Osteozyten die Messung der mechanischen Beanspruchung des Knochens, aber auch die Regulation der Knochenhomeostase durch Bildung und Abgabe von RANKL, Sklerostin und OPG gehören [215-217]. Ein Großteil der Osteoblasten (zwischen 50 und 80%) verstirbt nach der Knochenneubildung jedoch durch Apoptose [218].

Die Osteoklasten (osteon, Knochen; klastein, zerbrechen [gr.]) sind diejenigen Zellen, die für den Knochenabbau verantwortlich sind. Durch die Ausbildung einer stark gefalteten Zellmembran, des sogenannten Bürstensaums (ruffled border [engl.]) in Richtung des Knochens und anschließende Freisetzung starker Säuren und Proteasen in abgegrenzten Resorptionslakunen, den Howship-Lakunen, resorbieren sie den Knochen. Zu den sezernierten Proteasen zählen unter anderem Gelatinasen [219], Matrix-Metalloproteasen [220], Cathepsin K [220, 221] und tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) [222]. Im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteozyten stammen Osteoklasten aus der Monozyten-/Makrophagenlinie der hämatopoetischen Stammzellen ab [223].

I.3.1.3. Das Knochenremodeling

Der Knochen ist ein metabolisch aktives Organ und befindet sich ein Leben lang in einem ständigen Umbau, dem sogenannten Knochenremodeling, bei dem alter Knochen ununterbrochen durch neues Gewebe ersetzt wird. Hierdurch werden Mikrofrakturen, die unter physiologischer Belastung entstehen (aber keinen Funktionsverlust bedeuten), ausgebessert [224] und die Knochenarchitektur an variierende mechanische Ansprüche angepasst [210]. Bei einem Menschen werden so pro Jahr vier bis zehn Prozent der Knochen umgebaut, so dass sich das gesamte Skelett ca. alle 10 Jahre vollständig erneuert [225]. Dieser Prozess benötigt ein Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und wird von einer Vielzahl verschiedener biomechanischer und mechanischer Faktoren reguliert. Das Remodeling wird im Gegensatz zu dem in der Wachstumsphase der ersten zwanzig Lebensjahre ablaufenden Modeling von sogenannten *basic multicellular units* (BMUs) bewerkstelligt. Ein BMU ist eine Einheit aus resorbierenden Osteoklasten und ihnen folgenden matrixproduzierenden und mineralisierenden Osteoblasten [226, 227].

Der Prozess des Knochenremodeling besteht aus drei aufeinanderfolgenden Phasen; die erste Phase ist die Aktivierungsphase, in der mesenchymale Zellen der Osteoblastenzelllinie die Anlagerung hämatopoetischer Zellen der Osteoklastenzelllinie an die Knochenoberfläche induzieren und damit die zweite Phase, die Resorptionsphase einleiten, während der mineralisierter Knochen von Osteoklasten entfernt wird. Im Anschluss lagern sich in der Umkehrphase mononukleäre Zellen auf der Knochenoberfläche ab, beenden den Resorptionsprozess und initiieren über parakrine Botenstoffe die Formationsphase. In dieser differenzieren sich mesenchymale Zellen zu Osteoblasten, lagern daraufhin neuen Knochen (Osteoid) ab, bis der resorbierte Knochen vollständig ersetzt ist [210, 228, 229] und schlagen daraufhin die oben (siehe 1.3.1.2) beschriebenen Schicksalswege ein (siehe Abb.1.6.).

Das Knochenremodeling wird sowohl systemisch als auch lokal reguliert. Zu den Hauptbeteiligten systemischen Regulatoren gehören Parathormon, Calcitriol und andere Hormone wie z.B. Wachstumshormon und Glucokortikoide. Weiterhin sind auch Faktoren wie IGFs (insulinlike growth factors [engl.]), Prostaglandine, TGF- β , BMPs (bone morphogenetic proteins [engl.]) und Zytokine beteiligt. Das Remodeling wird auch lokal durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert. Darüber hinaus sind die Prozesse der Knochenresorption und -bildung durch das RANK (receptor activator of NF-kappa B [engl.]), RANKL (RANK Ligand [engl.])/OPG (Osteoprotegerin [lat.]) System eng miteinander verbunden [210].

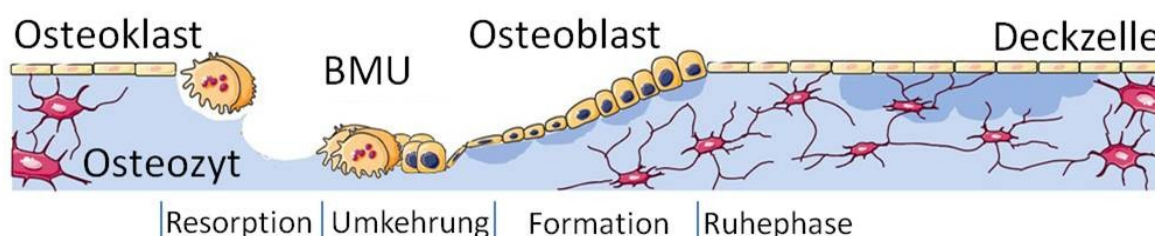


Abb.1.6. **Schematische Darstellung der Phasen des Knochenremodelings.** Von links nach rechts sind die Vorgänge der Resorption, Umkehrung, Formation und die anschließende Ruhephase schematisch dargestellt. BMU, bone multicellular unit [engl.]; Schema in Anlehnung an [230].

I.3.1.4. Das RANK/RANKL/OPG System

Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten können miteinander kommunizieren. Dies geschieht in erster Linie durch das RANK/RANKL/OPG System.

So können Zellen der Osteoblastenzelllinie die Entstehung und Aktivität der Osteoklasten durch die Expression von RANKL und M-CSF (macrophage colony stimulating factor [engl.]), die an ihre entsprechenden Rezeptoren auf den Osteoklasten, RANK bzw. c-Fms binden [231], stimulieren. Weiterhin sind osteoblastische Zellen durch die Bildung von Osteoprotegerin (os, Knochen; protegere, beschützen [lat.], OPG), das an RANKL bindet und somit dessen Bindung an RANK verhindert, in der Lage die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten zu inhibieren [232-234].

Somit regulieren die Osteoblasten durch das Verhältnis zwischen OPG und RANKL [235, 236] sowohl die Bildung und Aktivierung der Osteoklasten als auch deren Inhibierung [212].

Die Osteozyten hingegen regulieren durch Bildung und Sekretion von Sklerostin die Modulierung des Wnt Signalwegs und damit die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten [237] und die OPG und RANKL Expression [238] (siehe Abb.1.7). Die Osteozyten werden von verschiedenen noch nicht in Gänze erfassten Prozessen reguliert. Man weiß bereits, dass mechanische Belastung die Sklerostinfreisetzung vermindert und somit die Knochenbildung erhöht [239, 240].

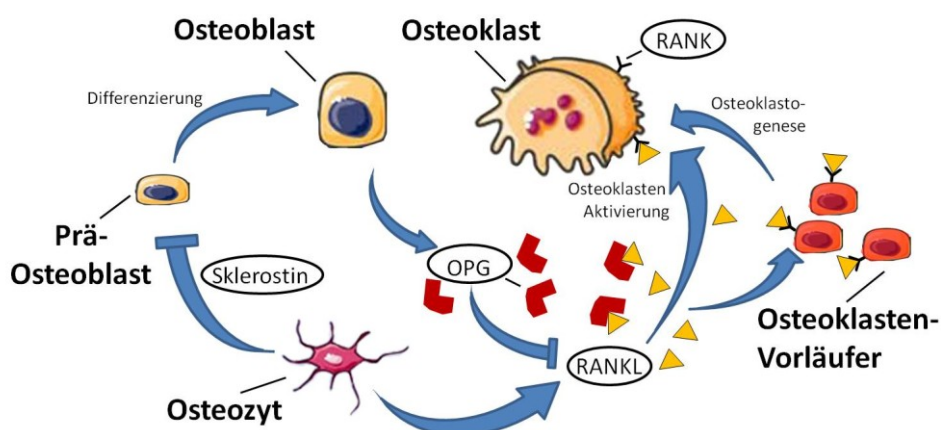


Abb.1.7. **Hypothetische schematische Darstellung des Sklerostin/RANK/RANKL/OPG Systems.** Osteozyten inhibieren durch die Bildung von Sklerostin die Differenzierung von prä-Osteoblasten zu Osteoblasten. Weiterhin stimulieren sie durch Sekretion von RANKL die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten. Osteoblasten inhibieren hingegen durch Bildung von OPG bzw. stimulieren durch Bildung von RANKL die Genese und Aktivierung von Osteoklasten. Abbildung in Anlehnung an [230, 237, 241].

I.3.2. Die Stammzellnische im Knochenmark

I.3.2.1. Begriffsbestimmung

Stammzellen sind eine Untergruppe von Zellen, die die einzigartige Fähigkeit besitzen, sich durch Selbsterneuerung zu regenerieren und das Potenzial haben, sich in verschiedene Typen erwachsener Zellen zu differenzieren [242]. Nach der Geburt residieren die adulten Stammzellen in hochspezialisierten Mikroumgebungen, als „Nische“ bezeichnet werden [243] und sich abhängig vom Gewebetyp in Zusammensetzung und Lage unterscheiden. Der Begriff „Nische“ wurde aus der Ökologie entliehen, in der er Umweltfaktoren beschreibt, unter denen eine Spezies überleben und sich reproduzieren kann. Im Zusammenhang mit Stammzellen (und auch Tumorzellen) beschreibt eine Nische die zelluläre Zusammensetzung der Mikroumgebung, die die Stammzellen umgibt, sowie Signale, die von unterstützenden Zellen abgegeben werden [242, 244].

Die adulten Stammzellen sind ein wesentlicher Bestandteil der Homeostase des Gewebes; sie unterstützen fortwährende Geweberegeneration und ersetzen Zellen, die durch Apoptose oder

Verletzungen gestorben sind. Um diese Funktionen aufrechtzuerhalten, ist der Erhalt einer feinen Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung notwendig [242]. Diese wird unter anderem durch einen Signalaustausch zwischen Stammzellen und anderen Zellen der Nische reguliert, der dazu führen kann, dass die Stammzellen nicht weiter differenzieren und ihre Stammzeleigenschaften behalten [223, 245, 246].

I.3.2.2. Die hämatopoetische und mesenchymale Stammzellnische

Die hämatopoetische Stammzellnische befindet sich in den trabekulären Bereichen der Knochen und es konnte gezeigt werden, dass in erster Linie osteoblastische aber auch endotheliale Zellen für die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen (HSC, hematopoietic stem cells [engl.]) verantwortlich sind [247-249]. Hämatopoetische (häma, Blut; poiesis, Erschaffung [gr.]) Stammzellen sind die Vorgänger aller Blutzellen, d.h. der Lymphoid-Vorgängerzellen, die sich zu T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen differenzieren, der Granulozyten/Makrophagen Vorgängerzellen, aus denen Granulozyten, Makrophagen und Osteoklasten hervorgehen und der Megakaryozyt/Erythrozyt-Vorgängerzellen, aus denen sich Megakaryozyten und Erythrozyten entwickeln [223, 250].

Auch mesenchymale Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells [engl.]) residieren im Knochen und man geht davon aus, dass die meisten Stromazellen, darunter Chondrozyten, Osteoblasten, Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen und Monozyten von diesen abstammen [223, 251]. Diese Nischenstromazellen regulieren vermutlich durch die Produktion und Sekretion von Zytokinen und durch die von Zell-Zell Adhäsion ausgelösten intrazellulären Signale die Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung der HSCs [252]. Weiterhin stellen sie sicher, dass der konstante Fluss der hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellennachkommenschaft über die gesamte Lebenszeit eines Individuums nicht abreißt [253].

Man geht davon aus, dass es sowohl eine vaskuläre (endotheliale) [254-256] als auch eine endosteale (osteoblastische) Nische [247, 248, 257] gibt, die sowohl anatomisch und physiologisch unterschiedlich sind [223]. Wie der Name bereits vermuten lässt, befindet sich die endosteale Nische in der endostealen Region des Knochens. Hier bilden Osteoblasten und andere von MSCs abstammende Zellen ein unterstützendes Mikroumfeld für Stammzellen im Knochenmark [258]. Die Osteoblasten vermitteln die Adhäsion der HSCs zu der Nische in der endostealen Region [259].

Es wird angenommen, dass HSCs in die vaskuläre Nische migrieren, um dort zu proliferieren, sich zu differenzieren und in die Blutzirkulation auszuwandern [256]. Vermutlich überschneiden sich die endotheliale und die vaskuläre Nische und interagieren miteinander [253] (siehe Abb.I.8., A). Neuere Studien legen nahe, dass die MSCs selbst in Nischen residieren, die sich in der direkten Nachbarschaft der HSC Nische befinden. Es gibt Hinweise darauf, dass HSCs und MSCs ihre

Aktivitäten co-regulieren [253] (siehe Abb.1.8., B). Einige aktuelle Studien vertreten sogar die Auffassung, dass sowohl HSCs als auch MSCs in einer einzigen Knochenmarknische durch die lokale Mikroumgebung aber auch durch entfernte Hormonsignale und das autonome Nervensystem reguliert werden [260].

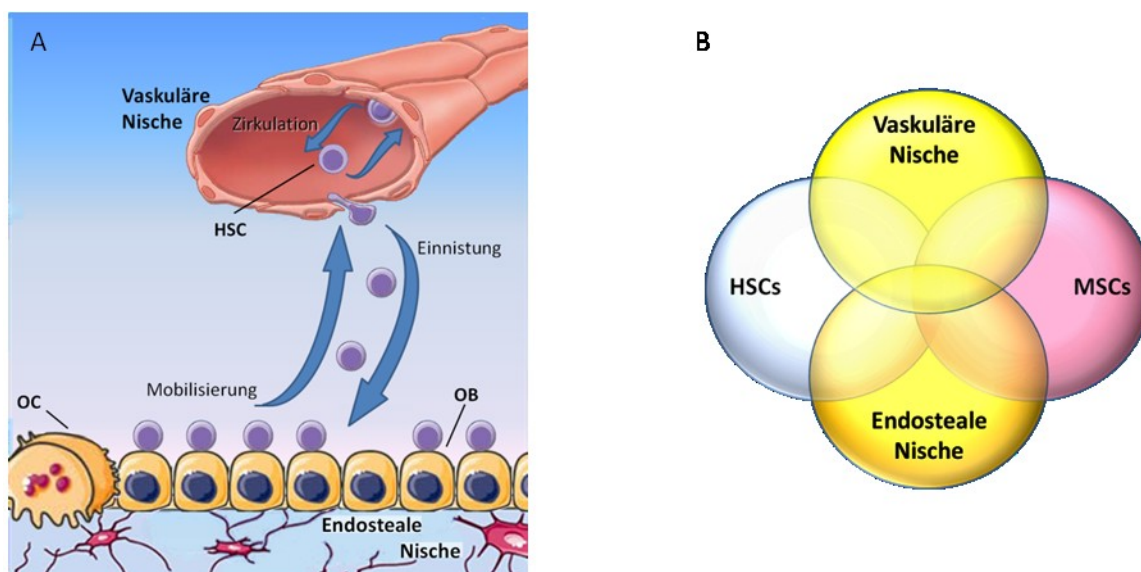


Abb.1.8. **Hypothetische schematische Darstellung der Knochenmarknischen.** In A sind die HSCs und ihre Interaktionen zwischen der vaskulären und der endostealen Nische dargestellt. Die hypothetische Grafik in B soll die Interaktion der HSCs und MSCs untereinander und mit den Nischen, aber auch die Zusammenarbeit der beiden Nischen darstellen, wodurch eine Kommunikation auf allen Ebenen für eine funktionierende Funktion der Nische geschaffen ist. OC, osteoclast [engl.], OB, osteoblast [engl.], HSC, hematopoietic stem cell [engl.], MSC, mesenchymal stem cell [engl.]. Abbildung A in Anlehnung an [230, 256]; B modifiziert nach [253].

I.3.2.3. Die klinische Relevanz der Stammzellnischen

Krebs wird immer häufiger als Stammzellenkrankheit betrachtet. Dies geschieht sowohl aufgrund der Art der Verbreitung, die von einer kleinen Minderheit der Tumorzellen die stammzellenähnliche Eigenschaften besitzen, ausgeht, als auch aufgrund einer möglichen Abstammung von normalen Stammzellen [261-263].

Brust-, Prostata-, und Lungenkrebs sind die am stärksten verbreiteten bösartigen Tumore in Erwachsenen und sind außerdem die Tumore, die am häufigsten in Knochen metastasieren [264]. Bereits in frühen Stadien einer Brustkrebserkrankung können bei 10-31 % der Patienten zirkulierende Tumorzellen in der Blutbahn gefunden werden [265, 266]. Wie in Abschnitt I.1.2.1.4.2 beschrieben können diese Zellen durch Extravasation Fernmetastasen in sekundären Organen bilden. Tumorzellen können an diesen sekundären Stellen jedoch nur erfolgreich wachsen, wenn sie dort eine günstige Mikroumgebung finden, die durch parakrine und autokrine Faktoren das Wachstum und die Vaskularisation unterstützt [267-269].

Nahezu 70% der Patienten mit metastasierenden Brust- oder Prostatakrebs haben Absiedlungen im Knochenmark [270]. Man nimmt an, dass sich zirkulierende Tumorzellen in Stammzellnischen einnisten, und dort eine vorteilhafte Mikroumgebung vorfinden, die reich an Wachstumsfaktoren

und Zytokinen ist [253]. Diese Absiedelungen sind die Grundlage späterer Fernmetastasen im Knochen, die besonders bei Mammakarzinomen über die Schwere der Erkrankung und die Mortalität bestimmen [271]. Sie entstehen durch eine Adaptation der Nische an die Bedürfnisse der Tumorzellen, wodurch das Wachstum und die Verbreitung des Tumors gefördert wird [131].

I.3.2.4. Die Einnistung

I.3.2.4.1. Definition

Einige Gruppen bezeichnen mit der Einnistung (auch homing [engl.], Zielsuche) die Ablösung der Tumorzelle aus dem Zellverband bis hin zur Bildung einer Fernmetastase [272] wie in I.1.2.1.4.2. beschrieben. Andere Gruppen hingegen beziehen sich beim Begriff Einnistung ausschließlich auf die organspezifische Bildung von Fernmetastasen, das heißt der Weg von der Extravasation bis hin zur Bildung der Fernmetastase. Dies liegt daran, dass es bei einem natürlichen Tumorverlauf ohne Tumorzellen die sich aus dem Primärtumor lösen, auch keine Tumorzellen geben kann die durch Extravasation Metastasen bilden. Da es bis jetzt aber kein zuverlässiges Modell für spontane Brustkrebsmetastasierung in den Knochen gibt [273], wurde für die vorliegende Arbeit ein Modell verwendet, in dem die Tumorzellen intrakardial durch das linke Herzventrikel in die Blut-zirkulation injiziert wurden. Hierbei müssen Schritte 1-4 (siehe Abb.I.3) nicht stattfinden; daher wird im weiteren Verlauf der Arbeit mit dem Begriff Einnistung der Weg der Tumorzellen von der Zirkulation bis zur Adhäsion von Tumorzellen im Zielorgan beschrieben.

I.3.2.4.2. Die Einnistung in den Knochen

Im Folgenden wird insbesondere auf die Einnistung in den Knochen eingegangen, da für die vorliegende Arbeit ausschließlich knochenspezifische Tumorzellen genutzt wurden (siehe II.4.4.1.1.). Nicht alle Tumorarten bilden Metastasen im Knochen. Dies weist daraufhin, dass Tumorzellen, die bevorzugt in den Knochen metastasieren, Eigenschaften haben, die andere Tumorarten, die nur selten in den Knochen metastasieren nicht besitzen. Einige dieser Eigenschaften könnten die Bildung proteolytischer Enzyme, angiogenetischer Faktoren, autokriner wachstumsstimulierender Faktoren, eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren, zeitliche und räumliche Expression von Zell-adhäsions Molekülen oder eine Resistenz gegen die Immunüberwachung des Wirtsorganismus sein [274]. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass diese Eigenschaften genetisch reguliert werden. Unter anderem konnte für einen knochenspezifisch selektierten Klon der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 ein Profil aus 43 Genen erstellt werden, welche im Zusammenspiel die Metastasierung des Knochens ermöglichen [275].

Der Knochen ist ein Organ, das reich an Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF, TGF- β , FGF (fibroblast growth factor [engl.]) und BMP ist, da diese von Osteoblasten während der Knochenablagerung abgegeben und in die Knochenmatrix inkorporiert werden [276]. Bei Resorption durch spätere Remodellierungsprozessen werden diese Wachstumsfaktoren freigesetzt, in die Umge-

bung des Knochens abgegeben und machen diese damit zu einem attraktiven Umfeld für die Metastasierung und späteres Wachstum von Tumorzellen [269, 277]. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Fragmenten der extrazellulären Matrix während des Knochenremodeling die Chemotaxis von Tumorzellen stimuliert [278, 279]. Sobald sich die Tumorzellen in der Nische eingenistet haben, parasitieren sie die Knochenmarkmikroumgebung um ihr Langzeitüberleben, bzw. ihre Ruhephase und letztendlich das metastatische Wachstum zu regulieren [280].

I.3.2.5. Der Einfluss von Zytokinen auf den Prozess der Einnistung

Zusätzlich zu Wachstumsfaktoren und ECM Fragmenten werden im Speziellen in der Stammzellennische im Knochenmark viele auch auf Tumorzellen chemotaktisch wirkende Zytokine wie z.B. *stromal derived factor 1* (SDF-1, auch CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12, CXCL12) freigesetzt. Wenn nun die Tumorzellen dem chemotaktischen Gradienten gefolgt sind, finden sie im Knochenmark eine Umgebung, die ihr Wachstum fördert. Es konnte belegt werden, dass Kulturüberstände von resorbierenden Knochen die Proliferation einiger Tumorzelllinien *in vitro* erhöhen [273]. Von den oben genannten freigesetzten Wachstumsfaktoren werden IGFs am stärksten freigesetzt [276] und es konnte gezeigt werden, dass diese das Wachstum humaner Brustkrebszellen fördern [273].

I.3.2.6. Die Mikroumgebung eines Blutgerinnsels

Knochen können durch einen operativen Eingriff oder mechanische Belastungen verletzt werden. In den darauffolgenden Prozess der Wundheilung (auf den bereits in Abschnitt I.1.2.1.4.1. eingegangen wurde) sind viele verschiedene Komponenten, unter anderem lösliche Mediatoren, Blutzellen, die extrazelluläre Matrix und parenchymale Zellen, involviert. Man kann diesen Prozess in drei Phasen unterteilen, die sich zeitlich überschneiden [281].

In der ersten Phase, der Entzündungsphase, die ca. von Tag 1-3 dauert, finden sich an der Stelle der Verletzung vor allem Fibrin (Fibrinogen), Fibronectin, Vitronectin, und Thrombospondin; in der zweiten, der Gewebephase, die ca. zwischen Tag 4 und Tag 6 stattfindet, finden sich in erster Linie Fibronectin, Hyaluronan, Osteonectin (SPARC; secreted protein acidic and rich in cysteine [engl.]) und Tenascin an der Wunde. In den Tagen 7-10 tritt die dritte Phase, die Gewebeumbauphase ein, während der hauptsächlich Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Fibronectin, Proteoglykane, SPARC und Tenascin an der Stelle der Verletzung zu finden sind [282].

Aufgrund des erhöhten Fibrinogengehalts, der erhöhten Gefäßpermeabilität und einer Entzündungsreaktion, die sowohl im Wundheilungsprozess als auch bei der Tumorentwicklung auftreten [283, 284], wurden bereits Parallelen zwischen der Mikroumgebung während der Wundheilung und dem Tumorstroma vorgeschlagen [285]. Bei verschiedenen Tumoren ist die extrazelluläre Umgebung tatsächlich durch Veränderungen von extrazellulären Matrixproteinen wie z.B. Fibro-

nektin, Thrombospondin, Osteopontin, Laminin, SPARC und hyaluronan Proteoglykanen und MMPs verändert [286].

Während der Entzündungsphase entstehen Blutgerinnsel. Hierbei werden Thrombozyten aktiviert und Proteine der Gerinnungskaskade eingelagert. Thrombozyten produzieren *stromal-cell derived factor-1* (SDF-1 [engl.]) [287, 288], das die Einnistung von Stammzellen und Krebszellen im Knochenmark vermittelt. Weiterhin unterstützen verschiedene Proteine der terminalen Gerinnungskaskade, wie z.B. Thrombin, Faktor XIII und Fibrinogen den Metastasierungsprozess [289-292]. Somit liegt im Falle einer Verletzung im Knochen eventuell ein Umfeld vor, das die Metastasierung fördern könnte.

I.3.3. Knochenmodulierende Substanzen

I.3.3.1. Das Parathormon

Wie in Abschnitt I.3.1 erwähnt, übernimmt Knochen unter anderem die Rolle eines körpereigenen Kalziumspeichers. Die Freisetzung des Kalziums aus dem Knochen und die damit verbundene Erhöhung der Kalziumkonzentration im Blut wird in erster Linie durch Parathormon (PTH) reguliert [293]. Parathormon ist ein von der Nebenschilddrüse (*glandula parathyroidea*) gebildetes Peptidhormon, das aus 84 Aminosäuren besteht. Es wird über die Leber und Niere, aber auch die Nebenschilddrüse selbst durch Proteolyse abgebaut [294]. Je nach der Länge des Zeitraums in dem gesteigerte Parathormonlevel im Serum auftreten, kann es sowohl anabolische, als auch katabolische Auswirkungen auf den Knochen haben [295-297].

I.3.3.1.1. Osteoanabolische Wirkung des Parathormons

Die intermittierende Gabe von dem aminoterminalen Bereich des Parathormons (PTH 1-34) führt zu einer Zunahme der Knochenmasse [298]. Die unterbrochene Gabe wird durch tägliche Injektionen erreicht, da Parathormon nur ca. 2-3 Stunden in der Zirkulation verbleibt [296, 299]. Die anabolischen Effekte der intermittierenden PTH Gabe resultieren vermutlich aus drei Vorgängen. Einerseits erhöht das Parathormon die Entwicklung von Osteoblasten, vermindert aber auch die Apoptose der Osteoklasten und reaktiviert außerdem die Knochenbelegzellen dazu ihre Matrixsynthese wiederaufzunehmen [300, 301]. Obwohl die verminderte Apoptose der Osteoklasten zu einem verstärktem Knochenabbau führen würde, resultiert aus der Parathormongabe eine erhöhte Knochenbildung, da die Effekte auf die Osteoblasten überwiegen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass diese erhöhte Knochenbildung durch eine Inhibierung der Transkription des Gens für Sklerostin [302, 303] und der Erhöhung von OPG in Kombination mit einer Reduzierung von RANKL [304] hervorgerufen wird. Um eine Erhöhung der Osteoblastenzahl zu initiieren, ist die therapeutische Dauer der PTH Exposition entscheidend und muss kurz sein [295].

I.3.3.1.2. Osteokatabolische Wirkung des Parathormons

Im Gegensatz zu der osteoanabolischen Wirkung einer intermittierenden Parathormongabe, führt die kontinuierliche Gabe von PTH zu erhöhten Kalziumserumwerten bei Menschen [305] und Ratten [295] und zu einer Stimulation der Knochenresorption, bei gleichzeitig nur geringen Auswirkungen auf die Knochenformation, woraus insgesamt ein Verlust in der Knochenmasse resultiert [296, 306]. Dieser Verlust scheint auf erhöhte RANKL und reduzierte OPG Level zurückzuführen zu sein [304], die zu einer erhöhten Osteoklastenbildung und -aktivität führen (siehe Abschnitt 1.2.1.4.).

I.3.3.2. Die Zoledronsäure

Die Zoledronsäure (ZOL) zählt zu den Bisphosphonaten, die die synthetischen Analoge zu den natürlich vorkommenden Pyrophosphat Molekülen (PP_i) darstellen [307]. Im Gegensatz zu diesem weisen sie jedoch eine höhere Stabilität auf und sind gegen die enzymatische Hydrolyse durch Osteoklasten resistent [307, 308]. Strukturell betrachtet bestehen sie aus einer P-C-P Struktur an dessen Kohlenstoffatom zwei Ketten (R_1 und R_2 , die nicht im Pyrophosphat vorkommen) kovalent gebunden sind [309]. Durch das P-C-P „Rückgrat“ können Bisphosphonate an das Hydroxylapatit des Knochens binden [310, 311]. Diese Bindung wird durch die Hydroxylgruppe in der R_1 Gruppe verstärkt [312] und die R_2 Kette inhibiert die Osteoklast vermittelte Knochenresorption [308].

Durch die Knochenresorption der Osteoklasten wird die an den Knochen gebundene Zoledronsäure abgelöst und induziert deren Apoptose [309]. Hierbei inhibiert das stickstoffhaltige Bisphosphonat ein Schlüsselenzym des Mevalonat Signalweges, die Farnesyldiphosphatsynthase (FPPS). Hierdurch werden die Konzentrationen von Farnesyl- und Geranylgeranyl- Diphosphat vermindert, die für die Prenylierung der kleinen GTPasen (z.B. Ras und Rho) benötigt werden, welche wiederum für das Überleben der Osteoklasten unerlässlich sind [313-315].

I.3.3.3. Einfluss von Parathormon und Zoledronsäure auf die hämatopoetische und mesenchymale Stammzellnische

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die intermittierende Gabe von Parathormon die Entwicklung von Osteoblasten beschleunigt, deren Apoptose inhibiert und Knochenbelegzellen reaktiviert und zur Matrixsynthese reanimiert. Zoledronsäure hingegen inhibiert die Funktion der Osteoklasten. Bei einer kombinierten Gabe von PTH und ZOL sollten im Knochen und damit auch in der hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellnische viele aktive Osteoblasten, aber kaum aktive Osteoklasten vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellnischen durch die intermittierende Gabe von Parathormon erhöht werden kann [280].

I.4. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin auf unterschiedliche Krankheitsmodelle in verschiedenen Organen untersucht. Daher wurde die Arbeit in zwei Teile unterteilt, von denen sich der erste mit Leberfibrose und der zweite mit Tumor und dessen Einnistung in den Knochen beschäftigt.

Im Lebermodell sollte untersucht werden, ob Fibronectin in der fibrotischen Matrix eine entscheidende Bedeutung für den Krankheitsverlauf hat. Um diese Frage zu klären, nutzten wir das Peptid pUR4b, welches die Bildung einer Fibronectinmatrix verhindert [316]. Wir untersuchten dessen Einfluss auf die Bildung von Narbengewebe in einem Fibrosemodell.

Im Tumor sollte die Rolle des Umgebungsfibronectins bzw. des tumoreigenen Fibronectins, der Gerinnselbildung und der Modifikation der Stammzellnische untersucht werden. Um den Einfluss des Fibronectins in verschiedenen Zellen bzw. Organen auf das Einnistungsverhalten der Tumorzellen zu untersuchen, wurden konditionelle Knockout-Mäuse genutzt, bei denen Fibronectin entweder ausschließlich in der Blutbahn (Plasmafibronectin), in den Osteoblasten/Osteozyten oder im gesamten Knochenmark ausgeschaltet war. Darüber hinaus sollte das Einnistungsverhalten einer Tumorzelllinie analysiert werden, bei der das zellendogene Fibronectin deletiert war. Dies sollte Aufschluss über den Einfluss des von Tumorzellen produzierten Fibronectins beim Einnistungsprozess geben. Aufgrund der Tatsache, dass Fibronectin in fast allen Prozessen der Wundheilung vorkommt und eine Rolle spielt, stellte sich uns weiterhin die Frage, ob sich Tumorzellen somit vermehrt in Bereichen mit einer Blutgerinnselbildung einnisten. Die Behandlung der Tiere mit Parathormon und Zoledronsäure zu einer genaueren Untersuchung der Rolle der osteoblastischen Nische im Einnistungs-Prozess könnte zu einer verstärkten Fibronectineinlagerung in den Knochen führen. Daher sollte eruiert werden, ob eine Erweiterung der osteoblastischen Nische die Einnistung zirkulierender Tumorzellen in diese modulieren könnte.

Die Klärung dieser Fragen sollten neue Erkenntnisse über die Effekte des Fibronectins bei verschiedenen Krankheitsmodellen im Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix geben.

II. Material und Methoden

II.1. Materialien

II.1.1. Herstellerverzeichnis

Abcam plc	Cambridge, UK
AbD Serotec	Kidlington, UK
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen
Agfa HealthCare GmbH	Köln
Alcan Packaging	Neenah, WI, USA
AMS biotechnology	Abingdon, UK
AppliChem GmbH	Darmstadt
AssayPro	St. Charles, MO, USA
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Österreich
Axis-Shield AG	Dundee, Scotland
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BD Biosciences	Heidelberg
Bibbi Scientific limited	Staffordshire, UK
Biometra GmbH	Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
BioLegend Inc.	San Diego, CA, USA
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
B. Braun	Melsungen
Canon Inc.	Tokyo, Japan
Caliper Life Sciences	Rüsselsheim
Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Charles River Laboratories	Sulzfeld
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dianova GmbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach
Ebioscience Corporation	San Diego, CA, USA
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Field Emission Corporation	McMinnville, OR, USA
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gerhardt Analytical Systems	Königswinter
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Gilson Inc.	Middleton, WI, USA

Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Grüssing GmbH	Filsum
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Hiss Diagnostics	Freiburg
Hybaid	Teddington, UK
IBS Integra	Fernwald
Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Keyence	Osaka, Japan
Knick GmbH + Co. KG	Berlin
Leica Microsystems	Wetzlar
Lexmark	Lexington, KY, USA
LG Electronics	Seoul, Korea
NOBA Verbandmittel	Wetter
Memmert GmbH + Co KG	Schwabach
Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
Merck KGaA	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach
Minerva Biolabs	Berlin
MP Biomedicals	Eschwege
New Brunswick Scientific	Edison, NJ, USA
Nikon, GmbH	Düsseldorf
Olympus America Inc.	Center Valley, PA, USA
PE Applied Biosystems	Waltham, MA, USA
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Pfizer	Berlin
Polyscience Europe GmbH	Eppelheim
Progen Biotchnik GmbH	Heidelberg
Qiagen GmbH	Hilden
R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Reckitt Benckiser	Slough, UK
Roche	Basel, Schweiz
Sakura Finetek Germany GmbH	Heppenheim
Sarstedt	Nümbrecht
Semperit Technische Produkte GmbH	Wien, Österreich

Servoprax GmbH	Wesel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest
Stratec Medizintechnik GmbH	Pforzheim
Synchem OHG	Felsberg / Altenburg
TebuBio	Paris
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Whatman International Ltd.	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum	Heidelberg

II.1.2. Geräte

Brutschrank:	Innova CO-170, New Brunswick Scientific
Bohrer:	#F01130300JA, 300l, Dremel
Drehrad:	SB1, Scientific Blood Tube Rotator, Stuart
Drucker:	Lexmark E460dn
Entwicklungsgerät:	Typ CP1000, Agfa
Einfrierbox:	#5100-0001, Cryo 1° freezing container, Nalgene, ThermoFisher
FACS-Gerät:	LSRII, BD Biosciences
Gelsystem DNA:	PerfectBlue 40-1410, Peqlab
Geldokumentation:	Gel Doc 1000, Bio-Rad
Heizblock:	Thermomixer compact, Eppendorf
Horizontalschüttler:	Laboshake, Gerhardt
IVIS-100 Imaging System:	Xenogen bzw. Caliper Life Sciences
Kameras:	EOS 350 Digital, Canon (Spiegelreflex) DXC-390 P, Sony (CCD) DS-1QM, Nikon (CCD), Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg
Kryomikrotom:	Kryostat, CM 3050, Leica Reichert-Jung Biocut 2035, Leica
Light Cycler:	Light cycler 2.0 Instrument, Roche
Magnetrührer:	Yellow line MSH basic, Roth
Mikroskope:	DM IL, inverses Routinemikroskop, Leica, mit Canon Kamera Eclipse 90i, Nikon, Nikon Imaging Center (NIC) Heidelberg Vanox-S, Olympus, mit Sony Kamera (CCD) Biozero, Keyence
Mikrowellenherd:	MS-1715TU Multiwave, LG Electronics
Mikrotiterplatten Reader:	Typ 16039400, Sunrise Basic, Tecan

	Wallace Victor ² 1420 Multi label counter, Perkin Elmer
pH-Meter:	Typ 761 Calimatic, Knick
Photometer:	Pharmacia Ultrospec III, GE Healthcare BioPhotometer Plus, Eppendorf
Pipettierhilfe:	Pipetboy comfort classic, IBS Integra
Plattenwascher:	anthos fluido Typ 24200, ASYS
pQCT:	XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P1, GE Healthcare Econo, Bio-Rad
Röntengerät:	Typ 8050-010, Faxitron, Field Emission Corporation
Ribolyser:	Ribolyser, Hybaid
Scanner:	Lide 60, Canon
Sterilbank:	Holten LaminAir 1.2, Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank:	Chronos Biosafe, Messer
Stromversorger:	Standard Power Pack P25, Biometra
Thermocycler:	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems T Personal Thermocycler, Biometra
Trockenschrank:	Sterilisorator, Memmert
Ultragefrierschrank:	Innova U725, New Brunswick Scientific
Vortex:	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen:	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern Feinwaage, ABJ 120-4M, Kern
Wasserbad:	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik SW-20C, Julabo
Zellzählapparatur:	Typ TT CASY®, Innovatis, Roche
Zentrifugen:	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen Biofuge 15, Heraeus Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific Light Cycler 2.0 Sample Carousel (20µl), Roche

II.1.3. Verbrauchsmaterial

Abdeckfolie:	#30001358, Tecan
Alkoholtupfer:	#G602, Servoprax
Aluminiumfolie:	#2596.1, Roth
Augen- und Nasensalbe:	#2182442, Bepanthen, Bayer
Chamber Slides:	#177445, Lab-Tek Chamber Slides, Nunc
Deckgläser:	#6101242, Marienfeld
Dialyseschlauch:	#44145, Servapor, Serva
Einbettungsform:	#64708955, Heraeus Kulzer
Einmalinjektionskanüle:	#304000, Microlance, 30G, BD Biosciences

	#302200, Microlance, 27G, BD Biosciences
Einmalröhrchen:	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt
Einmalspritze:	#300013, Plastipak, BD Biosciences
FACSRöhrchen:	#EC07.1 Autotube vials 1,2ml, Roth
Frischhaltefolie:	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Handschuhe:	#3780872, Sempercare, Semperit AG
Kapillare (light Cycler):	#0429292001, Roche
Knochenwachs:	#W30E, Klinikapotheke, Universitätsklinik Heidelberg
Kryoröhrchen:	#123263, Greiner bio-one
Mikrotiterplatten:	#439454, MaxiSorp, Nunc
	#655061, Microlon, Greiner bio-one
Microvette:	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt
	#20.1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt)
Objektträger:	#4951PLUS, Thermo Fisher Scientific
Parafilm:	#PM-996, Alcan Packaging
Pasteurpipetten:	#197734230, neo lab
PCR-Reaktionsgefäße:	#711080, Biozym
Petrischalen:	#633171, Greiner bio-one
Perfusionsschlauch:	Infusionsgerät R 87, #10355, Ohmeda, GE Healthcare
Pipettenspitzen:	#739296, #740290, Greiner bio-one
Reaktionsgefäße:	#72.706, 1,5 ml; #72.695 2 ml, Sarstedt
Röntgenfilme:	#10595000, Structurix D4 DW, Agfa
	#34090, CL-X Posure Filme, Pierce, Thermo Fisher Scientific
Serologische Pipetten:	(2, 5, 10 und 25 ml), Greiner bio-one
Sterilfilter:	#SLGV033RS, Millex GV, 0,22 µm, PVDF-Membran, Millipore
	#SLHV033RS, Millex HV, 0,45 µm, PVDF-Membran, Millipore
	#1564020, Nalgene, Thermo Fisher Scientific
Wattestäbchen (steril):	#974411, NOBA
Whatman Papier:	#3030917, 3MM CHr, Whatman International Ltd.
Zellkulturflaschen:	#169900, 25 cm ² ; #156800, 75 cm ² ; #159926, 175 cm ² , Nunc
Zellkulturplatten:	Flachbodenplatten: #150239, 6-Loch, #15020 12-Loch, #144530, 24-Loch, #150787, 96-Loch, Nunc; #655075 96-Loch Lumitrac200, Greiner;
Zellfilter:	#352360, 100 µm, Cell Strainer, BD Biosciences
Zentrifugenröhrchen:	#188271, 15 ml; #227261 50 ml, Greiner bio-one

II.1.4. Chemikalien

β-Alanin (C ₃ H ₇ NO ₂):	#23,972-0, Sigma-Aldrich
--	--------------------------

Azeton (C ₃ H ₆ O):	#40143 Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Borsäure (H ₃ BO ₃):	#A3581,1000, Applichem
Chloramin-T-Hydrat (CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂ N(Cl)Na·xH ₂ O):	#857319-100G, Sigma-Aldrich
Natrium Deoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄):	#3484.1, Roth
4-Dimethylaminobenzaldehyd((CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ CHO):	#39070, Fluka, Sigma-Aldrich
Dimethylnitrosamine (DMN, C ₂ H ₆ N ₂ O)	#N3632-1G, Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO, C ₂ H ₆ OS):	#D2650, Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O):	#A3567, 0500, Applichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈):	#E5134, Sigma-Aldrich
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂):	#10296, Grüssing
Ethanol (C ₂ H ₆ O):	#32205, Riedel-de Haën
Formaldehyd (CH ₂ O):	#31245, Riedel-de Haën
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃):	#7530.1, Roth
Isopropanol (C ₃ H ₈ O):	#69595, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Iodessigsäure (C ₂ H ₃ I ₂ O ₂):	#35603, ThermoScientific
Kaliumchlorid (KCl):	#A3582,1000, Applichem
Kaliumhydroxyd (KOH):	#Z12038, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
L-Hydroxyprolin (C ₅ H ₉ NO ₃):	#25834, Serva
Lichtgrün SF (C ₃₇ H ₃₄ N ₂ O ₉ S ₃ Na ₂):	#L5382-10g, Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS):	#444203-250ML, Merck
2-Methoxyethanol (C ₃ H ₈ O ₂):	#156205, Methyl Cellosolve, Sigma- Aldrich
Molybdatophosphorsäure (H ₃ [P(Mo ₃ O ₁₀) ₄]·xH ₂ O):	#1.00532.0025, Merck
Mowiol 4-88 Reagent:	#475904, Calbiochem, Merck
2-Methylbutan (C ₅ H ₁₂)	#A1263,1000, Applichem
Natriumchlorid (NaCl):	#0277, Mallinckrodt Baker
Natriumthiosulfat (NaS ₂ O ₃):	#S7026, Sigma-Aldrich
N-ethylmaleimid (C ₆ H ₇ NO ₂):	#2251,0005, AppliChem
Orange G (C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂):	#0317.2, Roth
Phenolphthalein (C ₂₀ H ₁₄ O ₄):	#34607, Sigma-Aldrich
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, C ₇ H ₇ FO ₂ S):	#A0999,0005, AppliChem
Pikrinsäure (C ₆ H ₃ N ₃ O ₇):	#80456, Fluka, Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl, 8N):	#Z-23/88, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
Säurefuchsin (C ₂₀ H ₁₇ N ₃ Na ₂ O ₉ S ₃):	#T128.1, Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄):	#13073, Grüssing

Sodiumbicarbonat 7,5% (NaHCO ₃):	#25080060, GIBCO, Invitrogen
Sodiumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃):	#11360-039, GIBCO, Invitrogen
Temgesic [®] :	#06GG51232LA, Reckitt Benckiser
Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄):	#289116, Sigma-Aldrich
Toluol (C ₇ H ₈):	#244511, Sigma-Aldrich
Tricin (C ₆ H ₁₃ NO ₅):	#T5816-25G, Sigma-Aldrich
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃):	#4855.2, Roth
Tris-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ xHCl):	#9090.3, Roth
Tween 20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆):	#9127.1, Roth

II.1.5. Puffer, Medien und Reagenzien

ACK-Puffer:	4,15 g Ammoniumchlorid / 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat / 100 µl 0,5 M EDTA (pH=7,5) in 500 ml H ₂ O _d , vor Gebrauch sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
Agarose:	#15510-027, Invitrogen
Agarosegel:	1,5% bzw. 2% Agarose in 1xTBE-Puffer geben und in der Mikrowelle aufkochen, 2µl red safe zugeben, vermischen, in Gelschlitten gießen und aushärten lassen, frisch herstellen
β-Alaninlösung:	10%ig: 5 g β-Alanin in H ₂ O _d , pH ad 8,7 (KOH), Lagerung bei 4°C
Mouse Albumin Elisa:	#EMA2201-1, AssayMax, AssayPro
Albumin Fraktion V (BSA):	#8076.2, Roth
αMEM:	#22561, Gibco, Invitrogen
Bio-Plex Pro™ Assay:	#M60-009RDPD, BIO-RAD
Blockierungspuffer (ELISA):	3% BSA in PBS-T Puffer
cDNA Synthese kit:	iScript Select, #170-8896, BioRad
Cell dissociation buffer:	#12151-014, GIBCO, Invitrogen
Chloramin-T-Lösung:	2,82 g Chloramin-T-Hydrat/50 ml, immer frisch ansetzen
Cytochrom-C:	#C2506-1G from equine heart, Sigma-Aldrich
DAPI:	#6335.1, 4',6-diamidino-2-phenylindol, Roth
DMEM:	#41966052, Gibco, Invitrogen
DMEM (phenolrotfrei):	#21063-029, Gibco, Invitrogen
DNA Exitus Plus:	#A7089, Applichem
DNA-Lysepuffer:	100 mM Tris (pH 8,5), 200 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8) 0,2% SDS, in 10 ml H ₂ O _{dd} (autoklavieren)
DNA-Marker:	#T835.1, 100 bp-DNA-Leiter extended, Roth
DNeasy blood & tissue Kit:	#69504, Qiagen
dNTPs:	#20-3012, Peqlab
DOC Lysepuffer:	2% Natrium Deoxycholat (von einer 10%igen Stock Lösung in H ₂ O _d), 20mM TrisCl (von einer 1M Stock Lösung, pH 8,8), 2mM

	Phenylmethansulfonyl Fluorid (PMSF, von einer 0,2M Stock Lösung in Ethanol), 2mM EDTA (von einer 0,5M Stock Lösung), 2mM Iodessigsäure (von einer frisch zubereiteten 100mM Stock Lösung in H ₂ O _d) und 2mM N-ethylmaleimid (von einer frisch zubereiteten 100mM Stock Lösung in H ₂ O _d), frisch zubereiten
DPBS:	#14190, Gibco, Invitrogen
Dynabeads®:	#100.04D, Protein G, Invitrogen #113.49D, Untouched™ Human NK Cells, Invitrogen # 110.35 Schaf anti Ratte IgG, Invitrogen
EDTA-Lösung:	10% EDTA, in H ₂ O _d , pH 7,4
EGTA Lösung (Perfusion):	EGTA (Stock 0,1 M) in HBSS (Endkonzentration: 0,5 mM), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Hepes
Ehrlich's Reagenz:	Lösung 1: 13,7 ml abs. Methanol/100 ml abs. Ethanol auf Eis rühren, Lösung 2: 60 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd/100 ml Ethanol auf Eis rühren. Lösung 1 unter Rühren auf Eis in Lösung 2 geben, bis zum vollständigen Lösen leicht erwärmen. Lagerung bei 4°C
Einbettungskit:	#17734-1, Osteo-bed bone embedding kit, Polyscience
Eiweiß-Glycerin:	#P049.1, Roth
Enhancer (PCR):	#01-1030, Peqlab
FACS Puffer:	2,5%FCS in DPBS
FCS:	#P30-3302, Pan Biotech
Geneticin:	#10131027, Gibco, Invitrogen
Hämatoxilin nach Gill II:	#T864.2, Roth
HBSS 10x:	#14185-045, GIBCO, Invitrogen
HBSS 1x:	HBSS 10x 1:10 in H ₂ O _d mit 350mg/l Natriumbicarbonat
HEPES:	#15630-056, GIBCO, Invitrogen
Histokitt:	#6638, Roth
Humanes Serum:	#P302702, Pan Biotech
IMDM:	#12440-16, Gibco, Invitrogen
IFN-γ:	#11500-1, TebuBio
Kaliumhydroxid (10 M):	56,11 g KOH/100 ml H ₂ O _d
Karbonat-Puffer (ELISA):	0,78 g Na ₂ CO ₃ / 1,5 g NaHCO ₃ in 500 ml H ₂ O _{dd} , pH 9,6, Lagerung bei 4°C (2 Monate haltbar)
Ketanest®:	Klinikapotheke Universität Heidelberg, Pfizer
KCl-Borat-Puffer:	15,45 g H ₃ BO ₃ + 56,25 g KCl lösen in 150 ml H ₂ O _d , pH ad 8,7 (KOH), ad 250 ml (mit H ₂ O _d), Lagerung bei 4°C
Kochsalzlösung (NaCl):	#190/12606084, B.Braun

Kollagen:	#C777-5mg, Sigma-Aldrich
Kollagenase Pronase Lsg.1:	0,015% Kollagenase B, 0,2% Pronase, 0,001% DNase I, in HBSS mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Hepes und 1% CaCl ₂ (von Stock 0,1 M), frisch zubereiten, vor Gebrauch sterilfiltrieren
Kollagenase Pronase Lsg.2:	0,005% Kollagenase B, 0,05% Pronase, 0,001% DNase I in HBSS mit 1% Pen/Strep, 1% Hepes und 1% CaCl ₂ (von Stock 0,1 M), frisch zubereiten, vor Gebrauch sterilfiltrieren
Light Cyler master kit:	#04735536001, light cyler taq man master kit, Roche
LSM-Lösung:	# J11-504, LSM 1077 ATMP-Ready, PAA
Luziferin:	# bc219, Synchem
Lysing Matrix D:	#D6913-100, MP Biomedicals
M-CSF:	#300-25-B, TebuBio
Micro BCA™ Protein assay:	#23235, Thermo Scientific
MgCl ₂ (PCR):	#01-1030, Peqlab
Mowiol (Elvanol):	5 g Mowiol 4-88 Reagent in 20 ml PBS (pH 8); ü. N. rotieren lassen bei RT, 10 ml Glycerin zugeben, 30 min bei 50°C im Wasserbad schütteln, daraufhin 30 min. bei 5000 g zentrifugieren, Lagerung bei -20°C
Mycoplasmen kit:	#11-1100 , VenorGeM®, Minerva Biolabs
Na-Thiosulfat-Lösung:	56,92 g NaS ₂ O ₃ in 50 ml H ₂ O _d lösen
NBF (10%):	36,5% Formaldehyd 1:10 in PBS verdünnt, stets frisch ansetzen
NEAA:	#11140-035, GIBCO, Invitrogen
Nycodenz Lösung:	25 ml Nycoprep™ Universal und 25 ml Tricine-Puffer, frisch zubereiten
Nycoprep™ Universal:	Axis-Shield, Progen, #1106865
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 zugeben, abkühlen, pH ad 7,4 (HCl), stets frisch ansetzen
ONE Glo™:	ONE Glo™ Luciferase Assay System, Promega, #E6120
PBS:	100 ml PBS (10x), in 1 L 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 in 5 L H ₂ O _d , pH 7,0, Lagerung bei RT
PBS-T:	100 ml PBS (10x) / 0,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05%) in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Penicillin/Streptomycin:	#15140-122, GIBCO, Invitrogen
Phosphormolybdän-Lsg.:	8 g Molybdätosphorsäure mit 4 g Orange G, ad 200 ml in H ₂ O _d , Lagerung bei RT
pl-pC:	# P9582, Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin:	#34-38-100-01, Cultrex, AMS Biotechnology

Ponceau-Lösung:	#33427.01, Serva
Probenpuffer (DNA, 4x):	50% Glycerin in 4x TBE, etwas Bromphenolblau zugeben
Proteinase-K:	#3115852001, Roche
Proteinase-K-Lösung:	20mg/ml Proteinase-K in H ₂ O _d
Puffer (rot, PCR):	#01-1030, Peqlab
Puromycin:	#540411, Merck
Qiashredder:	#79654, Qiagen
Red Safe:	#21141, Hiss Diagnostics
RNeasy Mini Kit:	#74104, Qiagen
Roti Histol:	#6640, Roth
RPMI:	#E15840, PAA, GE Healthcare
Säurefuchsin-Lösung:	0,2 g Ponceau Xylidine mit 0,1 g Säurefuchsin und 0,6 ml Essigsäure, ad 300 ml in H ₂ O _d , Lagerung bei RT
SDS Lösungspuffer:	1% SDS, 20mM TrisCl (pH 8,8), 2mM PMSF, 2mM EDTA, 2mM Iodessigsäure (frisch in H ₂ O _d zubereitet), 2mM N-ethylmaleimid (frisch in H ₂ O _d zubereitet)
Sirius-Rot F3B:	#43665, Direct Red 80, Fluka, Sigma-Aldrich
Stopplösung (ELISA):	0,5 M H ₂ SO ₄
Taq-Reaktionspuffer rot:	#01-1030, Peqlab
TBE:	100 ml TBE (10x), in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBE (10x):	108 g Tris / 55,6 g Borsäure / 4,65 g EDTA in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS:	100 ml TBS (10x), in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
TBS (10x):	12 g Tris / 88 g NaCl in 1L H ₂ O _d , pH ad 7,5
TBS-T Puffer:	100 ml TBS (10x)/1 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,1%) in 1 L H ₂ O _d , Lagerung bei RT
Tissue-Tek:	#4583, O.C.T. Compound, Sakura
TMB:	#613544, Merck
Trägerpuffer (pTH):	0,01mM β-Mercaptoethanol, 0,1mM Essigsäure in 0,9% NaCl
Tricin-Puffer:	1,8 g Tricin in 40 ml PBS lösen, pH ad 7,4 (NaOH), ad 50 ml mit PBS
Trypsin-EDTA:	#25300, Gibco, Invitrogen
Verdaulösung:	DMEM + 10%FCS und 1mg/ml Kollagenase I
Verdünnungspuffer (ELISA):	1,5% BSA in PBS-T
VCAM:	#643-VM-200, R&D Systems
Wachstumszusatz:	#E0760-15mg, für Endothelzellen, Sigma-Aldrich
Xylazin:	Klinikapotheke Universität Heidelberg
Zell-Dissoziations-Puffer:	#13151-014, GIBCO, Invitrogen
Zoledronsäure:	#484481, Zometa, Novartis

II.1.6. Antikörper, Enzyme und synthetische Oligonukleotide

II.1.6.1. Antikörper

II.1.6.1.1. Primärantikörper

- Anti-Desmin: Anti-Desmin-IgG aus Maus, Klon DE-R-11, (Dianova, #DLN-14830) Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:100 in 5% BSA in PBS, FACS: Verdünnung 1:20 in FACS Puffer
- Anti-CD3ε: Anti-CD3 ε-IgG aus armenischem Hamster, Klon 145-2C11, (BioLegend, #100324), Alexa Fluor® 647 konjugiert, Verdünnung 1:200 in FACS Puffer
- Anti-CD11b: Anti-CD11b-IgG aus ratte, Klon M1-70, (BioLegend, #101222), Alexa Fluor® 700 konjugiert, Verdünnung 1:1600 in FACS Puffer
- Anti-CD19: Anti-CD19-IgG aus Ratte, Klon 6D5, (BioLegend #115527), Alexa Fluor® 700 konjugiert, Verdünnung 1:800 in FACS Puffer
- Anti-CD31: Anti-CD31-IgG aus Ratte, Klon MEC 7.6, (Abcam, #ab7388), für Endothelzellisolation
- Anti-CD45: Anti-CD45-IgG aus Ratte, Klon 30-F11, (BD Pharmingen, #550539), 1:50 Verdünnung in 5% BSA in PBS
- Anti-CD45: Anti-CD45-IgG aus Ratte, Klon 30-F11, (BioLegend, #103125), Pacific Blue™ konjugiert 1:100 Verdünnung in FACS Puffer
- Anti-Col I: Anti-Kollagen Typ I-IgG aus Kaninchen, polyclonal (Millipore, Abcam, #AB765P), Verdünnung 1:100 in 5% BSA in PBS
- Anti-F4/80: Anti-F4/80-IgG aus Ratte, Klon BM8, (Biolegend, #123109), PE konjugiert, 1:200 in FACS Puffer
- Anti -FN: anti Fibronektin aus Schaf, (Biozol, #LS-C123551-1000), Verdünnung 1:200 in 5% BSA in PBS
- Anti-GFAP: Anti-GFAP-IgG aus Kaninchen, polyclonal, (Acris, #DP014-05), Verdünnung: 1:200 in 5% BSA in PBS
- Anti-PLVAP: Anti-PLVAP-IgG aus Ratte, Klon MECA-32, (AbDserotec, #MCA2539A647T), Alexa Fluor® 647 konjugiert, 1:25 in FACS Puffer
- Anti-Ly-6G: Anti-Ly-6G-IgG aus Ratte, Klon 1A8, (BioLegend, #123109), Alexa Fluor 647® konjugiert, Verdünnung: 1:200 in FACS Puffer
- Anti-α-SMA: Anti-α-SMA-IgG aus Maus, Klon 1A4, (Sigma-Aldrich, #C6198), Cy3-konjugiert, Verdünnung 1:200 in 5% BSA in PBS

II.1.6.1.2. Sekundärantikörper

- Anti-Kaninchen Alexa555: Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Molecular Probes, Invitrogen, #A21430), Alexa Fluor® 555-konjugiert, Verdünnung 1:500 in 5% BSA in PBS

anti Kann Alexa488:	Anti-Kaninchen-IgG aus Esel (Invitrogen, #A21206), Alexa Fluor® 488 konjugiert, Verdünnung 1:500 in 5% BSA in PBS
Anti Schaf Alexa555:	Anti-Schaf-IgG aus Esel, (Molecular probes, Invitrogen, #A-21436), Alexa Fluor® 555-konjugiert, Verdünnung 1:500 in 5% BSA in PBS
Anti-Ziege Cy3:	Anti-Ziege-IgG aus Maus, (Dianova, #205-165-108), Cy3 konjugiert, Verdünnung 1:500 in 5% BSA in PBS, starke Kreuzreaktion mit Ratte

II.1.6.2. Enzyme

DNase I:	#104159, grade II, Roche
Kollagenase B:	#1088807, Roche
Parathormon:	#H-4835.0005, PTH (1-34) human, Bachem
Pronase:	#165921, Roche
Proteinase-Inhibitoren:	#535142, Cocktail Set I, Calbiochem, Merck
Proteinase K:	#03115852001, Roche
Taq DNA-Polymerase:	#01-1030, Peqlab

II.1.6.3. Oligonukleotide

Zur Wahrung der besseren Übersicht wurden die Oligonukleotide jeweils der Methode angehängt, bei der sie verwendet wurden.

II.2. Zellkultur

II.2.1. Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂ Gehalt von 5% und bei 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Innova CO-170, New Brunswick Scientific) gehalten. Die Kultivierung erfolgte in dem jeweiligen Kulturmedium. Sämtliche Arbeiten zur Kultivierung, Passagierung und Konservierung (siehe II.3.4.2.3) der Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen (Holten LaminAir Sterilbank). Das Verhältnis von Wachstumsfläche [cm²] zu Medienvolumen [ml] betrug eins zu drei. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich (oder bei Erreichen einer ca. 70-80%igen Konfluenz) passagiert. Hierzu wurden das Medium entfernt, die adhärennten Zellen mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [engl.], GIBCO, Invitrogen, #14190) gewaschen und nach Absaugen des DPBS ca. eine Minute mit einem Zell-Dissoziations-Puffer (GIBCO, Invitrogen, #13151-014) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an das Kulturgefäß gelöst, anschließend in ihrem Kulturmedium aufgenommen, bei 250xg 3 Minuten lang zentrifugiert, gezählt (siehe II.2.2.), in Zellkulturmedium aufgenommen und in der erwünschten Anzahl wieder ausgesät.

II.2.2. Zählung der Zellen

Die Zellen wurden mit einem CASY[®] Gerät gezählt. Bei der CASY Technologie handelt es sich um ein Mehrkanal System zur Zellzählung, das mit einem elektrischen Feld arbeitet. Da eine intakte Zellmembran isolierend wirkt, kann bei der Messung die Viabilität der Zellen an Hand der Integrität der Plasmamembran bestimmt werden. Da der Strom bei einer Zelle mit zerstörter Zellmembran durch das Zytoplasma fließen kann und normale Zellen niemals kleiner als Ihr Kern sein können, ist die Größe der Zellen ist das Kriterium, mit welchem zwischen lebenden und toten Zellen diskriminiert wird. Weiterhin kann auf Grund der exakten Bestimmung der Zellgrößenverteilung und des Zellvolumens der Aggregationsgrad der Zellen bestimmt werden. Die Erstellung spezifischer Programme für die verschiedenen Zelllinien erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Hierzu wurden Zellen einer definierten Anzahl mit der „Casy[®] blue“ Lösung abgetötet und anschließend mit dem Gerät gemessen. Nun werden die so gemessenen Zellen auf Grund Ihrer geringen Größe für zukünftige Messungen als tote Zellen definiert. Nach einer weiteren Messung mit einer lebenden Zellpopulation wird die Verteilung der Zellen durch zwei Grenzen, deren eine die minimale Größe der Zellen und deren andere die maximale Größe der Zellen festlegt, definiert.

Zur Messung der Zellen wurde eine 150µl Kapillare genutzt und je 50µl Zellsuspension verdünnt in 10ml Casy[®]ton-Lösung eingesetzt. Zur exakten Bestimmung der oben beschriebenen Parameter wurden von dieser Verdünnung drei Messungen mit je 400µl Volumen durchgeführt.

II.2.3. Kryokonservierung der Zellen in gasförmigem Stickstoff

Da die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Experimenten genutzt werden mussten, die jedoch untereinander vergleichbar sein sollten, sollten für alle Untersuchungen Zellen der gleichen Passage genutzt werden. Daher war es notwendig, die Zellen zu konservieren. Da Zellen bei sehr tiefen Temperaturen über lange Zeit gelagert werden können, wurden die Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden Zellen einer möglichst niedrigen Passage, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und frei von Kontaminationen waren (siehe II.1.4) genutzt. Diese wurden nach Waschen mit DPBS ca. eine Minute mit dem Zell-Dissoziations-Puffer inkubiert, anschließend in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium [engl.], 4,5g Glucose/L, GIBCO, Invitrogen, #41966052) mit 10% FCS (fetal calf serum [engl.], fötales Kälber Serum, Pan Biotech, #P30-3302) aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und 3 Minuten bei 250xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM mit 16% FCS und 6% DMSO (Sigma-Aldrich, #D2650) aufgenommen, je $1,5 \times 10^6$ Zellen (im vorher genannten Medium) in ein Kryoröhrchen (#Greiner bio-one, #123263) überführt und diese in einer mit Isopropanol (#69595, Zentrallager Theoretikum, Universität Heidelberg) gefüllten Einfrierkiste (Nunc, Thermo Fisher Scientific, #3043317) bei -80°C langsam (1°C pro Minute) eingefroren. Nach ca. 24h bei -80°C wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank (Chronos Biosafe, Messer) überführt und dort in der Gasphase bis zur weiteren Verwendung (ca. -150°C) gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch, durch Schwenken des entsprechenden Kryoröhrchens in einem 37°C warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden direkt in vorgewärmtes, entsprechendes Medium gegeben und wie beschrieben inkubiert. Um Reste des DMSO zu entfernen, wurde das Nährmedium an dem Tag nach dem Auftauen gewechselt.

II.2.4. Überprüfung auf Kontaminationen – Mycoplasmentest

Bakterielle Kontaminationen werden im Allgemeinen bei starker Vergrößerung im Mikroskop oder durch Verfärbung des Indikatorfarbstoffs Phenolrot im Kulturmedium ersichtlich, eine Kontamination durch Mycoplasmen hingegen kann sehr unauffällig verlaufen. Daher wurden die Kulturzelllinien vor dem Einfrieren (siehe II.3.4.2.3.) und in regelmäßigen Abständen Mycoplasmentests unterzogen. Hierzu wurden, bei 90–100%iger Konfluenz der Zellen, $100\mu\text{l}$ der Medienüberstände für eine Zeit von 5 Minuten bei 99°C inkubiert und daraufhin 5 Sekunden lang bei $12470xg$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem PCR Kit (VenorGeM[®], Minerva Biolabs, #11-1100) zur Feststellung von Kontaminationen durch Mycoplasmen auf deren Anwesenheit getestet. Die Bedingungen hierbei waren wie folgt:

II.2.4.1. PCR Programm

Erster Schritt:	Einmalig 3 Minuten bei 95°C .
Zweiter Schritt:	30 Sekunden bei 95°C ,
Dritter Schritt:	30 Sekunden bei 55°C
Vierter Schritt:	30 Sekunden bei 72°C .

Die Schritte zwei bis vier wurden 39-mal wiederholt, danach ging es weiter mit Schritt fünf.

Fünfter Schritt: Kühlen auf 4°C.

II.2.4.2. PCR Ansatz

Bedingungen für je einen Ansatz:

15,3µl	H ₂ O _{dd}	2,5µl	Primer/Nukleotid-Mix
2,5µl	10x Reaktionspuffer	2,5µl	Interne Kontroll DNA
0,2µl	Taq (5U/µl)	2µl	Probe

Die Gesamtmenge pro Ansatz betrug 25µl.

Nach der PCR wurde jeder Ansatz mit 5µl DNA-Probenpuffer versetzt und durch eine Elektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel (siehe Abschnitt II.4.3.1.5.) analysiert. Der Erfolg der PCR wird durch eine interne Kontrolle überprüft, die eine Bande einer Größe von 191bp zeigt, anhand der positiv (Bande bei 265-268bp) und der negativ Kontrolle kann nun gezeigt werden, ob Mycoplasmen im Medium vorlagen.

II.3. Methoden im Leberprojekt

II.3.1. Die Mausmodelle im Leberprojekt

Für die Induktion der Fibrose und die darauf folgenden Peptidexperimente wurden „Wildtyp“ Tiere der Linie C57BL/6 verwendet, die über die interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg bei Charles River, Sulzfeld, bezogen wurden. Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Alter zwischen 7,5 und 8,5 Wochen.

II.3.2. Die Induktion einer Leberfibrose

Die Leberfibrose ist eine komplexe Erkrankung, die *in vitro* nicht nachgeahmt werden kann. Daher bedient man sich eines *in vivo* Modells, in dem man die Fibrose durch die Gabe von Chemikalien auslöst. Zur Induktion einer Fibrose durch die Gabe von Chemikalien, ist Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄), eine der am längsten und am häufigsten genutzten Methoden [317, 318], geeignet, aber auch Dimethylnitrosamin wird häufig zur Fibroseinduktion bei Nagern genutzt [319, 320].

II.3.2.1. Die Induktion einer Leberfibrose mit Dimethylnitrosamin (DMN)

Dimethylnitrosamin ist eine stark hepatotoxische Substanz und führt bei hoher Dosierung zu der Bildung von Fibrosen, bei niedrigerer Dosierung können jedoch Lebertumore entstehen [318, 321]. Es wird intraperitoneal verabreicht und wird in den Mikrosomen des Organismus zu Acetaldehyd metabolisiert, welches anschließend an Protein binden kann, was zu einem Funktionsverlust von Proteinen und Enzymen führen kann [322] und die DNA beeinträchtigt [323]. Hierdurch werden die Hepatozyten beeinträchtigt und Nekrosen im zentralen und periportal Bereich der Leberläppchen sind die Folge. Durch das Absterben der Endothelzellen mit der daraus resultierenden Bildung von Lücken im Bereich der Sinusoide werden die Hepatozyten morphologisch verändert und es kommt letztendlich zu deren Apoptose. Im Verlauf von vier Wochen wird das nekrotische durch fibrotisches Gewebe ersetzt [324]. Es konnte gezeigt werden, dass Acetaldehyd zusätzlich die Kollagenexpression der hepatischen Stellatezellen erhöht [325] und dieser Vorgang wahrscheinlich auf die Adduktbildung der Zellen mit dem Acetaldehyd zurückzuführen ist [323, 326]. Für die Etablierung einer Fibrose mit DMN genügt eine Behandlung über einen Zeitraum von vier Wochen [318] und die hierdurch ausgelöste Fibrose ist über einen Zeitraum von mehreren Monaten stabil [327]. Darüber hinaus ist der Verlauf der Fibrose bei dieser Methode dem Verlauf einer humanen Leberfibrose ähnlich [319, 328] und zeichnet sich durch eine hohe Reproduktionsrate und eine geringe Sterblichkeit der Tiere aus [328].

Die Chemikalie Dimethylsamin (DMN, Sigma-Aldrich, #N3632-1G) wurde in NaCl verdünnt (2mg/ml) und den Tieren mit einer sterilen Einmalspritze (#300013, Plastipak, BD Biosciences) und einer 27G Kanüle (#302200, Microlance, 27G, BD Biosciences) durch intraperitoneale (i.p.)

Injektionen in einer Konzentration von 10µg/g Körpergewicht der Maus verabreicht [329]. Da es sich bei den Tieren um junge Mäuse handelte, die noch im Wachstum waren und da ein Krankheitszustand der Tiere auch Auswirkungen auf deren Gewicht hat, wurden die Mäuse wöchentlich gewogen (Laborwaage, PRS 4200-2, Kern), und die zu injizierende Menge entsprechend angepasst. Die DMN Injektionen erfolgten 3x wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Die Tiere, die als Kontrollen dienten, erhielten anstelle der Chemikalie DMN die entsprechende Menge an steriler Kochsalzlösung (NaCl, B.Braun, #190/12606084) intraperitoneal injiziert.

II.3.2.2. Die Induktion einer Leberfibrose mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄)

Bei der intraperitonealen Injektion oder Sondenfütterung [317] mit CCl₄ entstehen durch die Aktivierung von Chlorkohlenstoff durch Oxidasen freie Trichlormethylradikale (CCl₃), die mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen reagieren oder die Peroxidation von Lipiden bewirken [318]. Letztendlich führen ein veränderter Fettgehalt der Hepatozyten und die Bildung von Nekrosen zur Apoptose der Leberzellen und damit nach vier- bis sechswöchiger Behandlung zur Bildung einer Fibrose. Erst ab einer achtwöchigen Behandlung kommt es zur Ausbildung einer Leberzirrhose [317].

Der Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄, Sigma-Aldrich, #289116) wurde den Tieren ebenso wie DMN intraperitoneal verabreicht, jedoch wurde dieser zuvor in Öl aufgenommen (in einer 1:5 Verdünnung) und mit einer 30G Kanüle (#304000, Microlance, 30G, BD Biosciences) appliziert. Von diesem Gemisch wurden den Mäusen 3x wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag), jedoch über einen Zeitraum von sechs Wochen 5µl pro Gramm Körpergewicht injiziert. Um die Gewichtsentwicklung der Tiere in die Dosierung der Chemikalie mit einzuberechnen, wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Die Tiere, die als Kontrollen dienten, erhielten anstelle der Chemikalie CCl₄ die entsprechende Menge an steriler Kochsalzlösung (NaCl) intraperitoneal injiziert.

II.3.3. Die Peptide

Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid pUR4“B“ (pUR4b), die Assemblierung einer Fibronectinmatrix erfolgreich verhindern kann [316]. Das Peptid pUR4b und das zugehörige Kontrollpeptid III-11c, das keine Effekte aufweisen sollte, wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Jane Sottile zur Verfügung gestellt.

II.3.3.1. Struktur der Peptide

Das Peptid pUR4b enthält die funktionelle *upstream* (functional upstream domain, FUD [engl.]) Domäne des F1 Adhäsins von *Streptococcus pyogenes*, und hat folgende Aminosäuresequenz:

**MRGSHHHHHHGSACELGTKDQSPLAGESGETEYITEVYGNQQNPVDIDKKLPNETGFSGNMVE
TEDTKA.**

In „fett“ gedruckt sind hierbei die C- und N-terminalen Sequenzen, die durch den Vektor beigetragen wurden. Das Peptid besteht aus 69 Aminosäuren (Abkürzungen siehe Tab.II.1), hat ein Molekulargewicht von 7130,6g/mol und einen Extinktionskoeffizienten von 0,52.

Der Kontrollvektor III-11c ist ein C-terminaler Teil des III-11 Moduls des Fibronectin und setzt sich aus folgender Aminosäuresequenz zusammen:

LPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSGESQPLVQ
TAVT**GSRSHHH**.

Auch hier sind die vom Vektor beigetragenen Aminosäuren in „fett“ gedruckt. Das Peptid enthält 75 Aminosäuren (Abkürzungen siehe Tab.II.1), hat ein Molekulargewicht von 7890g/mol und einen Extinktionskoeffizienten von 0,51.

Beide Peptide wurden vor Gebrauch mit einem mit DPBS angefeuchteten Sterilfilter (Millex GV, 0,22 µm, PVDF-Membran, Millipore, #SLGV033RS) sterilfiltriert, und quantifiziert. Hierzu wurden die Peptide in PBS verdünnt, an einem Photometer bei einer Wellenlänge von A280nm und A320nm gemessen. Anschließend der A320 Wert von dem A280 Wert abgezogen (A320 spiegelt die Lichtstreuung von Proteinaggregaten wieder) und die Peptidkonzentration anhand der Extinktionswerte ermittelt. Die Peptide wurden mit PBS auf die gewünschte Stockkonzentration von ca. 6mg/ml gebracht und bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

Tab.II.1. **Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren.** Angegeben ist der Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren und dessen Entschlüsselung.

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

II.3.3.2. Die Applikation der Peptide

II.3.3.2.1. Die Applikation der Peptide *in vivo*

Die Applikation der Peptide *in vivo* (pUR4b bzw. III11c, siehe II.3.3.) fand bei einer Gruppe nach den ersten 21 Tagen der Fibroseinduktion während der letzten 10 Tage (bis Tag 30) statt. Bei einer zweiten Gruppe wurden die Tiere erst nach Beendigung der Fibroseinduktion ab Tag 31 über einen Zeitraum von 14 Tagen (bis Tag 44) mit den Peptiden behandelt. In beiden Fällen wurden den Tieren der pUR4b bzw. der III11c Gruppen während dieser Behandlungszeit je 0,5mg des pUR4b-Peptids bzw. des III11c-Peptids täglich mit Hilfe einer sterilen 1ml Spritze und einer 27G Kanüle i.p. verabreicht (Lösung 2,5µg/µl in Kochsalz, daher Gesamtvolumen pro Maus: 200µl). Beide Peptide waren endotoxinfrei und wurden vor Applikation sterilfiltriert. Die Tiere die nicht mit Peptid behandelt wurden, wurden mit einer dem Volumen der Peptidlösungen entsprechenden Menge steriler Kochsalzlösung (NaCl) behandelt.

II.3.3.2.2. Die Applikation der Peptide *in vitro*

Für die Zellkulturversuche mit Peptiden wurden die frisch isolierten hepatischen Stellatezellen in Kulturmedium (siehe II.3.8.1. und II.3.8.1.1.1.) ausgebracht und bei den entsprechend zu behandelnden Zellen entweder pUR4b oder III11c in einer Konzentration von 1nM zugesetzt. Die Zellen wurden daraufhin über einen Zeitraum von 3 Tagen in diesem Medium kultiviert und wie in II.3.8. beschrieben weiterverarbeitet.

II.3.4. Töten der Mäuse und Probenentnahme

Um eine terminale Blutentnahme zu ermöglichen wurden die Tiere nach einer Betäubung getötet. Das Narkosemittel bestand aus einer Mischung von 10% Ketamin und 2% Xylazin, die in sterilem DPBS verdünnt wurden. Hiervon wurde den Mäusen mit einer sterilen Einmalspritze und einer 27G Kanüle ein Volumen von 10µl pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Dies entspricht einer Menge von 100mg/kg Ketamin und 3mg/kg Xylazin.

Bei dem gesamten Vorgehen wurde großen Wert auf eine zügige Arbeitsweise gelegt, um eine Autolyse des Gewebes zu verhindern. Sobald die Tiere betäubt waren, wurde mit Hilfe einer 1ml Spritze und einer 30G Kanüle Blut aus dem Herzen entnommen. Hiervon wurden 200µl für die Gewinnung von Blutserum in eine Microvette Z-Gel (mit Gerinnungsfaktor, Sarstedt, #20.1291) gegeben, diese dreimal invertiert und bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 10000xg fünf Minuten lang zentrifugiert. Für die Gewinnung von Blutplasma wurden weitere 200µl in eine Microvette (mit EDTA) gegeben, diese dreimal invertiert und bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 5000xg fünf Minuten lang zentrifugiert. Das Serum und Plasma wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Direkt im Anschluss wurde die Leber entnommen, die Leberlappen voneinander getrennt, einzeln auf whatman Papier (#3030917, 3MM CHr, Whatman International Ltd.) gelegt, für ca. 5-10 Sekunden in eiskaltes 2-Methylbutan (#A1263, 1000, Applichem) gehalten, dann für ca. 2-3 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei -80°C gelagert.

II.3.5. Nachweismethoden der Fibrose

II.3.5.1. Bestimmung des Kollagengehalts der Leber

Eine fibrotische Leber kennzeichnet sich durch die Anwesenheit von fibrotischem Narbengewebe (siehe I.2.4.), das hauptsächlich aus Kollagenen besteht. Dieses Protein enthält die Aminosäure Hydroxyprolin, die durch die Hydroxylierung der Aminosäure Prolin entsteht und in dieser Form nur in Kollagenen vorkommt. Das Kollagenprotein enthält in etwa 10% Hydroxyprolin [330]. Daher können anhand der Hydroxyprolinmenge Rückschlüsse auf den Kollagengehalt gezogen werden. Die Quantifikation von Hydroxyprolin ist eine alte [331] und dazu die gebräuchlichste Methode, um die Fibrose von Geweben bzw. die Ablagerung von Kollagen auszuwerten [330, 332].

Für die biochemische Bestimmung des Hydroxyprolingehalts wurden Leberstücke ungefähr gleicher Größe genommen und deren Nassgewicht mit Hilfe einer Waage bestimmt. Im Anschluss wurden sie mit je 2ml 8N Salzsäure (HCl, Zentrallager Theoretikum, #Z-23-88) in Teflonröhrchen gegeben und über eine Zeit von 16-24h bei 116°C in einem Trockenschrank (Sterilisator, Memmert) inkubiert. Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Proben mit H_2O_d auf ein Gesamtvolumen von 4ml gebracht und mit Hilfe einer Vortex (Vortex Genie 2, Bender & Hobein) gemischt. Zur Quantifizierung der Hydroxyprolinmenge wurde eine Standardkurve angesetzt, bei der je 30, 20, 15, 10, 8, 6 und $2\mu\text{g}$ L-Hydroxyprolin (Serva, #25834) in 4ml H_2O_d verdünnt wurden. Im weiteren Verlauf wurden alle Leberlysate- und Standard- Proben gleich behandelt. Zu allen Proben wurde zunächst ein Tropfen Phenolphthalein (Sigma-Aldrich, #34607) gegeben und der pH Wert mit 10M bzw. 1M Kaliumhydroxid (KOH, Zentrallager Theoretikum, #Z12038) auf einen pH-Wert von ca. 8,7 (zu erkennen am Farbumschlag von durchsichtig zu schwach rosa) eingestellt. Daraufhin wurden je Probe ca. 2-3g Kaliumchlorid (KCl, Applichem #A3582,1000), 0,5ml β -Alaninlösung (10% in H_2O_d , siehe II.1.5.) und 1ml Kalium-Borat Puffer (siehe II.1.5.) zugegeben, vermengt und während einer anschließenden 30 minütigen Inkubationsphase durch wiederholtes Vortexen vermischt. Dabei waren die Proben immer mit Salz gesättigt, bei Bedarf wurde weiteres KCl zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurde 1ml 0,2M Chloramin-T Lösung (siehe II.1.5.) zugegeben, wodurch Hydroxyprolin während einer exakt 25 minütigen Inkubationsphase zu Pyrrol-2-Karboxylsäure oxidierte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3ml 3M Natriumthiosulfat und anschließendem Mischen abgestoppt. Zum Waschen der Proben wurden daraufhin mit Hilfe einer Glaspipette 5ml Toluol (Sigma-Aldrich, #244511) je Probe zugefügt und diese 4 Minuten lang bei Stufe 5 horizontal geschüttelt (Gerhard, Laboshake). Durch eine Zentrifugation bei 470xg über einen Zeitraum von 4 Minuten wurden die Phasen wieder vonei-

inander getrennt, die obere Toluolphase abgenommen, verworfen und die Proben 30 Minuten lang in einem Wasserbad gekocht. Während dieser Zeit wurde Pyrrol-2-Karboxylsäure in Pyrrol umgewandelt, das nach Abkühlen der Proben und der Zugabe von 5ml Toluol durch 4 minütiges horizontales Schütteln gefällt wurde. Im Anschluss wurde wieder 4 Minuten lang bei 470xg zentrifugiert und daraufhin 2,5ml der Toluolphase mit je 1ml Ehrlich's Reagenz (siehe II.1.5.) versetzt und über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Hierauf konnte die Farbentwicklung bei 560nm mit Hilfe einer Quarzküvette und einem Photometer gemessen und anschließend anhand der Standardkurve evaluiert werden.

II.3.5.2. Färbungen von Matrix und Matrixkomponenten in Lebergefrierschnitten

II.3.5.2.1. Anfertigung von Lebergefrierschnitten

Die Lebern der Tiere wurden wie unter I.2.1 beschrieben entnommen bei -80°C aufbewahrt. Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Lebern in flüssigem Stickstoff zu dem auf -25°C gekühltem Kryomikrotom (Kryostat, CM 3050, Leica) transportiert. Dort wurde je Tier ein Leberläppchen in tissue-tek (O.C.T. Compound, Sakura, #4583) eingebettet. Nach Aushärten des Mediums wurden bei einer Kammertemperatur von -25°C und einer Objekttemperatur von -18°C 5µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger (Thermo Fisher Scientific, #4951PLUS) gebracht. Die fertigen Schnitte wurden bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten lange getrocknet und daraufhin direkt gefärbt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Eingefrorene Schnitte wurden vor dem Anfertigen von Färbungen ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, da sich beim Auftauen Kondenswasser bildete.

II.3.5.2.2. Färbung mit Picro-Sirius-Rot

Die extrazelluläre Matrix wurde mit Sirius-Rot F3B (Direct Red 80, Fluka, Sigma-Aldrich, #43665) nach der von Puchtler *et al.* publizierten Methode gefärbt [333]. Hierbei werden 5µm dicke Lebergefrierschnitte über einen Zeitraum von 10 Minuten in -20°C kaltem Azeton fixiert. Im Anschluss wurden auf jeden Schnitt ca. 200µl einer 1%igen in Pikrinsäure (Fluka, Sigma-Aldrich, #20456) verdünnten Sirius-Rot Lösung gegeben. Nach 90 Minuten Inkubation in einer feuchten Färbekammer bei Raumtemperatur wurden die Schnitte durch zweimaliges Tauchen in 0,5%ige Essigsäure gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte entwässert, indem sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe in 70, 80, 98 und 100%igen Alkohol getaucht wurden. Nach einer folgenden 2 minütigen Inkubation der Proben in Xylol Ersatz Lösung (Roti-Histol, Roth, #6640) wurde auf jeden Schnitt ein Tropfen Histokitt (Roth, #6638) gegeben, ein Deckglas (Marienfeld, #6101242) aufgelegt und überschüssiges Roti-Histol nach einer 24 stündigen Trocknungsphase vorsichtig mit Alkohol entfernt.

II.3.5.2.3. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Lebergefrierschnitte 5 Minuten lang mit einer 4% Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zum Waschen und Blockieren dreimal über einen Zeitraum von 5 Minuten in PBS (siehe II.1.5.) mit 5% BSA (Albumin Fraktion V, Roth, #8076.2) inkubiert. Hierauf wurden ca. 200µl des Primärantikörpers (verdünnt in PBS mit 5% BSA) auf die Proben gegeben und daraufhin eine Stunde lange bei Raumtemperatur in einer feuchten Färbekammer inkubiert. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen in PBS mit 5% BSA wurden je ca. 200µl eines entsprechend (in PBS mit 5% BSA) verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers auf die Schnitte gegeben und eine Stunde lange in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei Bedarf wurden dem Sekundärantikörper 0,06µg (0,3µg/ml) des fluoreszierenden Kernfarbstoffs DAPI (Roth, #6335.1) zugegeben. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen in PBS mit 5% BSA. Hierauf wurden ein Tropfen Mowiol und ein Deckglas auf die Proben gegeben. Bei einer Färbung mit zwei verschiedenen Primärantikörpern wurde zunächst wie oben beschrieben mit je einem Primärantikörper mit dem zugehörigen Sekundärantikörper und erst im Anschluss mit dem zweiten Primär- und Sekundärantikörper gefärbt.

Direkt konjugierten Primärantikörpern wurde bei der Färbung DAPI wie oben beschrieben zugesetzt. Die Lebergefrierschnitte wurden gegen Fibronectin (Biozol, #LS-C123551-1000), Kollagen (Abcam, #AB765P), α -sma (Sigma-Aldrich, #C6198) und CD45 (BD Pharmingen, #550539) gefärbt.

II.3.6. Evaluierung des Gesundheitszustandes der Tiere

II.3.6.1. Gewicht

Das Gewicht der Mäuse wurde wöchentlich gemessen (siehe II.3.2). Hierzu wurden die Tiere morgens je einzeln in einen leeren Wägekäfig überführt und gewogen.

II.3.6.2. Albuminwert

Die Albuminkonzentration im Serum der Mäuse wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA Kits (Mouse Albumin ELISA, AssayMax, AssayPro, #EMA2201-1) bestimmt. Hierzu wurde das eingefrorene Serum der Tiere (siehe II.3.1) aufgetaut und 1:8000 verdünnt in MIX Diluent aufgetragen. Der Versuch wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

II.3.7. Analyse und Quantifizierung von Proteinen

II.3.7.1. Herstellung von Gewebelysaten

Um Leberlysate für verschiedene Untersuchungen zu gewinnen, wurden etwa gleich große Leberstücke (Gewicht ca. 80-100mg) mit ca. 500µl DPBS oder 500µl DMEM mit 10% fötalem

Kalbsserum (FCS, Pan Biotech, #P30-3302) und 500µg/ml Antibiotikum (Geneticin, Gibco, Invitrogen, #10131027) in ein Röhrchen mit kleinen Kügelchen (Lysing Matrix D, Qbiogene, #6913-050) gegeben und mit Hilfe eines Ribolyser Geräts (Hybaid, Ribolyser) stark geschüttelt. Das Schütteln wurde auf Stufe 4 stoßweise in drei 15 Sekunden Intervallen durchgeführt um ein Erwärmen der Proben zu vermeiden. Die Proben wurden anschließend in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge kurz abzentrifugiert und daraufhin verwendet oder bis zu weiterem Gebrauch bei -20°C gelagert.

II.3.7.2. Quantifizierung von Proteinkonzentrationen

Der Proteingehalt von Proteinextrakten und Lysaten wurde mit einem Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fischer Scientific, #23235) bestimmt. Hierzu wurden die Proben 1:200 oder 1:1000 in H₂O_{dd} verdünnt, der Test nach Angaben des Herstellers in einer 96-Loch Platte durchgeführt und an einem Plattenlesegerät (Typ 16039400, Sunrise Basic, Tecan) gemessen und mit der dazugehörigen Software (Magellan V6.4) evaluiert.

II.3.8. Zelleexperimentelle Methoden im Leberprojekt

II.3.8.1. Isolierung primärer hepatischen Stellatezellen aus Mäuselebern

Hepatische Stellatezellen werden durch eine Perfusion der Leber gewonnen. Zunächst wurden die Tiere mit einem Ketamin/Xylazin Gemisch (siehe II.2.1) narkotisiert und das Erreichen der chirurgischen Toleranz durch Zwicken mit einer chirurgischen Pinzette zwischen die Zehen überprüft. Hierauf wurde der Maus der Bauchraum geöffnet, und eine EGTA Lösung (siehe II.1.5.) über ein Pumpsystem, das durch eine 25G Kanüle an die *Vena cava* angeschlossen ist, durch die Leber gepumpt. Gleichzeitig mit dem Beginn dieses Vorgangs wurde die *Vena abdominalis* durchtrennt um eine Stauung der Lösung zu verhindern und dieser einen Austritt aus der Leber zu ermöglichen. Der Spülvorgang wurde unterbrochen, nachdem das gesamte Blut aus dem Organ entfernt wurde und dieses eine hellbraune, gelbliche Färbung angenommen hatte. Hierauf wurden ca. 100ml eine Kollagenase-Pronase Lösung 1 (siehe II.1.5.) durch die Leber gepumpt, um Hepatozyten und Komponenten des Bindegewebes zu verdauen [334]. Im Anschluss wurde das Organ entnommen, in einer Kollagenase-Pronase Lösung 2 (siehe II.1.5.) zerkleinert und durch ein Zellsieb (Cell Strainer 100µm, BD Biosciences, 352360) gepresst um grobe Gewebsreste zu entfernen.

Um die lipidreichen hepatischen Stellatezellen von den anderen Zellen der Leber zu trennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen der zerkleinerten Leber in einem 50ml Reaktionsgefäß aufgenommen, 10 Minuten lang bei 400xg und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um die Kollagenase-Pronase Lösung 2 zu entfernen. Daraufhin wurden die pelletierten Zellen in 12ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution [engl.], GIBCO, Invitrogen, #14175) aufgenommen, diese mit 12ml Nycodenz Lösung (siehe

II.1.5.) vermischt, vorsichtig mit 2ml HBSS überschichtet und über einen Zeitraum von 22 Minuten bei 5°C und 1400xg zentrifugiert, woraufhin die Zentrifuge ungebremst bis zum Stillstand des Rotors weiterlief. Beim Entnehmen des Reaktionsgefäßes wurde darauf geachtet, dass die weiße Bande, die sich unterhalb der mit HBSS überschichteten Region befand sich nicht mit dem Rest der Lösung mischte, da sich in dieser Bande die hepatischen Stellatezellen befanden. Diese wurden mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in Kulturmedium (siehe II.3.8.1.1.1.) überführt. Nachdem die Zellen erneut 10 Minuten lang bei 400xg abzentrifugiert wurden, wurden sie wunschgemäß in Kulturmedium wiederaufgenommen und in Kulturgefäße überführt und wie in Abschnitt II.3.8.1.1.1. beschrieben kultiviert.

II.3.8.1.1. Kultivierung der Zellen

II.3.8.1.1.1. Kultivierung der primären hepatischen Stellatezellen

Die hepatischen Stellatezellen wurden direkt nach Ihrer Isolierung aus der Leber (siehe II.3.8.1.) in DMEM (4,5g Glucose/L) mit 10% FCS (fetal calf serum [engl.], fötales Kälber Serum) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, GIBCO, Invitrogen, #15140-122) gehalten. Da die Ausbeute der Zellisolierungen oft nur gering war und die hepatischen Stellatezellen verhältnismäßig kleine Zellen sind, wurden sie meist in 8 Kammer Zellkulturobjektträgern (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc, #177445), bei großen Ausbeuten auch in 24-Loch Kulturplatte (NUNC, #150787) kultiviert.

II.3.8.1.1.2. Kultivierung der Lungenepithelzellen des Mink (MLEC)

Die Lungenepithelzellen von Nerzen (MLEC, mink lung epithelial cells, zur Verfügung gestellt vom MPI für Biochemie, Martinsried) wurden unter Selektionsdruck gehalten und hatten daher dem Kulturmedium 500µg/ml Geneticin beigefügt. Da die Zellen für einen Lumineszenzversuch genutzt werden sollten wurden sie, um störende Einflüsse von Phenolrot zu vermeiden, in phenolrotfreiem Medium (DMEM, GIBCO, #21063-029) mit 10% FCS gehalten. Die Zellen wurden nach dem Auftauen drei Tage in Kultur gehalten, anschließend passagiert, über Nacht kultiviert und am folgenden Tag für den Lumineszenzversuch eingesetzt.

II.3.8.2. Herstellung von Matrixlysaten aus hepatischen Stellatezellen

Die Fibronektinassembly in die extrazelluläre Matrix ist ein schrittweiser Prozess, bei dem Fibronektin zunächst dünne zellassoziierte Fibrillen ausbildet, die durch eine fortlaufende Akkumulation von Fibronektin in ein dichtes Netzwerk aus Detergens unlöslichen Fibrillen umgebaut werden. Die biochemische Untersuchung der Fibronektin Matrix basiert auf der unterschiedlichen Löslichkeit in dem Detergens Deoxycholat. Die Methode zur Analyse der Fibronektinmatrixassembly wurde nach einem publizierten Protokoll leicht abgeändert [335].

Von den in 8 Kammer Zellkulturobjektträgern kultivierten Stellatezellen die zu ca. 80% konfluent waren (nach 2-3 Tagen Kultur) wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen anschließend mit 0,5ml DPBS/ Kammer gewaschen um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Daraufhin wurde

in jede Kammer 0,5ml DOC Lysepuffer (siehe II.1.5.) gegeben, ca. 3 Minuten lang inkubiert und das Zelllysate daraufhin mit einer 1ml Einmalspritze fünfmal durch eine 27G Kanüle gepresst um die genomische DNA zu zerkleinern und dadurch die Viskosität zu reduzieren. Die Lysate wurden daraufhin in 2ml große Reaktionsgefäße überführt und 15 Minuten lang bei 5°C in einer Tischzentrifuge bei 12470xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt (doc sol) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Das unlösliche Pellet (doc insol) wurde mit 200µl SDS Lösungspuffer (siehe II.1.5.) und Proteaseinhibitor (1:100) versetzt und kräftig gevortext. Von beiden Fraktionen wurden im Anschluss sowohl eine Proteinbestimmung (siehe II.3.7.2.) als auch ein ELISA zur Bestimmung der Fibronectinmenge (siehe II.3.8.3.) durchgeführt.

II.3.8.3. ELISA zum Nachweis von Fibronectin in Zelllysaten

Der Sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, [engl.]) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung löslicher Proteine. Hierbei wird das zu untersuchende Protein zunächst mit einem primären Antikörper an eine feste Phase gebunden und anschließend ein Sekundärantikörper an ein proteinspezifisches Epitop gebunden. Da der Sekundärantikörper mit dem Enzym Peroxidase konjugiert ist, das in einer Substratlösung eine Farbreaktion auslöst, kann das Protein mit Hilfe einer Standardreihe quantifiziert werden.

Der Gesamtfibronectingehalt wurde mit einem ELISA bestimmt, der nach der in Kanters *et al.* veröffentlichten Methode modifiziert ist [336]. Zunächst wurde auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte je Vertiefung 50µl einer in Karbonat-Puffer (siehe II.1.5.) verdünnten Primärantikörperlösung (anti-human Fibronectin, 0,12µg/ml) gegen Fibronectin aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte 3 mal mit je 350µl TBS-T Puffer (siehe II.1.5.) pro Vertiefung gewaschen und anschließend mit 50µl Blockierungspuffer (siehe II.1.5.) versehen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert um verbliebene freie Bindungsstellen abzusättigen. Während dieser Zeit wurde eine Standardreihe mit Fibronectin Konzentrationen von 4000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 und 0 (Leerwert) ng/ml Mausplasmafibronectin (Dunn, #IMFBN), verdünnt in Verdünnungspuffer (siehe II.1.5.) angefertigt. Das Fibronectin hierfür wurde in unserer Arbeitsgruppe aufgereinigt [337]. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platte mit TBS-T Puffer wurden in jede Vertiefung 50µl der zu analysierenden Probe, bzw. der Standardreihe oder der Kontrollen (entsprechend verdünnt in Verdünnungspuffer) gegeben und die Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal gewaschen, 50µl des sekundären Antikörpers (anti-human Fibronectin, HRP konjugiert, 1:500 verdünnt in Verdünnungspuffer) pro Vertiefung aufgetragen und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Platte fünfmal gewaschen, je Vertiefung 50µl TMB Substratlösung (Merck, #613544) zugegeben und die Reaktion nach 30 Minuten mit Stopp Lösung (siehe II.1.5.) beendet. Die Platte wurde daraufhin direkt in einem Mikrotiterplattenlesegerät gelesen und ausgewertet. Als Kontrolle diente Mausplasma, das aliquotiert bei -20°C gelagert wurde.

II.3.8.4. Luziferase Versuch zum Nachweis des Gesamt TGF- β aus Leberlysaten

Zum Nachweis des TGF- β Gehaltes von Leberlysaten benutzten wir einen Luziferase Reporter Versuch. Dieser basiert auf Lungenepithelzellen von Nerzen, die das Gen des Leuchtkäfers für Luziferase enthalten, das unter der Kontrolle eines verkürzten Plasminogen Aktivator Inhibitor I Promotors (PAI-I) steht, welcher durch TGF- β aktiviert wird [338].

Die MLEC Zellen wurden nach kurzer Kultur (siehe II.3.8.1.1.2.) mit DPBS gewaschen, mit Zell-Dissoziations-Puffer abgelöst, in dem entsprechendem Kulturmedium wiederaufgenommen, 5 Minuten bei 400xg abzentrifugiert, mit dem casy® Gerät gezählt und je 35 000 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Loch Kulturplatte (Nunc, #150787) ausgesät. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden kultiviert und hatten hierauf eine ca. 100%ige Konfluenz erreicht. Das Kulturmedium wurde entfernt und in den entsprechenden Vertiefungen durch 100 μ l mit Kulturmedium verdünnte (1:200) Leberlysate (siehe II.3.7.1.) ersetzt. Da TGF- β in der extrazellulären Matrix gespeichert wird, mussten weitere Leberlysate zur Freisetzung des Gesamt TGF- β s zunächst 10 Minuten lang bei 80°C in einem Thermocycler erhitzt werden. Weiterhin wurde eine Standardkurve aus 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,1563, 0,07813, 0,0391, 0,0195 und 0 ng/ml TGF- β (Sigma-Aldrich, #T7039) erstellt und je 100 μ l pro Vertiefung aufgetragen.

Sowohl Proben als auch Standardkurve wurden in Duplikaten aufgetragen. Nach einer fünfstündigen Inkubation bei 37°C im Inkubator wurden je Vertiefung 50 μ l Medium entfernt und durch 80 μ l einer Luziferin Reagenz (ONE-Glo, Promega, #E610) ersetzt. Um eine komplette Lyse der Zellen sicherzustellen, wurde die Platte 10 Minuten lang bei -80°C eingefroren und anschließend 10 Minuten lang bei 37°C im Inkubator wieder aufgetaut. Direkt im Anschluss wurde mit einem Luminometer (Wallace Victor² 1420 Multi label counter, Perkin Elmer) über einen Zeitraum von 2 Sekunden die Emission der freien Photonen pro Sekunde gemessen und der TGF- β Gehalt der Proben anhand der Standardkurve berechnet.

II.4. Methoden im Tumorprojekt

II.4.1. Die Mausmodelle im Tumorprojekt

Die Mausstämme wurden in der interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg gezüchtet und gehalten.

Tab.II.1 Übersicht über die verwendeten Mauslinien und deren Herkunft

Mausstamm	Bezugsquelle
CD1 nude (Crl:CD1- <i>Foxn1^{nu}</i>); Auszucht	Charles River; Sulzfeld
ColCre (FVB-Tg(Col1a1-cre)1Kry/Mmcd)	MMRRC (engl. Mutant Mouse Regional Resource Center); USA
FN fl/fl (129/C57-Tg(fn1)tm1Ref)	MPI für Biochemie; Martinsried
MxCre-FN fl/fl (C57BL/6xCBA-Tg(Mx1-cre)1Cgn//129/C57-Tg(fn1)tm1Ref)	MPI für Biochemie; Martinsried
AlbCre-FN fl/fl (C57BL/6-Tg(Alb-cre)21Mgn/J)	MPI für Biochemie; Martinsried
eGFP	Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ); Heidelberg

II.4.1.1. Athymische, immundefiziente Nacktmäuse

Die haarlosen CD1 *nude* (CD1 nu/nu) Mäuse mit einem Albino Hintergrund wurden aus dem Mausstamm CD1 (Cesarean Derived 1 [engl.]), in den das Crl:NU-*Foxn1^{nu}* (*nude*) Gen transferriert wurde, durch eine Reihe von Kreuzungen und Rückkreuzungen von der Firma Charles River entwickelt. Diese Mäuse sind immundefizient, da ihnen ein Thymus fehlt, und sie daher nicht in der Lage sind, reife T- Zellen zu bilden. Somit eignen sich diese Mäuse für Untersuchungen in der Tumorbilogie, da sie nicht in der Lage sind, die körperfremden, humanen Tumorzellen abzustößen. Eine Besonderheit dieser Linie ist, dass weibliche Tiere, die für das *nude* Gen homozygot sind, für die Zucht ungeeignet sind, da sie Probleme bei der Ovulation haben und nicht in der Lage sind, Milch abzusondern. Um sicherzustellen, dass auch die im Folgenden beschriebenen konditionellen Knockout-Mäuse immundefizient waren, wurden für Kreuzungen homozygote männliche und heterozygote weibliche Tiere verpaart, und für die Versuche ausschließlich Mäuse verwendet, die für das *nude* Gen homozygot und damit immundefizient waren.

II.4.1.1.1. Konditionelle Knockout-Mäuse,

Die in II.4.1.1. beschriebenen CD1 *nude* Tiere wurden mit Mäusen verpaart, deren Fibronectin-Gen gefloxt vorlag (FN fl/fl für Fibronectin floxed/floxed), um immundefiziente Mäuse zu erzeu-

gen, bei denen Fibronectin spezifisch ausgeschaltet werden kann. Die FN fl/fl Mäuse wurden von Herrn Professor R. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

II.4.1.1.2. AlbCre-Mäuse

Bei Mäusen der AlbCre-Linie wird das zirkulierende Fibronectin (Plasmafibronectin) ausgeschaltet. Zur Generierung dieser Tiere wurde ein Albumin-Promotor (im Weiteren abgekürzt mit Alb-Promotor), der endogen, ohne Intervention während der embryonalen Entwicklung ab einem Alter von etwa 6 Wochen aktiviert wird, und ausschließlich in den Hepatozyten der Leber aktiv ist, genutzt [339-341]. Mäuse mit diesem Promotor wurden mit Tieren gekreuzt, deren Fibronectin gefloxt vorlag. Daraufhin wurden die Nachkommen mit dem Alb-Promotor, bei denen FN gefloxt war, mit CD1 *nude* Tieren verpaart, so dass Individuen mit dem Genotyp FN fl/fl AlbCre/+ CD1 nu/nu entstanden.

II.4.1.1.3. MxCre-Mäuse

Die Tiere der MxCre-Linie mit dem Genotyp FN fl/fl MxCre/+ CD1 nu/nu zeichnen sich dadurch aus, dass Fibronectin sowohl in der Zirkulation als auch im Knochenmark ausgeschaltet wird. Sie entstanden durch die Kreuzung von gefloxten Fibronectin Mäusen mit Tieren, deren Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Interferon und damit pIpC (Polyinosinic-Polycytidylic Säure) induzierbaren Mx-Promotors stand, und darauf folgender Weiterverpaarung der MxCre positiven FN fl/fl Individuen mit CD1 *nude* Tieren.

II.4.1.1.4. ColCre-Mäuse

Eine in den Osteoblasten und Osteozyten spezifische Fibronectinausschaltung wird bei den Mäusen der ColCre Linie erreicht. Zur Generierung dieser transgenen Mäuse, verwendeten wir Tiere, deren Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines 2,3 Kilobasen (Kb) langen Fragments des Promotors der Kollagen Typ I α 1-Kette (im Weiteren abgekürzt mit Col-Promotor) standen [342]. Dieser Promotor wird endogen, ohne Intervention während der Embryonalentwicklung ab Tag 14,5 aktiviert [343]. Diese Tiere wurden über das „Mutant Mouse regional Resource Center“ (USA) bezogen und mit Tieren deren Fibronectin Gen gefloxt vorlag verpaart, so dass Nachkommen entstanden, bei denen FN homozygot gefloxt (FN fl/fl) war und die einen aktiven Col-Promotor besaßen. Durch eine Weiterverpaarung dieser Tiere mit CD1 *nude* Mäusen wurden Mäuse mit dem Genotyp Fn fl/fl Col/Cre/+ CD1 nu/nu erzeugt.

II.4.1.1.5. AlbCre/eGFP-Mäuse

Um mit Hilfe der Reporter-mäuse die Aktivität des Alb-Promotors nachweisen zu können, wurden AlbCre-Mäuse mit eGFP Reporter-mäusen so verpaart, dass Tiere mit dem Genotyp FN fl/fl AlbCre eGFP/+ entstanden. Die eGFP Reporter-mäuse besitzen ein eGFP-Gen mit einem vorangeschaltetem Stoppcodon. Bei Aktivierung des jeweiligen Promotors wird das Stoppcodon entfernt und die Zellen beginnen eGFP zu produzieren. Somit kann die Aktivität der Promotoren in

den Zellen nachgewiesen werden [344]. Die eGFP Reporter-mäuse wurden von Herrn R. Constien (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

II.4.1.1.6. MxCre/eGFP-Mäuse

Analog zu den AlbCre/eGFP-Mäusen wurden auch MxCre-Mäuse mit eGFP Reporter-mäusen so verpaart, dass Tiere mit dem Genotyp FN fl/fl MxCre eGFP/+ entstanden. Somit konnte auch die Aktivität des Mx-Promotors in Reporter-mäusen überprüft werden.

II.4.1.1.7. DelCre/eGFP-Mäuse

Analog zu den AlbCre/eGFP-Mäusen wurden auch DelCre-Mäuse mit eGFP Reporter-mäusen so verpaart, dass Tiere mit dem Genotyp FN fl/fl DelCre eGFP/+ entstanden. Somit konnte auch die Aktivität des DelCre-Promotors in Reporter-mäusen überprüft werden.

II.4.2. Eingriffe bei Versuchstieren und deren Handhabung

II.4.2.1. Injektionen

Alle injizierten Substanzen waren entweder steril, oder wurden vor der Injektion steril filtriert.

II.4.2.1.1. Induktion des Mx-Promotors

Da der Mx-Promotor durch Interferon aktiviert wird, dessen Ausschüttung durch die Gabe der synthetischen Doppelstrang RNA plpC aktiviert wird, wurden den Tieren im Alter von ca. 3-4 Wochen 3 intraperitoneale Injektionen von je 300µl DPBS mit 2mg/ml plpC verabreicht. Zwischen den Einzelinjektionen lag je ein Tag ohne Injektionen (Injektionen üblicherweise Mo/Mi/Fr). Das plpC wurde in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 2mg/ml plpC in DPBS gelöst und wurde bis zur Verwendung steril bei -20°C gelagert.

II.4.2.1.2. Anästhesie der Tiere

Bei allen Tieren wurden die Augen während der Narkosedauer mit Augen und Nasensalbe (Bepanthen, Bayer, #2182442) benetzt um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden. Das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde durch ein Überprüfen des Zwischenzehenreflexes bestätigt.

II.4.2.1.2.1. Anästhesie vor der intrakardialen Injektion

Für die intrakardiale Applikation von Tumorzellen müssen die Tiere adäquat gelagert werden. Da aber der Kreislauf so aktiv wie möglich bleiben soll, werden die Tiere nur mit einer leichten Narkose betäubt. Hierzu wird den Mäusen ein Gemisch aus Ketamin und Xylazin subcutan injiziert.

II.4.2.1.2.2. Anästhesie vor der intratibialen Bohrung

Bei der intratibialen Bohrung ist neben der richtigen Lagerung der Tiere auch das Erreichen einer chirurgischen Toleranz von großer Bedeutung. Daher wurden die Tiere analog zu der Anästhesie

vor der intrakardialen Injektion betäubt. Da der Eingriff bei Nachlassen der Betäubung jedoch schmerzhaft sein kann, wurden die Tiere im Anschluss mit Schmerzmittel behandelt (siehe II.4.2.1.4.).

II.4.2.1.3. Luziferin Applikation

Nach Betäubung der Mäuse durch Isofluran in einer Inhalationskammer wurde den Tieren eine sterile Lösung von in DPBS gelöstem Luziferin (150mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Luziferaseaktivität wurde immer in dem Zeitraum von 5-10 Minuten nach Applikation gemessen (siehe II.3.2.1.6.2).

II.4.2.1.4. Schmerztherapie

Da die intratibiale Bohrung zu postoperativen Schmerzen bei den Tieren führen kann, wurden diesen ca. 6 Stunden nach der Operation und für einen darauf folgenden Zeitraum von zwei Tagen täglich Schmerzmittel verabreicht. Hierbei handelte es sich um Temgesic[®], dass den Tieren subcutan in einer Konzentration von 0,075mg/kg Körpergewicht injiziert wurde.

II.4.2.1.5. Parathormon und Zoledronsäureinjektionen

II.4.2.1.5.1. Parathormoninjektion

Den Tieren wurde angelehnt an eine veröffentlichte Methode über einen Zeitraum von vier Tagen täglich eine Dosis von 400ng/g [345] Parathormon (pTH human 1-34, bachem, #48350001) Körpergewicht subcutan injiziert. Das Parathormon wurde hierzu mit einem sterilen Trägerpuffer [346] auf die Konzentration von 1µg/20µl verdünnt.

II.4.2.1.5.2. Zoledronsäureinjektion

Die Applikation von Zoledronsäure erfolgte in Anlehnung an eine veröffentlichte Methode [347]. Den Tieren wurde das Mittel in einer Konzentration von 0,1mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Hierzu wurde die Zoledronsäure in steriler Kochsalzlösung verdünnt und auf eine Konzentration von 1,5µg/100µl gebracht. Die Injektionen erfolgten immer zeitgleich mit der ersten und dritten Parathormoninjektion.

II.4.2.1.6. Calceininjektionen

Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der eine starke Affinität zu Kalzium besitzt und daher an Stellen eingebaut wird, an denen der Knochen aktiv mineralisiert wird. Dieser Farbstoff emittiert bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 495nm grünes Licht einer Wellenlänge von 515nm. Den Tieren wurde das Calcein (Sigma-Aldrich, #C0875), das verdünnt (100mg Calcein in 19ml 0,9% Kochsalzlösung und 1ml 1M NaCO₃, Lagerung bei 4°C) und anschließend sterilfiltriert wurde, in einer Menge von 200µl/30g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Injektion erfolgte drei und einen Tag vor der Tötung der Tiere.

II.4.2.1.7. Xenotransplantat Einnistungs- und Metastasierungsmodell

Unter einer Xenotransplantation versteht man die Übertragung von lebensfähigen Zellen oder Zellverbände (auch ganze Organe) zwischen verschiedenen Spezies [348]. In dem hier vorgestellten Modell werden humane Tumorzellen durch intrakardiale Injektion auf Nacktmäuse (Xenografts [engl.]) übertragen. Um auszuschließen, dass die Zellen von den Mäusen abgestoßen werden, wurden ausschließlich Tiere verwendet, die homozygot für das Gen *nude* waren, somit keinen Thymus besaßen und immundefizient waren. Weitere genetische Modifikationen dieser Mäuse waren ein gefloxtes Fibronectin-Gen, das unter der Kontrolle der unter II.4.1.1. beschriebenen Promotoren stand.

Die humanen Tumorzellen wurden zunächst wie in II.4.4.3.1. beschrieben vorbereitet und anschließend in die betäubte Maus injiziert. Hierzu wurden 250µl der Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in einer sterilen 1ml Einmalspritze aufgezogen, entlüftet, eine sterile Einmalinjektionskanüle (27G) aufgebracht, das Totvolumen der Kanüle gefüllt und die Spritze entleert, bis nur noch 150µl in der Spritze verblieben. Nach Desinfektion der Haut der Maus (zur Vermeidung von Infektionen) mit einem Alkoholtupfer (Servoprax, #G602) wurde die Kanüle ventral vom Sternum 2mm rechts zwischen dem zweiten und dritten Interkostalraum platziert, leicht kaudal ausgerichtet und ca. in einem 25° Winkel relativ zur Sagittalebene subcutan in den linken Herzventrikel der Maus eingeführt. Die Öffnung der Kanüle zeigte hierbei nach links und das erfolgreiche Einführen der Kanüle führte zum Einströmen von hellem sauerstoffreichem Blut in die transparente Kanüle [349]. Der Erfolg dieser Methode wurde an einigen Tieren exemplarisch durch Biolumineszenzbildgebung bestätigt (siehe Abb.III.2.1.).

II.4.2.1.8. Xenotransplantat Einnistungs- und Metastasierungsmodell bei Hämatombildung

II.4.2.1.8.1. Hämatominduktion

Nach Bestätigen des Erreichens der chirurgischen Toleranz (siehe II.4.1.2.) wurden die Tiere dorsal fixiert (ventrale Seite nach oben). Hierauf wurde die Haut der Mäuse desinfiziert und mit einem ca. 1cm langem Schnitt (ausgehend vom Knie der Tiere in Richtung des Fußes) durchtrennt, der Muskel vom Schienbein gelöst und beiseite geschoben. Im Anschluss wurden 2 Löcher in die Tibia gebohrt, die einen Abstand von ca. 5-6mm voneinander hatten. Die Spülung des Abschnitts zwischen den Löchern erfolgte mit Hilfe einer Einmalspritze und einer Kanüle (30G), indem ca. 500µl steriles DPBS in das distale Bohrloch gespritzt wurden. Im Anschluss wurden die Bohrlöcher mit Knochenwachs verschlossen und die Haut des Tiers reponiert und vernäht. Während der gesamten Prozedur wurde auf eine sterile Arbeitsweise geachtet und die Wunde immer wieder mit einem sterilen Wattestäbchen und sterilem DPBS gesäubert. Die intratibialen Bohrungen wurden freundlicherweise von Frau Anja von Au durchgeführt.

II.4.2.1.8.2. Biolumineszenzmessungen

Die in den Xenotransplantatmodellen eingesetzten Tumorzellen exprimieren Luziferase (siehe II.4.4.1). Dieses Enzym katalysiert die ATP abhängige Oxidierung der polyzyklischen aromatischen Substanz Luziferin unter der Freisetzung von Lichtblitzen. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 530 bis 640nm und besitzt bei einer Temperatur von 37°C ein Emissionsmaximum bei 562nm [350].

Mit Hilfe dieses Biolumineszenzsystems können die injizierten Tumorzellen in der Maus durch die Gabe von Luziferin *in vivo* untersucht werden.

Da die Mäuse für die Kameraaufnahmen während der Messung der Biolumineszenz immobilisiert und gelagert werden müssen, wurden sie zunächst mit einer Inhalationsnarkose (1-2% Isofluran) anästhesiert. Hierauf wurden den Mäusen die Luziferin Lösung intraperitoneal injiziert, und in der 37°C warmen Aufnahmekammer des „IVIS-100 Imaging“ Systems positioniert. 5 Minuten nach der Injektion wurden ein Bild der Maus sowie die emittierten Photonen durch eine hoch sensitive Kamera aufgenommen.

II.4.2.1.8.3. Radiographie der Mausskelette

Radiographische Aufnahmen wurden nach Tötung der Tiere *ex vivo* durchgeführt. Die Tiere wurden ventral auf Röntgenfilme (Structurix D4 DW, Agfa, #10595000) gelegt und in einem Röntgengerät (Typ 8050-010, Faxitron, Field Emission Corporation) 90 Sekunden lang bei einer Röhrenspannung von 30kv bestrahlt. Die Filme wurden markiert, mit einem Entwicklungsgerät (Typ CP1000, Agfa) in einer Dunkelkammer entwickelt und anschließend mit einem Scanner (Lide 60, Canon) gescannt. Die so entstandenen Bilder konnten mit der Software Image J (Wayne Rasband, NIH) analysiert werden.

II.4.2.1.8.4. Ermittlung der Knochendichte mittels peripherer quantitativer Computertomographie

Bei der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) handelt es sich um eine Spezialform der Computertomographie (einem bildgebenden Verfahren auf Basis von Röntgenstrahlen), die für die peripheren Extremitäten (z.B. Arme und Beine) gedacht ist und aufgrund einer sehr aufwändigen Kompensation dazu in der Lage ist, die physikalische Dichte als Masse oder Volumen jedes Voxels exakt zu messen. Weiterhin ist man hiermit in der Lage zwischen trabekulären und kortikalen Bereichen des Knochens zu diskriminieren. Die peripheren Computertomographiemessungen wurden *ex vivo* am distalen Femur der Mäuse durchgeführt.

Bei allen Messungen wurde mit einer Auflösung von 70 Millivoxel, einer Schichtdicke von 0,5mm und einer äußeren Schwelle von 280 mg/cm³ gemessen. Mit der äußeren Schwelle wird die Grenze zwischen Knochen und Umgebung bestimmt.

II.4.2.1.9. Xenotransplantat Einnistungsmodell bei Anwendung pharmakologischer Modifikationen

Die Tiere wurden mit Parathormon oder mit Zoledronsäure oder mit beiden Substanzen behandelt (siehe Abschnitt II.4.2.1.5.). Hierfür wurden die Tiere in vier Gruppen aufgeteilt. Die Kontrolltiere (CT) erhielten ausschließlich Injektionen von Trägerlösung, die in ihrer Menge denen der anderen Tiere glichen. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von vier Tagen behandelt. Einer Gruppe wurde Parathormon (PTH), einer weiteren Zoledronsäure (ZOL) und einer anderen die Kombination von Parathormon und Zoledronsäure (PTH/ZOL) injiziert. Zusätzlich erhielten die Tiere aller Gruppen Calceininjektionen (siehe II.4.2.1.6.). Direkt nach dem letzten Tag der Behandlung wurden allen Tieren Tumorzellen intrakardial injiziert. Die Mäuse wurden 24 Stunden später getötet und die Organe zur weiteren Analyse entnommen.

II.4.2.2. Tötung der Tiere und Probenentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte wie in II.3.4. beschrieben. Den Tieren wurden je nach Bedarf Serum, Plasma, Knochen oder Organe entnommen. Auch hier wurde Wert auf eine zügige Arbeitsweise gelegt, um eine Degradation der Gewebe zu verhindern.

II.4.2.3. Versuchstierhaltung

Sämtliche Tiere wurden in der IBF Heidelberg gezüchtet. Es wurden ausschließlich spezifiziert pathogenfreie (SPF) Tiere verwendet, die unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Die Haltung der Mäuse erfolgte in 360cm² großen, durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Typ II), die mit Weichholzgranulat (#LTE E-001; Lab & Vet Service GmbH) ausgelegt waren, bei einer Temperatur von 22±2°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55±5%. Die Tiere wurden kontinuierlich mit Pellets (#V1166-341, ssniff Spezialdiäten GmbH; 23% Rohprotein, 6% Rohfett, 3,3% Rohfaser und 6,3% Rohasche; Angaben in %des Trockengewichts) gefüttert und hatten Leitungswasser über eine Trinkflasche zur Verfügung.

II.4.3. Molekularbiologische, biochemische und immunologische Methoden

II.4.3.1. PCR zur Ermittlung des Genotyps der Mäuse

Um den Genotyp der in der IBF Heidelberg gezüchteten transgenen Tiere festzustellen, nutzten wir eine „touch down“ Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction [engl.]).

II.4.3.1.1. DNA Isolation zur Bestimmung des Genotyps

Den Tieren wurde in einem Alter von 3 Wochen von Mitarbeitern der IBF Heidelberg eine Biopsie (ca. 5mm großes Schwanzstück) entnommen, eingefroren (-20°C) und an unser Labor weitergegeben. Hiervon wurden ca. 0,5mm abgeschnitten und zum Verdau in 92µl DNA-Lysepuffer (siehe II.1.5.) mit 8µl Proteinase-K-Lösung (siehe II.1.5.) gegeben und bei 55°C ca. 2-3 Stunden

inkubiert. Hierauf wurden die Proben 10 Minuten lang bei 99°C erhitzt, um die Proteinase-K zu inaktivieren. Um unverdaute Gewebereste wie z.B. Haare aus dem Lysat zu entfernen, wurden die Proben 20 Minuten lang bei 13000xg zentrifugiert und der Überstand anschließend direkt für die PCR genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

II.4.3.1.2. PCR Programm

Erster Schritt: Einmalig 3 Minuten bei 95°C.

„Touch down“:

Zweiter Schritt: 30 Sekunden bei 95°C,

Dritter Schritt: 30 Sekunden bei 63°C (je Wiederholung wurde die Temperatur um 1°C verringert)

Vierter Schritt: 30 Sekunden bei 72°C.

Die Schritte zwei bis vier wurden 10-mal wiederholt, danach ging es weiter mit Schritt fünf.

„Amplifikation“:

Fünfter Schritt: 30 Sekunden bei 95°C.

Sechster Schritt: 30 Sekunden bei 53°C

Siebter Schritt: 30 Sekunden bei 72°C

Die Schritte fünf bis sieben wurden 35-mal wiederholt, danach folgte der achte Schritt.

Achter Schritt: 3 Minuten bei 72°C

Anschließend wurden die Proben bei 4°C für unbegrenzte Zeit (bis zur Entnahme) gekühlt.

II.4.3.1.3. PCR Ansatz

Bedingungen für je einen Ansatz:

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

Die Gesamtmenge pro Ansatz betrug 25µl.

II.4.3.1.4. Sequenzen der PCR Primer

FN vorwärts: 5'TGT CCC ATA TAA GCC TCT GCT3'

FN rückwärts: 5'ACC CCT GAG CAT CTT GAG TG3'

Mx vorwärts: 5'GCA AGC TCA GGC TTT TTC AC3'

Cre rückwärts: 5'ATG TTT AGC TGG CCC AAA TG3'

Alb vorwärts: 5'TAG TGT GGT TAA TGA TCT ACA G3'

Cre rückwärts: 5'ATG TTT AGC TGG CCC AAA TG3'

Col vorwärts: 5'CAG CTC TCC ATC AAG ATG GT3'
 Cre rückwärts: 5'ATG TTT AGC TGG CCC AAA TG3'

eGFP vorwärts: 5'TCG TGA CCA CCC TGA CCT A3'
 eGFP rückwärts: 5'TCG TCC ATG CCG AGA GTG AT3'

RAGE vorwärts: 5'GAA GGA AGC ACC ATG CCA3'
 RAGE rückwärts: 5'AGG ACC TTC CAA GCT TCA GT3'

DelCre vorwärts: 5'AAC ATG CTT CAT CGT CGG3'
 DelCre rückwärts: 5'TTC GGA TCA TCA GCT ACA CC3'

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 25µM eingesetzt (außer denjenigen für eGFP und RAGE (beide 10µM)).

II.4.3.1.5. Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA Fragmente

Zur Auftrennung der DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden die Proben je mit 5µl Probenpuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel (siehe II.1.5.) aufgetragen. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde zusätzlich ein DNA Marker (100 bp-DNA-Leiter extended, Roth, #T835.1) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem Gelsystem (PerfectBlue, Peqlab, #40-1410) bei 150 Volt (Standard Power Pack P25, Biometra) in TBE-Puffer (siehe II.1.5.) und die Dokumentation unter UV Licht (Gel Doc 1000, Bio-Rad).

II.4.3.2. ELISA zur Ermittlung des Gesamtfibronektingehalts im Plasma der Mäuse

Der ELISA zur Ermittlung des Gesamtfibronektingehalts im Plasma der Tiere wurde analog zu dem in II.3.4.3. beschriebenen durchgeführt. Das Plasma der Mäuse wurde hierbei 1:750 verdünnt. Die Ergebnisse des ELISAs wurden auch hier zum Proteingehalt korrigiert.

II.4.3.3. DNA-Isolation aus murinem Gewebe

Die genomische DNA verschiedener Gewebe wurde mit dem DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, #69504) isoliert. Die Isolation wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Um die Lokation der Tumorzellen im murinen Knochen zu untersuchen, wurden die Knochen zunächst in drei Abschnitte (Epiphyse distal, Diaphyse, Epiphyse proximal, siehe Abb.II.1) unterteilt und die DNA dieser drei Abschnitte getrennt untersucht.

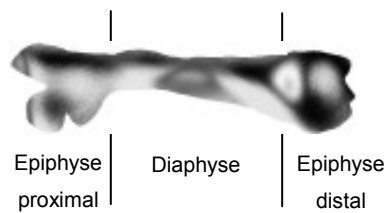


Abb.II.1. **Schematische Darstellung der Unterteilung des Femurs in drei Abschnitte.** Um die Tumorzellen im Knochen zu lokalisieren, wurden die Femora in je drei Abschnitte unterteilt und analysiert.

Um später herauszufinden, ob die Tumorzellen bevorzugt im Knochenmark oder am Knochen selbst gefunden werden können, wurde bei der DNA Isolation der Knochen zunächst mit DPBS ausgespült, das DPBS mit den Knochenmarkzellen 3min lang bei 470xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für die DNA Isolation verwendet. Der gespülte Knochen wurde aufgeschnitten und über Nacht lysiert, bis der Knochen leicht angegriffen, jedoch noch nicht vollständig aufgelöst war. Um eine hohe DNA Konzentration zu erlangen, wurde in 50µl Elutionspuffer eluiert.

II.4.3.4. RNA-Isolation aus murinem Gewebe

Zur Gewinnung von RNA aus murinem Gewebe (Knochenmark) wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, #74104) genutzt. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Aufbrechen der Proben durch die Qiasredder Säulen (Qiagen, #79654).

II.4.3.5. Reverse Transkription der RNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA (copy-DNA) erfolgte mit dem iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, #170.8896) nach Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

II.4.3.6. Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Mit der genomischen DNA bzw. der cDNA wurde eine quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Hierzu wurde ein Light cycler 2.0 Instrument (Roche) benutzt. Die Bedingungen während der einzelnen Schritte der qPCR waren wie folgt:

II.4.3.6.1. QPCR Programm

Erster Schritt: Einmalig 10 Minuten bei 95°C.

Zweiter Schritt: 10 Sekunden bei 95°C,

Dritter Schritt: 30 Sekunden bei 55°C

Vierter Schritt: Eine Sekunde bei 72°C.

Die Schritte zwei bis vier wurden 45-mal wiederholt, danach ging es weiter mit Schritt fünf.

Fünfter Schritt: 30 Minuten bei 40°C.

II.4.3.6.2. QPCR Ansatz

Bedingungen für je einen Ansatz:

1µl	5' Primer	0,2µl	Sonde
1µl	3' Primer	1µl	DNA (Probe) bzw. cDNA
4µl	Taq-Man master mix + Taq	12,8µl	H ₂ O _{dd}

Die Gesamtmenge pro Ansatz betrug 20µl.

Alle Reagenzien wurden in einem Kit erworben (LightCycler, TaqMan Master, Roche, #04735536001).

II.4.3.6.3. Sequenzen der qPCR Primer

Alu vorwärts: 5'CAT GGT GAA ACC CCG TCT CTA3'

Alu rückwärts: 5'GCC TCA GCC TCC CGA GTA G3'

Sonde Alu: 5'ATT AGC CGG GCG TGG TGG CG3'

Sonde Alu mit den Modifikationen: 5' Mod.: 6-FAM;
3'Mod.: Tamra

β-Aktin vorwärts: 5'CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG3'

β-Aktin rückwärts: 5'ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA3'

Sonde β-Aktin: 64 universal probe library:
5'CCA GGC TG3'

Sonde mit den Modifikationen: 5' Mod.: 6-FAM;
3'Mod.: dunkler quencher (Roche)

MCP-1 vorwärts: 5'GTG GAG GCC CTG TTG AAG3'

MCP-1 rückwärts: 5'GGT TGA AGG TGG CAA TCG3'

Sonde MCP-1: 62 universal probe library:
5'ACC TGC TG3'

Sonde mit den Modifikationen: 5' Mod.: 6-FAM;
3'Mod.: dunkler quencher (Roche)

IL-12 (p30) vorwärts: 5'GAA TCC AGC GCA AGA AAG AA3'

IL-12 (p30) rückwärts: 5'TTG CAT TGG ACT TCG GTA GA3'

Sonde IL-12 (p30): 94 universal probe library:
5'GGA GAC AG3'

Sonde mit den Modifikationen: 5' Mod.: 6-FAM;
3'Mod.: dunkler quencher (Roche)

Die verwendeten Primer wurden in einer Konzentration von 10µM eingesetzt, die Sonden 100µM.

II.4.3.7. Detektion humaner Zellen in murinem Gewebe mit Hilfe der qPCR

Zur Detektion der humanen Zellen in murinem Gewebe verwendeten wir eine quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR, quantitative polymerase chain reaction [engl.]) unter Nutzung der humanspezifischen Alu Sequenz [351]. Alu Sequenzen sind hochrepetitiv und machen mit $0,5-1,1 \times 10^6$ Sequenzen 8-13% der humanen genomischen DNA aus [352, 353]. Da zahlreiche Alu Sequenzen pro Chromosomensatz einer Zelle auftreten, führt dies zu einer Amplifizierung des Signals. Somit konnten auch eine geringe Menge humaner Zellen in der großen Menge muriner Zellen detektiert werden. Die Methode erfolgte in Anlehnung an bereits veröffentlichte Protokolle [354, 355]. Die qPCR wurde wie in II.4.3.6. beschrieben durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen β -Aktin Standardkurve.

II.4.3.8. Analyse der Zytokinumgebung mit Hilfe eines Multiplex Versuchs

Um die Zytokinumgebung im Knochenmark zu untersuchen, verwendeten wir einen Multiplex assay. Zunächst wurde das Knochenmark der Mäuse gewonnen, der Proteingehalt bestimmt und mit einem Verdünnungspuffer (bio rad) alle Proben auf eine Konzentration von 800 μ g/ml eingestellt. Die Multiplex Analyse wurde mit einem Bio-Plex Pro™ Assay (BIO-RAD, #M60-009RDPD) an einem Luminex Gerät von einer benachbarten Arbeitsgruppe durchgeführt.

II.4.3.9. Analyse der Zytokinumgebung mit Hilfe von qPCR

Zur Untersuchung der Zytokinumgebung des Knochenmarks wurde zunächst RNA aus dem Knochenmark der Tiere gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde diese mit einer qPCR analysiert.

II.4.3.10. CD45 Depletion des Knochenmarks, der Milz und der Leber

Da Tumorzellen im Knochenmark mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden sollten, wurden je 500 000 MDA Zellen pro Maus intrakardial injiziert, da es hierdurch leichter war, die Tumorzellen in der Überzahl der Knochenmarkzellen zu finden. Das Knochenmark wurde gewonnen, indem die Femora freipräpariert, aufgeschnitten und mit 2,5ml DPBS pro Femur gespült wurden. Hierauf wurde eine Ack Lyse mit 12ml Ack Puffer pro Probe durchgeführt, um die Erythrozyten zu zerstören, die aufgrund ihrer großen Anzahl eine weitere Aufbereitung und Auswertung der Proben erschwert hätten. Die Milz und die Leber wurden direkt nach ihrer Isolation kleingeschnitten und in DPBS durch ein 100 μ m Sieb gepresst. Hierauf folgte eine zweifache Ack Lyse mit je 12ml Ack Puffer um die Erythrozyten zu zerstören.

Da selbst bei der Injektion von 500 000 MDA Zellen pro Maus die murinen Zellen im Verhältnis zu den humanen Tumorzellen stark in der Unterzahl sind, wurden die Knochenmarkzellen und die Milzzellen vor der zytometrischen Analyse von CD45⁺ Zellen depletiert. Hierzu wurden magnetische Kügelchen genutzt, die mit Protein G ummantelt sind (Protein G, Dynabeads®, Invitrogen, #100.04D). Protein G ist eine von *G Streptococcus* Stämmen gebildete Zellwandkomponente, die den Fc Teil vieler Immunglobuline bindet. Nach einer 10 minütigen Inkubation von 5 μ l der Kü-

gelchen mit 0,5µg/µl CD45 Antikörper (anti-CD45 Klon 30-F11) in 200µl DPBS + 0,1%Tween auf einer Wippe, wurden ungebundene Antikörper durch 3 maliges Waschen mit je 200µl DPBS + 0,1%Tween und Abnehmen des Überstandes am Magneten entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 200µl DPBS mit 0,1%Tween auf die gewaschenen Kügelchen gegeben und 10 Minuten auf der Wippe inkubiert. Da nun die CD45 positiven Zellen an die Kügelchen gebunden hatten, wurde der Überstand nach Bindung der Kügelchen an einen Magneten abgenommen und für die zytometrische Analyse verwendet. Da die Leber ein besonders zellreiches Gewebe ist, war die Depletion einer ausreichenden Zellmenge über die magnetischen Kügelchen nicht möglich. Daher wurde die Fraktion der Immunzellen durch eine Zentrifugation bei 200xg über einen Zeitraum von 5 Minuten bei 4°C gewonnen. Die schweren Hepatozyten setzten sich hierbei ab und waren im Pellet wiederzufinden, wohingegen sich die leichteren Immunzellen im Überstand befanden.

II.4.4. Zellexperimentelle Methoden im Tumorprojekt

II.4.4.1. Zelllinien

Die im Folgenden beschriebenen Zelllinien exprimieren das Reporter-gen Luziferase. Um stabile Transfektanten zu generieren, wurde ein Mammalian-Expressionsvektor für Luziferase kreiert, der durch einen CMV-Promotor kontrolliert wird (CMV-Luc). MDA bzw. PC3 Zellen wurden mit dem kompletten Gen der Leuchtkäfer-Luziferase cDNA21, die in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert worden war, transfiziert. Daraufhin wurden stabile Transfektanten mit Geneticin (G418) selektiert und jeweils der Klon mit der höchsten Luziferaseexpression gewählt und in den weiteren Experimenten verwendet (MDA-MB-231/luc⁺ bzw. PC-3M-Pro4/luc⁺). Die Luziferase Aktivität dieser Zellen bleibt selbst bei Kultivierung über 40 Passagen und in gelegentlicher Abwesenheit von G418 stabil [356, 357].

Beide Zelllinien wurden von Herrn Dr. M. Cecchini (Universität Bern; Abteilung Urologie/urologisches Forschungslaboratorium, Bern) zur Verfügung gestellt.

II.4.4.1.1. MDA-MB-231/luc⁺

Die MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie wurde 1973 von einer 41-jährigen Patientin am M.D. Anderson Cancer Center aus dem Pleuraerguss (pathologische Zunahme der Flüssigkeit zwischen den Blättern der Pleura) gewonnen [358]. Diese humanen Adenokarzinomzellen besitzen eine epithelzellähnliche Morphologie, erscheinen *in vitro* phänotypisch spindelförmig und wachsen adherent in einer Einzelschicht (monolayer [engl.]). Nach der oben (II.4.4.1.) beschriebenen Transfektion dieser Zelllinie wurden Zellen dieser Linie immundefizienten Mäusen *in vivo* intrakardial injiziert, resultierende Knochenmetastasen extrahiert und *in vitro* kultiviert. Die so erhaltenen Zellen wurden erneut in immundefiziente Mäuse injiziert, resultierende Knochenmetastasen analog isoliert und erneut injiziert. Nach einer viermaligen Wiederholung dieses Vorgangs wurden die Zellen *in vitro* expandiert. Die so gewonnene Zelllinie besteht nun aus „knochensuchenden“

(bone-seeking clone [engl.]) Klonen, die hauptsächlich osteolytische Knochenläsionen verursachen [359]. Diese Zelllinie wurde für die weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Experimente genutzt.

Alle genutzten MDA Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert, dem sowohl 1µg/ml Puromycin als auch 800µg/ml Geneticin zugesetzt wurden, da die Zellen unter Selektionsdruck standen. Um diese Zellen von den Zellen, bei denen Fibronectin lentiviral ausgeschaltet war (siehe nächster Absatz), zu diskriminieren, wurden sie im weiteren Verlauf der Arbeit auch als MDA-CT bezeichnet.

Um die endogene Fibronectinproduktion dieser Zellen zu unterbinden, erfolgte eine lentivirale Transduktion mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi). Die Ausschaltung des endogenen Fibronectins, die Proliferation und Luziferase Aktivität dieser Zellen wurden im Anschluss getestet. Diese Arbeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Norman Hackl durchgeführt [337].

Die so generierten Zellen, die nicht in der Lage sind endogenes Fibronectin zu produzieren, werden im Weiteren auch als MDA-KD bezeichnet.

II.4.4.1.2. PC-3M-Pro4/luc⁺

Bei der PC3-3M-Pro4/luc⁺ Zelllinie handelt es sich um eine Prostata Adenokarzinom Zelllinie, die in den Knochen metastasiert [360]. Die Zellen wachsen *in vitro* adhärent in einer Einzelschicht (monolayer [engl.]). Alle genutzten MDA Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert, dem sowohl 1µg/ml Puromycin als auch 500µg/ml Geneticin zugesetzt wurden, da die Zellen unter Selektionsdruck standen. Diese Zellen werden im Weiteren auch als PC3-CT bezeichnet.

Auch bei dieser Zelllinie wurde von Herrn Dr. Norman Hackl analog zu der in II.4.4.1.1. beschriebenen eine lentivirale Ausschaltung des endogenen Fibronectins vorgenommen [337]. Die resultierende Zelllinie, die nicht mehr in der Lage ist endogenes Fibronectin zu produzieren, wird als PC3-KD bezeichnet.

II.4.4.2. Primärzellen

II.4.4.2.1. Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden aus dem Herzen einer Maus isoliert. Während der Zellisolation wurde auf eine möglichst sterile Arbeitsweise geachtet und alle verwendeten Materialien und Lösungen waren steril oder wurden vor Benutzung sterilfiltriert. Zur Gewinnung der Zellen wurde eine Maus getötet, das Herz entnommen und mit ca. 40ml 1x HBSS gewaschen. Anschließend wurde das HBSS entfernt und das Herz mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden daraufhin in ca. 20ml Verdauungslösung (siehe II.1.5.) aufgenommen und 45 Minuten lang in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C und ständigem Schütteln inkubiert. Diese Verdauungslösung wurde nach Ende der Inkubationszeit durch ein 40µm Zellsieb pipettiert und daraufhin 10 Minuten

lang bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10ml α MEM + 10%FCS resuspendiert und erneut bei 400xg 10 Minuten lang zentrifugiert. Da dieser Schritt dem Waschen der Zellen diente, wurde der Überstand erneut verworfen.

Währenddessen wurden magnetische Kügelchen (Schaf anti-Ratte IgG, Invitrogen, #110.35) zusammen mit 2 μ g eines Antikörpers gegen CD 31 (MEC 7.46, anti CD31) auf einem Thermo- schüttler nach Protokoll des Herstellers (der Kügelchen) inkubiert und überschüssige ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen (am Magneten) entfernt.

Dem Pellet wurde 1ml dieser Kügelchen zugegeben und beides zusammen über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Hierauf wurden die Kügelchen mit den an ihnen gebundenen Zellen dreimal mit DMEM + 10%FCS gewaschen während sie an einem Magneten anhafteten. Zuletzt wurden die Zellen mit 100 μ l Trypsin EDTA von den Kügelchen gelöst und in Kulturmedium (DMEM + 20%FCS, dem 200mM L-Glutamin, 100mM Natriumpyruvat, 1% NEAA, 10000U/ml Penicillin/Streptomycin, 1M HEPES, 3mg/ml EC-Wachstumssubstanz und 250U/ml Heparin zugesetzt wurde, das Medium wurde immer frisch angesetzt) überführt.

II.4.4.2.2. Knochenmarkzellen

Auch bei der Isolation der Knochenmarkzellen wurde während der gesamten Prozedur auf eine möglichst sterile Arbeitsweise geachtet und alle verwendeten Materialien und Lösungen waren steril oder wurden vor Benutzung sterilfiltriert.

Zur Isolation der Knochenmarkzellen wurden Mäuse getötet, ihre Beine entnommen und die Femora freipräpariert. Die Epiphysen wurden abgeschnitten und zusammen mit den Diaphysen mit sterilem DPBS in ein 15ml Gefäß ausgespült. Nach einer 4minütigen Zentrifugation bei 400xg wurde der Überstand abgenommen und eine AcK Lyse mit 12ml sterilem AcK Puffer durchgeführt, um die Erythrozyten zu zerstören, die aufgrund ihrer großen Anzahl eine erfolgreiche Kultivierung der Zellen erschwert hätten. Daraufhin wurden die Zellen in 10ml DMEM mit 10% FCS gewaschen, bei 400xg 4 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen anschließend in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

II.4.4.2.3. Nk-Zellen

Die Nk-Zellen wurden in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, GIBCO, Invitrogen, #21980-032) kultiviert, welches mit 10% humanem Serum (Pan Biotech, #P302702), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA (Non Essential Amino Acids, [engl.], nicht essentiellen Aminosäuren, GIBCO, Invitrogen, #11140-035) und 1% Sodium Pyruvat (GIBCO, Invitrogen, #11360-039) versetzt wurde. Die Zellen wurden in 96-Loch Rundboden Kulturplatten in Suspension gehalten.

II.4.4.2.4. Makrophagen

Die verwendeten Makrophagen wurden von einer befreundeten Arbeitsgruppe mit Hilfe von anti-CD14 beschichteten MACS beads aus humanen buffy coats isoliert und zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI Medium (PAA, #E15840) mit 10%FCS gehalten, dem entweder IFN- γ (interferon γ , 1000U/ml, TebuBio, #11500-1) oder M-CSF (macrophage colony stimulating factor, 50ng/ml, TebuBio, #300-25-B) zugegeben wurde.

II.4.4.3. Untersuchungen in den Zelllinien

II.4.4.3.1. Vorbereitung der Zellen für die intrakardiale Injektion

Um bei der Injektion Zellen mit einer möglichst hohen Viabilität zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen immer drei Tage vor der Verwendung so ausgebracht, dass am Tag der Injektion eine Konfluenz von 70 bis 80% erreicht wurde. Hierzu wurden je $3,8 \times 10^6$ Zellen der entsprechenden Zelllinie in einer 175cm^2 großen Kulturflasche ausgesät. Da die Zellen mit Geneticin, einem Aminoglykosid, das irreversibel an die 80S Ribosomenuntereinheit eukaryotischer Zellen bindet und damit die Proteinbiosynthese hemmt, unter Selektionsdruck kultiviert wurden (siehe II.4.4.1.1.), wurden sie am Tag vor der Injektion zweimalig mit je 18ml DPBS gewaschen und Zellkulturmedium (+10% FCS) ohne Antibiotika zugegeben. Am Tag der intrakardialen Injektion wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit je 18ml DPBS mit Zell-Dissoziations-Puffer von der Kulturflasche gelöst, in 8ml Kulturmedium (+10% FCS) aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und eine entsprechende Menge Zellsuspension 3 Minuten bei RT und 250xg zentrifugiert und anschließend in dem Volumen DPBS resuspendiert, mit dem eine Zellzahl von 10^5 Zellen pro 100 μl erreicht wurde. Diese Zellsuspension wurde nach nochmaliger Überprüfung der Zellkonzentration zu je 400 μl aliquotiert (je Injektion ein Aliquot) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Injektionen wurden ausschließlich Zellen verwendet, bei denen eine Lebendzellzahl von mehr als 96% gemessen werden konnte. Nach Beendigung der intrakardialen Injektionen wurde die Zellzahl erneut überprüft.

II.4.4.3.2. Adhäsions Versuche

Mit Hilfe der Adäsions Versuche sollte herausgefunden werden, ob die Zellen der MDA-CT und der MDA-KD Linie unterschiedlich stark an unterschiedlichen Materialien, Matrixkomponenten und Zellen adhären. Da diese Zellen bei der Zugabe von Luziferin Photonen emittieren konnten die Zellen mit einem Luminometer detektiert werden.

II.4.4.3.2.1. Versuche zur Klärung der Adhäsion auf Matrixkomponenten

Zunächst wurden 96-Loch Kulturplatten mit den verschiedenen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen beschichtet. Hierzu wurden die zu beschichtenden Komponenten in je 100 μl DPBS verdünnt und über Nacht auf der Kulturplatte belassen. Fibronectin (von unserer eigenen

Arbeitsgruppe aufgereinigt [337]) wurde in den Konzentrationen $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,01\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Kollagen (Sigma-Aldrich, #C7774-5mg) in den Konzentrationen $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und $0,01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Protein [engl.], R&D Systems, #643-VM-200) nach Angaben des Herstellers in einer Konzentration von $0,0025\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgebracht. Poly-L-Lysin (AMS Biotechnology, #34-38-100-01) wurde unverdünnt nach Angaben des Herstellers auf die Kulturplatten aufgebracht. Nach Beschichtung der Kulturplatten wurde verbliebene Flüssigkeit abgesaugt und die Platten dreimal mit je $200\mu\text{l}$ /well DPBS gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 5×10^5 Zellen der beiden MDA Linien (MDA-CT und MDA-KD) in je $100\mu\text{l}$ Kulturmedium auf zwei Kulturplatten aufgetragen.

Eine der beiden Kulturplatten diente dazu, die Gesamtblumineszenz aller aufgetragenen Zellen zu bestimmen und wurde daher sofort mit $100\mu\text{l}$ one-glo (Luciferase assay system, Promega, #6120) versetzt, über einen Zeitraum von 10 Minuten bei -80°C eingefroren, anschließend 10 Minuten lang bei 37°C wieder aufgetaut (dieser Prozess diente dazu, alle Zellen zu lysieren) und direkt im Anschluss auf dem Luminometer gemessen. Die andere der beiden Platten wurde zwei Stunden lang bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ inkubiert. Hierauf wurde sie mit einem automatisierten Plattenwaschgerät dreimal mit $250\mu\text{l}$ DPBS/Vertiefung gewaschen und $100\mu\text{l}$ Kulturmedium pro Vertiefung zugegeben. Die weitere Behandlung erfolgte Analog zu der bei der ersten Platte beschriebenen. Kurz, es wurde one glo aufgebracht, die Zellen lysiert und die Biolumineszenz gemessen. Zuletzt wurde die Biolumineszenz der nach dem Waschen verbliebenen Zellen (die adhären Zellen) prozentual zu der Gesamtblumineszenz (ursprüngliche Zellmenge, auf erster Platte) berechnet.

II.4.4.3.2.2. Versuche zur Klärung der Adhäsion auf Zellen

Die Adhäsionsversuche auf Zellen verliefen analog zu den unter II.4.4.3.2.1. beschriebenen, jedoch mussten hier zunächst konfluente Zellschichten erzeugt werden. Hierzu wurden Endothelzellen und Knochenmarkzellen wie unter II.4.4.2. beschrieben isoliert und auf einer 96-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Beim Erreichen der Konfluenz dieser Zellen wurden MDA Zellen (siehe II.4.4.3.2.1.) zugegeben, die Lumineszenz detektiert und analysiert. Da die Zellen, auf denen der Versuch durchgeführt wurde selbst keine Biolumineszenz zeigten, beeinflussten sie die Ergebnisse nicht.

II.4.4.4. Chromfreisetzungstest

Der Chromfreisetzungstest wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob bei den beiden untersuchten Zelllinien Unterschiede in der durch humane natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Lyse auftreten. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen (Zielzellen) mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) markiert, das bei der durch die lysierenden Zellen (Effektorzellen) vermittelten Lyse freigesetzt wird. Die Isolation der hier verwendeten Nk-Zellen erfolgte nach einer publizierten Methode [361]. Hierzu wurden aus humanem Vollblut zunächst PBMC (peripheral blood

mononuclear cells) durch Dichtezentrifugation über eine LSM Lösung (LSM 1077 ATMP-Ready, #J11-504, PAA) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Nk-Zellen wurden aus den PBMC durch eine negativ Depletion mit einem Kit (Dynabeads® Untouched™ Human NK Cells, #113.49D, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

II.4.4.4.1. ⁵¹Cr Markierung der Zielzellen

Die Zielzellen die in diesem Test analysiert und verglichen werden sollten, waren Zellen der MDA-CT und der MDA-KD Linie. Die Zellen der unterschiedlichen Linien wurden gleich behandelt: Zu Beginn wurden die Zellen 3x mit je 18ml DPBS gewaschen, mit Zell-Dissoziations-Puffer von der Kulturflasche gelöst, in 6ml Kulturmedium aufgenommen und bei 500xg 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstandes wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 50µl Kulturmedium aufgenommen, mit 10µl ⁵¹Cr versetzt und eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO₂ auf einem Schwenkrad inkubiert, so dass die Zellen das radioaktive Nuklid aufnehmen konnten. Hierauf wurde die Zellsuspension zweimal in 10ml Kulturmedium resuspendiert, je 5 Minuten lang bei 500xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der Zweck dieses Waschschrittes war, nicht aufgenommenes ⁵¹Cr zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin in 5ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) versetzt mit 10%FCS und 1% Penicillin/Streptavidin aufgenommen und wie im Folgenden beschrieben mit den Effektorzellen vermischt.

II.4.4.4.2. Nk-Zell abhängige Zelllyse

Die Nk-Zellen (Effektorzellen) wurden in dem von ihnen benötigten Effektorzellmedium: IMDM + 10%FCS + 1% Penicillin/Streptavidin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und drei Tage vor Versuchsbeginn mit IL-2 aktiviert. Von diesen Zellen wurden je 8×10^5 in 200µl Effektorzellmedium pro Vertiefung einer 96-Loch Rundbodenplatte ausgesät und in einer Verdünnungsreihe sechsmal eins zu eins verdünnt. Da von den chrommarkierten Zellen (Zielzellen, siehe II.3.4.3.1.) je 5000 pro Vertiefung zugegeben wurden, ergaben sich also Effektorzellen zu Zielzellen Verhältnisse zwischen 80 zu 1 und 1,25 zu 1. Zur Bestimmung der spontanen und der maximalen Chromfreisetzung wurden 5000 Zielzellen ohne Zugabe von Effektorzellen (spontan) bzw. 5000 Zielzellen mit Zugabe von 2% TRITON-X 100 in DPBS (maximal) pro Vertiefung aufgetragen. Nach einer vierstündigen Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand abgenommen und das freigesetzte radioaktive Chrom mit einem Gerät zur Messung von Gammastrahlung bestimmt. Die prozentuale zellvermittelte Lyse ergab sich wie folgt: $[(\text{experimentelle Chromfreisetzung} - \text{spontane Chromfreisetzung}) \div (\text{maximale Chromfreisetzung} - \text{spontane Chromfreisetzung})] \times 100$. Alle Proben wurden in Triplikaten bestimmt und es wurden nur Experimente gewertet, die eine Ratio zwischen der maximalen und der spontanen Chromfreisetzung von mindestens 4 aufwiesen.

II.4.4.5. Cytochrom-C-Versuch

Mit dem Cytochrom-C-Versuch sollte untersucht werden, ob Zellen der beiden Zelllinien MDA-CT und MDA-KD unterschiedlich stark phagozytiert werden. Makrophagen bilden bei ihrer Aktivierung O_2^- , das bakterizid wirkt. Aufgrund seiner negativen Ladung reduziert das O_2^- das Cytochrom Fe^{3+} zu Fe^{2+} . Dies führt zu einem Farbumschlag von braun zu rot, wobei die Menge an reduziertem Cytochrom-C der Menge des produzierten O_2^- entspricht. Daher kann die Aktivität der Makrophagen durch die Veränderung der Extinktion bei 550nm gemessen werden.

Zunächst wurden 1×10^5 Makrophagen, die entweder mit IFN- γ oder MCSF-1 stimuliert worden waren (siehe II.4.4.2.4.) in einer 96-Loch Zellkulturplatte in 50 μ l Cytochrom-C Lösung (80 μ M Cytochrom-C in phenolrotfreiem DMEM +10% FCS) ausgebracht. Da die Cytochrom-C Lösung lichtempfindlich ist, wurden alle weiteren Schritte soweit möglich im Dunkeln durchgeführt. Im Anschluss hieran wurden hierzu MDA Zellen im Verhältnis 1:10 (MDA Zellen/Makrophagen) und 1:5 in je 50 μ l phenolrotfreiem DMEM mit 10%FCS zugegeben. Als Negativkontrolle dienten Makrophagen, denen keine MDA Zellen zugefügt wurden. Hierauf wurde die Kulturplatte in einem Fluorometer bei einer Extinktion von 550nm gemessen um den Anteil des reduzierten Cytochroms zu Beginn des Versuches zu bestimmen. Hierauf wurde die Platte über einen Zeitraum von 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und die Extinktion im Anschluss erneut gemessen. Der Anteil des reduzierten Cytochrom-C zum Ende des Versuches wurde prozentual zum Anteil des reduzierten Cytochrom-C zu Beginn des Versuchs berechnet.

II.4.5. Färbungen

II.4.5.1. Immunfluoreszenzfärbungen

II.4.5.1.1. Entkalkifizierung des Knochens

Da Knochen ein sehr sprödes und hartes Gewebe ist, muss es für die Anfertigung von Gefrierschnitten entkalkifiziert (entkalkt) werden. Hierzu wurden die Knochen zunächst von umgebendem Muskelgewebe befreit, zwei Stunden lang bei Raumtemperatur in 10% nbf (neutral buffered formalin [engl.]) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Knochen über einen Zeitraum von zwei Wochen in EDTA-Lösung (siehe II.1.5.) bei 5°C entkalkifiziert, wobei die Lösung jeden zweiten Tag erneuert wurde. Sobald die Knochen soweit entkalkt waren, dass sie sich bei leichtem Druck verbiegen ließen, wurden sie eine Stunde lang in 10%iger, daraufhin eine Stunde lang in 20%iger und zuletzt über Nacht in 30%iger mit PBS verdünnter Saccharose inkubiert.

II.4.5.1.2. Anfertigung von Gefrierschnitten des Knochens

Von den entmineralisierten, flexiblen Knochen wurden analog zu der unter II.3.5.2.1. beschriebenen Prozedur Gefrierschnitte angefertigt.

II.4.5.1.3. Färbung der Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte wurden analog zu den in II.3.5.2.2. beschriebenen Methode gefärbt. Die verwendeten Antikörper waren gegen Desmin und CD31 gerichtet.

II.4.5.2. Histologische Untersuchungen des Knochens

II.4.5.2.1. Einbettung des Knochens in Kunststoff

Für die Anfertigung von Schnitten mineralisierter Knochen wurden Tibiae der Mäuse in Kunststoff eingebettet. Hierzu wurden die Knochen zunächst in 70% Alkohol fixiert. Daraufhin wurden die Knochen zwei Stunden lang in 80%igem, daraufhin zwei Stunden in 95%igem, danach zwei weitere Stunden lang in 98%igem und zuletzt über Nacht in 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert, um sie zu entwässern und zu entfetten. Die Einbettung der Knochen erfolgte in Einbettungsförmchen (Heraeus Kulzer, #64708955) mit Hilfe eines Einbettungskits (Osteo-bed bone embedding kit, Polyscience, #17734-1). Hierbei wurden die Knochen in die Förmchen gelegt, diese daraufhin mit einer Kunststofflösung befüllt, die Förmchen luftdicht verschlossen und zum Auspolymerisieren 24 Stunden bei 34°C inkubiert. Nach der vollständigen Auspolymerisierung der Kunststofflösung konnten die eingebetteten Knochen aus den Förmchen gedrückt werden.

II.4.5.2.2. Schneiden des in Kunststoff eingebetteten Knochens

Um die eingebetteten Knochen mit einem Tischmikrotom zu schneiden, wurde zunächst um die Probe herum überflüssiger Kunststoff ausgesägt. Die Schnitte wurden in einer Dicke von 3µm angefertigt, mit einem Pinsel und 50%igem Alkohol von der Probe gelöst und in eine Petrischale mit 70%igen Alkohol gegeben, in der sie auf einen mit Eiweiß-Glycerin (Roth, #P049.1) beschichteten Objektträger gezogen wurden. Hierauf wurden Papierstreifen auf die Schnitte aufgelegt und gleichmäßig aufgedrückt. Um die Entstehung von Wellen im Schnitt zu vermeiden, wurde auf die Papierstreifen ein zweiter Objektträger gelegt und der Schnitt auf einer warmen Platte getrocknet.

II.4.5.2.3. Calcein Färbungen

Da die Tiere mit Calcein injiziert wurden, wurden die ungefärbten Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Kamera photographiert. Die gleichen Schnitte wurden anschließend nach Masson-Goldner gefärbt.

II.4.5.2.4. Färbung von Knochenschnitten nach Masson-Goldner

Um überschüssigen Kunststoff zu entfernen, wurden die Proben dreimal je 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in Azeton inkubiert. Die Proben wurden daraufhin in einer Ethanolreihe (100%, 98%, 80%, 70%, H₂O je 3 Minuten lang bei RT) rehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte 10 Minuten lang in Hämatoxylin nach Gill (Roth, #T864.2) gefärbt und anschließend H₂O_d gewaschen und 10 weitere Minuten in Leitungswasser gebläut, woraufhin die Proben erneut in H₂O_d gewaschen wurden. Hierauf wurden die Schnitte 6 Minuten lang mit Säurefuchsinlösung (siehe II.1.5.)

gefärbt, gefolgt von einem Waschschrift mit H_2O_d und einem weiteren mit 1%iger Essigsäure. Im Folgenden wurden die Knochenschnitte 2 Minuten in Phosphomolybdänlösung (siehe II.1.5.) inkubiert, woraufhin sie dreimal mit 1%iger Essigsäure gewaschen, 5 Minuten lang in Lichtgrün gefärbt, erneut dreimal in 1%iger Essigsäure gewaschen und danach rasch durch dreimalige dreiminütige Inkubation in 100% Ethanol entwässert wurden. Die Schnitte wurden 2 Minuten lang in Roti-Histol (Roth, #6640) inkubiert, anschließend mit einem Tropfen Histokitt (Roth, #6638) versehen, ein Deckplättchen aufgelegt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Morgen konnte überschüssiges Roti-Histol vorsichtig mit Ethanol entfernt werden.

II.4.5.2.5. Histomorphometrische Analyse

Die Erhebung der sekundären Parameter erfolgte anhand der Daten der dynamischen und der statischen Histomorphometrie.

Zu den Parametern der dynamischen Histomorphometrie zählen die Oberfläche mit einfachem Calceinsignal, die Oberfläche mit doppeltem Calceinsignal und die Distanz zwischen den beiden Calceinsignalen bei dem doppelten Calceinsignal. Zu den Parametern der statischen Histomorphometrie zählen die Knochenoberfläche, die Osteoidoberfläche, die Osteoiddicke, die Osteoblastenzahl, die Osteoklastenoberfläche und die Osteoklastenzahl (siehe Tab II.2.).

Tab.II.2: **Abkürzungen und Berechnungen der histomorphometrischen Parameter.** Dargestellt ist der jeweilige Parameter in der linken Spalte, in der rechten sind dessen Abkürzung und Berechnung angegeben.

Parameter	Abkürzung und Berechnung
dynamische	
Oberfläche mit einfachem Calceinsignal	sLS, single label surface [engl.], [mm]
Oberfläche mit doppeltem Calceinsignal	dLS, double label surface [engl.], [mm]
Distanz zwischen den beiden Calceinsignalen bei dem doppelten Calceinsignal.	ddLS, distance between double labels [engl.], [µm]
statische	
Knochenoberfläche	BS, bone surface [engl.], [mm]
Osteoidoberfläche	OS, osteoid surface [engl.], [mm]
Osteoiddicke	O.Th, osteoid thickness [engl.], [µm]
Osteoblastenzahl	Ob.N, osteoblast number [engl.]
Osteoklastenoberfläche	Oc.S, osteoclast surface [engl.], [mm]
Osteoklastenzahl	Oc.N, osteoclast number [engl.]
sekundäre Parameter	
Mineralisierungsrate	MAR, mineral apposition rate [engl.] [µm/Tag] MAR=ddLS/"Anzahl Tage zwischen Calcein Injektionen"
Reifungszeit des Osteoid	OMT, osteoid maturation time [engl.] OMT=O.Th./MAR
angepasste Ablagerungsrate	Aj.AR, adjusted apposition rate [µm/day] Aj.AR=MAR*MS/OS

Aus diesen Daten ließen sich die Mineralisierungsrate, die Anzahl der resorbierenden Osteoklasten pro Knochenoberfläche, die Reifungszeit des Osteoids und die angepasste Ablagerungsrate in mm/Tag berechnen (siehe Tab II.2.).

II.4.5.3. Färbungen für die Durchflusszytometrie

Die Analyse der Durchflusszytometrie (FACS, flow associated cell sorting [engl.]) ermöglicht die Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression von verschiedenen Moleküle durch Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Alle in dieser Arbeit durchgeführten zytometrischen Messungen erfolgten an einem LSRII Gerät der Firma BD Biosciences und die Analysen erfolgten mit dem Programm FACSDiva 5.0.2 (BD Biosciences). Darüber hinaus wurden alle Arbeiten mit den Zellen auf Eis und die Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. Ferner wurde darauf geachtet, dass die fluoreszenzmarkierten Antikörper so wenig Licht wie möglich ausgesetzt waren. Vor der Färbung wurden die jeweiligen Zellen bei 400xg zentrifugiert und in FACS-Puffer (siehe II.1.5.) wiederaufgenommen, so dass pro Ansatz ca. 1×10^6 Zellen in 100µl Puffer vorlagen. Die Färbung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten. Daraufhin wurde je Ansatz 1ml eiskalter FACS-Puffer zugegeben und die Zellen 10 Minuten lang bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und direkt am Zytometer gemessen. Als Negativkontrollen wurden ungefärbte Zellen bzw. mit unspezifisch bindenden Antikörpern (Isotypkontrollen) versetzte Zellen verwendet.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse primärer Zellen, wurden diese zunächst einer AcK Lyse unterzogen, um die Erythrozyten zu entfernen, die auf Grund ihrer hohen Anzahl eine sinnvolle Untersuchung der anderen Zellen vereitelt hätten. Hierzu wurden die Zellen 3 Minuten lang in 12 ml AcK Puffer (siehe II.1.5.) inkubiert (bei Bedarf bis zu dreimal wiederholt), bei 400xg zentrifugiert und das Pellet in FACS-Puffer aufgenommen.

II.4.6. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Versuche erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel (2007, Microsoft, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism (V3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und SPSS (V11.0, IBM, Chicago, IL, USA). Statistische Unterschiede wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test evaluiert. Für die Bestimmung der Lokalisation der Tumore wurde ein Fisher-Exakt Test genutzt. Die Fehler sind jeweils als Standardfehler (SEM, standard error of the mean [engl.]) angegeben.

III. Ergebnisse

III.1. Effekt der Inhibierung der Bildung einer Fibronectinmatrix

Fibronectin ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und auch an deren Aufbau beteiligt. Eine Leberfibrose, die aus einer chronischen Leberschädigung resultiert, ist durch die Bildung einer fibrotischen Matrix gekennzeichnet. Fibronectin spielt bei der Entstehung dieses fibrotischen Narbengewebes eine wichtige Rolle [165, 362, 363]. Auch im Verlauf der Fibrose übernimmt Fibronectin zahlreiche Funktionen, die zur Bildung eines Kollagennetzwerks und damit zum Aufbau einer fibrotischen Matrix beitragen (siehe I.2.5.1).

Daher sollte untersucht werden, ob die Inhibition des Fibronectinnetzwerks durch das Peptid pUR4b zu einer veränderten Matrixablagerung führen und somit das Ausmaß der Fibrose modifizieren kann.

III.1.1. Fibroseinduktion

Für die Induktion einer Leberfibrose im Tiermodell werden verschiedene Methoden beschrieben. Die gängigsten Methoden sind Fibroseinduktion durch Gallengangligaturen oder die Induktion einer Fibrose durch Chemikalien. Da die Fibroseinduktion mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) eine der am längsten und am häufigsten genutzten Methoden [317, 318] ist und auch Dimethylnitrosamin (DMN) häufig zur Erzeugung von Fibrosen bei Nagern genutzt wird [319, 320], bedienen wir uns dieser beiden Methoden. Die Entwicklung einer Fibrose durch CCl_4 dauert mit ca. sechs Wochen etwas länger als eine durch DMN verursachte Fibrose, die sich innerhalb eines Zeitraums von ca. vier Wochen etabliert (siehe II.3.2.1. und II.3.2.2.).

III.1.1.1. Wahl der Methode zur Induktion einer Fibrose

In unserem Modell sollte unter anderem untersucht werden, ob eine Behandlung mit dem Peptid pUR4b zu einer Regression der Leberfibrose führt. Daher mussten wir zunächst untersuchen, ob das von uns gewählte Modell zur Induktion einer Fibrose über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen stabil war. Hierzu unterteilten wir die Versuchstiere in drei Gruppen, von denen eine mit DMN, eine mit CCl_4 und eine als Kontrollgruppe mit NaCl behandelt wurde.

Den Tieren der DMN Gruppe wurde die Chemikalie zur Induktion einer Leberfibrose über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht. Hierauf wurden die Hälfte der Tiere sofort und die andere Hälfte nach einem Zeitraum von zwei weiteren Wochen, in denen sie nicht behandelt wurden, getötet und die Lebern entnommen (siehe Abb.III.1.1. DMN).

Um eine Fibrose mit CCl_4 zu induzieren wurden die Tiere über einen Zeitraum von sechs Wochen mit der Chemikalie behandelt. Auch hier wurde die eine Hälfte der Tiere sofort, und die andere Hälfte nach einer zweiwöchigen behandlungsfreien Phase getötet und die Lebern entnommen (siehe Abb.III.1.1. CCl_4).

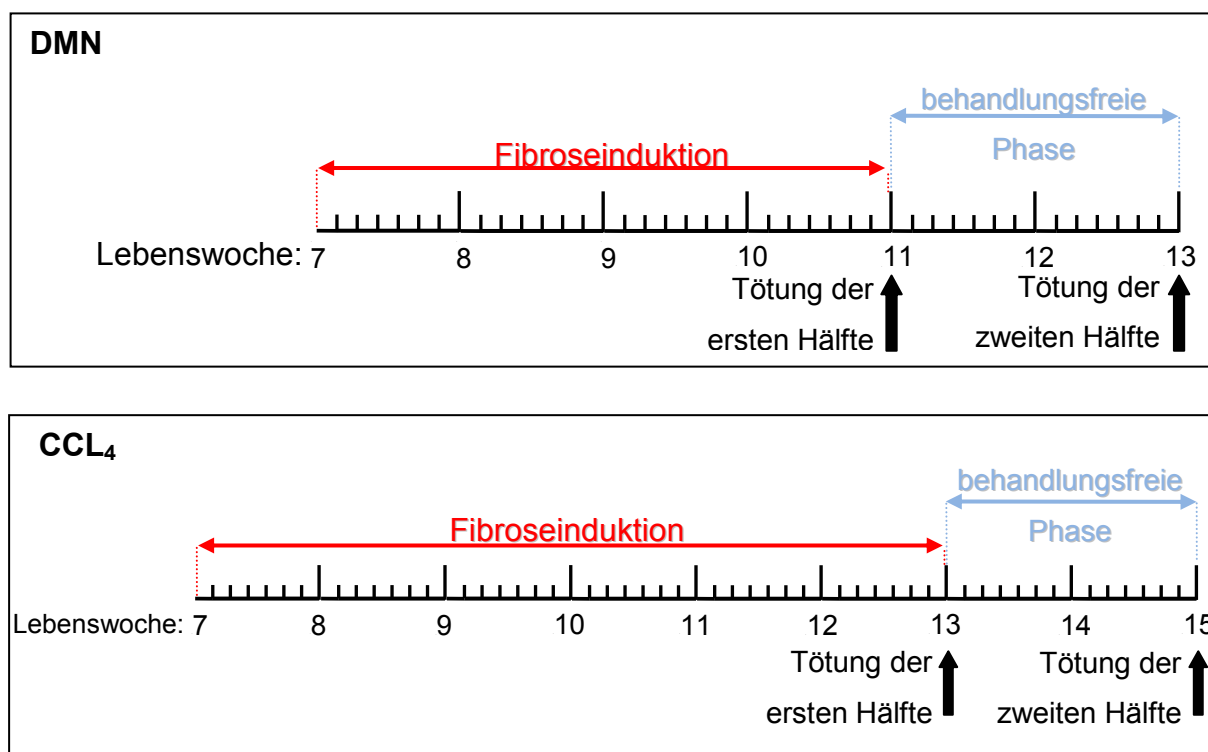


Abb.III.1.1. **Zeitachsen zum Experimentaufbau.** Dargestellt ist in der oberen Abbildung die Zeitachse zum Experimentaufbau bei der DMN Behandlung, in der unteren bei der CCl_4 Behandlung der Tiere.

III.1.1.1.1. Bestimmung des Kollagengehalts der Leber

Da eine Leberfibrose immer mit einer Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Organ einhergeht, ist die Kollagenmenge im Gewebe ein Anhaltspunkt für die Schwere der Fibrose. Die am häufigsten genutzte Methode, um fibrotisches Gewebe bzw. die Ablagerung von Kollagen nachzuweisen ist die Quantifikation des Hydroxyprolins [332, 364]. Dieses kann mit Hilfe eines biochemischen Versuchs bestimmt werden und ermöglicht eine Berechnung des Kollagengehalts der Leber. Hydroxyprolin ist nämlich eine Aminosäure, die durch die Hydrolyse der Aminosäure Prolin entsteht. Etwa 10% aller Aminosäuren in Kollagenen sind Hydroxyproline [330].

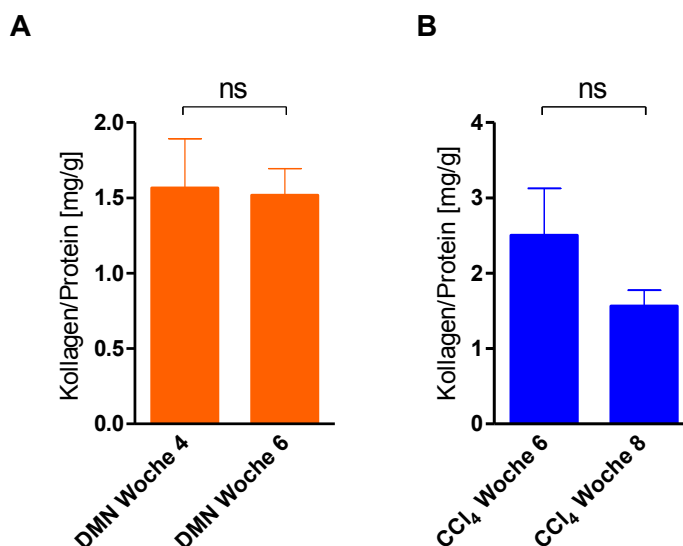


Abb.III.1.2. **Kollagengehalt der fibrotischen Lebern.** Die Kollagengehalte der Lebern der mit DMN behandelten Tiere sind links in orange abgebildet (A), die der mit CCl₄ behandelten rechts in blau (B). Dargestellt ist je Gruppe der Kollagengehalt direkt im Anschluss an die Behandlung (DMN Woche 4 bzw. CCl₄ Woche 6) und der Kollagengehalt nach Verstreichen einer zweiwöchigen behandlungsfreien Phase (DMN Woche 6 bzw. CCl₄ Woche 8).

Bei beiden Modellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Kollagengehalt der Lebern, die zum Zeitpunkt des Endes der Behandlung, und dem Gehalt derjenigen, die erst zwei Wochen später entnommen wurden (DMN Woche 4: $1,63 \pm 0,72$, $n=4$ vs. DMN Woche 6: $1,90 \pm 0,41$, $n=4$, $p=ns$; CCl₄ Woche 6: $2,50 \pm 0,62$, $n=4$ vs. CCl₄ Woche 8: $1,46 \pm 0,43$, $n=4$, $p=ns$). Da CCl₄ eine Tendenz zum Rückgang und eine höhere Standardabweichung aufwies und einen längeren Zeitraum für die Fibrosebildung benötigte, wurde DMN für die weiteren Versuche zur Fibroseinduktion verwendet.

III.1.1.1.2. Histologische Bestätigung der Entwicklung einer Leberfibrose

Um zu bestätigen, dass die Behandlung mit der Chemikalie DMN zu einer Leberfibrose führt, wurde untersucht, ob eine verstärkte Ablagerung extrazellulärer Matrix beobachtet werden konnte. Hierzu wurden Lebergefrierschnitte mit matrixspezifischen Farbstoff Sirius-Rot 3Fb angefärbt.

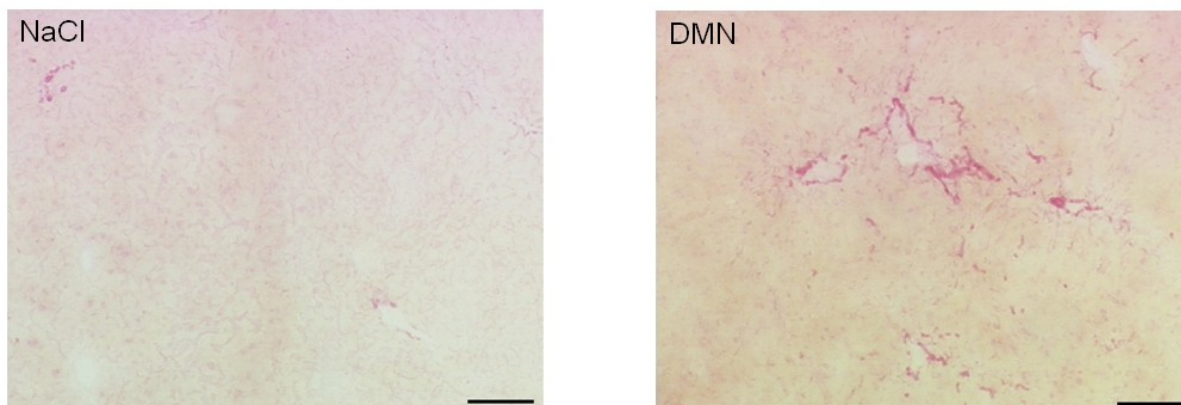


Abb.III.1.3. **Färbung der Matrix mit Sirius-Rot.** Abgebildet sind Sirius-Rot 3Fb gefärbte Lebergefrierschnitte von einem Tier, das mit NaCl behandelt wurde, und einem Tier, das mit DMN behandelt wurde. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Bei den Tieren, die mit DMN behandelt wurden, kann man im Bereich der portalen Gefäße eine Färbung erkennen, die bei unbehandelten Tieren nicht zu sehen ist. Dies weist daraufhin, dass die Behandlung mit DMN nicht nur eine Erhöhung des Kollagengehalts verursacht sondern auch mit histologischen Veränderungen einhergeht die denen einer Leberfibrose entsprechen [193].

III.1.2. Untersuchungen zu den Effekten des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose

Eine Leberfibrose kennzeichnet sich in erster Linie durch die Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Dissé-Raum, welche darüber hinaus für die meisten Komplikationen im Verlauf dieser Krankheit verantwortlich ist. Während dieses Prozesses wird zunächst ein Fibronectinnetzwerk aufgebaut, an das weitere Proteine der extrazellulären Matrix angelagert werden [165] (siehe Abschnitt I.2.5.1).

PUR4b ist ein 69 Aminosäuren großes Peptid, das die 49 Aminosäuren lange funktionelle *upstream* Domäne (functional upstream domain, FUD [engl.]) des F1 Adhäsins von *Streptococcus pyogenes* enthält. Dieses Adhäsin bindet Fibronectin hochaffin und dient dem Bakterium dazu, an die extrazelluläre Matrix der Wirtszellen zu adhären [365]. Es konnte gezeigt werden, dass FUD und auch der Klon pUR4b den Einbau von sowohl endogenem zellulärem als auch exogenem Plasmafibronectin in die extrazelluläre Matrix verhindert [316]. Daher sollte untersucht werden, ob die Gabe des Peptids pUR4b den Aufbau der extrazellulären Matrix *in vivo* modulieren und somit eine Fibrose beeinflussen kann.

III.1.2.1. *In vivo* Untersuchungen zu den Effekten des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen unterteilt, von denen eine Gruppe als fibrosefreie Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung (NaCl), eine Gruppe als fibrotische Gruppe mit DMN, eine Gruppe als fibrotische Kontrollgruppe mit DMN und dem Kontrollpeptid III11c (DMN+III11c) und eine Gruppe als fibrotische Experimentiergruppe mit DMN und pUR4b (DMN+pUR4b) behandelt wurde.

III.1.2.1.1. Auswirkungen des Peptids pUR4b auf den Kollagengehalt der Matrix

Die Auswirkungen des Peptids pUR4b sollten sowohl in einem Modell untersucht werden, in dem das Peptid bereits während der Entstehung der Fibrose appliziert wird als auch in einem anderen Modell, bei dem erst nach der Etablierung einer Fibrose mit dem Peptid pUR4b behandelt wird. Hierdurch sollte sowohl die Frage geklärt werden, ob das Peptid pUR4b in der Lage ist, die Entstehung einer Fibrose zu modulieren als auch die Frage, ob es eine bereits bestehende Fibrose beeinflussen kann. Die Ergebnisse der ersten der beiden Fragen werden unter Abschnitt I.2.1.1.1. und die der zweiten unter Abschnitt I.1.2.1.1.2. aufgeführt.

III.1.2.1.1.1. Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge bei Applikation während der Fibrosebildungsphase

Bei diesem Ansatz wurden die Tiere der fibrotischen Kontrollgruppe und der fibrotischen Experimentiergruppe während der letzten 10 Tage der Fibrosebildungsphase intraperitoneal mit dem Kontrollpeptid III11c (DMN+III11c) bzw. dem Peptid pUR4b (DMN+pUR4b) behandelt und die restlichen Tiere (Kontrollen) mit den entsprechenden Mengen an NaCl (siehe Abb.III.1.4.).

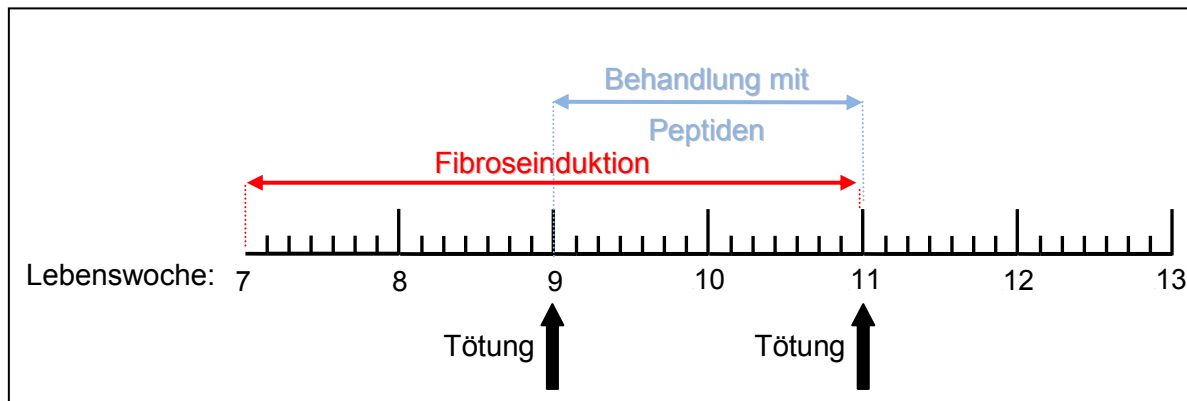


Abb.III.1.4. **Zeitachse zum Experimentaufbau.** Dargestellt ist die Zeitachse zum Experimentaufbau bei der Behandlung der Tiere mit Peptiden (bzw. entsprechend NaCl) während der Fibrosebildungsphase.

Um zu ersehen, ob die fibrotischen Tiere zum Zeitpunkt des Beginns der Peptidgabe (Lebenswoche 9) bereits Narbengewebe entwickelt hatten, wurde ein Teil der Tiere der fibrotischen Gruppe zu diesem Zeitpunkt getötet, die Lebern entnommen und deren Kollagengehalt durch die biochemische Quantifizierung des Hydroxyprolins (siehe III.1.1.1.1.) bestimmt (siehe Abb.III.1.5., A). Die restlichen Tiere wurden erst zum Ende der Peptidbehandlung (Lebenswoche 11) getötet und analog untersucht (siehe Abb.III.1.5., B).

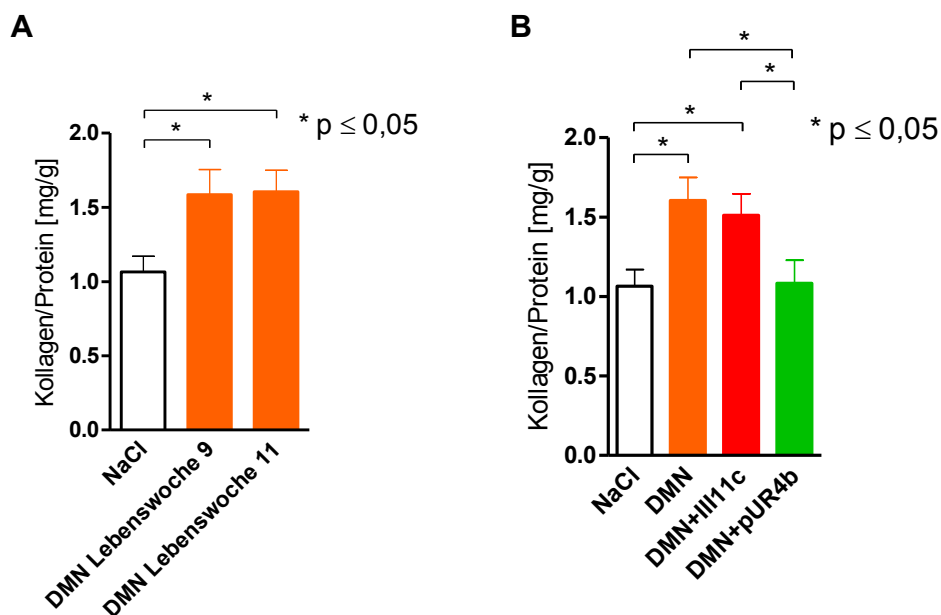


Abb.III.1.5. **Kollagengehalt der fibrotischen Lebern.** Dargestellt sind die Kollagenmengen in den Lebern der behandelten Tiere. Der Kollagengehalt der Lebern wurde anhand des Hydroxyprolinegehalts berechnet. In Graph A sind die Kollagengehalte der fibrotischen Tiere (DMN Gruppe) zu den Zeitpunkten vor Beginn und nach Ende der Peptidbehandlung im Vergleich zu mit NaCl behandelten Kontrolltieren (Lebenswoche 11) dargestellt. In Graph B repräsentiert der Balken links in weiß die Leberkollagengehalte der Tiere der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe, der orange Balken die der mit DMN behandelten, in rot sind die Werte der mit DMN und III11c und in grün die der mit DMN und pUR4b behandelten Tiere dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Kollagengehalt der Lebern der Tiere, die mit DMN behandelt wurden, sowohl vor als auch am Ende der Peptidgabe signifikant von denen der mit NaCl behandelten Kontrolltiere unterschied (Abbildung III.1.5., Graph A: NaCl: $1,06 \pm 0,11$, $n=21$ vs. DMN Lebenswoche 9: $1,59 \pm 0,17$, $n=9$ oder DMN Lebenswoche 11: $1,60 \pm 0,14$ [mg Kollagen/g Protein], $n=16$, $p \leq 0,05$).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich der Kollagengehalt der mit pUR4b behandelten Tiere nicht signifikant von denen der gesunden Kontrollgruppe unterschieden (Abbildung III.1.5., Graph B: DMN+pUR4b: $1,08 \pm 0,14$, $n=9$ vs. NaCl: $1,06 \pm 0,11$ [mg Kollagen/g Protein], $n=21$, $p=ns$). Es zeigte sich jedoch, dass die Kollagenwerte der mit DMN oder mit DMN+III11c behandelten Tiere im Vergleich zu denen der mit NaCl oder DMN+pUR4b behandelten Tiere signifikant erhöht waren (Abbildung III.1.5., Graph B: NaCl: $1,06 \pm 0,11$, $n=21$ oder DMN+pUR4b: $1,08 \pm 0,14$, $n=9$ vs. DMN+III11c: $1,51 \pm 0,13$, $n=10$ oder DMN: $1,60 \pm 0,14$ [mg Kollagen/g Protein], $n=16$, $p \leq 0,05$).

III.1.2.1.1.2. Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge bei Applikation nach der Fibrosebildungsphase

Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Peptid pUR4b auch einen Einfluss auf die Kollagenmenge in der Leber ausübt, wenn es nach vollständiger Induktion einer Fibrose appliziert wird. Hierzu wurde den Tieren wiederum eine Fibrose induziert. Erst nach Vollendung der Fibroseinduktion wurde den Mäusen über einen Zeitraum von weiteren 14 Tagen pUR4b bzw. III11c verabreicht (siehe Abb.III.1.6.).

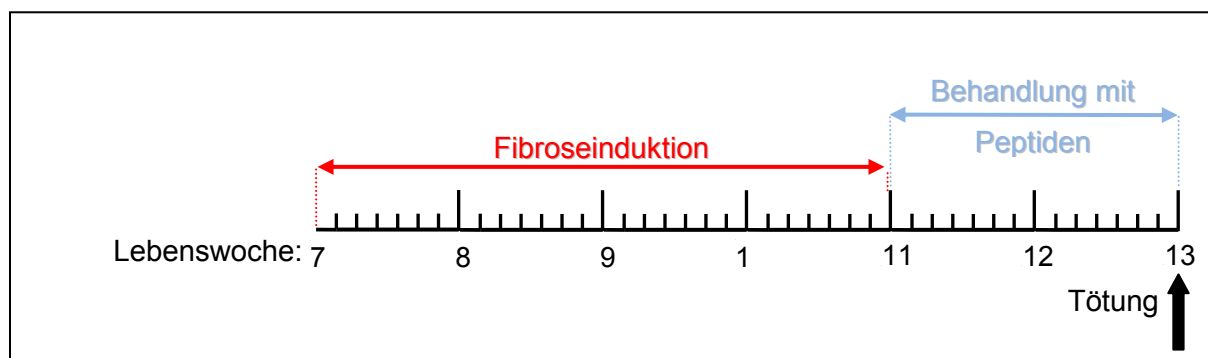


Abb.III.1.6. **Zeitachse zum Experimentaufbau.** Dargestellt ist die Zeitachse zum Experimentaufbau bei der Behandlung der Tiere mit Peptiden (bzw. entsprechend NaCl) in der Zeit nach der Fibrosebildungsphase.

Auch hier hätte ein Teil der fibrotischen Tiere vor Beginn der Peptidbehandlung getötet werden sollen, um die Entstehung von Narbengewebe zu evaluieren. Da bereits Tiere zu diesem Zeitpunkt untersucht wurden (vgl. III.1.2.1.1.1. Gruppe DMN Lebenswoche 11), wurden diese Werte für die Evaluierung herangezogen. Nach Beendigung der Peptidbehandlung wurden die verbleibenden Tiere getötet, ihre Lebern entnommen, deren Hydroxyprolinegehalt ermittelt und die Kollagenwerte hieraus berechnet.

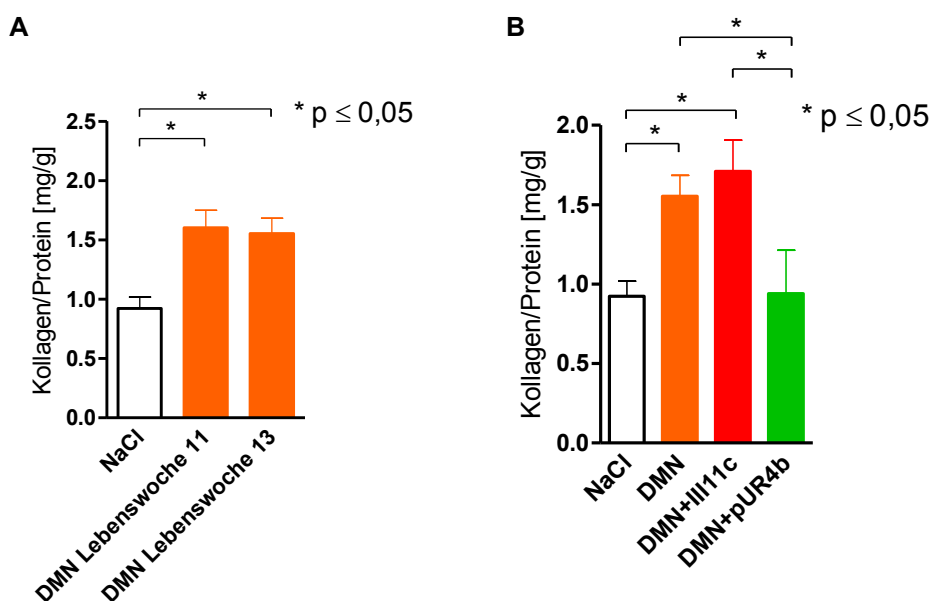


Abb.III.1.7. **Kollagengehalt der fibrotischen Lebern.** Dargestellt sind die Kollagenmengen der Lebern der behandelten Tiere. Die Kollagenmengen der Lebern wurden anhand des Hydroxyprolinegehalts berechnet. In Graph

A sind die Kollagengehalte der fibrotischen Tiere (DMN Gruppe) zu den Zeitpunkten vor Beginn und nach Ende der Peptidbehandlung im Vergleich zu mit NaCl behandelten Kontrolltieren (Lebenswoche 13) dargestellt. In Graph B repräsentiert der Balken links in weiß den durchschnittlichen Leberkollagengehalt der Tiere der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe, der orange Balken den der mit DMN behandelten, in rot sind die Werte der mit DMN und III11c und in grün die der mit DMN und pUR4b behandelten Tiere dargestellt. Dieser Farbcode wird für den Teil der Arbeit, der sich mit der Leberfibrose beschäftigt, beibehalten.

Es zeigte sich auch hier, dass der Kollagengehalt der fibrotischen Lebern sowohl zum Zeitpunkt des Beginns der Peptidgabe (DMN Lebenswoche 11) als auch bei Beendigung des Experiments (DMN Lebenswoche 13) im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren signifikant erhöht war (Abbildung III.1.7., Graph A: NaCl: $0,923 \pm 0,0946$, $n=16$ vs. DMN Lebenswoche 11: $1,604 \pm 0,146$, $n=16$ oder DMN Lebenswoche 13: $1,554 \pm 0,130$ [mg Kollagen/g Protein], $n=10$, $p \leq 0,05$).

Darüber hinaus unterschieden sich die Kollagenwerte der mit pUR4b behandelten Tiere nicht signifikant von denen der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung III.1.7., Graph B: DMN+pUR4b: $0,941 \pm 0,272$, $n=6$ vs. NaCl: $0,923 \pm 0,0946$ [mg Kollagen/g Protein], $n=16$, $p=ns$). Auch hier waren die Kollagenwerte der mit DMN und mit DMN+III11c behandelten Tiere im Vergleich zu denen der mit NaCl und DMN+pUR4b behandelten Tiere signifikant erhöht (Abbildung III.1.7., Graph B: DMN+pUR4b: $0,941 \pm 0,272$, $n=6$ oder NaCl: $0,923 \pm 0,0946$, $n=16$ vs. DMN+III11c: $1,709 \pm 0,197$, $n=10$ oder DMN: $1,554 \pm 0,130$ [mg Kollagen/g Protein], $n=10$, $p \leq 0,05$).

III.1.2.1.2. Untersuchung der Matrixzusammensetzung der Leber

Die Hydroxyprolinegehaltbestimmungen zeigten, dass in den Lebern der mit pUR4b behandelten Gruppe signifikant weniger Kollagen vorhanden war, als in den anderen fibrotischen Gruppen. Diese Ergebnisse ließen auf eine veränderte Matrixzusammensetzung schließen. Daher sollte die Matrix histologisch untersucht und mit Immunfluoreszenzfärbungen genauer charakterisiert werden.

III.1.2.1.2.1. Histologische Ausbreitung der Leberfibrose

Um die Auswirkungen der Gabe des Peptids pUR4b auf die Leber zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Matrix der Lebern der Tiere unterschiedlicher Gruppen gefärbt. Hierzu wurden Lebergefrierschnitte angefertigt und mit dem matrixspezifischen Farbstoff Sirius-Rot 3Fb angefärbt.

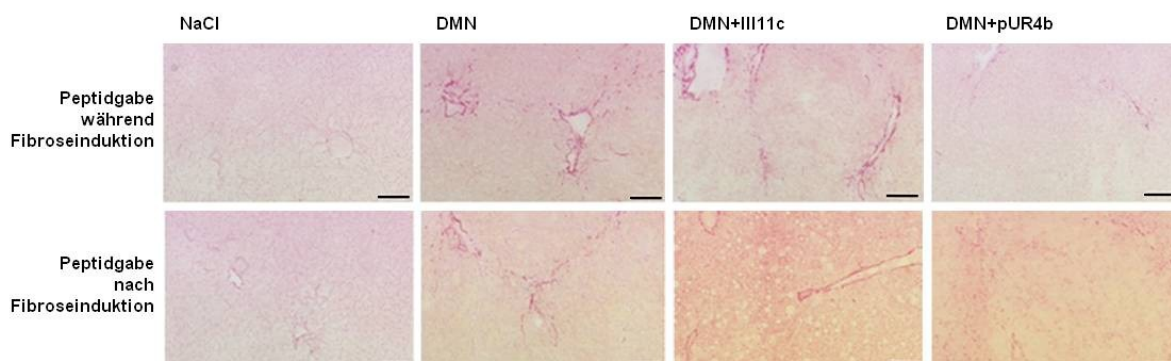


Abb.III.1.8. **Färbung der Matrix mit Sirius-Rot.** Abgebildet sind von links nach rechts exemplarisch mit Sirius-Rot gefärbte Lebergefrierschnitte der Gruppen NaCl, DMN, DMN+III11c und DMN+pUR4b. In der oberen Reihe befinden sich die Bilder der Gruppen, die eine Peptidbehandlung (oder entsprechend NaCl) während der Fibroseentstehung erhielten, in der unteren Reihe die der Gruppen, die erst nach Beendigung der Fibrosebil-

dungsphase mit Peptiden (oder entsprechend mit NaCl) behandelt wurden. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Bei den Leberschnitten der mit DMN behandelten Tieren konnte eine verstärkte Ablagerung von extrazellulärer Matrix beobachtet werden, die bei den Färbungen der Schnitte der Kontrolltiere, die mit NaCl behandelt wurden, nicht ersichtlich ist. Beim Betrachten der Schnitte lässt sich darüber hinaus vermuten, dass die mit DMN+pUR4B behandelten Mäuse ebenso wie die mit NaCl behandelten Kontrolltiere eine schwächer ausgeprägte Matrix aufweisen, als die mit dem Kontrollpeptid DMN+III11C oder DMN behandelten fibrotischen Tiere.

Dieser Eindruck sollte mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Fibronectin und Kollagen bestätigt werden. Hierzu wurden wiederum Gefrierschnitte der Lebern angefertigt und diese mit Antikörpern gegen Fibronectin und gegen Kollagen gefärbt.

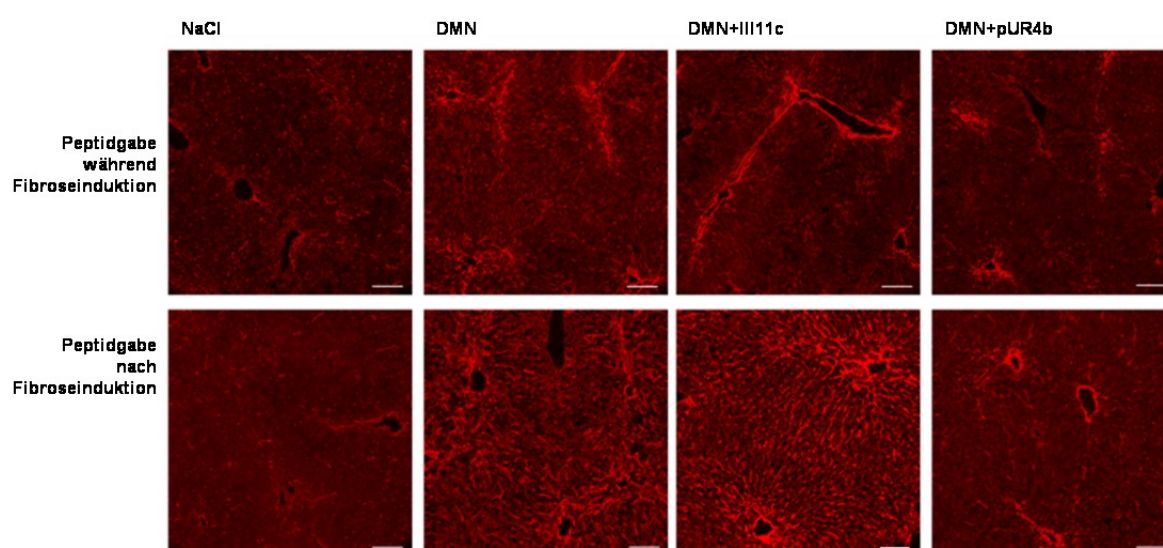


Abb.III.1.9. **Immunfluoreszenzfärbung der Matrix gegen Fibronectin.** Abgebildet sind exemplarisch mit Antikörper gegen Fibronectin gefärbte Lebergefrierschnitte der Gruppen bei der Peptid- (bzw. NaCl-) Behandlung während (je oben) und nach (je unten) der Fibroseinduktion. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Beim Betrachten der in rot dargestellten Fibronectinfärbungen (Abb.III.1.9., oben) entsteht der Eindruck, dass sowohl die Schnitte der mit DMN behandelten Tiere als auch die der mit DMN+III11c behandelten Tiere eine stärkere Färbung aufweisen, als die der mit DMN+pUR4b behandelten und die der mit NaCl behandelten Kontrolltiere. Die Schnitte der mit DMN+pUR4b behandelten Tiere scheinen jedoch eine stärkere Fibronectinfärbung aufzuweisen, als die gesunden Kontrolltiere.

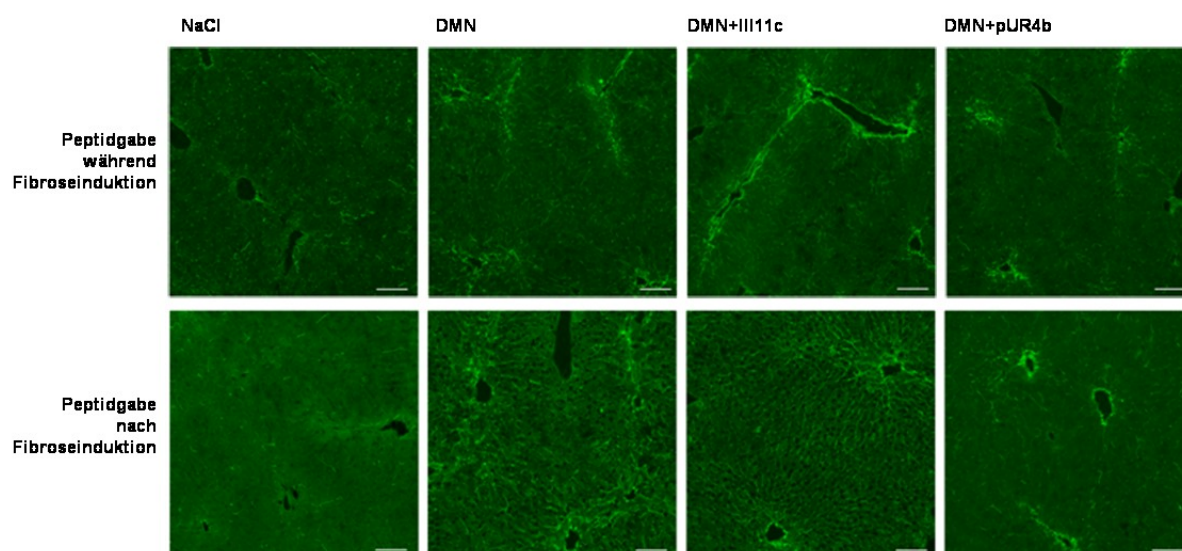


Abb.III.1.10. **Immunfluoreszenzfärbung der Matrix gegen Kollagen.** Abgebildet sind exemplarisch mit Antikörper gegen Kollagen gefärbte Lebergefrierschnitte der Gruppen bei der Peptid- (bzw. NaCl-) Behandlung während (je oben) und nach (je unten) der Fibroseinduktion. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m.

Die bei der Fibronektinfärbung entstandenen Eindrücke bestätigen sich beim Betrachten der Färbung gegen Kollagen (Abb.III.1.10.). Auch hier scheint die Färbung der Lebern der mit pUR4b behandelten Tiere schwächer, als die der anderen fibrotischen Tiere, jedoch stärker als die der Kontrollen zu sein.

Insgesamt scheint sich die Fibrose in der mit DMN und der mit DMN+III11c behandelten Gruppe über die gesamte Leberfläche zu erstrecken, wohingegen sich die Fibrose in der DMN+pUR4b Gruppe in erster Linie auf die Periportalfelder zu beschränken scheint.

III.1.2.1.2.2. Entzündliche Zellen in der Leber

Die Bildung einer Fibrose wird von einer entzündlichen Reaktion begleitet [173]. Daher sollte ergründet werden, ob das Peptid pUR4b durch direkte oder indirekte Mechanismen einen Einfluss auf die inflammatorischen Zellen ausübte.

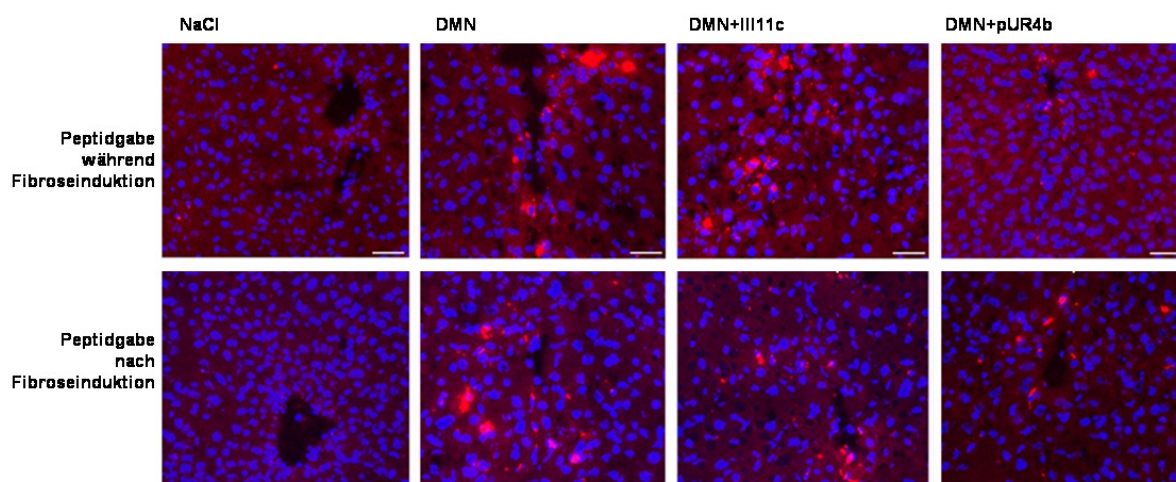


Abb.III.1.11. **Immunfluoreszenzfärbung inflammatorischer Zellen mit Antikörper gegen CD45.** Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. Inflammatorische CD45 positive Zellen sind rot dargestellt. Exemplarisch dargestellt sind angefärbte Leberschnitte der Gruppen NaCl, DMN, DMN+III11c und DMN+pUR4b. Die oberen vier Bilder repräsentieren die Gruppe, bei der die Peptidbehandlung (oder entsprechend NaCl) wäh-

rend der Fibroseinduktion stattgefunden hat, die unteren diejenige, bei denen erst nach der Fibroseentstehung mit Peptid (oder entsprechend mit NaCl) behandelt wurde. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Beim Betrachten der gegen CD45 gefärbten Leberschnitte lässt sich erkennen, dass in den gesunden Tieren weniger inflammatorische Zellen gefunden wurden, als in den anderen Gruppen. Es entsteht weiterhin der Eindruck, dass die mit DMN+pUR4b behandelten Tiere weniger CD45 positive Färbung aufwiesen als die Tiere der anderen fibrotischen Gruppen (DMN und DMN+III11c). Diese Beobachtungen ließen sich sowohl für die Tiere der Gruppen, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden (oder entsprechend mit NaCl) behandelt wurden (siehe Abb.III.1.11., oben), als auch für diejenigen, die erst nach Ende der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden (siehe Abb.III.1.11., unten), anstellen.

Um diese Eindrücke zu quantifizieren und zu evaluieren, wurden die positiv gefärbten Zellen ausgezählt.

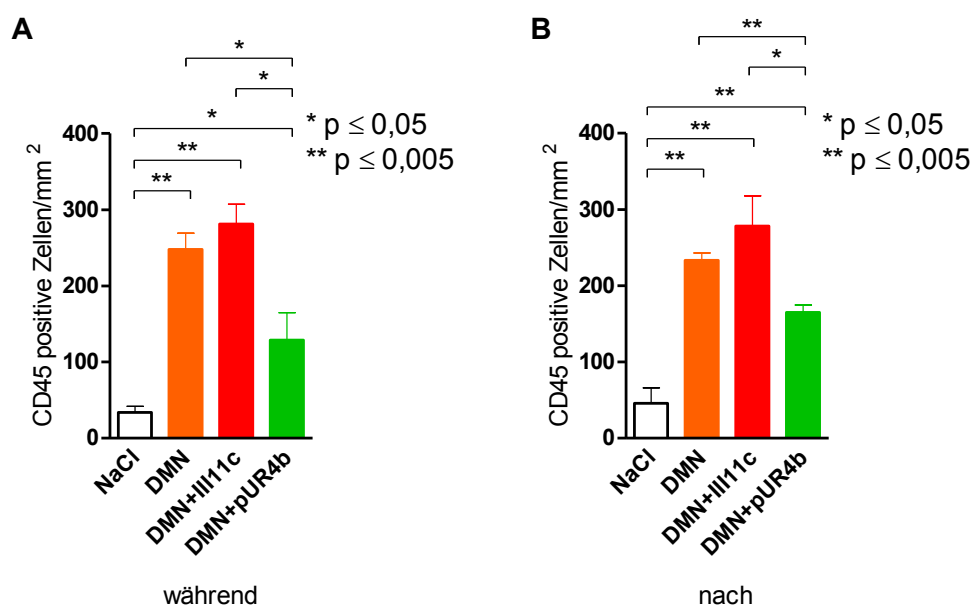


Abb.III.1.12. **Auszählung der CD45 positiv gefärbten Zellen.** Die CD45 gefärbten Zellen wurden ausgezählt, die bearbeitete Fläche ausgemessen, und die Anzahl der positiven Zellen pro mm² berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählung der Gruppe, die während der Fibrosebildungsphase mit pUR4b (A) oder III11c (oder entsprechend mit NaCl) behandelt wurde bzw. die der Gruppe, die nach der Fibrosebildungsphase mit pUR4b bzw. III11c (oder entsprechend mit NaCl) behandelt wurde (B).

In der Gruppe, bei der während der Fibrosebildungsphase mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurde, waren die entzündlichen Zellen bei den fibrotischen Tieren im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Kontrolltieren signifikant erhöht (NaCl: 33,84±8,082, n=4 vs. DMN: 247,9±21,21, n=4, p≤0,005 oder DMN+III11c: 281,2±26,08, n=3, p≤0,005 oder DMN+pUR4b: 128,7±36,19 [CD45 positive Zellen/mm²], n=4, p≤0,05). Darüber hinaus waren auch bei den mit DMN+pUR4b behandelten Tieren signifikant weniger inflammatorische Zellen zu finden als bei den anderen fibrotischen Gruppen (p≤0,05).

Auch in der Gruppe, bei der nach der Fibrosebildungsphase mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurde, waren die entzündlichen Zellen bei den fibrotischen Tieren im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Kontrolltieren signifikant erhöht (NaCl: $45,89 \pm 20,29$, $n=4$ vs. DMN: $233,2 \pm 9,82$, $n=4$, oder DMN+III11c: $278,4 \pm 39,38$, $n=3$, oder DMN+pUR4b: $165,1 \pm 9,631$ [CD45 positive Zellen/mm²], $n=4$, $p \leq 0,005$). Bei den mit DMN+pUR4b behandelten Tieren waren wiederum signifikant weniger inflammatorische Zellen zu finden als bei den anderen fibrotischen Gruppen (DMN+pUR4b vs. DMN: $p \leq 0,005$ oder vs. DMN+III11c: $p \leq 0,05$).

III.1.2.1.2.3. Aktivierte hepatische Stellatezellen der Leber

Ein Großteil des Narbengewebes wird von aktivierten hepatischen Stellatezellen gebildet. Da aktivierte hepatische Stellatezellen α -SMA produzieren [187], wurden Gefrierschnitte der Leber gemacht, diese mit einem Antikörper gegen α -SMA (einem Marker für aktivierte Stellatezellen [366]) gefärbt und anschließend ausgewertet.

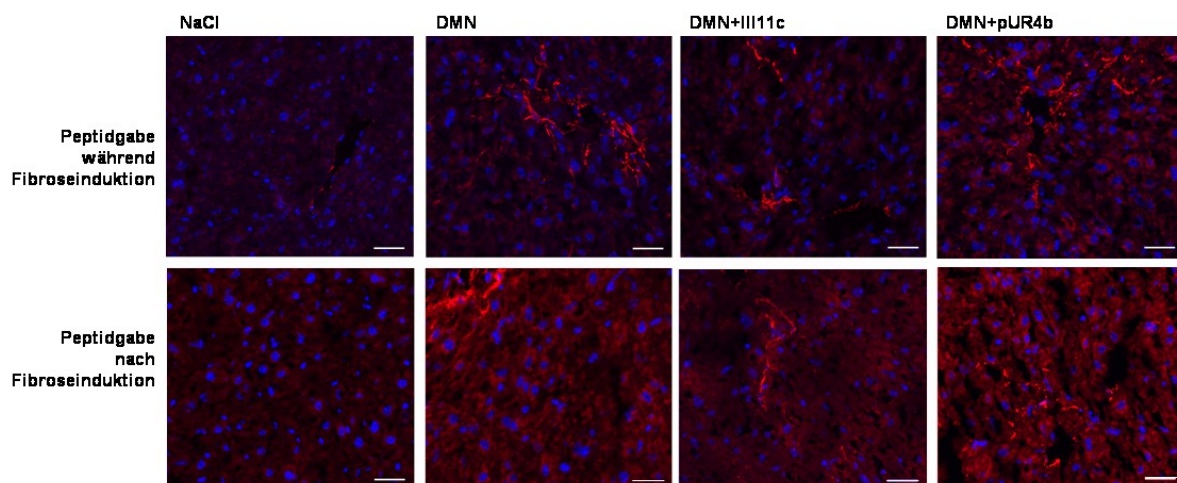


Abb.III.1.13. Immunfluoreszenzfärbung aktivierter Stellatezellen mit Antikörper gegen α -sma. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. Alpha-sma positive Bereiche sind rot dargestellt. Exemplarisch gezeigt werden angefärbte Leberschnitte der Gruppen NaCl, DMN, DMN+III11c und DMN+pUR4b sowohl bei der Peptidbehandlung (oder entsprechend NaCl Behandlung) während der Fibroseinduktion (obere Bilder) als auch bei der Peptidbehandlung (oder entsprechend NaCl Behandlung) nach der Fibroseinduktion (untere Bilder). Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m.

Bereits beim Betrachten der Färbungen fiel auf, dass Schnitte der mit NaCl behandelten Tiere wesentlich weniger positiv gefärbte Zellen aufwiesen als die der fibrotischen Tiere. Dieser Eindruck wurde bestätigt, indem die positiv gefärbten Zellen ausgezählt und zur Fläche des bearbeiteten Leberschnitts korrigiert wurden.

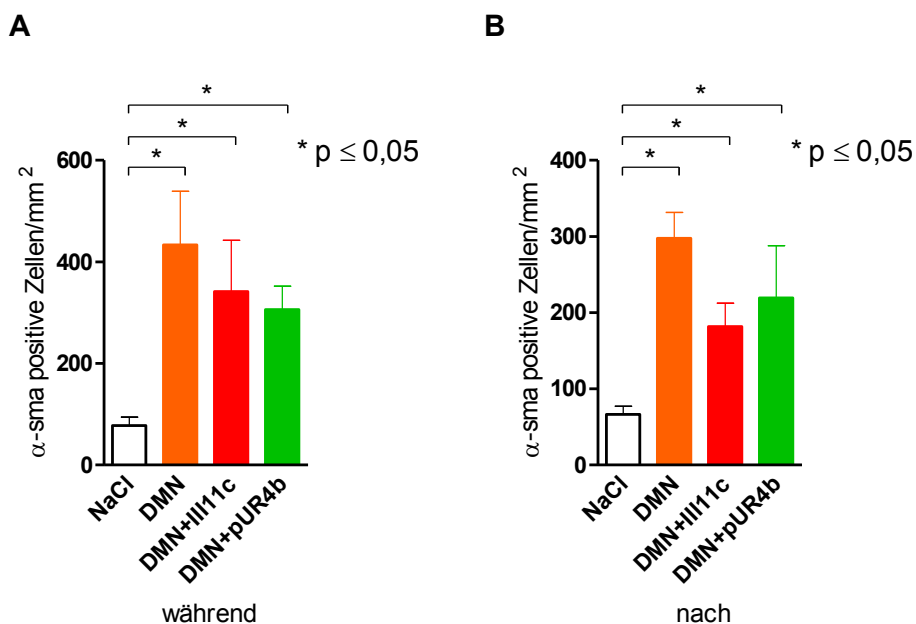


Abb.III.1.14. **Auszählung der α -sma positiv gefärbten Zellen.** Die α -sma gefärbten Zellen wurden ausgezählt, die bearbeitete Fläche ausgemessen, und die Anzahl der positiven Zellen pro mm^2 berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählung der Gruppe, die nach der Fibrosebildungsphase mit pUR4b oder III11c (bzw. entsprechend mit NaCl) behandelt wurde (A) und die der Gruppe, die nach der Fibrosebildungsphase mit pUR4b oder III11c (bzw. entsprechend mit NaCl) behandelt wurde (B).

Die Auszählung der Färbungen ergab, dass die fibrotischen Tiere bei der Gruppe, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. entsprechend mit NaCl) behandelt wurden, signifikant mehr α -sma positive Zellen als die mit NaCl behandelten Tiere aufwiesen. Innerhalb der fibrotischen Tiergruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb.III.1.14., A: NaCl: $77,84 \pm 16,24$, $n=7$ vs. DMN: $433,3 \pm 105,5$, $n=7$ oder DMN+III11c: $341,7 \pm 100,7$, $n=6$ oder DMN+pUR4b: $306,1 \pm 45,81$ [α -sma positive Zellen/ mm^2], $n=7$, $p \leq 0,05$).

Auch bei der Gruppe, bei der erst nach der Fibroseinduktion mit der Peptidbehandlung (bzw. einer entsprechenden Behandlung mit NaCl) begonnen wurde, waren die α -sma positive Zellen der fibrotischen Tiergruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren (NaCl) signifikant erhöht (Abb.III.1.14., B: NaCl: $66,29 \pm 10,65$, $n=7$ vs. DMN: $297,4 \pm 34,15$, $n=7$ oder DMN+III11c: $181,6 \pm 30,80$, $n=7$ oder DMN+pUR4b: $219,5 \pm 68,29$ [α -sma positive Zellen/ mm^2], $n=7$, $p \leq 0,05$).

III.1.2.1.3. Auswirkungen des Peptids pUR4b auf den Allgemeinzustand der Tiere

Eine Leberfibrose und sicherlich auch die Gabe des toxischen DMN beeinträchtigen die Gesundheit und den Allgemeinzustand der Tiere. Eine Leberfibrose führt oftmals nicht zu Schmerzen, da die Leberläppchen nur schwach innerviert sind [367] und verläuft daher unerkant [368].

III.1.2.1.3.1. Das Gewicht der Tiere

Um herauszufinden, ob und zu welchem Zeitpunkt der Fibroseinduktion Veränderungen im Gewicht der Tiere stattfanden, wurde die Gewichtsentwicklung im Verlauf der einzelnen Wochen betrachtet.

III.1.2.1.3.1.1. Gewichtsentwicklung der Tiere, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden

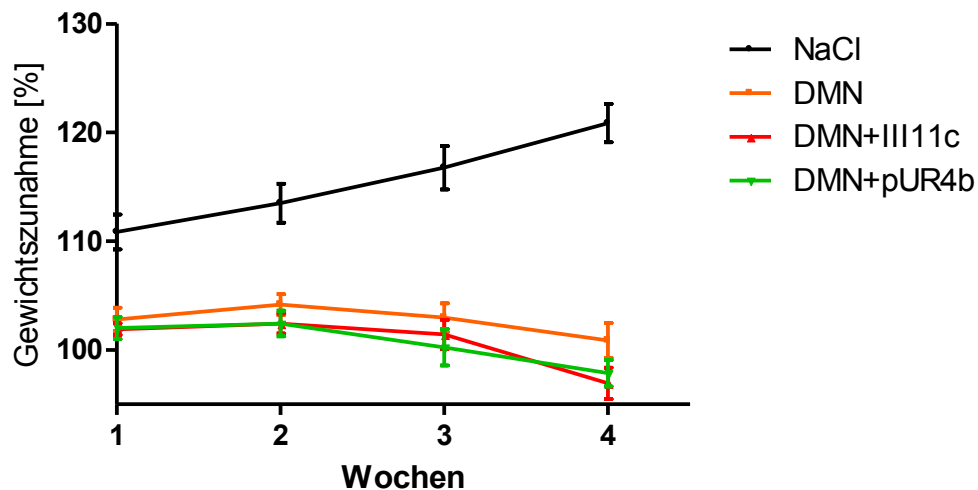


Abb.III.1.15. **Gewichtsentwicklung der Tiere während der Fibroseinduktion.** Dargestellt ist die prozentuale Gewichtszunahme der Tiere während der vier Wochen der Fibroseinduktion bei gleichzeitiger Behandlung mit pUR4b bzw. III11c (oder entsprechend mit NaCl) während der letzten zwei Wochen. Die Gewichtszunahme wurde für jede Woche im Verhältnis zu den Werten bei Versuchsbeginn berechnet.

Bei einer Betrachtung der Gewichtsentwicklung der Tiere, bei welchen während der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. entsprechend mit NaCl) behandelt wurde, lässt sich erkennen, dass das Gewicht der Tiere der fibrotischen Gruppen zunächst konstant bleibt und gegen Ende der Behandlungszeit abfällt. Das Gewicht der mit NaCl behandelten Kontrolltiere hingegen steigt konstant an und die prozentuale Gewichtszunahme unterscheidet sich zu allen aufgenommenen Zeitpunkten signifikant von der der fibrotischen Tiere (**Woche 1:** NaCl: $110,8 \pm 1,6$, $n=10$ vs. DMN: $103,1 \pm 1,0$, $n=10$, oder DMN+III11c: $101,9 \pm 0,5$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $102,1 \pm 0,8$ [%], $n=6$, $p \leq 0,005$; **Woche 2:** NaCl: $113,5 \pm 1,8$, $n=10$ vs. DMN: $104,7 \pm 1,0$, $n=10$, oder DMN+III11c: $102,4 \pm 0,9$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $102,5 \pm 1,0$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$; **Woche 3:** NaCl: $116,8 \pm 2,0$, $n=10$ vs. DMN: $103,7 \pm 1,4$, $n=10$, oder DMN+III11c: $101,4 \pm 1,3$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $99,8 \pm 1,4$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$; **Woche 4:** NaCl: $120,9 \pm 1,8$, $n=10$ vs. DMN: $101,8 \pm 1,7$, $n=10$, oder DMN+III11c: $96,9 \pm 1,4$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $96,6 \pm 1,6$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$).

III.1.2.1.3.1.2. Gewichtsentwicklung der Tiere, die nach der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden

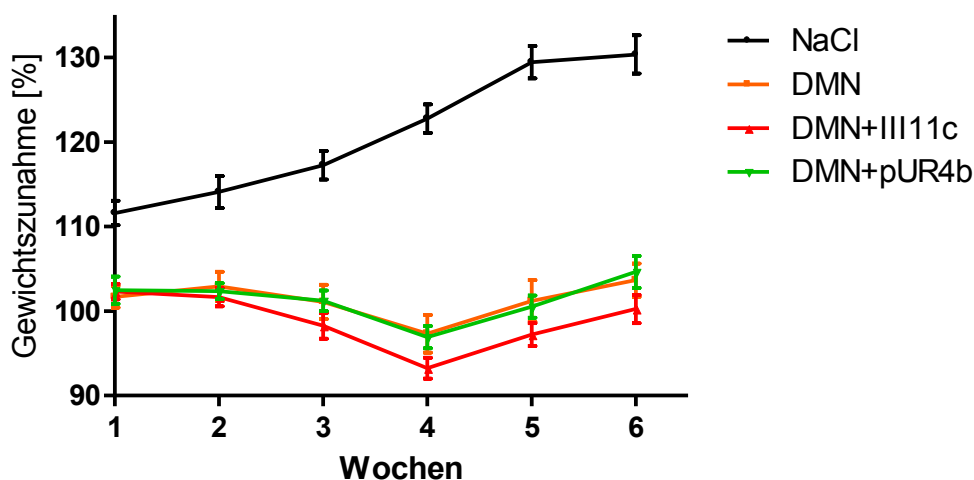


Abb.III.1.16. **Gewichtsentwicklung der Tiere während und nach der Fibroseinduktion.** Prozentuale Gewichtszunahme der Tiere während der vier Wochen der Fibroseinduktion und der darauffolgenden zweiwöchigen Behandlung mit pUR4b oder III11c (bzw. NaCl). Die Gewichtszunahme wurde für jede Woche im Verhältnis zu den Werten bei Versuchsbeginn berechnet.

Bei der Auswertung der Gewichtsentwicklung der Tiere, die erst nach Ende der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. NaCl) behandelt wurden, zeigte sich, dass die mit NaCl behandelten Kontrolltiere zu allen aufgenommenen Zeitpunkten ein signifikant höheres Gewicht hatten als die fibrotischen Tiere (**Woche 1:** NaCl: $111,6 \pm 1,4$, $n=10$ vs. DMN: $101,1 \pm 1,3$, $n=9$, oder DMN+III11c: $102,3 \pm 0,9$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $102,5 \pm 1,6$ [%], $n=6$, $p \leq 0,005$; **Woche 2:** NaCl: $114,1 \pm 1,9$, $n=10$ vs. DMN: $102,1 \pm 1,7$, $n=9$, oder DMN+III11c: $101,6 \pm 1,0$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $102,4 \pm 0,9$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$; **Woche 3:** NaCl: $117,2 \pm 1,7$, $n=10$ vs. DMN: $100,2 \pm 2,0$, $n=9$, oder DMN+III11c: $98,2 \pm 1,5$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $101,2 \pm 101,2$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$, **Woche 4:** NaCl: $122,7 \pm 1,7$, $n=10$ vs. DMN: $96,2 \pm 2,2$, $n=9$, oder DMN+III11c: $93,2 \pm 1,2$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $96,9 \pm 1,3$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$, **Woche 5:** NaCl: $121,4 \pm 1,9$, $n=10$ vs. DMN: $100,0 \pm 2,5$, $n=9$, oder DMN+III11c: $97,2 \pm 1,3$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $100,5 \pm 1,3$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$, **Woche 6:** NaCl: $130,3 \pm 2,3$, $n=10$ vs. DMN: $103,0 \pm 2,0$, $n=9$, oder DMN+III11c: $100,2 \pm 1,7$, $n=7$, oder DMN+pUR4b: $104,6 \pm 1,9$ [%], $n=6$, $p \leq 0,0005$). Weiterhin lässt sich bei den fibrotischen Tieren der Trend einer Gewichtszunahme ab dem Zeitpunkt des Endes der Fibroseinduktion erkennen.

III.1.2.1.3.2. Die Albuminwerte im Serum

Bei einer Leberfibrose kann aufgrund der entstandenen Störung der Proteinsynthese die Albuminproduktion vermindert und somit der Albumingehalt im Blut erniedrigt sein [328].

Zur Messung der Albuminkonzentration im Serum der Tiere wurde ein ELISA durchgeführt. Zunächst wurde hierbei nur die Gruppe untersucht, die bereits während der Fibroseinduktion mit pUR4b bzw. III11c behandelt wurde und direkt im Anschluss an die Fibroseinduktion getötet wurde.

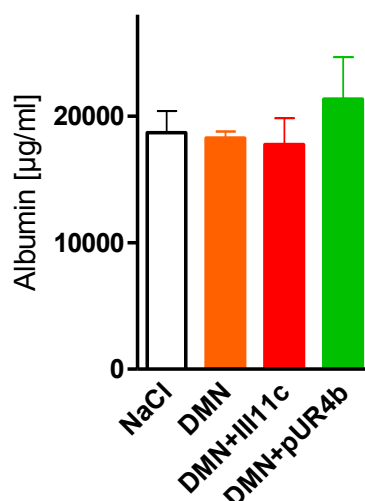


Abb.I.1.17. **Albuminserumwerte der Tiere.** Ergebnisse des ELISAs zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Serum der Tiere.

Die Albuminwerte der untersuchten Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (NaCl: 18677±1714, n=3 vs. DMN: 18278±496,5, n=4, vs. DMN+III11c: 17765±2071, n=3, vs. DMN+pUR4b: 21343±3303 [µg/ml], n=3, p=ns).

Die unveränderte Albuminkonzentration ist ein Anzeichen dafür, dass die Leberfunktion nur moderat beeinträchtigt ist [369, 370]. Da keine Effekte ersichtlich waren, wurde bei der Gruppe, die nach der DMN Behandlung eine zweiwöchige Peptidbehandlung ohne weitere Fibroseinduktion erhielt, auf die Evaluierung der Albuminwerte des Bluts verzichtet.

III.1.2.1.4. Auswirkungen der Gabe des Peptids pUR4b auf das Zytokin TGF-β

In einer anderen Arbeit aus unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die konditionelle Ausschaltung des Fibronektins den TGF-β Gehalt der Matrix veränderte [193]. Da TGF-β die Leberfibrose beeinflusst, stellte sich die Frage, ob die von uns beobachteten Effekte, der verminderten Kollagenablagerung in der mit pUR4b behandelten Gruppe, auf eine veränderte TGF-β Produktion der Zellen in der Leber zurückzuführen waren.

TGF-β wird von Zellen in einem inaktiven Komplex abgegeben und in der extrazellulären Matrix gespeichert. Es konnte gezeigt werden, dass Fibronectin sowohl für die Bildung als auch die Stabilisierung des inaktiven TGF-β Komplexes benötigt wird [52, 190, 191]. Daher sollte untersucht werden, ob der TGF-β Gehalt in unserem Modell durch eine verminderte Fibronectinmatrix verändert wird. Zum Nachweis des TGF-βs bedienten wir uns eines Luziferase Versuchs, bei dem sensitive Zellen auf die Anwesenheit von TGF-β mit der Bildung von Luziferase reagieren [338]. Durch dieses Vorgehen kann zwischen dem gesamten TGF-β Gehalt der Leber und dem Anteil des aktiven TGF-β differenziert werden. Es wurden entsprechend präparierte Leberlysate der fibrotischen Gruppen verdünnt, auf diese Zellen aufgebracht und nach einer definierten Inkubationszeit in einem Luminometer gemessen und mit Hilfe einer Standardreihe quantifiziert.

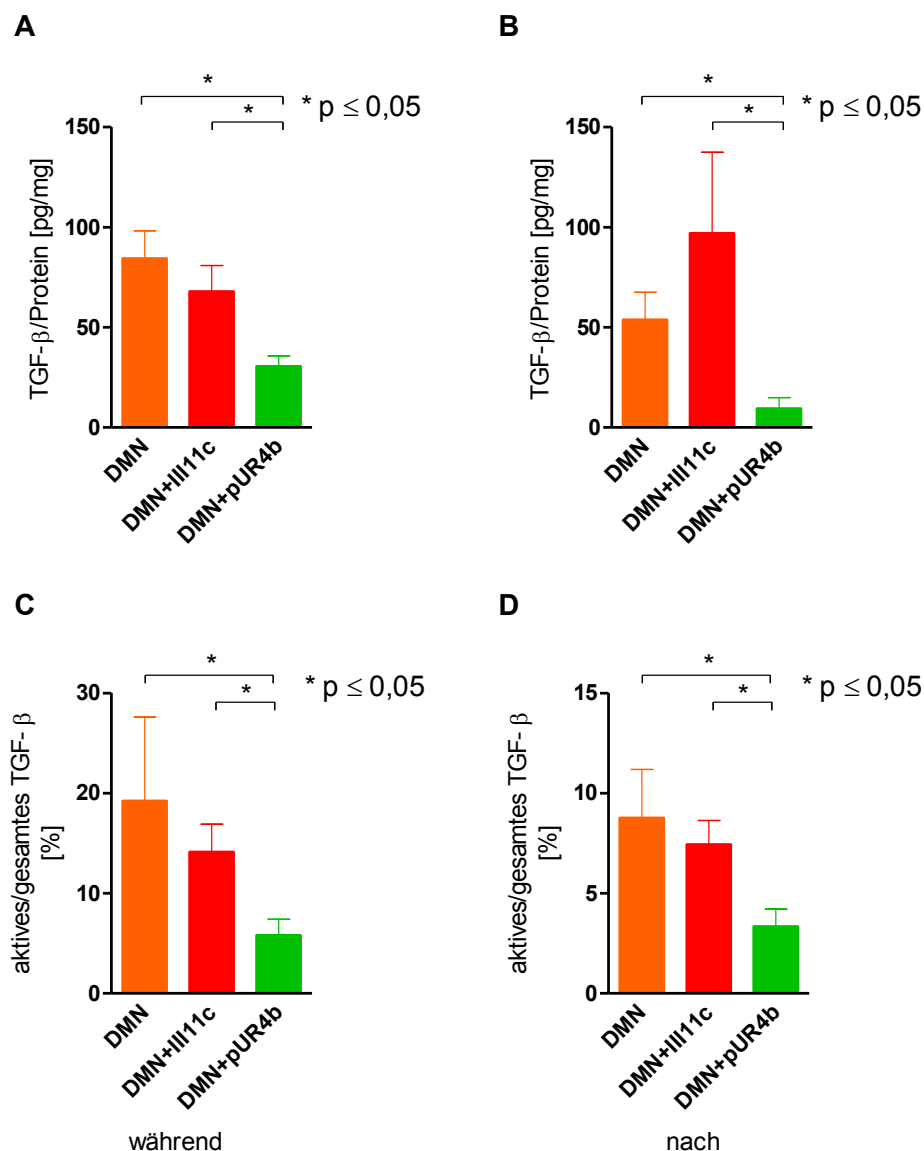


Abb.III.1.18. **Luziferase Versuch zur Ermittlung des Gesamtgehalts und des aktiven Gehalts des TGF-βs in Leberlysaten.** Abgebildet ist der Gesamtgehalt des TGF-β (A, B) und der prozentuale Anteil des aktiven TGF-βs (C, D) von Leberlysaten der fibrotischen Gruppen. In Graph A und C sind diejenigen Tiere dargestellt, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden behandelt wurden, in Graph B und D hingegen diejenigen, die erst nach Beendigung der Fibroseinduktion Peptide erhielten.

Bei der Gruppe der Tiere, die während der Fibroseinduktion mit Peptiden behandelt und direkt im Anschluss untersucht wurden, war der TGF-β Gehalt der mit pUR4b behandelten Tiere im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen signifikant vermindert (Abb.III.1.18., A: DMN+pUR4b: $30,55 \pm 5,28$, $n=7$ vs. DMN: $84,38 \pm 13,84$, $n=3$ oder DMN+III11c: $67,93 \pm 13,00$ [pg TGF-β/mg Protein], $n=6$, $p \leq 0,05$). Auch der prozentuale Gehalt des aktiven TGF-βs war bei den Tieren, die pUR4b erhielten, signifikant geringer als bei denjenigen anderer Gruppen (Abb.III.1.18., C: DMN+pUR4b: $5,82 \pm 1,59$, $n=6$ vs. DMN: $19,22 \pm 8,39$, $n=3$ oder DMN+III11c: $14,13 \pm 2,78$ [%], $n=7$, $p \leq 0,05$).

Bei den Tieren, die erst nach der Fibroseinduktion mit Peptiden behandelt wurden, war der TGF-β Gehalt der mit DMN+pUR4b behandelten Tiere ebenfalls signifikant niedriger als derjenige der

anderen Mäuse (Abb.III.1.18., B: DMN+pUR4b: $9,45 \pm 5,52$, $n=5$ vs. DMN: $53,71 \pm 13,73$, $n=3$, $p \leq 0,05$ oder vs. DMN+III11c: $97,01 \pm 40,45$ [pg TGF- β /mg Protein], $n=4$, $p=ns$). Darüberhinaus konnte auch hier bei den mit pUR4b behandelten Mäusen ein signifikant niedrigerer Anteil des aktiven TGF- β s gefunden werden als bei den anderen Tieren (Abb.III.1.18., D: DMN+pUR4b: $3,34 \pm 0,88$, $n=6$ vs. DMN: $8,76 \pm 2,42$, $n=4$ oder vs. DMN+III11c: $7,44 \pm 1,19$ [pg TGF- β /mg Protein], $n=5$, $p \leq 0,05$).

Die Behandlung der Tiere mit pUR4b führte zu einer Verminderung des TGF- β Gehalts im Vergleich zu den anderen fibrotischen Tieren. Die oben erwähnte Ausschaltung des Fibronektins führte jedoch zu einer Erhöhung des TGF- β Gehalts. Daher kann man davon ausgehen, dass die Ausschaltung des Fibronektins Auswirkungen auf den gesamten Organismus der Maus hat, eine Behandlung mit pUR4b hingegen nur die im Umbau befindliche Matrix beeinflusst.

III.1.2.2. *In vitro* Untersuchungen zu den Auswirkungen des Peptids pUR4b bei Leberfibrose

Da die Untersuchungen der Mauslebern gezeigt hatten, dass mit pUR4b behandelte fibrotische Tiere weniger Kollagen in der Leber ablagerten, als die anderen Tiere der fibrotischen Kontrollgruppen, sollte *in vitro* untersucht werden, ob dieser Effekt auf ein verändertes Verhalten der hepatischen Stellatezellen zurückzuführen war. Wie bereits erwähnt, nehmen die hepatischen Stellatezellen eine Schlüsselrolle bei dem Aufbau der fibrotischen Matrix ein, da sie unter anderem die Hauptproduzenten von Kollagen Typ I sind [156]. Daher sollte *in vitro* untersucht werden, ob das Peptid pUR4b die Bildung eines Fibronektinnetzwerks dieser Zellen beeinträchtigt.

III.1.2.2.1. Isolation und Kultivierung der hepatischen Stellatezellen

Die hepatischen Stellatezellen wurden durch eine Perfusion der Leber mit verschiedenen Enzymlösungen isoliert und anschließend mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation von den anderen Leberzellen getrennt. Im Anschluss wurden die Zellen über einen kurzen Zeitraum von 24 Stunden in Kultur gehalten, überprüft, ob sie an den Kulturgefäßen adhärirt hatten und hierauf für die Versuche verwendet. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen kultivierten Zellen auch tatsächlich um Stellatezellen handelte, wurden diese nach einer Kultivierungszeit von 2-3 Tagen mit Antikörpern, gegen die für sie spezifischen Markerproteine Desmin und GFAP (glial fibrillary acidic protein [engl.]), gefärbt.

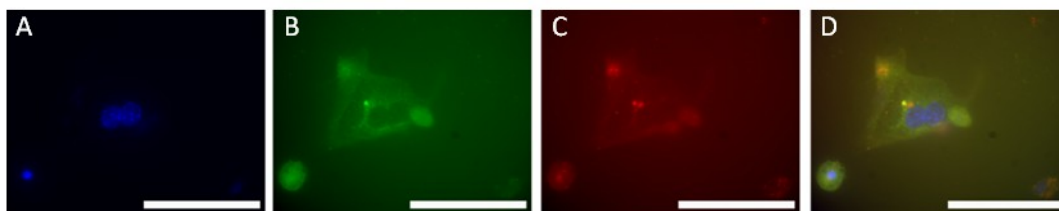


Abb.III.1.19. **Immunfluoreszenzfärbung kultivierter hepatischer Stellatezellen.** Die Zellkerne der isolierten hepatischen Stellatezellen wurden mit DAPI angefärbt und blau dargestellt (A). Die Färbung gegen Desmin wird in grün dargestellt (B), die gegen GFAP in rot (C) und in D sind alle drei Färbungen als Überlagerung abgebildet. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Die Färbungen zeigten, dass es sich bei den von uns isolierten Zellen um hepatische Stellatezellen handelte. Es fanden sich zwar auch Zellen die nicht positiv gefärbt waren, diese traten jedoch nur sporadisch auf. Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die von uns isolierten hepatischen Stellatezellen einen Reinheitsgrad von ca. 90% aufwiesen [371].

III.1.2.2.2. Der Einfluss von pUR4b auf die Fibronektinproduktion der kultivierten hepatischen Stellatezellen

Um den Einfluss des Peptids pUR4b auf die Etablierung einer Fibronektinmatrix durch die hepatischen Stellatezellen *in vitro* zu untersuchen, wurde beim Aussähen der Zellen bei einigen Kulturgefäßen dem Kulturmedium pUR4b, bei einigen anderen III11c als Kontrolle zugegeben. Hierauf wurden diese über einen Zeitraum von drei Tagen kultiviert. Im Anschluss wurden die kultivierten hepatischen Stellatezellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Fibronektin angefertigt.

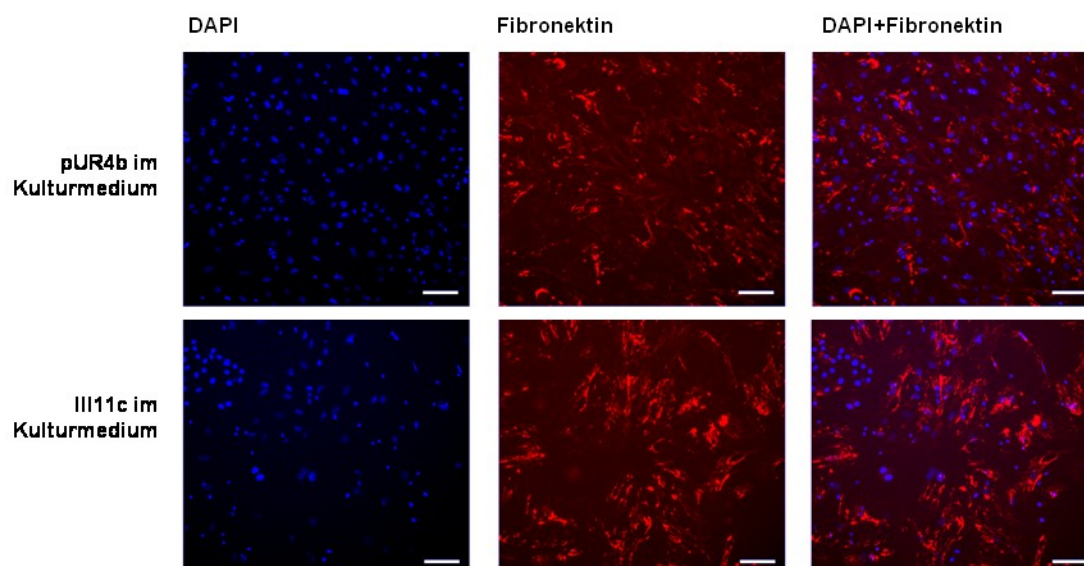


Abb.III.1.20. **Immunfluoreszenzfärbung des Fibronektins hepatischer Stellatezellen.** Dargestellt sind Bilder von nach Leberperfusion kultivierten hepatischen Stellatezellen, die mit DAPI (dargestellt in blau, links) und einem Antikörper gegen Fibronektin (dargestellt in rot, Mitte) gefärbt wurden. In den rechten Abbildungen sind beide Färbungen übereinandergelegt dargestellt. Die Zellen in den oberen Abbildungen wurden mit pUR4b, die in den unteren mit dem entsprechenden Kontrollpeptid III11C behandelt. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine verminderte Fibronectinmatrix bei denjenigen hepatischen Stellatezellen, die mit pUR4b behandelt wurden.

III.1.2.2.3. Die Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Fibronectinmatrix kultivierter hepatischer Stellatezellen

Um den Eindruck der bei den Immunfluoreszenzfärbungen der hepatischen Stellatezellen (siehe Abb.III.1.20.) entstanden war, zu bestätigen, sollte der Fibronectingehalt der Zellen quantifiziert werden. Bei der Bildung eines Fibronectinnetzwerks bindet Fibronectin zunächst an Integrinrezeptoren von Zellen, ist dadurch immobilisiert und beteiligt sich dann an Interaktionen zwischen sich selbst (Fibronectin) und Fibronectin, die zu der Ausbildung von Fibrillen führen. Beim Voranschreiten dieses Prozesses werden kurze, dünne Fibrillen dichter und länger. Die anfänglichen integrinassozierten Fibrillen sind in dem Detergens Deoxycholat (doc sol für deoxycholate soluble [engl.], löslich in Deoxycholat) löslich, wohingegen durch das Voranschreiten der Fibronectinassemblierung die ursprünglich in Deoxycholat löslichen Fibrillen in eine Deoxycholat unlösliche (doc insol für deoxycholate insoluble [engl.], unlöslich in Deoxycholat) Matrix umgewandelt werden, in der die Fibronectin Dimere eng in hochmolekularen detergensstabilen Multimeren assoziiert sind [26, 335]. Daher wurden zur Analyse des Fibronectingehalts der Matrix von in fibronectinfreiem Medium kultivierten hepatischen Stellatezellen, zwischen dem in Deoxycholat löslichen Anteil des Fibronectins (doc sol) und dem nicht in Deoxycholat löslichen Anteil des Fibronectins (doc insol) unterschieden. Somit konnte das fest in der Matrix assemblierte Fibronectin (doc insol) von Fibronectin unterschieden werden, dass sich z.B. in oder an den Zellen befand oder erst vor Kurzem eingebaut worden war.

Weiterhin wurde auch der Fibronectingehalt der Zellüberstände bestimmt, um freies Fibronectin, das weder in Zellen noch in der Matrix gebunden ist, nachzuweisen. Der exakte Fibronectingehalt wurde nach dem Herstellen der entsprechenden Lysate mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert und zu dem Proteingehalt der Lysate korrigiert.

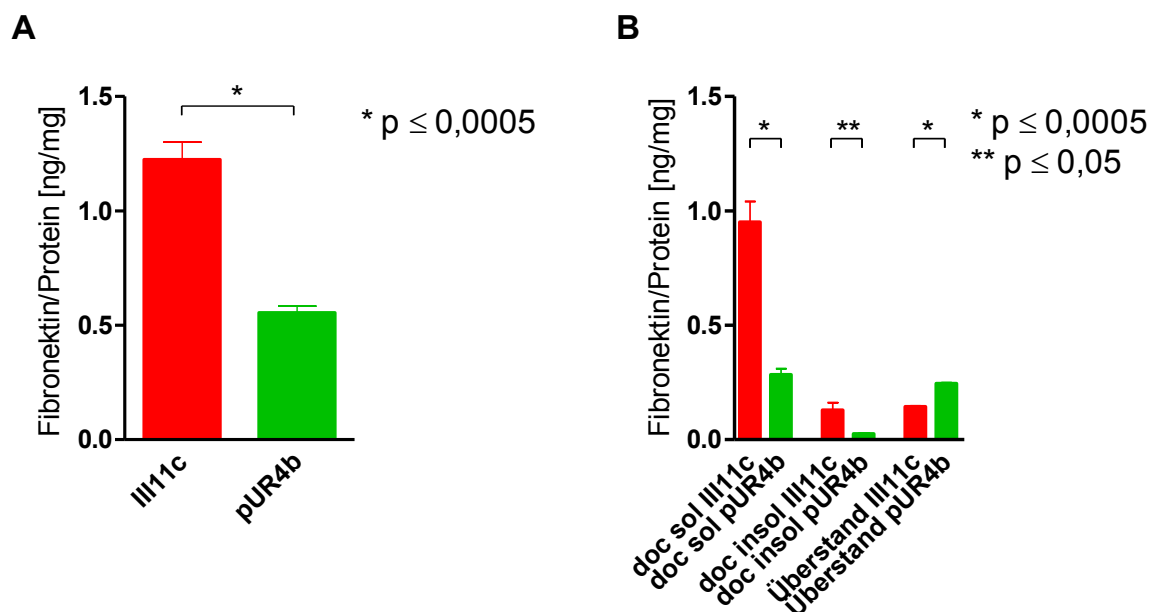


Abb.I.1.21. **Fibronektingehalt der kultivierten hepatischen Stellatezellen.** In Abbildung A ist der Gesamtfibronektingehalt aller untersuchten Fraktionen (doc sol + doc insol + Überstand) bei den mit III11c sowie den mit pUR4b behandelten hepatischen Stellatezellen dargestellt. In Abbildung B hingegen sind die Fibronektingehalte der mit III11c und der mit pUR4b behandelten hepatischen Stellatezellen in unterschiedliche Fraktionen aufgeteilt. Links ist hierbei der Fibronektingehalt der in Deoxycholat löslichen Fraktion (doc sol), in der Mitte der der in Deoxycholat unlöslichen (doc insol) und rechts der der Überstände dargestellt.

Diejenigen hepatischen Stellatezellen, die mit pUR4b behandelt wurden, wiesen einen signifikant niedrigeren Gesamtfibronektingehalt auf, als die mit III11c behandelten Kontrollen (Abb.III.1.21., A: III11c: 1,122±0,0758, n=4 vs. pUR4b: 0,555±0,0293 [ng Fibronektin/mg Protein], n=4, p≤0,005).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Fibronektingehalt der mit pUR4b behandelten Zellen sowohl in der in Deoxycholat löslichen (doc insol) als auch in der in Deoxycholat unlöslichen Fraktion (doc insol) signifikant vermindert war (Abb.III.1.21., B: doc sol: III11c: 0,951±0,0904, n=4 vs. pUR4b: 0,284±0,0263, n=4 [ng Fibronektin/mg Protein], p≤0,05 doc insol: III11c: 0,129±0,0323, n=4 vs. pUR4b: 0,0255±0,00361, n=4 [ng Fibronektin/mg Protein], p≤0,005). In den Medienüberständen hingegen war der Fibronektingehalt der mit pUR4b behandelten Zellen gegenüber den mit III11c behandelten Kontrollzellen signifikant erhöht (Abb.III.1.20., B: III11c: 0,144±0,00376, n=4 vs. pUR4b: 0,245±0,00480 [ng Fibronektin/mg Protein], n=4, p≤0,0005). Dies lässt darauf schließen, dass der Einbau des Fibronektins in der Matrix durch pUR4b vermindert wird.

III.1.3. Bestätigung der Ergebnisse in einem Modell mit CCl₄ induzierter Fibrose

Um herauszufinden ob die Erkenntnisse, die in dem Modell der Fibroseinduktion durch DMN gewonnen wurden auch auf andere Fibrosemodelle übertragen werden könnten, untersuchten wir die wichtigsten Ergebnisse erneut, allerdings in einem Modell, in dem die Fibrose durch die Chemikalie CCl₄ induziert wurde (siehe III.1.1.1.)

Auch in diesem Modell sollten sowohl die Auswirkungen des Peptids bei einer Anwendung während der Fibrosebildungsphase als auch einer Anwendung nach deren Beendigung untersucht werden (siehe III.1.2.1.1.1. bzw. III.2.1.1.2.).

III.1.3.1. Auswirkungen der Gabe des Peptids pUR4b auf die Matrixmenge

Um die Auswirkungen des Peptids pUR4b auf die Bildung der exzessiven extrazellulären Matrix bei einer durch CCl₄ induzierten Fibrose zu untersuchen, bestimmten wir zunächst die Kollagenmenge von Leberlysaten.

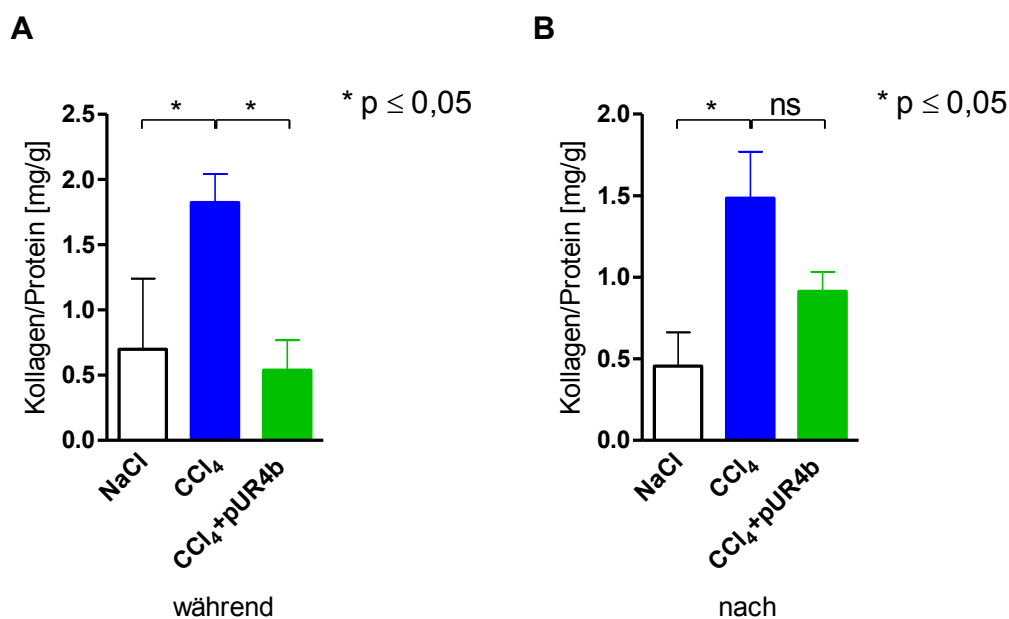


Abb.III.1.22. **Kollagengehalt der fibrotischen Lebern.** Dargestellt sind die Kollagenleberwerte der mit CCl₄ behandelten Tiere bei Anwendung des Peptids pUR4b (bzw. entsprechend NaCl) während der Fibroseinduktion (links) und nach Beendigung der Fibroseinduktion (rechts). Der Kollagengehalt der Leber wurde anhand des Hydroxyprolinegehalts berechnet. Der weiße Balken repräsentiert die Tiere der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe, der blaue Balken die mit CCl₄ behandelten, und der grüne die mit CCl₄+pUR4b behandelten Tiere.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den Tieren, die während der Fibrosebildungsphase mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurden, auch in diesem Modell sowohl die mit NaCl behandelten Kontrollen als auch die mit CCl₄+pUR4b behandelten Mäuse signifikant weniger Kollagen in der Leber abgelagert hatten, als die mit CCl₄ behandelten fibrotischen Tiere (NaCl: 0,698±0,541, n=3 oder CCl₄+pUR4b: 0,537±0,229, n=3 vs. CCl₄: 1,82±0,217 [mg Kollagen/g Protein], n=7, p≤0,05).

Bei den Tieren, welche erst nach Beendigung der Fibrosebildungsphase mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurden, hatten die mit NaCl behandelten Mäuse signifikant weniger Kollagen in der Leber als die fibrotischen Tiere der CCl₄ Gruppe (NaCl: 0,455±0,207, n=4 vs. CCl₄: 1,484±0,286 [mg Kollagen/g Protein], n=8, p≤0,05). Darüber hinaus unterschied sich der Kollagengehalt der mit pUR4b+CCl₄ behandelten Tiere nicht signifikant zu dem der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollen (CCl₄+pUR4b: 0,914±0,119, n=3 vs. NaCl: 0,455±0,207 [mg Kollagen/g Protein], n=4, p=ns). Innerhalb der fibrotischen, das heißt der mit CCl₄+pUR4b und der

mit CCl_4 behandelten Tiere unterschied sich der Kollagengehalt nicht signifikant, es konnte jedoch der Trend eines verminderten Kollagengehalts bei den mit CCl_4 +pUR4b behandelten Mäusen gezeigt werden (CCl_4 +pUR4b: $0,914 \pm 0,119$, $n=3$ vs. CCl_4 : $1,484 \pm 0,286$ [mg Kollagen/g Protein], $n=8$, $p=0,2$).

III.1.3.2. Immunfluoreszenzuntersuchungen

Auch in dem CCl_4 induzierten Fibrosemodell sollte der mögliche Einfluss der hepatischen Stellatezellen und der inflammatorischen Zellen untersucht werden. Daher wurden Gefrierschnitte der Lebern angefertigt und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

III.1.3.2.1. Die aktivierten hepatischen Stellatezellen

Da die aktivierten hepatischen Stellatezellen in dem Fibrosemodell mit DMN in den fibrotischen Gruppen erhöht waren, sollten sie auch in dem Modell der CCl_4 induzierten Leberfibrose untersucht werden. Hierzu wurden Gefrierschnitte der Leber mit einem Antikörper gegen α -sma angefärbt und somit die aktivierten hepatischen Stellatezellen dargestellt.

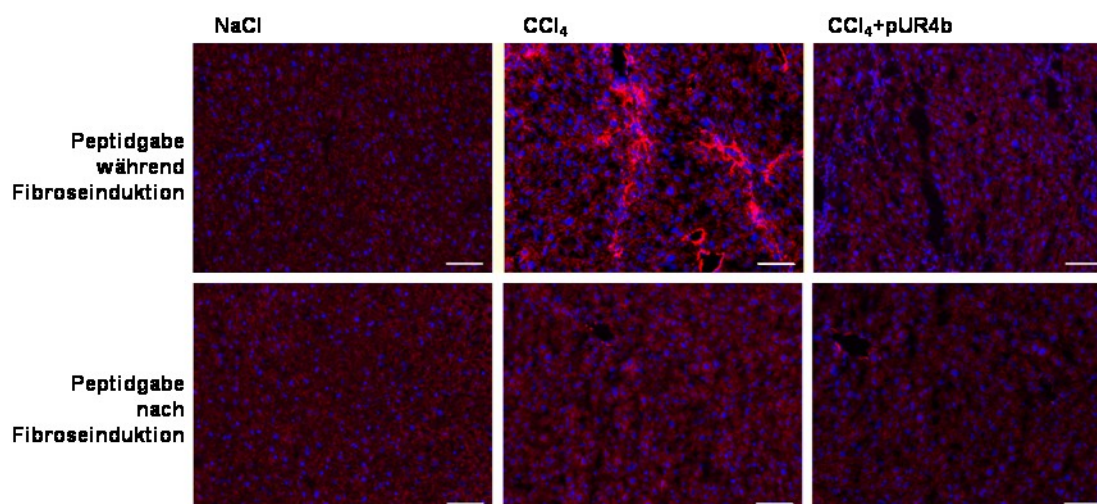


Abb.III.1.23. Immunfluoreszenzfärbung aktivierter Stellatezellen mit Antikörper gegen α -sma. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. Aktivierte hepatische Stellatezellen sind rot dargestellt. Exemplarisch dargestellt sind angefärbte Leberschnitte der Gruppen NaCl (je links), CCl_4 (je in der Mitte), und CCl_4 +pUR4b (je rechts). Oben abgebildet sind je die Bilder der Gruppen, die während der Fibroseinduktion mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) und unten je diejenigen die erst nach Beendigung der Fibroseinduktion mit Peptid (bzw. NaCl) behandelt wurden. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von $200\mu\text{m}$.

Die Färbungen ergaben eine Erhöhung der aktivierten hepatischen Stellatezellen bei der fibrotischen CCl_4 Gruppe der Tiere, die während der Fibroseinduktion mit Peptid (bzw. NaCl) behandelt wurden. Bei der Gruppe der Tiere, die nach der Fibroseinduktion mit Peptid (bzw. NaCl) behandelt wurden, traten keine merklichen Unterschiede auf. Um diese Eindrücke zu bestätigen, wurden die positiv gefärbten Zellen ausgezählt und zur Größe der Lebergefrierschnitte korrigiert.

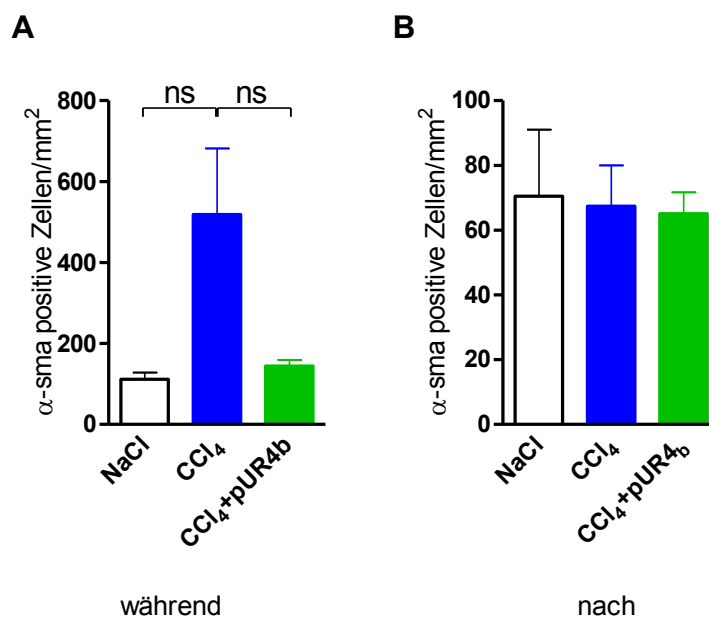


Abb.III.1.24. **Auszählung der α -sma positiv gefärbten Zellen im CCl_4 Modell.** Die α -sma gefärbten Zellen wurden ausgezählt, die bearbeitete Fläche ausgemessen und die Anzahl der positiven Zellen pro mm^2 berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählung der Gruppe, die während der letzten zehn Tage der Fibrosebildungsphase mit pUR4b (A) behandelt wurden bzw. die der Gruppe, die nach der Fibroseinduktion zwei Wochen lang mit pUR4b behandelt wurde (B).

Bei den Tieren, die während der Fibrosebildungsphase mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurden (Abb.III.1.24., A), ergaben sich in der Anzahl der aktivierten Stellatezellen keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich jedoch ein Trend, der auf eine Erhöhung der hepatischen Stellatezellen in der fibrotischen CCl_4 Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen hinwies (CCl_4 : $518,4 \pm 163,6$, $n=4$ vs. NaCl : $111,7 \pm 16,4$, $n=3$, $p=0,09$ oder CCl_4 +pUR4b: $144,3 \pm 14,9$ [α -sma positive Zellen/ mm^2], $n=4$, $p=0,06$).

Bei den Tieren, die erst nach Beendigung der Fibroseinduktion mit Peptiden (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurden (Abb.III.1.24., B), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (NaCl : $70,52 \pm 20,51$, $n=3$ vs. CCl_4 : $67,83 \pm 12,55$, $n=3$ vs. CCl_4 +pUR4b: $65,06 \pm 6,61$ [α -sma positive Zellen/ mm^2], $n=3$, $p=\text{ns}$).

III.1.3.2.2. Die entzündlichen Zellen

Da eine Leberfibrose oftmals mit einer Entzündung des Gewebes einhergeht und bereits in dem Modell der DMN induzierten Leberfibrose Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der entzündlichen Zellen gefunden wurden, sollte dies auch in dem Modell der CCl_4 induzierten Leberfibrose untersucht werden. Hierzu wurden Gefrierschnitte der Lebern mit Antikörper gegen CD45 angefärbt.

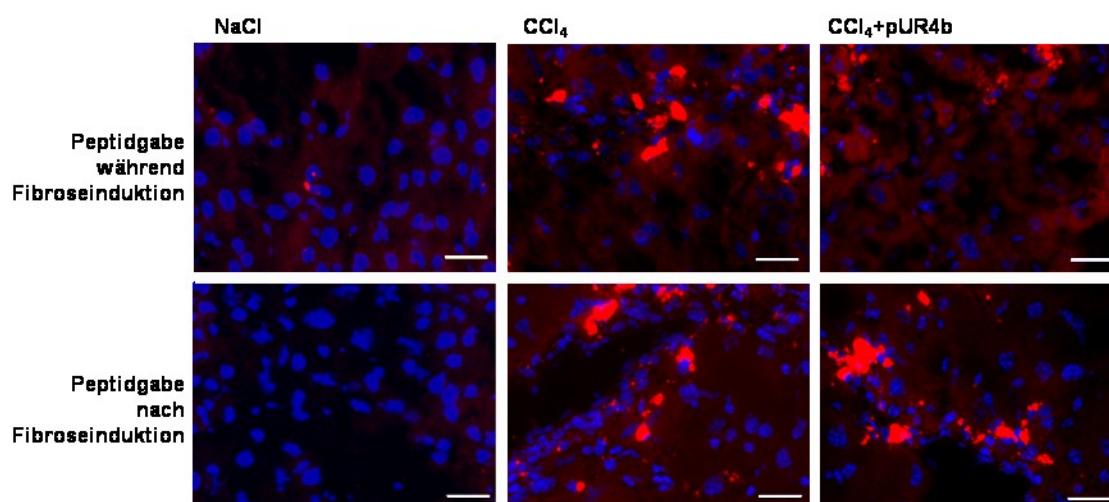


Abb.III.1.25. **Immunfluoreszenzfärbung inflammatorischer Zellen mit Antikörper gegen CD45.** Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. Inflammatorische Zellen sind rot dargestellt. Oben abgebildet sind je die Bilder der Gruppen, die während der Fibrosebildungsphase mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) und unten je diejenigen die erst nach Beendigung der Fibrosebildungsphase mit Peptid (bzw. NaCl) behandelt wurden. Exemplarisch dargestellt sind angefärbte Leberschnitte der Gruppen NaCl (je links), CCl₄ (je in der Mitte), und CCl₄+pUR4b (je rechts). Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Beim Betrachten der Färbungen ließ sich erkennen, dass bei den mit Kochsalzlösung (NaCl) behandelten Kontrolltieren weniger positiv gefärbte Zellen in den Gefrierschnitten zu finden waren als bei den der anderen Gruppen. Weiterhin schienen diejenigen Tiere, welche mit CCl₄+pUR4b behandelt wurden, etwas weniger positiv gefärbte Zellen aufzuweisen als die ausschließlich mit CCl₄ behandelten fibrotischen Tiere. Um diese Eindrücke zu evaluieren, wurden die positiv gefärbten Zellen ausgezählt und zu der Fläche des Gefrierschnittes korrigiert.

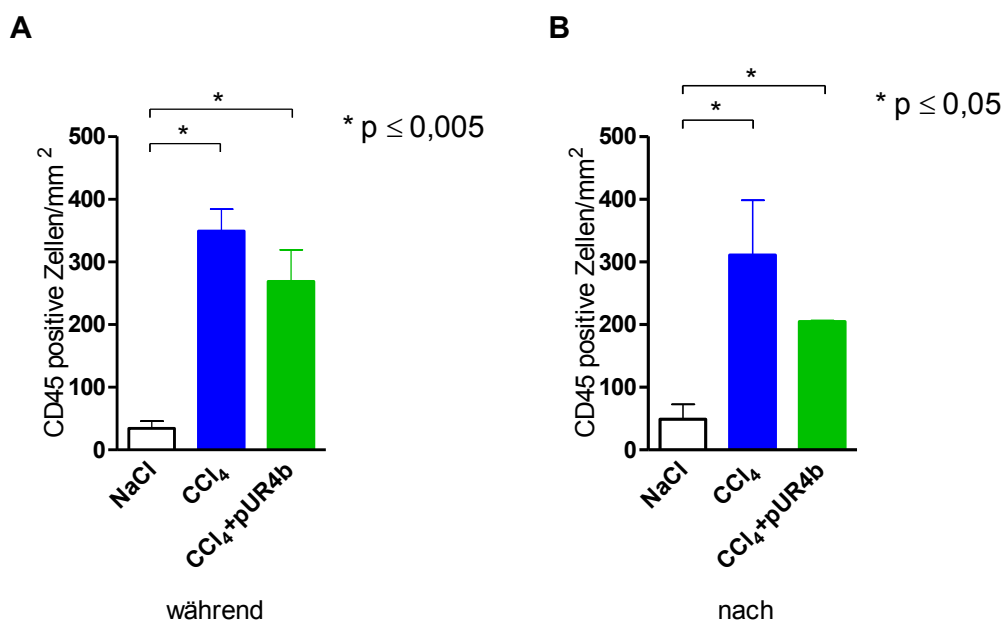


Abb.III.1.26. **Auszählung der CD45 positiv gefärbten Zellen.** Die CD45 gefärbten Zellen wurden ausgezählt, die bearbeitete Fläche ausgemessen, und die Anzahl der positiven Zellen pro mm² berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Auszählung der Gruppe, die während der letzten zehn Tage der Fibrosebildungsphase mit pUR4b (bzw. entsprechend NaCl) (A) behandelt wurden bzw. die der Gruppe, deren Tiere nach der Fibrosebildungsphase zwei Wochen lange mit pUR4b (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurde (B).

Die Auszählung der positiv gefärbten Zellen bei den Tieren, welche während der Fibrosebildungsphase mit Peptid behandelt wurden, ergab, dass bei den Tieren der fibrotischen Gruppen signifikant mehr CD45 positive Zellen gefunden wurden als bei den gesunden Tieren (Abb.III.1.26., A) (NaCl: $34,50\pm 11,39$, n=3 vs. CCl₄: $349,00\pm 34,88$, n=3 oder CCl₄+pUR4b: $268,80\pm 50,17$ [CD45 positive Zellen/mm²], n=3, p $\leq 0,005$). Obwohl bei den Tieren der mit CCl₄+pUR4b behandelten Gruppe etwas weniger positiv gefärbte Zellen gefunden wurden als bei denjenigen der CCl₄ behandelten Gruppe, war dieser Unterschied nicht signifikant (siehe oben).

Bei denjenigen Tieren, die erst nach der Fibrosebildungsphase mit Peptiden (oder entsprechend NaCl) behandelt wurden (Abb.III.1.26., B), zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den fibrotischen Tieren und eine leichte Verminderung der positiv gefärbten Zellen der pUR4b behandelten Tiere im Vergleich zu den CCl₄ behandelten Tieren (NaCl: $48,91\pm 23,84$, n=3 vs. CCl₄: $310,60\pm 87,62$, n=3 oder CCl₄+pUR4b: $204,50\pm 1,61$ [CD45 positive Zellen/mm²], n=3, p $\leq 0,05$).

Zusammenfassend weisen alle Daten darauf hin, dass die Gabe des Peptids pUR4b im DMN Modell sowohl während als auch nach der Fibrosebildungsphase zu einer verminderten Fibronectinmatrix und in Folge dessen einem verminderten Aufbau von Narbengewebe in fibrotischen Tieren führte. Dieser Prozess war unabhängig von einer Aktivierung der hepatischen Stellatezellen, ging jedoch mit einer verringerten Anzahl der entzündlichen Zellen einher. Darüber hinaus enthielten die Lebern der mit pUR4b behandelten Tiergruppe weniger Gesamt- und auch weniger aktives TGF- β als die der Tiere anderer Gruppen. Auch bei der Fibroseinduktion durch CCl₄ führte die Gabe von pUR4b zu einer verminderten Ablagerung von fibrotischem Narbengewebe.

III.2. Die Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere des Matrixproteins Fibronektin bei der Tumorentstehung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) spielt eine wichtige Rolle bei dem Überleben, der Proliferation und der Migration von Zellen, ist in Mammakarzinomen anormal exprimiert und ist von entscheidender Bedeutung bei der Angiogenese, Zellinvasion und Metastasierung [372, 373]. Die Invasion der Krebszellen in die extrazelluläre Matrix ist ein unerlässlicher Vorgang bei der Tumordinfiltration und Metastasierung [374]. Das extrazelluläre Protein Fibronektin vermittelt Zelladhäsion und Migration. Da Fibronektin vermutlich eine Rolle bei der Einnistung von Tumorzellen spielt [375], wurde dessen Einfluss auf das Einnistungsverhalten von Luziferase exprimierenden Brustkrebszellen der Linie MDA-MB-231-B/luc⁺ (im Weiteren abgekürzt mit MDA) untersucht. Diese Zelllinie ist daraufhin selektiert sich im Knochenmark einzunisten und dort Metastasen zu bilden. Für die Untersuchungen wurden die Zellen immuninsuffizienten Mäusen intrakardial injiziert.

III.2.1. Detektion sich einnistender Tumorzellen im Knochenmark

Da ausschließlich der Prozess der Einnistung von Tumorzellen untersucht werden sollte, wurde das intrakardiale Modell (siehe II.3.2.1.5.1.) gewählt. Es musste zunächst festgestellt werden, ob die Zellen tatsächlich vom Blutkreislauf der Mäuse in das Knochenmark gelangen und dort quantifiziert werden können. Als erfolgreiche intrakardiale Injektionen wurden Injektionen gewertet, bei denen vor und nach Injektion der Tumorzellen stoßweise einströmendes hellrotes Blut in der Kanüle zu erkennen war. Um zu bestätigen, dass diese Injektionen tatsächlich erfolgreich waren, wurde bei einigen Mäusen stichprobenartig direkt nach der intrakardialen Injektion (und nach Zugabe von Luziferin) das durch die Tumorzellen emittierte Licht (siehe II.4.2.1.8.2.) in Form eines Biolumineszenzsignals (RLU, relative light unit [engl.], emittierte Lichteinheiten) gemessen.

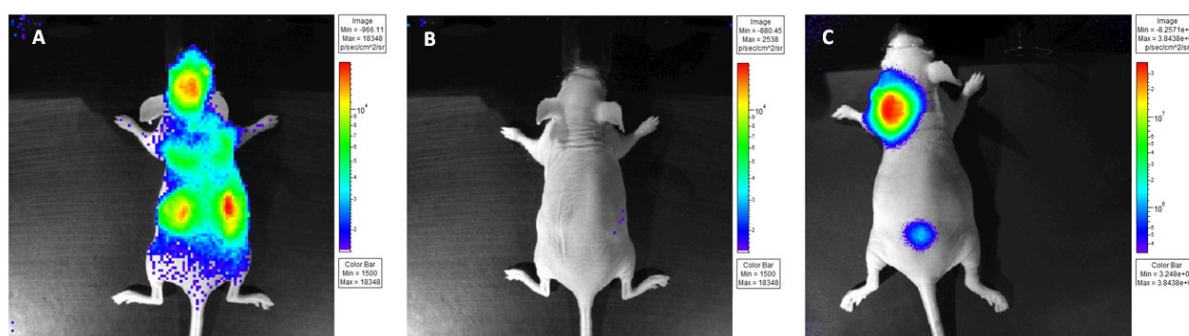


Abb.III.2.1. **Nachweis einer erfolgreichen intrakardialen Injektion.** Um den Erfolg der intrakardialen Injektionen zu überprüfen, wurde bei einigen Tieren stichprobenartig das Biolumineszenzsignal gemessen. Die Lichtemission der Luziferase exprimierenden Tumorzellen ist durch farbige Pixel dargestellt. Abgebildet sind Tiere direkt nach (A), 24h nach (B) und 6 Wochen nach (C) einer intrakardialen Injektion.

Es zeigte sich, dass die Injektionen, bei denen vor und nach Injektion hellrotes einströmendes Blut zu erkennen war, erfolgreich waren, da bei diesen durch die Messung der Biolumineszenz Tumorzellen im Kreislauf der Maus gefunden werden konnten (Abb.III.2.1., A). Bereits 24h nach

der Injektion konnten keine zirkulierenden Tumorzellen mehr durch die Biolumineszenzmessungen nachgewiesen werden (Abb.III.2.1., B). Nach einer Zeitspanne von 6 Wochen nach der Injektion konnten Tumorkläsionen gezeigt werden (Abb.III.2.1., C).

Da sich die Tumorzellen im Knochen mit den dort vorhandenen Zellen vermischen, ist es schwierig, die verhältnismäßig wenigen Tumorzellen in der Knochenmarkzellpopulation zu detektieren. Ausgehend von Arbeiten anderer Gruppen erwarteten wir bei 300 000 injizierten Zellen ca. 44 Tumorzellen/Femur wiederzufinden [376]. Daher wurde für die Untersuchung des Einnistungsverhaltens von Tumorzellen zur Detektion der im Knochenmark eingemisteten Zellen eine Alu-basierte quantitative PCR verwendet. Hierbei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die ausnutzt, dass Alu ein hochrepetitives Motiv ist und das Signal hierdurch verstärkt wird (siehe II.3.3.2.) [354, 355].

Zu Beginn der Versuche sollte die Empfindlichkeit der Methode getestet werden, um herauszufinden, welche Anzahl an Tumorzellen in eine Maus injiziert werden muss, um diese, nachdem sie sich im Knochenmark eingemistet haben, wiederzufinden und nachweisen zu können. Hierzu wurden Mäusen Tumorzellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-23-B/luc⁺ intrakardial injiziert, die rechten Femora der Tiere daraufhin entnommen und deren DNA extrahiert. Mit dieser DNA wurde eine qPCR Analyse durchgeführt und die gefundenen humanen Zellen zu je 1×10^6 murinen Knochenmarkzellen korrigiert. Als Kontrolle diente die DNA des rechten Femurs eines Tieres, dem keine Tumorzellen injiziert wurden.

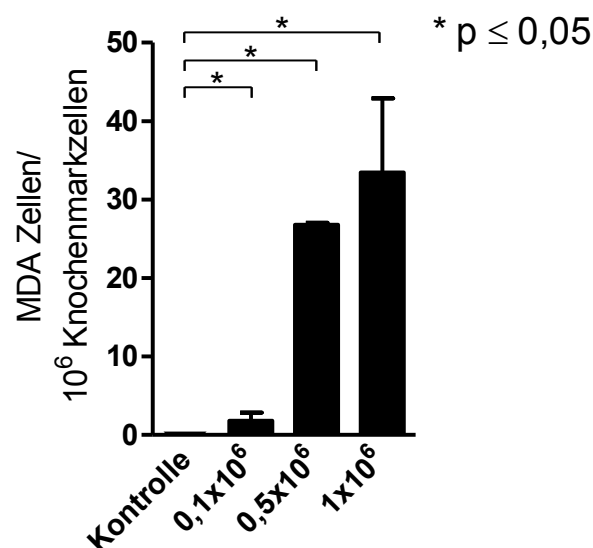


Abb.III.2.2. **Nachgewiesene MDA Zellen im Knochenmark.** Die Analyse der Alu qPCR ergab, dass bei allen injizierten Zellkonzentrationen Tumorzellen wiedergefunden werden konnten, und diese sich signifikant von der der Kontrolle ohne Tumorzellinjektion unterschieden.

Es zeigte sich, dass bei allen injizierten Zellkonzentrationen signifikant mehr eingemistete Zellen detektiert werden konnten als bei Kontrolltieren, die keine Zellen injiziert bekommen hatten

(1×10^6 : $33,44 \pm 9,46$, $n=2$, bzw. $0,5 \times 10^6$: $26,79 \pm 0,24$, $n=2$, bzw. 1×10^5 : $1,82 \pm 1,01$, $n=2$ vs. CT: $0,069 \pm 0,046$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=4$, $p \leq 0,05$). Da die Konzentration von 1×10^5 Zellen in unserer Gruppe bereits in vorhergehenden *in vivo* Experimenten zur Tumorinduktion genutzt wurde und in verschiedenen, genotypisch unterschiedlichen Tiergruppen signifikante Unterschiede im Wachstum zeigte [337], wurde sie für die weiteren Experimente beibehalten.

Unklar war jedoch weiterhin, welchen Zeitraum die Zellen benötigten um sich einzunisten; daher wurden Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion getötet, die Knochen entnommen, DNA extrahiert und Anzahl der eingesteten Tumorzellen bestimmt.

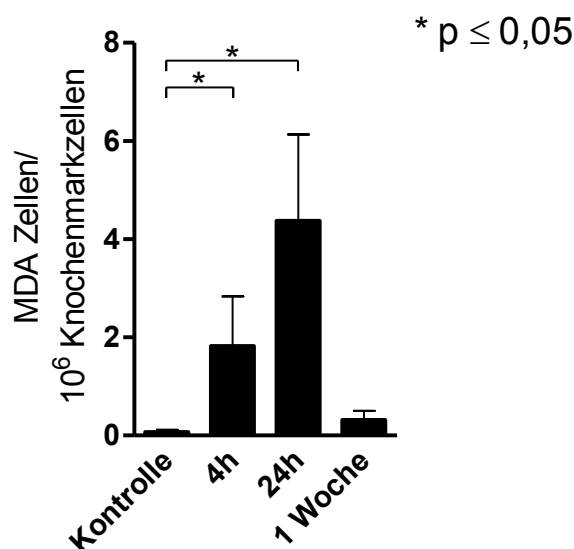


Abb.III.2.3. **Zeitpunkt der Probenentnahme.** Die Analyse der Tumorzellzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergab, dass zu allen 3 gewählten Zeitpunkten Zellen nachgewiesen werden konnten.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnten Zellen nachgewiesen werden (CT: $0,069 \pm 0,046$, $n=2$ vs. 4h: $1,823 \pm 1,01$, $n=2$, $p \leq 0,05$ oder 24h: $4,37 \pm 1,76$, $n=2$, $p \leq 0,05$ oder 1 Woche: $0,31 \pm 0,18$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=2$, $p=ns$). Daher wurde für weitere Versuche der Zeitpunkt 24h gewählt, da es sich bei den zu diesem Zeitpunkt gefundenen Zellen wahrscheinlich um bereits eingestete Tumorzellen handelt. Zellen, die bereits nach 4h gefunden werden, könnten noch in der Blutzirkulation oder an die Wände der Blutgefäße adhärirt gewesen sein, ohne jedoch den nächsten für die Einnistung entscheidenden Schritt, nämlich die Transmigration durch die Gefäßwand vollzogen zu haben. Der Zeitpunkt eine Woche nach Injektion wurde nicht in Betracht gezogen, da bereits beschrieben wurde, dass die Proliferation der Tumorzellen bereits 72 Stunden nach der intrakardialen Injektion beginnt [376]. Somit besteht die Möglichkeit, dass gefundene Effekte vom Einnistungsverhalten unabhängig und eher der Proliferation zuzuschreiben wären. Weiterhin könnten auch das Wachstum der Mäuse und die damit einhergehende Vermehrung der Knochenmarkzellen die Ergebnisse beeinflussen.

Um nun die Lokalisation der Zellen im Knochen zu bestimmen, wurde dieser in 3 Abschnitte unterteilt (Epiphyse proximale Seite, Diaphyse, Epiphyse distale Seite, siehe Abb.II.1.). Von jedem dieser 3 Abschnitte wurde die DNA getrennt extrahiert und analysiert.

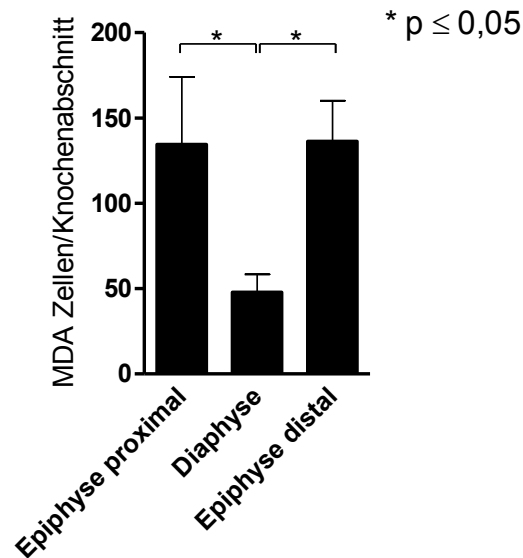


Abb.III.2.4. **Lokalisation der MDA Zellen im Knochenmark.** Dargestellt ist die Anzahl der nachgewiesenen Tumorzellen innerhalb der verschiedenen Knochenabschnitte.

Sowohl in der distalen als auch in der proximalen Epiphyse konnten signifikant mehr Tumorzellen nachgewiesen werden als in der Diaphyse (Epiphyse proximal: 134,40±39,56, n=27 bzw. Epiphyse distal: 136,30±23,82, n=26 vs. Diaphyse: 47,84±10,56 [MDA Zellen], n=26, p≤0,05). Für die weiteren Untersuchungen wurden alle drei Knochenabschnitte verwendet und für die Auswertung zusammenaddiert, da die Gesamtheit aller Tumorzellen die im Knochenmark gefunden werden, analysiert werden sollte.

III.2.2. Ausschaltung des Fibronektins in Mäusen unterschiedlicher Genotypen

Zur Untersuchung der Effekte des Fibronektins in unterschiedlichen Zellen bzw. unterschiedlichem Gewebe, wurden verschiedene genetisch veränderte Mauslinien mit Mx-, Col- oder Alb-Promotor (siehe II.4.1.1.1.) herangezogen, die in bestimmten Zellen oder Geweben kein Fibronektin mehr bilden konnten.

Vor Beginn der Experimente musste überprüft werden, ob die Promotoren Fibronectin zuverlässig ausschalten. Zur Untersuchung ob der Alb- und der Mx-Promotor das Fibronectin in der Zirkulation ausschalten, wurde mit Hilfe eines Fibronectin ELISAS der Fibronectingehalt des Plasmas der Mäuse bestimmt.

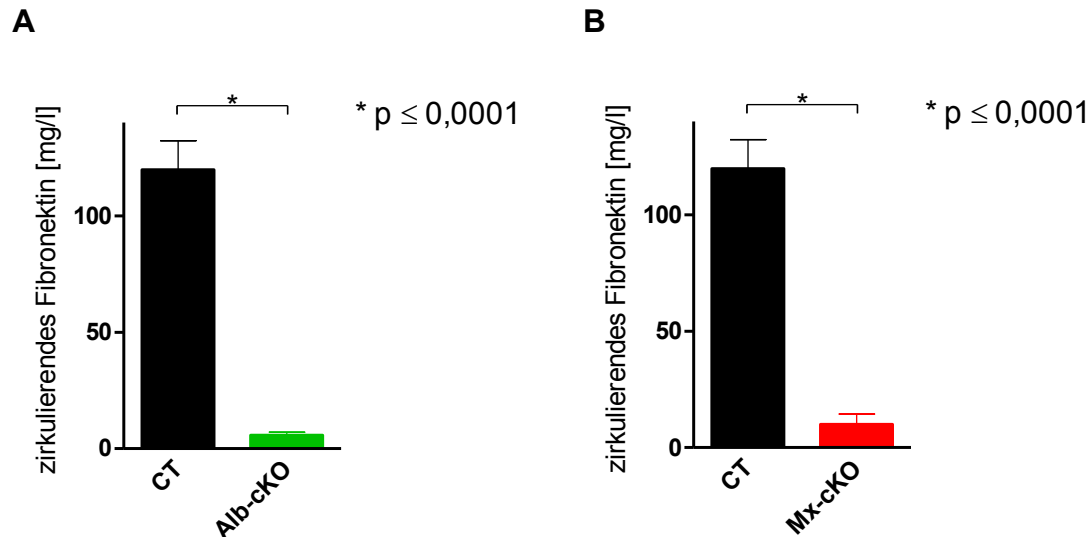


Abb.III.2.5. **Ausschaltung des Fibronectins in der Zirkulation.** Um eine erfolgreiche Ausschaltung des zirkulierenden Fibronectins sicherzustellen, wurden mit Hilfe von Fibronectin ELISAs der Fibronectingehalt nach Korrektur zum Gesamtproteingehalt im Plasma von Mäusen mit Alb-Promotor (A) und im Plasma von Mäusen mit Mx-Promotor (B) mit dem im Plasma von Kontrolltieren verglichen.

Die Fibronectinkonzentration war sowohl bei den Mäusen mit Alb-Promotor (Abb.III.2.5., A: CT: $119,80 \pm 12,44$, $n=16$ vs. Alb-cKO: $5,75 \pm 1,33$ [zirkulierendes FN [mg/l]], $n=9$, $p \leq 0,0001$) als auch bei denjenigen mit Mx-Promotor (Abb.III.2.5., B: CT: $119,80 \pm 12,44$, $n=16$ vs. Mx-cKO: $9,99 \pm 4,39$ [zirkulierendes FN [mg/l]], $n=6$, $p \leq 0,0001$) im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant vermindert. Bei den Tieren mit Alb-Promotor betrug die Ausschaltung verglichen mit den Kontrolltieren ca. 95%, bei denjenigen mit Mx-Promotor ca. 92%.

Da der Mx-Promotor durch plpC Injektionen aktiviert wird, war es notwendig sicherzustellen, dass diese bei späteren Analysen keinen Einfluss auf die Immunzellen der Mäuse hatten. Weiterhin sollte auch festgestellt werden, ob der aktive Mx-Promotor die Immunzellen beeinflusst. Hierzu wurden die Immunzellen im Knochenmark von mit plpC injizierten Mäusen und plpC injizierten Mx-Mäusen mit denen von Kontrolltieren, die keine plpC Injektionen erhalten hatten, in einer durchflusszytometrischen Analyse verglichen. Das Knochenmark der Mäuse wurde drei Tage nach der letzten plpC Injektion (siehe II.4.2.1.) isoliert und die Erythrozyten lysiert (siehe II.4.4.2.2.).

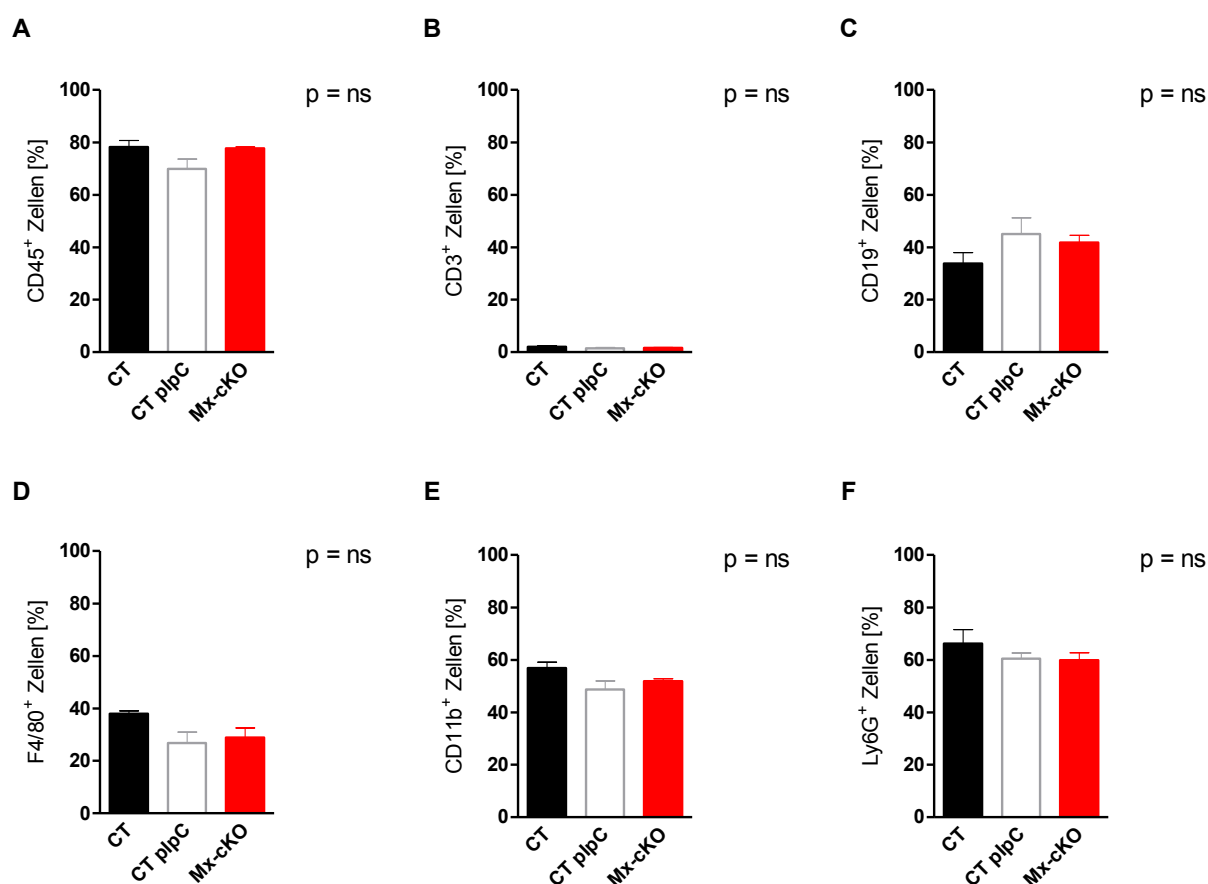


Abb.III.2.6. Einfluss der plpC Injektionen auf das Immunsystem der Mäuse. Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Immunzellen des Knochenmarks plpC injizierter Knockout-Mäuse (Mx-cKO) und des von Kontrolltieren (CT plpC) im Vergleich zu dem nicht injizierter Kontrollen (CT). Untersucht wurden CD45⁺ Zellen (Leukozyten, A), CD3⁺ Zellen (T-Lymphozyten, B), CD19⁺ Zellen (B-Lymphozyten, C), F4/80⁺ Zellen (Makrophagen, D), CD11b⁺ Zellen (Monozyten, E) und Ly6G⁺ Zellen (Granulozyten, F).

Die zytometrische Analyse ergab, dass sich die Anzahl der Immunzellen im Knochenmark (Leukozyten (CD45), T-Lymphozyten (CD3), B-Lymphozyten (CD19), Makrophagen (F4/80), Monozyten (CD11b), Granulozyten (Ly6G)) von Tieren, die mit plpC behandelt wurden oder einen Mx-Promotor besaßen und mit plpC behandelt wurden, nicht signifikant von der der unbehandelten Kontrolltiere unterschied (**CD45⁺**: CT: 78,23±2,45, n=3 vs. CT plpC: 69,90±9,74, n=33 vs. Mx-cKO: 77,77±0,49 [%], n=3, p=ns; **CD3⁺**: CT: 2,07±0,42, n=3 vs. CT plpC: 1,43±0,38, n=3 vs. Mx-cKO: 1,60±0,23 [%], n=3, p=ns; **CD19⁺**: CT: 33,80±4,13, n=3 vs. CT plpC: 45,07±6,18, n=3 vs. Mx-cKO: 41,87±2,7 [%], n=3, p=ns; **F4/80⁺**: CT: 37,9±1,10, n=2 vs. CT plpC: 26,80±4,11, n=3 vs. Mx-cKO: 28,83±3,68 [%], n=3, p=ns; **CD11b⁺**: CT: 56,93±2,22, n=3 vs. CT plpC: 48,73 ± 3,27 n = 3 vs. Mx-cKO: 48,25 ± 0,86 [%] n = 3, p=ns; **Ly6G⁺**: CT: 66,23±5,34, n=3 vs. CT plpC: 60,47±2,15, n=3 vs. Mx-cKO: 59,93±2,84 [%], n=3, p=ns). Somit sollte der Einfluss einer unterschiedlichen Aktivierung der Immunzellen in Abwesenheit von Fibronectin in den verschiedenen Zelltypen begrenzt gewesen sein.

Zur Untersuchung der Aktivität der Promotoren im Knochenmark wurden eGFP (enhanced green fluorescent protein [engl.]) Reporter-mäuse verwendet. Diese besitzen ein eGFP-Gen mit einem vorangeschaltetem Stoppcodon und wurden mit Mx-cKO bzw. Alb-cKO Mäusen verpaart. Bei Ak-

tivierung des jeweiligen Promotors (Mx oder Alb) wird das Stoppcodon entfernt und die Zellen beginnen eGFP zu produzieren und unter Fluoreszenzanregung grün zu leuchten. Somit kann die Aktivität der Promotoren in den Zellen nachgewiesen werden. Das Knochenmark dieser eGFP-Mäuse, sowie das von Kontrollen (eGFP-Mäuse ohne Mx-Promotor), wurde isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

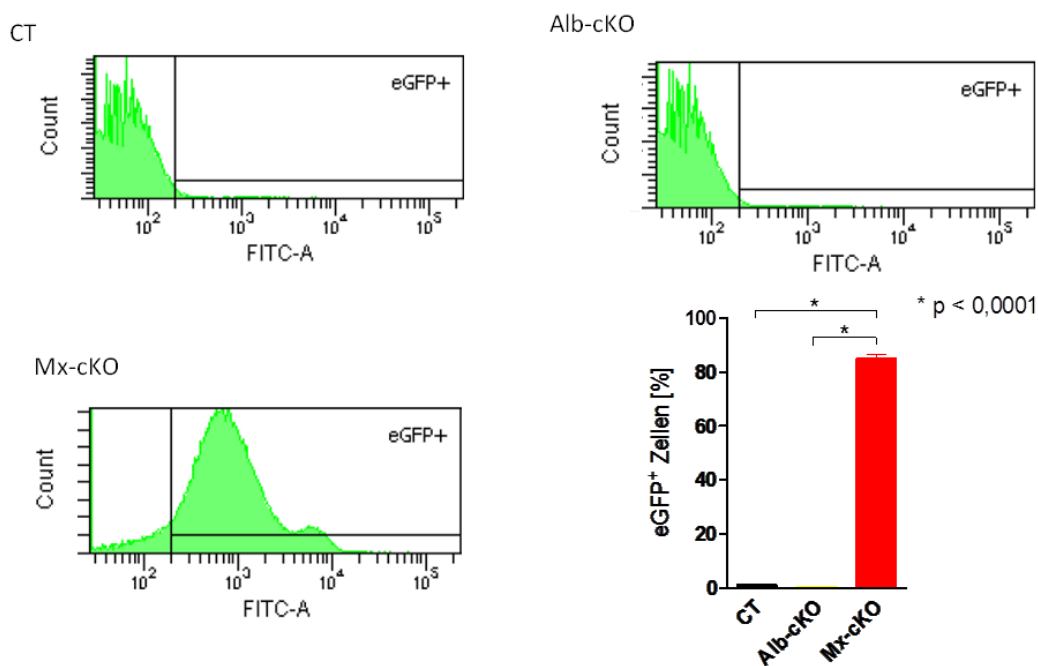


Abb.III.2.7. Durchflusszytometrische Analyse der Promoteraktivität im Knochenmark mit Hilfe von eGFP Reporter-mäusen. Um die Aktivität des Mx- und des Alb-Promotors im Knochenmark zu überprüfen, wurden Knochenmarkzellen von eGFP, Alb/eGFP und Mx/eGFP Reporter-mäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Knochenmarkzellen der Kontrollmäuse (CT), sowie die der Alb-Mäuse (Alb-cKO) zeigten keinerlei Färbung, wohingegen die der Mx-Mäuse (Mx-cKO) eGFP exprimierten. Die statistische Auswertung der Gruppen ist in dem Balkendiagramm unten rechts graphisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass bei den Mäusen mit Mx-Promotor im Gegensatz zu den Mäusen der anderen Gruppen zusätzlich zur Ausschaltung des Fibronectin in der Zirkulation (siehe Abb.III.2.4.), auch der Promoter in Knochenmarkszellen aktiv und somit dass Fibronectin in diesen Zellen ausgeschaltet war (siehe Abb.III.2.6.: CT: $1,00 \pm 0,20$, $n=2$ bzw. Alb-cKO: $0,50 \pm 0,10$, $n=2$ vs. Mx-cKO: $84,87 \pm 1,87$ [% positiv von Gesamtpopulation], $n=3$, $p \leq 0,0001$). Dieses Ergebnis bestätigte publizierte Berichte, in denen beschrieben wurde, dass der Promotor auch in hämatopoetischen Stammzellen aktiv ist [377].

Im Weiteren wurde die Ausschaltung der Fibronectin-Expression in einzelnen Zelltypen mit Hilfe weiterer durchflusszytometrischen Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen genauer charakterisiert.

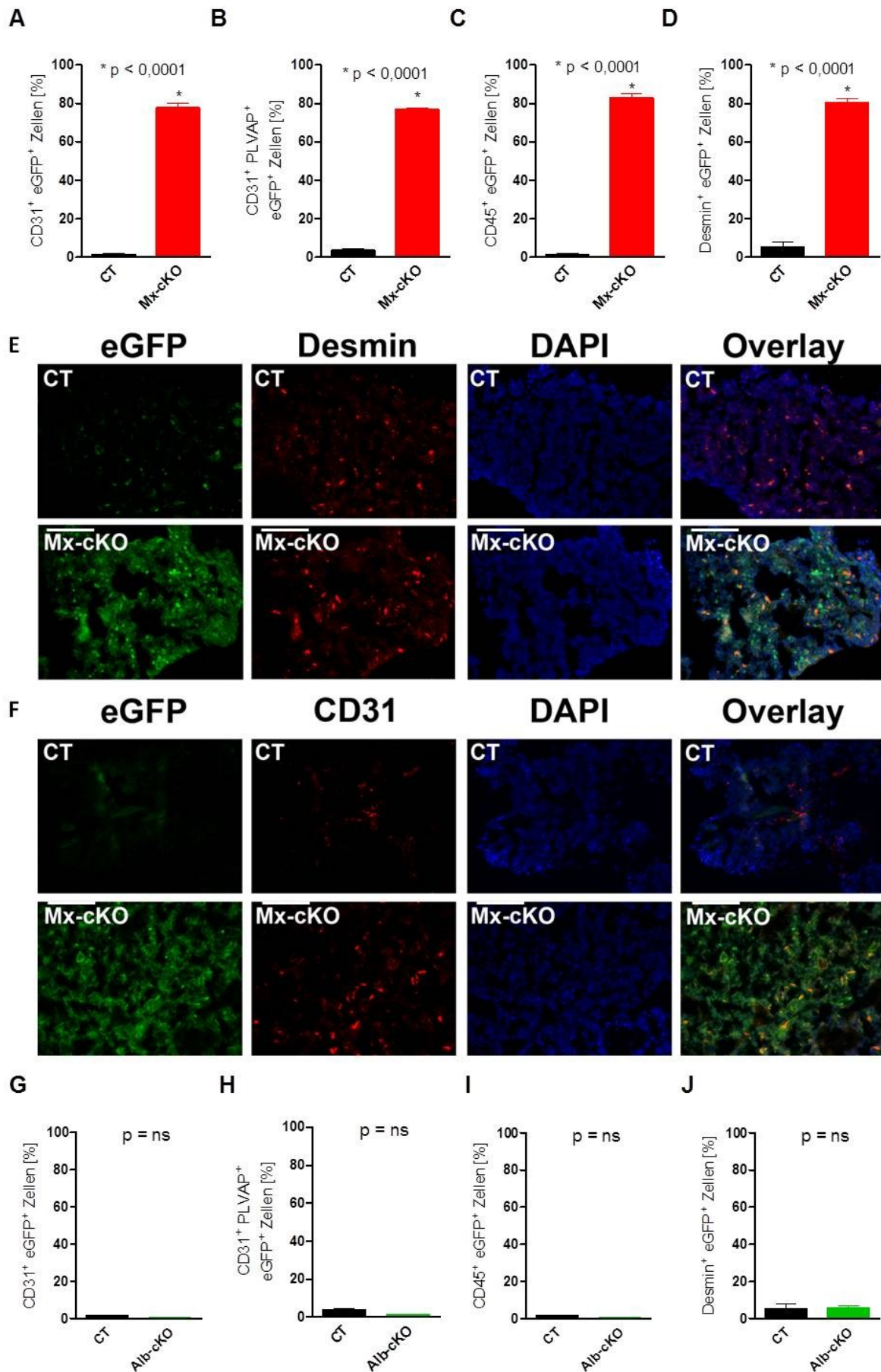


Abb.III.2.8. Ausschaltung verschiedener Zelltypen in den Mx- bzw. Alb-Mäusen. Dargestellt ist die

durchflusszytometrische Untersuchung der Mx-Promotoraktivität in Endothelzellen (A), Zellen der Knochenmarksinusoide (B), Immunzellen (C) und Perizyten (D). In diesen Zellen ist der Promotor aktiv und die Fibronectin-Bildung in diesen Zelltypen somit vermutlich deletiert. Zusätzlich wurden für die Perizyten (E) sowie für die Endothelzellen (F) Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm. Weiterhin abgebildet ist die durchflusszytometrische Analyse der Aktivität des Alb-Promotors in Endothelzellen (G), Zellen der Knochenmarksinusoide (H), Immunzellen (I) und Perizyten (J).

Es konnte gezeigt werden, dass der Mx-Promotor im Knochenmark sowohl in Endothelzellen (**CD31⁺**: CT: 1,4±0,4, n=4 vs. Mx-cKO: 77,8±2,1, n=4, p<0,0001), in Knochenmarksinusoiden (**CD31⁺/PLVAP⁺**: CT: 3,4±1,0, n=4 vs. Mx-cKO: 77,0±0,7, n=4, p<0,0001), in Immunzellen (**CD45⁺**: CT: 1,3±0,3, n=4 vs. Mx-cKO: 82,8± 2,1, n=4, p<0,0001) als auch in Perizyten (**Desmin⁺**: CT: 5,2±2,5, n=4 vs. Mx-cKO: 80,3±2,2 [% der Gesamtpopulation], n=4, p<0,0001) aktiv ist und somit die Fibronectinbildung dieser Zellen verhindert. Somit ist bei den Mäusen mit Mx-Promotor zusätzlich zur Ausschaltung des zirkulären Fibronectins (siehe Abb.III.2.5.) auch die Produktion von lokalem Fibronectin durch Zellen des Knochenmarks unterbunden (siehe Abb.III.2.7. und Abb.III.2.8.). Die Immunfluoreszenzfärbungen von Perizyten und Endothelzellen bestätigten die durch die durchflusszytometrische Analyse gewonnenen Daten (siehe Abb.III.2.8.).

Für die Alb-Mäuse hingegen konnte gezeigt werden, dass der Promotor nur Fibronectin in der Zirkulation deletiert (siehe Abb.III.2.5.), die Zellen im Knochenmark jedoch in der Lage sind, Fibronectin normal zu produzieren (**CD31⁺**: CT: 1,4±0,4, n=4 vs. Alb-cKO: 0,35±0,05, n=2, p=ns; **CD31⁺/PLVAP⁺**: CT: 3,4±1,0, n=4 vs. Alb-cKO: 1,15±0,05, n=2, p=ns; **CD45⁺**: CT: 1,3±0,3, n=4 vs. Alb-cKO: 0,35±0,05, n=2, p=ns; **Desmin⁺**: CT: 5,2±2,5, n=4 vs. Alb-cKO: 5,5±1,4 [% der Gesamtpopulation], n=2, p=ns) (siehe Abb.III.2.7., Abb.III.2.8.).

Um die Ausschaltung durch den Col-Promotor, der ausschließlich in Osteoblasten und Osteozyten aktiv ist [378], zu überprüfen, wurden Col-cKO Mäuse mit eGFP Mäusen verpaart. Die Osteoblasten der so generierten Mäuse wurden isoliert und nach Differenzierung *in vitro* untersucht.

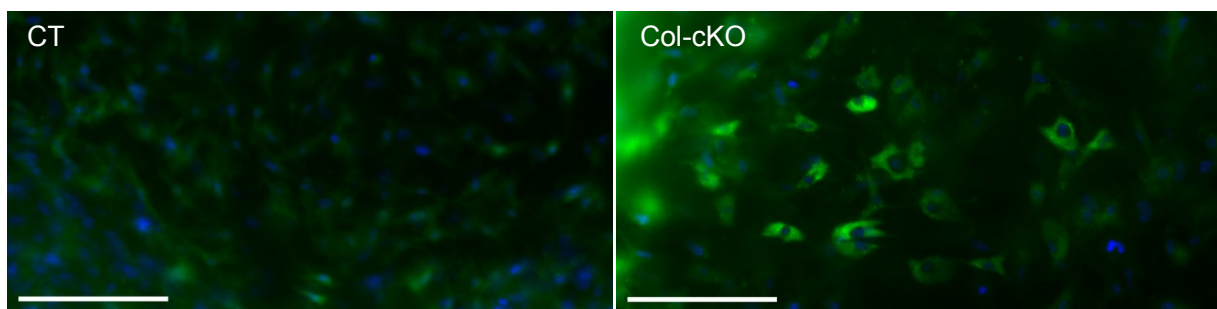


Abb.III.2.9. Immunhistochemische Bestätigung der Ausschaltung in Osteoblasten mit Hilfe von eGFP Reporter-mäusen. Die eGFP Fluoreszenz der Zellen ist grün, die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt und blau dargestellt. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich bei einigen der Col-cKO Osteoblasten eine grüne Fluoreszenz, die bei den Kontrollmäusen nicht zu sehen war. Um diese Beobachtung genauer zu quantifizieren, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

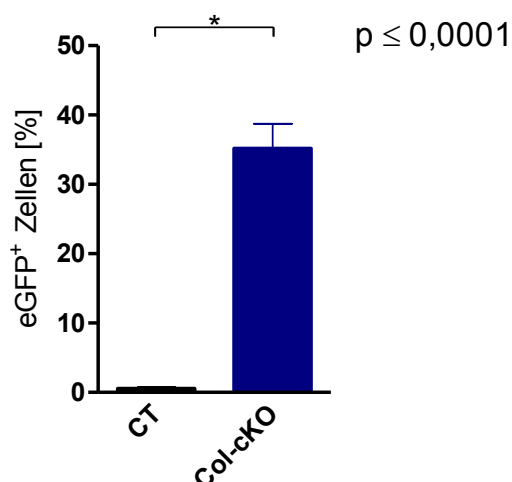


Abb.III.2.10. Durchflusszytometrische Bestätigung der Ausschaltung in Osteoblasten mit Hilfe von eGFP Reportermäusen. Dargestellt sind prozentual zur Gesamtpopulation die für eGFP positiven Zellen.

Die Osteoblasten, die aus Col-cKO Mäusen isoliert worden waren, zeigten zu ca. 35–40% eine grüne Fluoreszenz entsprechend dem zu erwartenden Signal für eGFP, wohingegen die Osteoblasten, die aus Kontrolltieren isoliert worden waren, nicht fluoreszierten (CT: 0,55±0,18, n=8 vs. Col-cKO: 35,17±3,68 [% der Gesamtzellen], n=6, p≤0,0001).

III.2.2.1. Einnistungsverhalten von MDA Zellen

Da nun eine ausreichende Ausschaltung des Fibronektins innerhalb der verschiedenen Mausgenotypen gewährleistet war, konnte untersucht werden, ob das Fehlen des Fibronektins in unterschiedlichen Zelltypen oder Geweben einen Einfluss auf das Einnistungsverhalten der Tumorzellen hat.

III.2.2.1.1. Auswirkungen der Ausschaltung von Fibronektin in verschiedenen Geweben der Maus auf das Einnistungsverhalten von MDA Zellen

Zur Untersuchung des Einnistungsverhaltens wurden Knockout-Mäusen verschiedenen Genotyps und Kontrolltieren (bei denen keine Gene ausgeschaltet wurden) Tumorzellen der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-23-B/luc⁺ intrakardial injiziert.

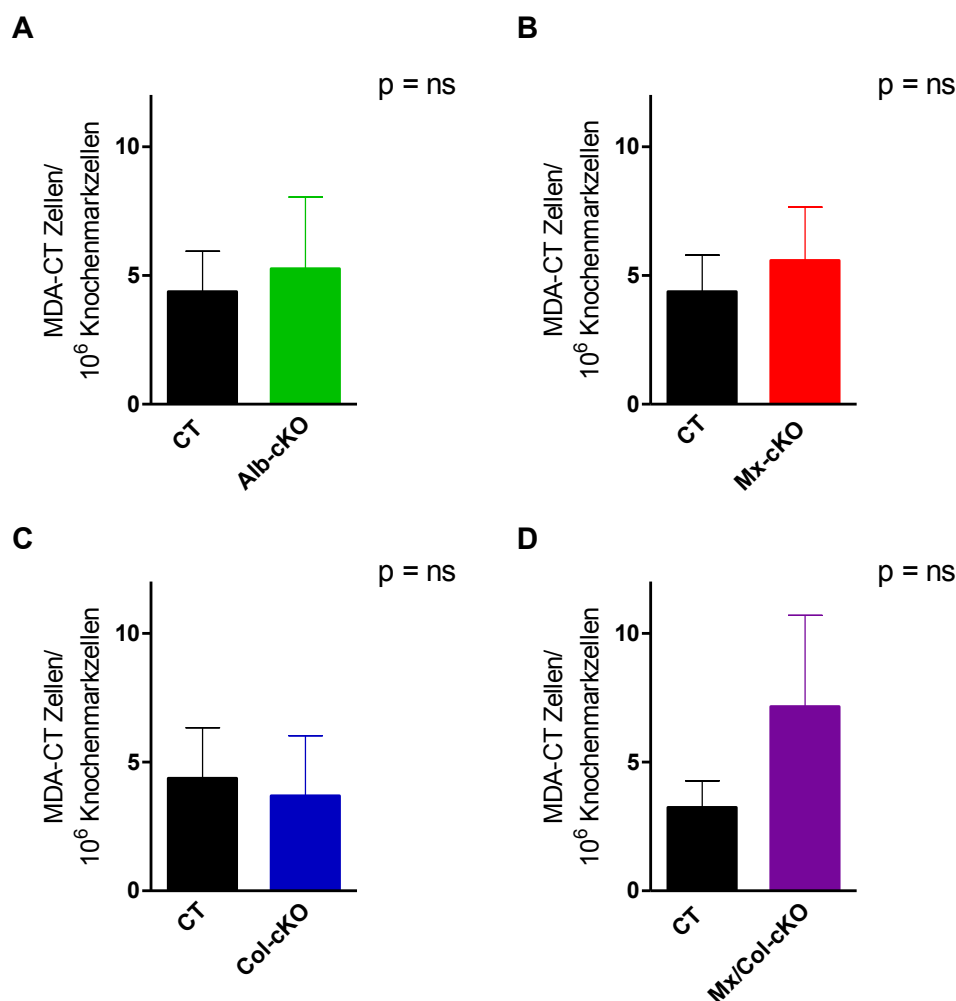


Abb.III.2.11. **Einnistungsverhalten der MDA Zellen.** Bei Mäusen verschiedener Genotypen (A: Alb-cKO, B: Mx-cKO, C: Col-cKO, D: Mx/Col-cKO) wurde das Einnistungsverhalten der Tumorzellen in das Knochenmark nach Ausschaltung von Fibronectin in den entsprechenden Geweben (siehe II.4.1.1.1.) innerhalb von 24h mittels qPCR untersucht.

Weder bei den Tieren mit Alb-Promotor (Abb.III.2.11., A: CT: $4,38 \pm 1,57$, $n=9$ vs. Alb-cKO: $5,26 \pm 2,79$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=7$, $p=ns$), bei denen Fibronectin in der Zirkulation ausgeschaltet war, noch bei denjenigen mit Mx-Promotor (Abb.III.2.11., B: CT: $4,37 \pm 1,41$, $n=8$ vs. Mx-cKO: $5,58 \pm 2,07$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=6$, $p=ns$), bei denen Fibronectin in der Zirkulation und im Knochenmark ausgeschaltet war, noch bei denjenigen mit Col-Promotor (Abb.III.2.11., C: CT: $4,38 \pm 1,95$, $n=5$ vs. Col-cKO: $3,69 \pm 2,33$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=3$, $p=ns$), der das Fibronectin der Osteoblasten und Osteozyten ausschaltet, noch bei denjenigen mit Col- und Mx-Promotor (Abb.III.2.11., D: CT: $3,24 \pm 1,03$, $n=4$ vs. Mx/Col-cKO: $7,15 \pm 3,54$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=4$, $p=ns$), der das Fibronectin sowohl in der Zirkulation, dem Knochenmark und zusätzlich Osteoblasten und Osteozyten ausschaltet, gab es einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der eingesteten Tumorzellen im Vergleich zu Kontrolltieren.

III.2.2.1.2. Auswirkungen der Ausschaltung von endogenem Fibronectin der MDA Zellen auf das Einnistungsverhalten von MDA Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das endogene Fibronectin der Tumorzellen die Einnistung beeinflusst. Hierzu wurden Kontrolltieren Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-23-B/luc⁺, bei der Fibronectin mit Hilfe fibronectinspezifischer sh-RNA stabil ausgeschaltet wurde (im Weiteren als MDA-KD bezeichnet, im Gegensatz zu MDA-CT, die Fibronectin normal exprimiert, siehe II.4.4.1.1.), intrakardial appliziert. Die Mäuse wurden 24 Stunden nach intrakardialer Tumorzellapplikation getötet, die DNA des rechten Femurs extrahiert und mit Hilfe einer Alu qPCR evaluiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine andere Zelllinie, die Prostatakrebszellen PC-3M-Pro4/luc⁺ (im Weiteren abgekürzt mit PC3-CT) herangezogen, bei der auch das Fibronectin mittels sh-RNA ausgeschaltet war (PC3-KD).

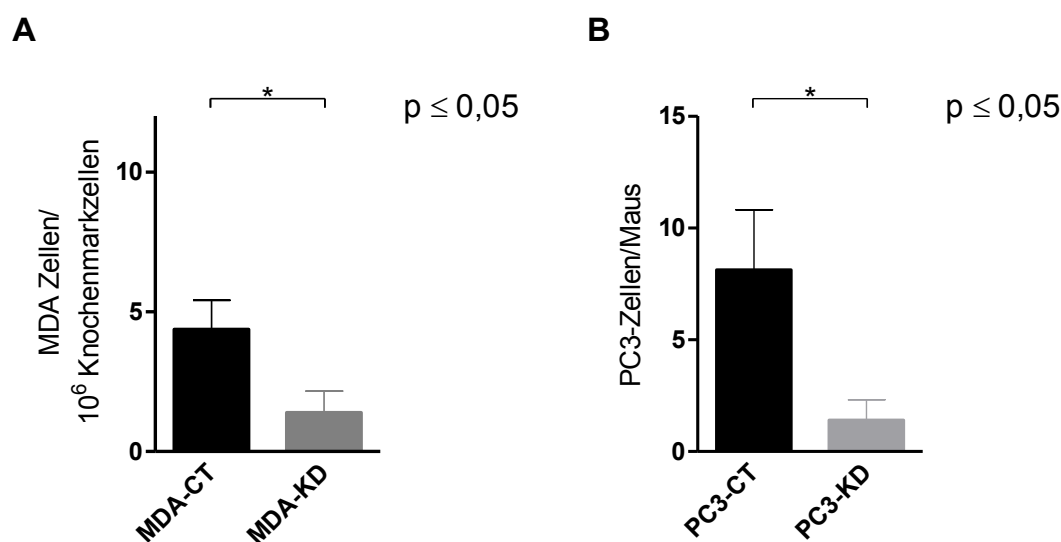


Abb.III.2.12. **Einnistungsverhalten der MDA Zellen.** In A ist das Einnistungsverhalten der Fibronectinknockdown-Zelllinie MDA-KD im Vergleich zur regulären MDA-CT Linie dargestellt. Die im Knochenmark gefundenen eingenisteten Tumorzellen wurden zu 1×10^6 Knochenmarkzellen korrigiert, um die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich großen Tieren zu gewährleisten. Graph B zeigt die gefundenen Zellen der PC3 (PC3-CT) bzw. der PC3 Fibronectinknockdown-Zelllinie (PC3-KD) pro Maus.

Beim Vergleich der Anzahl der eingenisteten Zellen der MDA-CT und der MDA-KD Linie in der die endogene Fibronectinproduktion ausgeschaltet war, zeigte sich ein signifikant stärkeres Einnistungsverhalten der Zellen der MDA-CT Linie (Abb.III.2.12., A: MDA-CT: $4,38 \pm 1,03$, $n=7$ vs. MDA-KD: $1,40 \pm 0,76$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=7$, $p \leq 0,05$).

Um herauszufinden, ob dieses Verhalten nicht ausschließlich für die MDA Zelllinie spezifisch ist, wurde das Experiment mit Zellen der Prostatakrebszelllinie PC3 wiederholt. Auch hierbei nisteten sich im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant weniger Zellen der Fibronectinknockdown-Linie ein (Abb.III.2.12., B: PC3-CT: $10,46 \pm 2,60$, $n=10$ vs. PC3-KD: $3,74 \pm 0,68$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=6$, $p \leq 0,05$).

III.2.2.1.2.1. Adhäsionsverhalten der MDA-CT und der MDA-KD Zelllinie auf Matrixkomponenten

Da sich die MDA-CT Zellen im Vergleich zu denen der MDA-KD Linie verstärkt im Knochenmark einnisteten, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auf veränderte Adhäsionseigenschaften der KD Zellen an verschiedene Matrixkomponenten zurückzuführen war. Daher wurde dies mit Hilfe eines Adhäsionsversuches *in vitro* getestet. Hierzu wurden Zellen der beiden Zelllinien auf Kulturgefäße aufgebracht, die mit Fibronectin in verschiedenen Konzentrationen beschichtet waren. Nach einem Zeitraum von zwei Stunden wurden die Kulturgefäße gewaschen und die Anzahl der verbliebenen (adhärierten) Zellen verglichen.

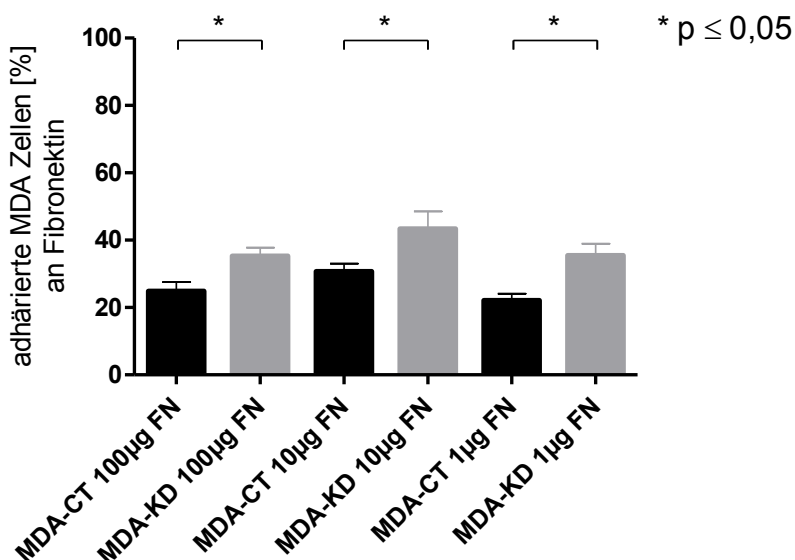


Abb.III.2.13. **Adhäsionseigenschaften der MDA Zelllinien an Fibronectin (FN).** Die beiden MDA Zelllinien wurden auf Kulturplatten, die mit unterschiedlichen Fibronectinkonzentrationen je Vertiefung beschichtet waren, aufgebracht und die adhärierten Zellen nach 2h in Kultur bestimmt.

Bei allen Fibronectin Konzentrationen adhärierten signifikant mehr Zellen der MDA-KD Linie an das beschichtete Kulturgefäß als Zellen der MDA-CT Linie (**100µg FN:** MDA-CT: 24,83±2,73, n=12 vs. MDA- KD: 35,26±2,56, n=12, p≤0,05; **10µg FN:** MDA-CT: 30,68±2,33, n=11 vs. MDA-KD: 43,37±5,19, n=11, p≤0,05; **1µg FN:** MDA-CT: 22,13±2,03, n=12 vs. MDA-KD: 35,46±3,48 [%], n=12, p≤0,005).

Auf Grund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die Zellen der MDA-KD Linie auch verstärkt an andere Matrixkomponenten binden. Hierzu wurden 96-Loch Kulturplatten mit verschiedenen Matrixbestandteilen beschichtet bzw. zur Kontrolle unbehandelt gelassen oder mit Poly-L-Lysin versehen. Darüber hinaus wurden als weitere Kontrolle unbehandelte Kulturgefäße aus Glas genutzt. Auf diesen Beschichtungen wurden weitere Adhäsionsversuche analog zu dem oben aufgeführten (Abb.III.2.13.) durchgeführt.

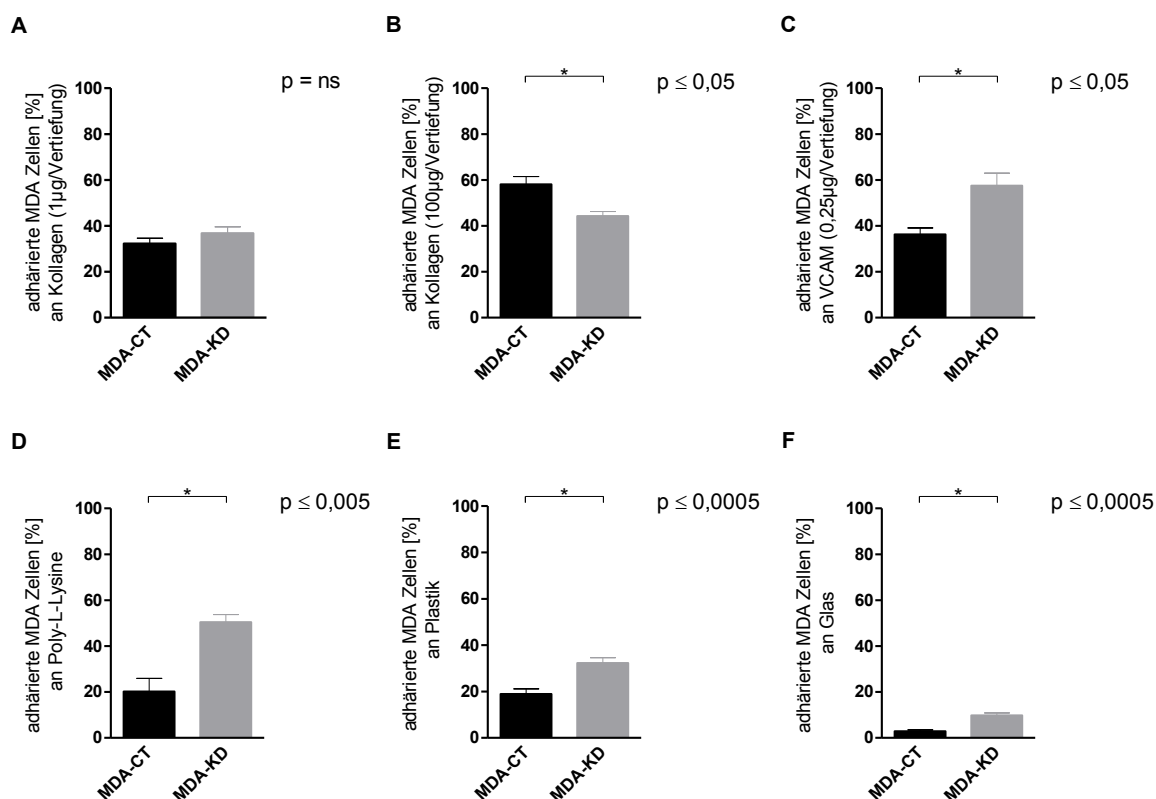


Abb.III.2.14. **Adhäsionsverhalten der MDA Zelllinien an Matrixkomponenten und geladene Oberflächen.** Die beiden MDA Zelllinien wurden auf Kulturplatten, die mit unterschiedlichen Matrixkomponenten, nämlich mit 1 µg/Vertiefung Kollagen I (A), mit 100 µg/Vertiefung Kollagen I (B), mit 0,25 µg/Vertiefung VCAM (C) und mit 40 µl/Vertiefung Poly-L-Lysin (D) beschichtet waren, aufgebracht und die Adhäsion nach 2h in Kultur bestimmt. Bei den Graphen E und F wurde die Adhäsion an das Material bestimmt, die Kulturgefäße waren unbeschichtet.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei einer Konzentration von 1 µg/Vertiefung Kollagen Typ I keine signifikanten Unterschiede (Abb.III.2.14., A: MDA-CT: 32,30±2,26, n=4 vs. MDA-KD: 36,76±2,82 [%], n=4, p=ns) im Adhäsionsverhalten der beiden Zelllinien gibt. Bei einer Kollagen Typ I Konzentration von 100 µg/Vertiefung jedoch zeigte sich, dass signifikant mehr Zellen der MDA-CT Linie adhären als Zellen der MDA-KD Linie (Abb.III.2.14., B: MDA-CT: 58,06±3,45, n=4 vs. MDA-KD: 44,30±1,96 [%], n=4, p≤0,05). Bei Beschichtung mit VCAM, Poly-L-Lysine oder den unbeschichteten Platten unterschiedlicher Materialien zeigte sich eine signifikant stärkere Adhäsion der Zellen der MDA-KD Linie (Abb.III.2.14., C-F: VCAM: MDA-CT: 36,28±2,77, n=5 vs. MDA-KD: 57,49± 5,52 [%], n=5, p≤0,01; Poly-L-Lysine: MDA-CT: 20,21±5,75, n=5 vs. MDA-KD: 50,43±3,35 [%], n=5, p≤0,005; Plastik: MDA-CT: 18,91±2,23, n=18 vs. MDA-KD: 32,31±2,25 [%], n=18, p≤0,0005; Glas: MDA-CT: 2,86±0,62, n=8 vs. MDA-KD: 9,76±21,13 [%], n=8, p≤0,0001).

III.2.2.1.2.2. Adhäsionsverhalten der MDA-CT und der MDA-KD Zelllinie auf Zellen

Da weniger MDA-KD Zellen im Knochenmark gefunden wurden, aber gezeigt werden konnte, dass sie verstärkt an VCAM und FN (beides Matrixproteine, die verstärkt in Blutgefäßen vorkommen [379-381]) adhären, stellte sich die Frage ob die KD Zellen an den Endothelzellen in den Blutgefäßen hängen blieben und somit der Immunantwort ausgeliefert waren bevor sie sich im

Knochenmark einnisten konnten. Um dieser Frage nachzugehen sollte untersucht werden, ob sie sich auch in der Adhäsion an Endothel und Knochenmarkzellen unterscheiden.

Daher wurden Adhäsionsversuche auf Endothelzellen bzw. auf Knochenmarkzellen und auf Knochenmarkzellen einer Mx-Maus durchgeführt um herauszufinden, ob und wie das Zusammenspiel mehrerer Matrixkomponenten die Adhäsionseigenschaften beeinflussen kann. Hierzu wurde zunächst durch Lichtmikroskopie sichergestellt, dass die Zellen, auf denen die Versuche durchgeführt werden sollten zu 100% konfluent waren (siehe Abb.III.2.15., A und B).

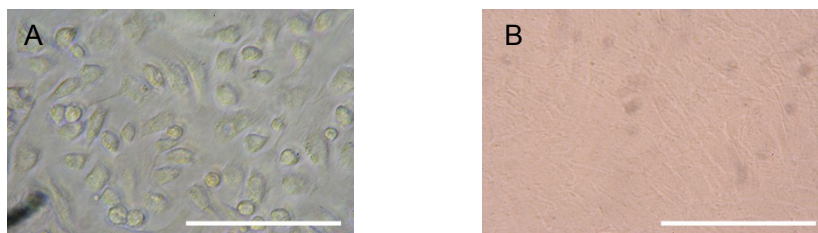


Abb.III.2.15. **Konfluente Zellen als Grundlage für einen Adhäsionsversuch.** Gezeigt wird eine konfluente Matrix von Endothelzellen (A) und Knochenmarkzellen (B). Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Daraufhin wurde auf diesen Zellen ein Adhäsionsversuch analog zu dem oben beschriebenen (siehe III.1.2.2.1.) durchgeführt.

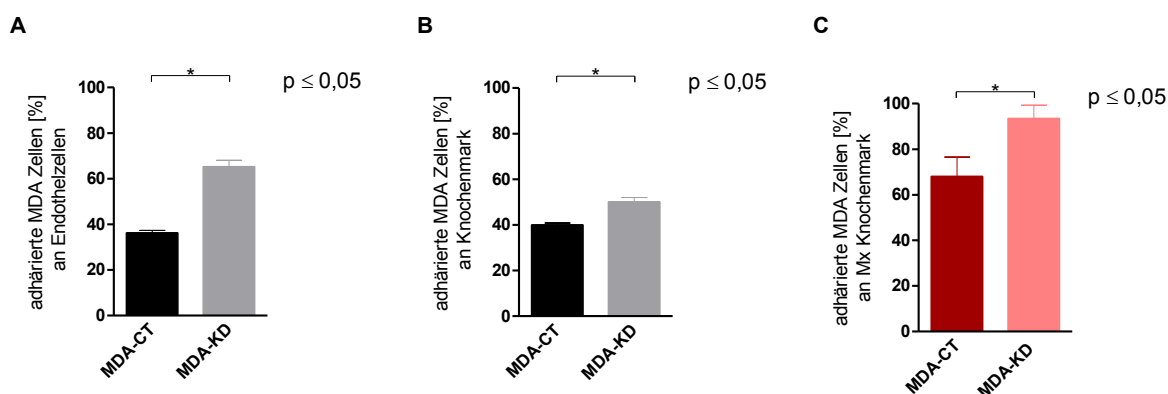


Abb.III.2.16. **Adhäsion der verschiedenen Zelllinien auf Zellen.** Die beiden MDA Zelllinien wurden auf Zellkulturplatten, die mit einer konfluente Zellmatrix von Endothelzellen (A), Knochenmarkzellen (B) und Knochenmarkzellen einer Mx-Maus (C) bewachsen waren, aufgebracht und die Adhäsion nach 3h in Kultur untersucht.

Es zeigte sich, dass an allen untersuchten Zelltypen signifikant mehr Zellen der MDA-KD Linie im Vergleich zu Zellen der MDA-CT Linie adhärten (**Endothelzellen**: MDA-CT: $36,16 \pm 1,22$, $n=10$ vs. MDA-KD: $65,15 \pm 2,92$, $n=10$, $p < 0,0001$; **Knochenmarkzellen**: MDA-CT: $39,94 \pm 0,88$, $n=4$ vs. MDA-KD: $50,03 \pm 1,93$, $n=4$, $p < 0,005$; **Knochenmarkzellen einer Mx-Maus**: MDA-CT: $67,98 \pm 8,56$, $n=9$ vs. MDA-KD: $93,39 \pm 5,88$ [%], $n=10$, $p < 0,05$).

III.2.2.1.2.3. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von eCadherin

Bei der Kultivierung der Zellen zeigte sich bei der mit der Passagierung der Zellen verbundenen Ablösung mit Zell-Dissoziations-Puffer (siehe II.2.1.), dass die Zellen der MDA-KD Linie zu stärkerer Klumpenbildung neigten als die Zellen der MDA-CT Linie. Es stellte sich die Frage, ob die

beiden Zelllinien Zelladhäsionsmoleküle unterschiedlich stark exprimierten. ECadherin spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Zell Adhäsion und wirkt außerdem als Tumorinvasions-Suppressormolekül [382]. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Tumorzellen aufgrund der Adhäsionseigenschaften des eCadherins entweder verstärkt an Zellen des murinen Gewebes adhäreren oder durch verstärkte Zell-Zell Kontakte untereinander Zellaggregate bilden, die in feinen Kapillaren der Organe „steckenbleiben“ könnten.

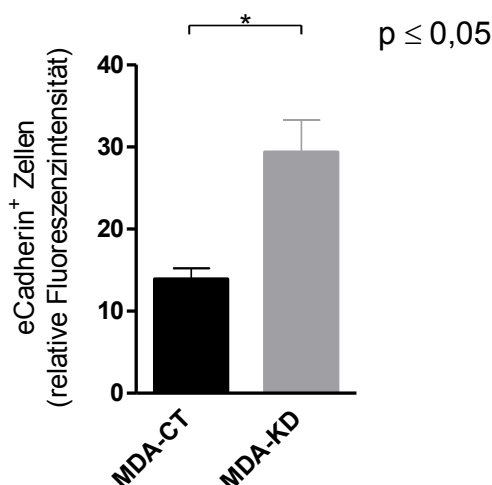


Abb.III.2.17. **Durchflusszytometrische Analyse der MDA Zellen.** Gezeigt ist die relative Fluoreszenzintensität von e-Cadherin der Zelllinie MDA-CT im Vergleich zur Zelllinie MDA-KD.

Ausgewertet wurde die relative Fluoreszenzintensität (RFI, relative fluorescence intensity [engl.], die anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI, Mean Fluorescence Intensity [engl.]) nach folgender Formel berechnet werden kann: $RFI = \frac{MFI(\text{spezifische Färbung}) - MFI(\text{Kontrolle})}{MFI(\text{Kontrolle})}$ [383-385]. Die relative Fluoreszenzintensität entspricht die dem Expressionslevel des Proteins auf der Zelloberfläche. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der prozentualen Angabe positiver Zellen besteht darin, dass bestimmte Moleküle bei Zellen, die für diese zu 100% positiv sind, noch in der Stärke ihrer Expression differenziert werden können.

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten ergab, dass die Zellen der Zelllinie MDA-CT signifikant weniger eCadherin als die Zellen der Zelllinie MDA-KD auf der Zelloberfläche exprimieren (MDA-CT: $13,89 \pm 1,32$, $n=4$ vs. MDA-KD $29,36 \pm 3,90$ [RFI], $n=3$, $p \leq 0,05$).

III.2.2.1.2.4. Einnistung der Tumorzellen in verschiedene Organe direkt im Anschluss an die intrakardiale Injektion

Beim Betrachten der Biolumineszenzbilder, die direkt im Anschluss an die intrakardialen Injektionen aufgenommen wurden, fällt auf, dass Bereiche starker Photonenanhäufungen besonders an Arealen auftreten, an denen sich stark durchblutete Organe, wie Leber, Nieren und Milz [386] befinden. Da die Zelllinien unterschiedlich stark das Zelladhäsionsprotein eCadherin exprimierten und die Zellen der MDA-KD Linie an fast allen Materialien stärker adhärerten, als die Zellen der

MDA-CT Linie, aber sich weniger MDA-KD Zellen im Knochenmark einnisteten, stellte sich die Frage, ob die Zellen der KD Linie stärker in anderen Organen adhären und dadurch weniger Zellen das Knochenmark erreichen.

Um dies zu klären wurden Mäuse intrakardial mit Tumorzellen der MDA-CT oder entsprechend der MDA-KD Linie intrakardial injiziert, nach einem Zeitraum von 4h verschiedene Organe entnommen, deren genomische DNA extrahiert und eine qPCR durchgeführt.

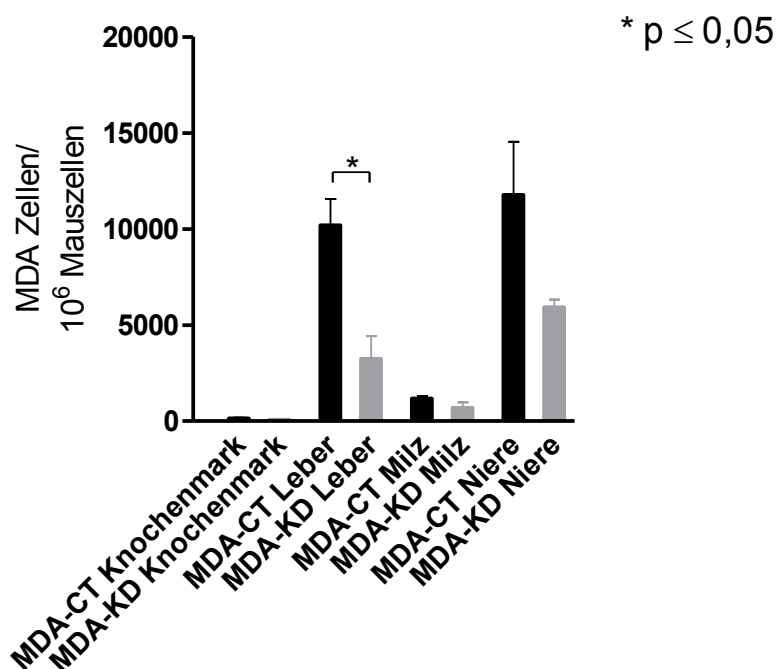


Abb.III.2.18. **Adhäsion der verschiedenen Zelllinien an Organen *in vivo*.** Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die in dem jeweiligen Organ gefunden werden konnte, korrigiert zu der Anzahl der Gesamtzellen. Die Werte der Zellen der MDA-CT Linie sind in schwarz und diejenigen der KD Linie in grau dargestellt.

In allen untersuchten Organen konnte ein Trend gesehen werden, nämlich dass mehr MDA-CT als MDA-KD Zellen gefunden werden konnten (**Knochenmark:** MDA-CT: 134±34,06, n=4 vs. MDA-KD: 74,50±26,85, n=4, p=0,2; **Milz:** MDA-CT: 1175±125,6, n=4 vs. MDA-KD: 698,7±272,3, n=3, p=0,1; **Niere:** MDA-CT: 11769±2781, n=4 vs. MDA-KD: 5933±390,9 [MDA Zellen/10⁶ Mausezellen], n=4, p=0,08); nur in der Leber war dieser Unterschied jedoch signifikant (**Leber:** MDA-CT: 10192±1370, n=4 vs. MDA-KD: 3237±1197 [MDA Zellen/10⁶ Mausezellen], n=4, p=0,08). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass im Knochenmark weniger Tumorzellen gefunden wurden als in den anderen Organen.

III.2.2.1.2.5. *In vivo* Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der Tumorzelllinien an verschiedenen Organen und deren Immunzellen mit Durchflusszytometrie und qPCR

Da in allen Organen weniger MDA-KD Zellen gefunden werden konnten, lag die Überlegung nahe, dass die MDA-KD Zellen stärker vom Immunsystem der Maus angegriffen werden. Um diese Frage *in vivo* zu untersuchen, bedienen wir uns wieder den eGFP Reportermausen. Hiermit soll-

te in einem FACS Versuch gezeigt werden, ob die Zellen der beiden Tumorzelllinien an die Mauszellen adhären, und wie viele dieser Zellen an Immunzellen gebunden sind.

Für diesen Versuch wurden DelCre Reporterermäuse, welche kein Stoppcodon besaßen und daher immer in allen Zellen eGFP exprimierten und bei entsprechender Anregung grün leuchteten, verwendet (siehe Abb.III.20).

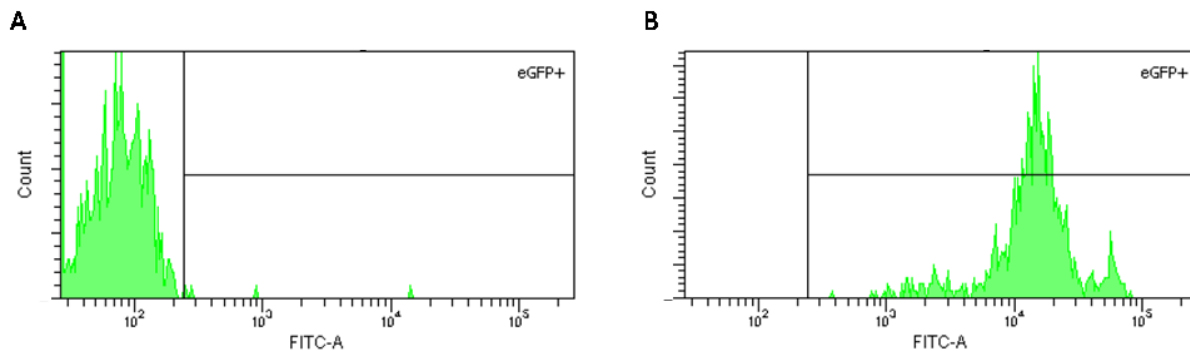


Abb.III.2.19. **Zuverlässigkeit der Reporterermäuse.** Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarkzellen von Kontrollmäusen (A), die kein eGFP exprimieren und eGFP Reporterermäusen ohne Stoppcodon, bei denen über 99% der Zellen eGFP produzierten (B).

Eine durchflusszytometrische Analyse konnte bestätigen, dass die DelCre Reporterermäuse in über 99% der Zellen eGFP exprimierten.

Daher wurden den Tieren Tumorzellen der entsprechenden Zelllinie injiziert und die Mäuse fünf Minuten darauf getötet und die Organe entnommen. Diese wurden im Anschluss zu Zellsuspensionen verarbeitet, die Erythrozyten lysiert und durch Immunzelldepletion in zwei Fraktionen unterteilt: die immunzelldepletierten- (CD45 depl.) und die Immunzellen der Maus (CD45). Bei der Leber wurde auf Grund ihrer hohen Zelldichte eine andere Methode zur Trennung der Immunzellen von den Leberzellen verwendet (siehe II.4.3.10.). Mit der FACS Analyse sollte untersucht werden, wie viele Zellen der jeweiligen Zelllinie an den immunzelldepletierten- und wie viele an den Immunzellen anhafteten.

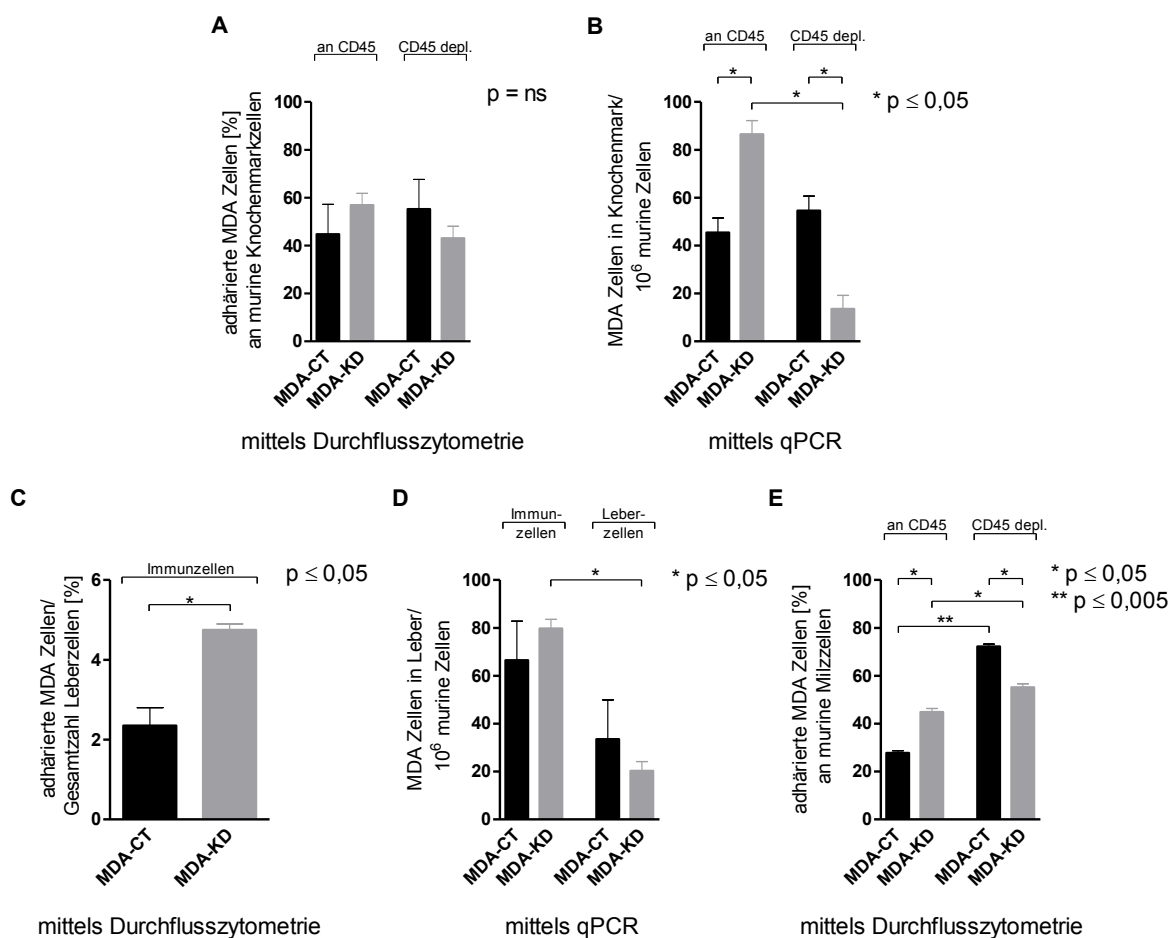


Abb.III.2.20. **Adhäsion der Tumorzellen an Zellen verschiedener Organe *in vivo***. Die Tumorzellen der entsprechenden Zelllinie wurden mit einem humanspezifischen Antikörper gefärbt. Diejenigen MDA Zellen, die adhären an eine eGFP exprimierende Zelle auftraten, wurde als am jeweiligen Organ adhärende Zelle gewertet. Gezeigt ist die prozentuale Adhäsion der an der jeweiligen Immunzellfraktion oder immunzelldepletierten Fraktion adhärenenden Zellen im Knochenmark (A) und in der Milz (E). Für die Leber (C) sind aus technischen Gründen (siehe II.4.3.10.) nur die an den Immunzellen adhärenierten Tumorzellen prozentual zu der Gesamtzellzahl gezeigt. In Abbildung B und D wurden die Ergebnisse mit Hilfe einer qPCR ergänzt. Dargestellt sind die im Knochenmark (B) und in der Leber (D) an der jeweiligen Fraktion gefundenen MDA Zellen/10⁶ murinen Zellen des jeweiligen Gewebes.

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten ergab, dass signifikant mehr Zellen der MDA-KD Linie in der Leber (Abb.III.2.20., C) und in der Milz (Abb.III.2.20., E) an die Immunzellen adhärenierten als Zellen der MDA-CT Linie. Im Knochenmark (Abb.III.2.20., A) ist diesbezüglich ein Trend in die gleiche Richtung zu erkennen (**Leber**: MDA-KD: 4,750±0,15, n=2 vs. MDA-CT: 2,350±0,45, n=2, p≤0,05; **Milz**: MDA-KD: 44,87±1,50, n=2 vs. MDA-CT: 27,73±0,97, n=2, p≤0,05; **Knochenmark**: MDA-KD: 56,88±4,93, n=2 vs. MDA-CT: 44,80±12,45 [%], n=2). An den CD45 depletierten Zellen adhärenierten im Knochenmark (Abb.III.2.20., A) und in der Milz (Abb.III.2.20., E) weniger MDA-KD Zellen, dieser Unterschied war jedoch nur in der Milz signifikant (**Milz**: MDA-KD: 55,13±1,50, n=2 vs. MDA-CT: 72,27±0,97 n=2, p≤0,05; **Knochenmark**: MDA-KD: 43,12±4,9, n=2 vs. MDA-CT: 55,20±12,45 [%]).

Darüber hinaus zeigte sich beim Vergleich der einzelnen Fraktionen der jeweiligen Zelllinie, dass in der Milz signifikant mehr Zellen der MDA-CT und der MDA-KD Linie in der

immunzelldepletierten Fraktionen im Vergleich zu den Immunzellfraktionen (Abb.III.2.20., E) gefunden werden konnten (**MDA-CT: immunzelldepletierte Fraktion:** $72,27 \pm 0,97$, $n=2$ vs. **Immunzellenfraktion:** $27,73 \pm 0,97$, $n=2$, $p \leq 0,005$; **MDA-KD: immunzelldepletierte Fraktion:** $55,13 \pm 1,50$, $n=2$ vs. **Immunzellenfraktion:** $44,87 \pm 1,50$, $n=2$, $p \leq 0,05$).

Da die Leber ein sehr zellreiches Organ ist, war es nicht möglich, die immunzellfreie Fraktion mit der FACS Analyse zu untersuchen, weil die hohe Anzahl der Leberzellen die geringe Anzahl der Tumorzellen überdeckte. Deshalb wurden die Leberzellen mit einer Alu basierten qPCR untersucht. Da diese Methode empfindlicher ist, wurde sie auch für eine erneute Untersuchung des Knochenmarks genutzt, da hierbei zwar Trends, jedoch keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden konnten. Bei der Analyse dieser Daten (Abb.III.2.20., B und D) konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark (Abb.III.2.20., B) signifikant mehr MDA-KD Zellen in der Immunzellenfraktion gefunden wurden als Zellen der MDA-CT Linie (**MDA-KD:** $86,50 \pm 5,69$, $n=2$ vs. **MDA-CT:** $45,43 \pm 6,05$, $n=2$, $p \leq 0,05$). Darüber hinaus waren von den Zellen der MDA-KD Linie signifikant mehr in der Fraktion der Immunzellen als in der immunzellfreien zu finden (**MDA-KD: Immunzellenfraktion:** $86,50 \pm 5,69$, $n=2$, $p \leq 0,05$ vs. **immunzelldepletierte Fraktion:** $13,50 \pm 5,69$, $n=2$). Bei der Untersuchung der Leber (Abb.III.2.20., D) zeigte sich, dass auch hier signifikant mehr MDA-KD Zellen in der Fraktion der Immunzellen, als in der immunzellfreien Fraktion gefunden werden konnten (**MDA-CT: Immunzellenfraktion:** $79,69 \pm 3,88$, $n=2$, $p \leq 0,05$ vs. **immunzelldepletierte Fraktion:** $20,31 \pm 3,88$, $n=2$).

Insgesamt waren in allen untersuchten Organen mehr Zellen der MDA-KD Linie mit Zellen des Immunsystems assoziiert als Zellen der MDA-CT Linie. Dies könnte eine verstärkte Zerstörung der MDA-KD Zellen durch das Immunsystem nach sich ziehen.

III.2.2.1.3. Untersuchungen zu der Rolle der Immunzellen

Da die Analyse der zytometrischen und der qPCR Untersuchung zeigte, dass die Zellen der MDA-KD Linie verstärkt mit den Immunzellen assoziiert waren, stellte sich die Frage, welche Immunzellen hierfür verantwortlich waren.

III.2.2.1.3.1. Einfluss der natürlichen Killerzellen (Nk-Zellen)

Zunächst wurde mit einem Chrom-Freisetzungstest der Einfluss von Nk-Zellen auf die zwei unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Bei diesem Test wird während einer definierten Inkubationsphase radioaktiv markiertes Chrom in die beiden Zelllinien (Zielzellen) eingebaut. Hierauf werden den Zellen eine definierte Anzahl humaner Nk-Zellen (Effektorzellen) zugegeben und im Anschluss zusammen inkubiert. Da mögliche Effekte von der Ratio der Effektorzellen zu den Zielzellen abhängig sein könnten, wurden verschiedene Verhältnisse untersucht. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde der Überstand, in dem sich nun durch die Nk-zellvermittelte Lyse radioaktives Chrom befindet, mit einem Gammastrahlungs-Zählgerät gemessen.

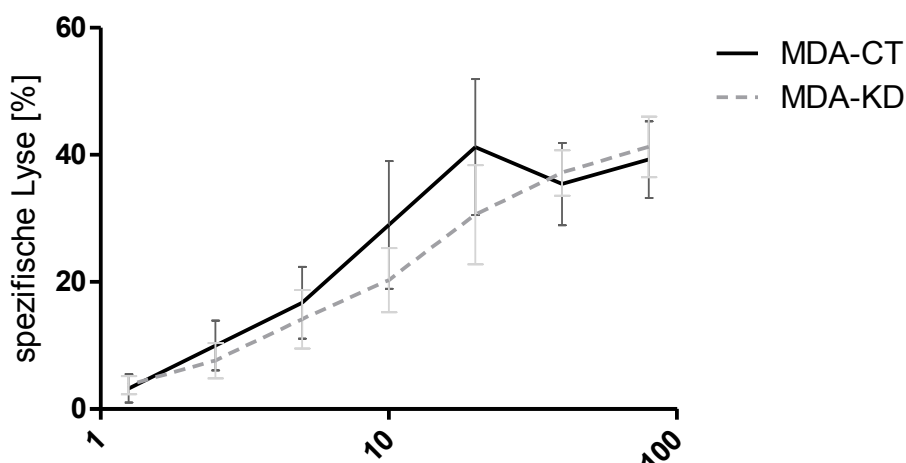


Abb.III.2.21. **Chrom-Freisetzungstest mit den MDA Zelllinien.** Dargestellt ist die spezifische Lyse [%] bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von Ziel- (MDA-CT; MDA-KD) zu Effektorzellen (Nk-Zellen). Die Ratio bewegte sich von 80% bis 1,25% Effektorzellen im Verhältnis zu Zielzellen und ist auf der x-Achse logarithmisch aufgetragen.

Bei der zellvermittelten spezifischen Lyse konnte bei verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellen/Zielzellen kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien gezeigt werden (**MDA-CT**: 80%: 39,2±6 n=2; 40%: 35,4±6,4, n=2; 20%: 41,2±10,7, n=5; 10%: 28,9±10, n = 5; 5%: 16,7±5,6, n=5; 2,5%: 10±3,9, n=5; 1,25%: 3,2±2,2, n=5 vs. **MDA-KD**: 80%: 41,2±4,8, n=2; 40%: 37,1±3,5, n=2; 20%: 30,6±7,8, n=5; 10%: 20,3±5, n=5; 5%: 14,1±4,6, n=5; 2,5%: 7,6±2,8, n=5; 1,25%: 3,8±1,4 [spezifische Lyse [%]], n=5, p=ns).

III.2.2.1.3.2. Untersuchungen zur Rolle der Phagozytose durch Makrophagen

Da kein signifikanter Unterschied in der Lyse der beiden untersuchten Zelllinien MDA-CT und MDA-KD als Reaktion auf die Nk-Zellaktivität gefunden werden konnte, wurde die Reaktion der Zelllinien auf die makrophageninduzierte Phagozytose untersucht. Da Makrophagen im Zuge der Phagozytose reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species [engl.]) abgeben, können diese nachgewiesen und dadurch der Grad der Phagozytose bestimmt werden. Makrophagen wurden in einer definierten Anzahl auf eine 96-Loch Kulturplatte aufgebracht und hierzu MDA-Zellen einer definierten Anzahl addiert, Cytochrom-C Lösung zugegeben und 4 Stunden lang inkubiert. Im Anschluss wurde die Emission jede halbe Stunde auf einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Untersucht wurden die Verhältnisse Makrophagen zu MDA-Zellen eins zu fünf und eins zu zehn.

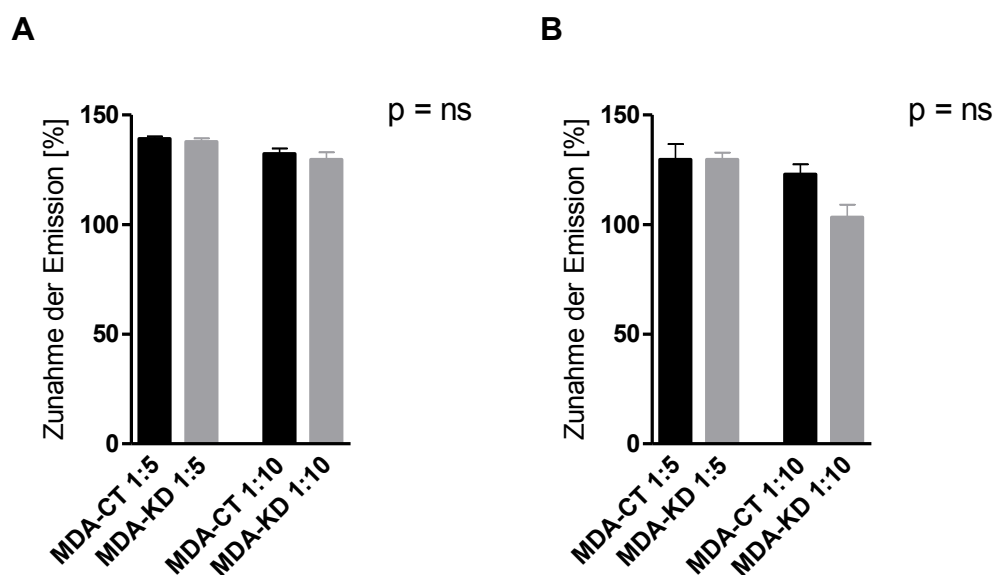


Abb.III.2.22. **Cytochrom-C Test mit den MDA Zelllinien.** Dargestellt ist die Zunahme der Cytochrom-C Färbung nach 4 Stunden Inkubation der Makrophagen zusammen mit den jeweiligen Tumorzellen. Phagozytierende Makrophagen geben reaktiven Sauerstoffspezies ab, welche wiederum eine Farbveränderung des Cytochrom-C bedingen. Die Zunahme der Emission gibt somit eine Aussage über die Phagozytose. Die entsprechenden Tumorzelllinien wurden je in einer 1:5 und einer 1:10 Verhältnis zu den Makrophagen aufgetragen. Beide Verdünnungen wurden je mit IFN- γ (A) und mit M-CSF (B) stimulierten Makrophagen durchgeführt.

Die Analyse des Cytochrom-C Tests zeigte sowohl bei den mit IFN- γ als auch bei den mit M-CSF stimulierten Makrophagen zwischen den beiden Tumorzelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Phagozytose (**IFN- γ 1:5**: MDA-CT: $139,3 \pm 0,99$, $n=8$ vs. MDA-KD: $137,9 \pm 1,43$, $n=8$; **IFN- γ 1:10**: MDA-CT: $132,3 \pm 2,33$, $n=3$ vs. MDA-KD: $129,7 \pm 3,28$, $n=3$; **M-CSF 1:5**: MDA-CT: $129,7 \pm 6,98$, $n=3$ vs. MDA-KD: $129,7 \pm 3,18$, $n=3$; **M-CSF 1:10**: MDA-CT: $123,0 \pm 4,51$, $n=3$ vs. MDA-KD: $103,3 \pm 5,81$, $n=3$, $p=ns$).

III.2.3. Krankheitsbedingte Modifikationen der extrazellulären Matrix und deren Einfluss auf das Einnistungsverhalten

Bei einer Fraktur entstehen Blutgerinnsel, in denen sich neben verschiedenen einnistungsfördernden Substanzen auch verstärkt Fibronectin befindet (siehe I.1.2.1.4.1.). Daher war es von Interesse, herauszufinden, ob diese Veränderungen zu einer erhöhten Einnistung von Tumorzellen im Bereich eines Hämatoms führen.

III.2.3.1. Induktion eines Hämatoms

Für die Untersuchungen dieser Fragestellung entschieden wir uns für das intratibiale Modell in dem die Tibia gebohrt wird [387]. Um zu belegen, dass durch eine intratibiale Bohrung (siehe II.4.2.1.8.1.) tatsächlich ein Hämatom entsteht, wurden zunächst die rechten Femora im Bereich der Bohrung mit Masson-Goldner angefärbt und evaluiert.

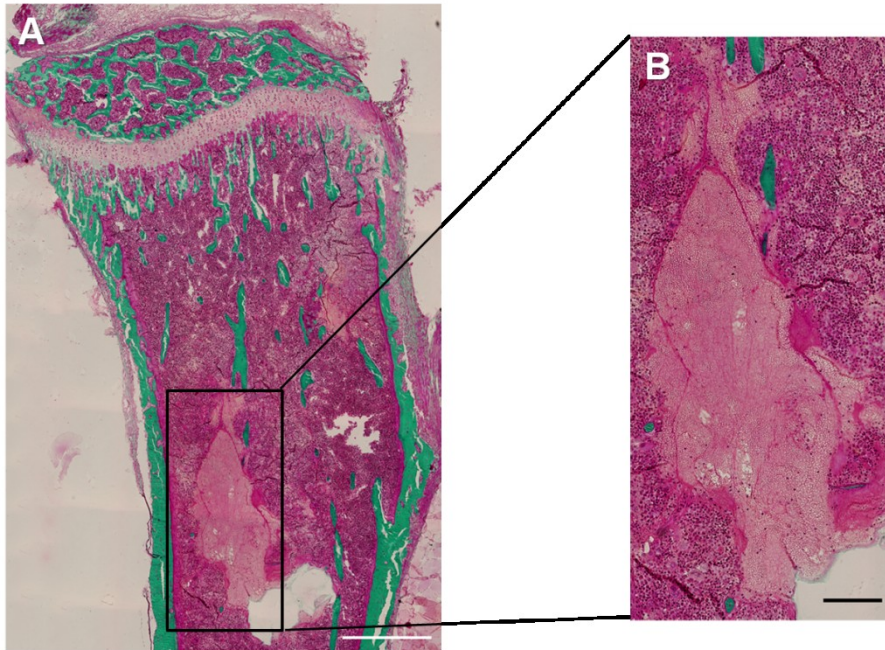


Abb.III.2.23. **Entwicklung eines Hämatoms durch intratibiale Bohrung.** Masson-Goldner Färbung des rechten Femurs nach intratibialer Bohrung. Zu erkennen ist das Blutgerinnsel (hellrosa), welches von Matrix (dunkelrosa) umgeben ist. Der Maßbalken entspricht einer Größe von 500 μ m (A) bzw. 100 μ m (B).

Die Masson-Goldner Färbung zeigt, dass die Bohrung zur Bildung eines Hämatoms führt. Somit konnte bei den weiteren Experimenten von der Anwesenheit eines Blutgerinnsels im Bereich der Bohrung ausgegangen werden.

III.2.3.2. Einfluss eines Hämatoms auf das Einnistungsverhalten von Tumorzellen

Um herauszufinden, ob ein Hämatom zu einer verstärkten Einnistung von Tumorzellen im Bereich des Blutgerinnsels führt, wurde zunächst eine Alu qPCR durchgeführt, mit deren Hilfe die Tumorzellen detektiert wurden, die sich 4 Stunden nach Hämatominduktion und anschließender intrakardialer Injektion der Tumorzellen, in den jeweiligen Tibiae befanden. Als Kontrolle diente die jeweils linke Tibia der entsprechenden Mäuse, in der kein Hämatom induziert wurde.

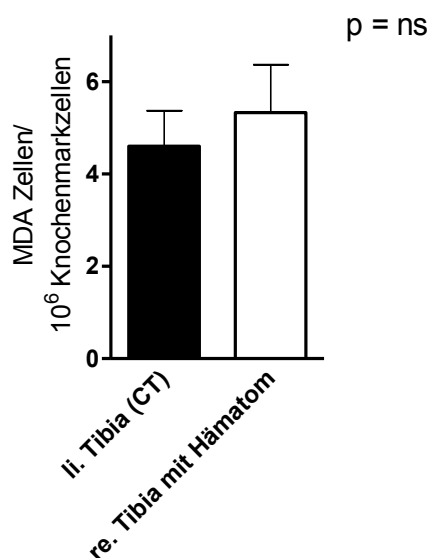


Abb.III.2.24. **Einfluss eines Blutgerinnsels auf das Einnistungsverhalten von Tumorzellen.** Gezeigt sind die MDA Zellen die sich in den Tibiae der entsprechenden Tiere fanden. Verglichen wurden je die linke Tibia in der sich kein Hämatom gebildet hatte (li. Tibia (CT)) mit der rechten Tibia, in der ein Hämatom entstanden war (re. Tibia mit Hämatom).

In den Tibiae, die ein Blutgerinnsel entwickelt hatten, wurden nicht signifikant mehr Tumorzellen gefunden, als in den Bereichen ohne Blutgerinnsel (li. Kontrolltibia: $4,6 \pm 0,8$, $n=5$ vs. re. Tibia mit Hämatom: $5,3 \pm 1$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=5$, $p=ns$).

III.2.3.3. Einfluss eines Hämatoms auf die Entwicklung und das Wachstum von Tumorerläsionen

Obwohl keine Unterschiede im Einnistungsverhalten der Tumorzellen in Bereiche mit Hämatom verglichen zu Bereichen ohne Hämatombildung gezeigt werden konnten, sollten Langzeiteffekte eines Hämatoms auf die Entwicklung und das Wachstum der Tumore untersucht werden. Hierzu wurden Tiere nach intratibialer Bohrung (Hämatominduktion) und anschließender intrakardialer Injektion longitudinal über einen Zeitraum von sieben Wochen mit Hilfe von Biolumineszenzmessungen beobachtet und diese ausgewertet. Als Kontrolle (CT) dienten Tiere, die ausschließlich (ohne Hämatominduktion) intrakardial injiziert wurden.

III.2.3.3.1. Einfluss eines Hämatoms auf die Anzahl und Lokalisation von Tumoren

Um zu untersuchen, ob sich bei Tieren mit einer Hämatombildung vermehrt Tumore im Bereich des Hämatoms bildeten, wurden die Tumore, die sich in den Tieren gebildet hatten, nach einem Zeitraum von sieben Wochen ausgezählt und deren Lokalisation in der Maus bestimmt.

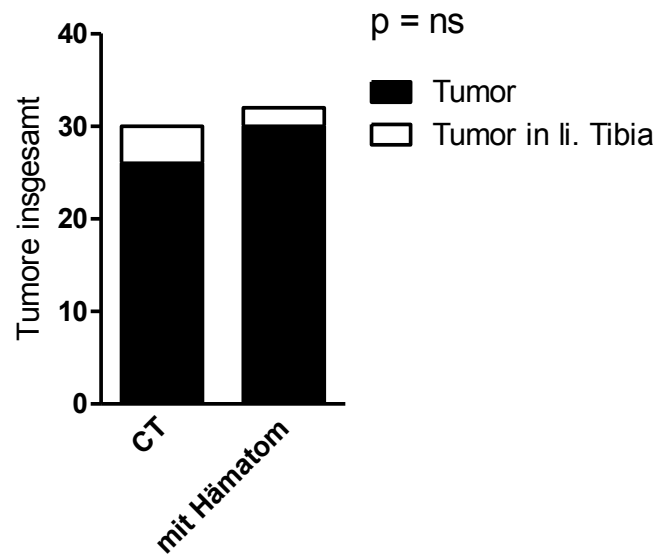


Abb.III.2.25. **Einfluss eines Blutgerinnsels auf die Anzahl und die Lokalisation von Tumorerläsionen in der linken Tibia.** Dargestellt sind die beiden Gruppen, bei denen die Gesamtanzahl und die Anzahl der Tumorerläsionen in der linken Tibia verglichen wurden. In schwarz sind die Tumorerläsionen, die gefunden wurden, und in weiß diejenigen, die sich hiervon in der linken Tibia fanden, dargestellt.

Es zeigte sich, dass sich die Anzahl der Tumorerläsionen, die sich in der linken Tibia der Mäuse gebildet hatten, zwischen den Tieren, die ein Hämatom entwickelt hatten und den Kontrolltieren nicht signifikant unterschieden (siehe Tab. III.2.1.).

Tabelle III.2.1. **Vergleich der Gruppe mit Hämatom und der Kontrollgruppe.** Die Anzahl der Tumore, die an der Stelle der Hämatombildung (linke Tibia) gefunden wurde, wurde verglichen mit der Anzahl der Tumore, die bei Kontrolltieren an der gleichen Stelle (linke Tibia) gefunden wurde. Die Daten wurden mit einem Fisher-Exact Test analysiert.

	Kontrollgruppe (n=7)	Gruppe mit Hämatombildung (n=7)
Gesamttumorerläsionenzahl	26	30
Anzahl der Tumorerläsionen in der linken Tibia	4	2 (p=ns)
Anzahl der Tumorerläsionen pro Tier	4.3	4.6 (p=ns)

III.2.3.3.2. Einfluss eines Hämatoms auf die Gesamtumorerlast und die Größe der Einzeltumore

Die Gesamtmenge der Tumorzellen, die sich in einer Maus befanden, und die Größe der Einzeltumore wurden mit Hilfe der Biolumineszenzmessungen in RLU (Relative light unit [engl], relative Lichteinheiten) festgehalten.

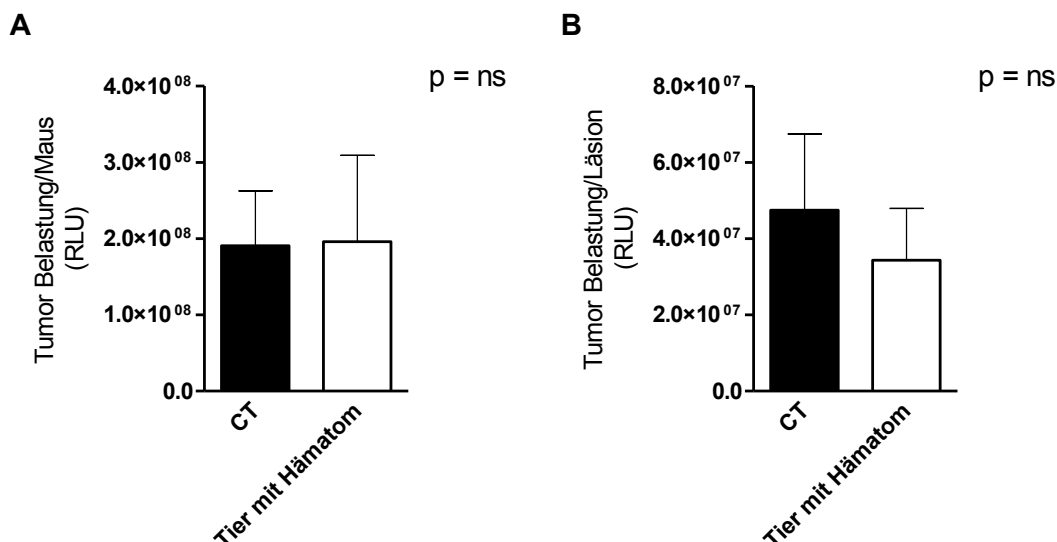


Abb.III.2.26. **Einfluss eines Blutgerinnsels auf die Gesamttumorlast und die Größe von Einzeltumoren.** Dargestellt sind die beiden Gruppen, bei denen die Anzahl der Tumore in der linken Tibia (A), die Tumorbelastung pro Maus (B) und die Tumorbelastung pro Läsion (C) verglichen werden. Die Tumorbelastung wurde jeweils in RLU angegeben.

Beim Vergleich zeigten weder die Tumorbelastung pro Maus noch die Tumorbelastung pro Läsion signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit Hämatom und den Kontrolltieren (Abb.III.2.26.: Tumorbelastung/Maus: CT: $1,9 \times 10^8 \pm 7,2 \times 10^7$, $n=13$ vs. Tier mit Hämatom: $1,9 \times 10^8 \pm 1,1 \times 10^8$, $n=7$, $p=ns$; Tumorbelastung/Läsion: CT: $4,7 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^7$, $n=13$ vs. Tier mit Hämatom: $3,4 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$ [RLU], $n=7$, $p=ns$).

III.2.3.3.3. Einfluss eines Hämatoms auf das Wachstum von Tumoren

Im Weiteren sollte herausgefunden werden, ob ein Hämatom einen Einfluss auf das Wachstum der Tumore hat. Hierzu wurden Tumore gewählt, die eine in etwa gleiche Größe (ausgedrückt in RLU) hatten und deren prozentuale Zunahme innerhalb einer Woche evaluiert. Da die Möglichkeit besteht, dass große und kleine Tumore unterschiedlich schnell wachsen, wurde das Wachstum in einer Gruppe mit kleineren Tumoren (Abb.III.2.27., A) sowie in einer Gruppe mit größeren Tumoren untersucht (Abb.III.2.27., B).

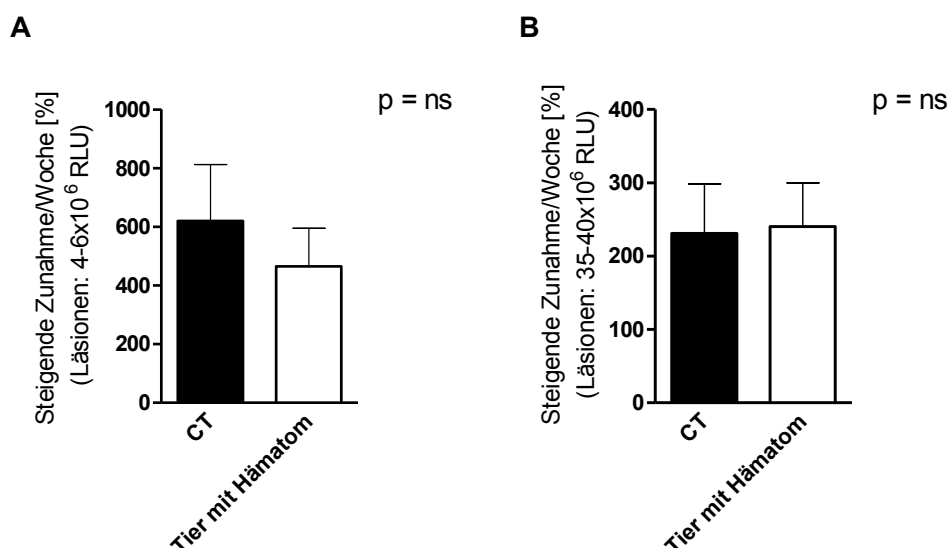


Abb.III.2.27. **Einfluss eines Blutgerinnsels auf das Wachstum von Tumoren.** Dargestellt ist die Zunahme der Tumorgöße innerhalb einer Woche für sowohl kleinere (A) als auch für größere Tumore (B). Die Tumorbelastung wurde jeweils in RLUs angegeben.

Es zeigten sich sowohl bei kleineren (durchschnittliche Größe $4-6 \times 10^6$ RLUs) als auch größeren Tumoren (durchschnittliche Größe $35-40 \times 10^6$ RLUs) keine signifikanten Unterschiede in der Zunahme der Tumorgöße (kleinere Tumore: $619,9 \pm 192,3$, $n=9$ vs. mit Hämatom: $464,8 \pm 129,8$, $n=4$, $p=ns$; größere Tumore: $231,1 \pm 67,5$, $n=4$ vs. mit Hämatom: $240,3 \pm 59,5$, $n=5$ [% Zunahme RLUs innerhalb einer Woche], $p=ns$).

III.2.3.3.4. Radiologische Untersuchungen der Tumorentwicklung

Um die Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen zu bestätigen und darüber hinaus auszuschließen, dass die Tumorzellen (zumindest teilweise) die Fähigkeit zur Expression des Enzyms Luziferase verloren hatten, wurden die Tiere radiologisch untersucht.

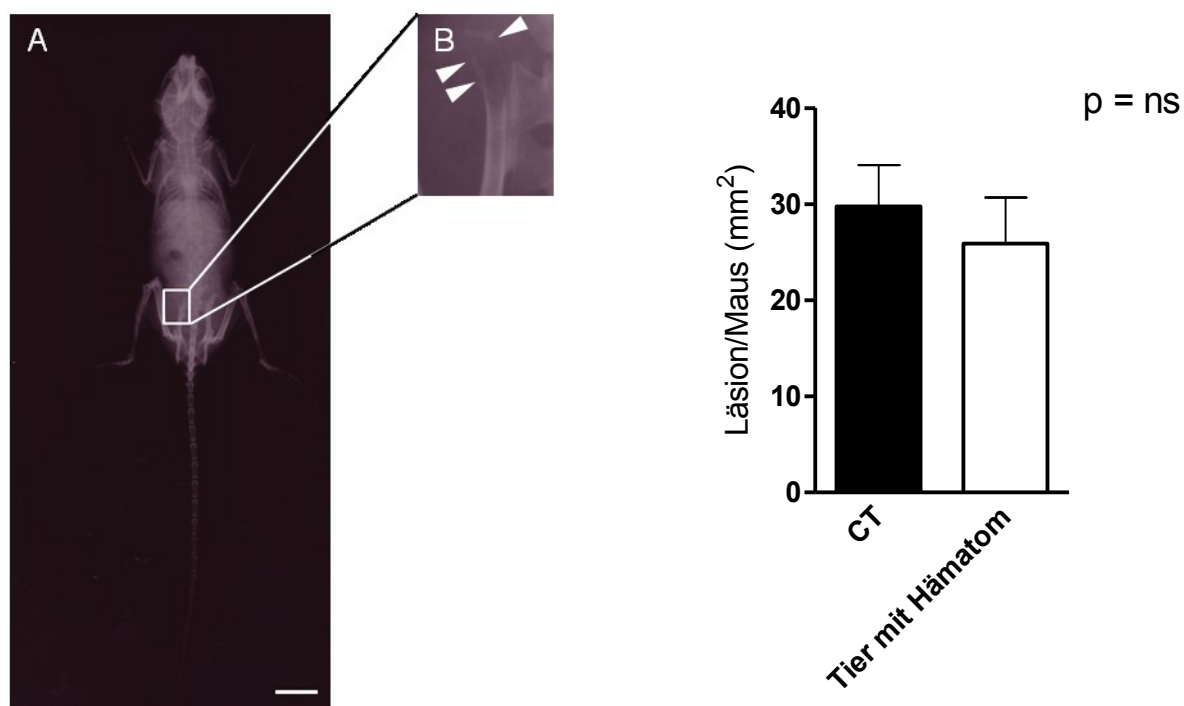


Abb.III.2.28. **Radiographische Aufnahme einer an Tumor erkrankten Maus und Evaluierung der Läsionen.** Links abgebildet ist ein radiographisches Bild einer Maus (A). Anhand solcher radiographischer Aufnahmen wurden Läsionen im Knochen (vergrößert dargestellt in B) ersichtlich, die im Folgenden ausgemessen und evaluiert wurden (C). Der Maßbalken entspricht einer Länge von 1 cm.

Die Vermessung und Auswertung der osteolytischen Flächen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, bei denen ein Hämatom induziert worden war (CT: 25,91±4,78, n=5 vs. Tier mit Hämatom: 29,75±4,31 [mm²], n=9, p=ns).

III.2.4. Pharmakologische Modifikationen

Weiterhin war von Interesse, ob pharmakologisch bedingte Modifikationen der osteoblastischen Nische und daraus resultierende Veränderungen der extrazellulären Matrix einen Einfluss auf das Einnistungsverhalten von Tumorzellen haben würden. Parathormon vermindert die Apoptose der Osteoblasten und Osteoklasten und erhöht die Produktion verschiedener Zytokine, die fördernd auf die Einnistung der Tumorzellen wirken könnten. Darüber hinaus führt die Gabe von Parathormon zu einer gesteigerten Fibronectinproduktion [388]. Basierend auf diesem Hintergrund sollte in diesem Versuchsansatz der Einfluss der osteoblastischen Nische genauer untersucht werden. Hierzu wurde Parathormon genutzt, um die Osteoblasten zu stimulieren und die osteoblastische Nische zu erweitern [280]. Gleichzeitig kann Parathormon leider auch die Osteoklasten stimulieren [389], weswegen wir eine gleichzeitige Gabe von Zoledronsäure dazu verwendeten, um diese Effekte zu minimieren. Da Bisphosphonate (zu denen auch die Zoledronsäure gehört), die durch Osteoklasten vermittelte Knochenresorption vermindern (siehe I.3.3.2.), könnten sie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix verringern, wodurch Tumorzellen eine weniger günstige Umgebung für ihre Ansiedelung finden [390]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Bisphosphonate die Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix verhindern können [391].

III.2.4.1. Untersuchung des Einnistungsverhaltens mit Alu basierter qPCR

Immundefizienten Mäusen wurde entweder Parathormon (PTH) oder Zoledronsäure (ZOL) oder die Kombination PTH und ZOL über einen Zeitraum von 4 Tagen verabreicht. Am darauffolgenden Tag wurden den Mäusen Tumorzellen der Linie MDA-MB-231-B/luc⁺ injiziert und die Tiere 24 Stunden darauf getötet. Nach Entnahme der Femora und Ausspülen des Knochenmarks wurde die Anzahl der eingenisteten Tumorzellen mit der Alu qPCR ermittelt.

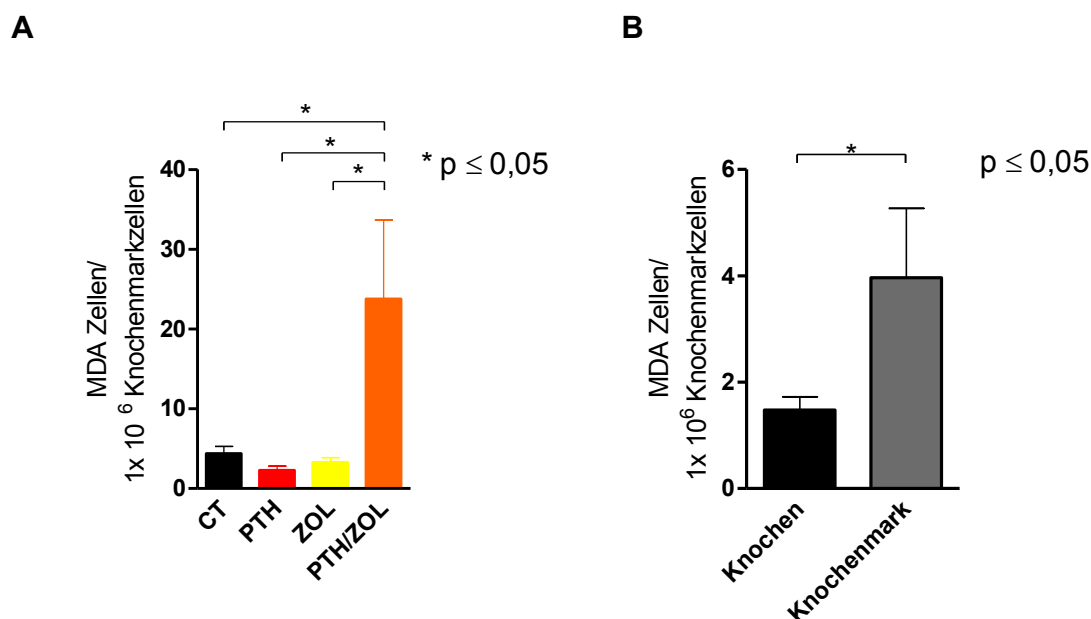


Abb.III.2.29. **Eingenistete MDA Zellen im Knochenmark nach keiner, PTH, ZOL oder PTH/ZOL Behandlung.** Dargestellt ist die Anzahl der eingenisteten Tumorzellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen (A). Der schwarze Balken repräsentiert die Kontrollgruppe, der rote die mit PTH, der gelbe die mit ZOL und der orange die mit PTH und ZOL behandelten Tiere. Dieser Farbcode wird in den folgenden Graphen beibehalten. In Abbildung B ist die Lokalisation der eingenisteten Tumorzellen innerhalb des Knochens abgebildet.

Überraschenderweise zeigte sich, dass sich ausschließlich bei der Gruppe, die sowohl mit Parathormon als auch mit Zoledronsäure behandelt wurde, signifikante Unterschiede zu den anderen Gruppen zeigten (Abb.III.2.29., A: CT: $4,38 \pm 0,90$, $n=19$; PTH: $2,27 \pm 0,54$, $n=16$; ZOL: $3,28 \pm 0,60$, $n=14$; vs. PTH/ZOL: $23,77 \pm 9,88$ [MDA Zellen/ 1×10^6 Knochenmarkzellen], $n=10$, $p < 0,05$).

Die Untersuchung der Lokalisation der Tumorzellen zeigte, dass sich signifikant mehr Tumorzellen im Knochenmark als am Knochen selbst fanden (Abb.III.2.29., B: Knochenmark: $1,48 \pm 0,25$, $n=19$ vs. Knochen: $3,96 \pm 1,30$, $n=15$, $p \leq 0,05$).

III.2.4.2. Untersuchung am Knochen

III.2.4.2.1. Radiographische Untersuchung der Knochen

Um zu überprüfen, ob es zwischen den unterschiedlich behandelten Mäusen Unterschiede hinsichtlich der Knochendichte gab, wurden die linken Femora der Tiere auf einen Röntgenfilm aufgeklebt, der Film 90s bei 30kV geröntgt und anschließend entwickelt.

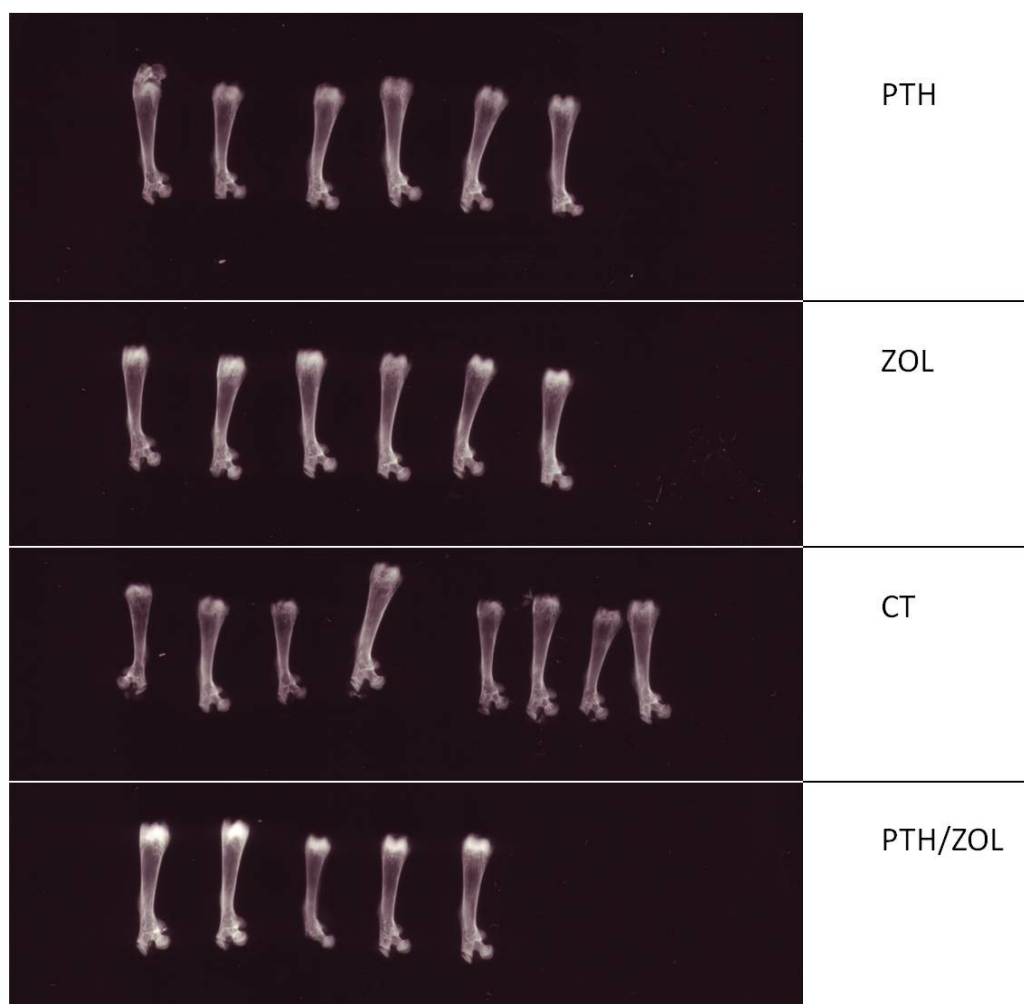


Abb.III.2.31. **Röntgenbilder der Femora nach keiner, PTH, ZOL oder PTH/ZOL Behandlung.** Die Femora der Tiere der verschiedenen Gruppen (von oben nach unten, wie im Bild beschrieben: PTH, ZOL, CT, PTH/ZOL) wurden auf einen Röntgenfilm gelegt, 90s lang bei 30kV geröntgt und der Film anschließend entwickelt.

Beim Betrachten der Röntgenbilder scheint es, als hätten die Tiere, die mit Zoledronsäure oder der Kombination Parathormon/Zoledronsäure behandelt wurden, vor allem an den Epiphysen, also im trabekulären Bereich der Knochen, eine höhere Knochendichte als die der anderen Gruppen.

III.2.4.2.2. Untersuchung der Knochendichte mit pQCT

Um diese Eindrücke zu bestätigen, wurde die Knochendichte mit einer peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) gemessen und anschließend ausgewertet.

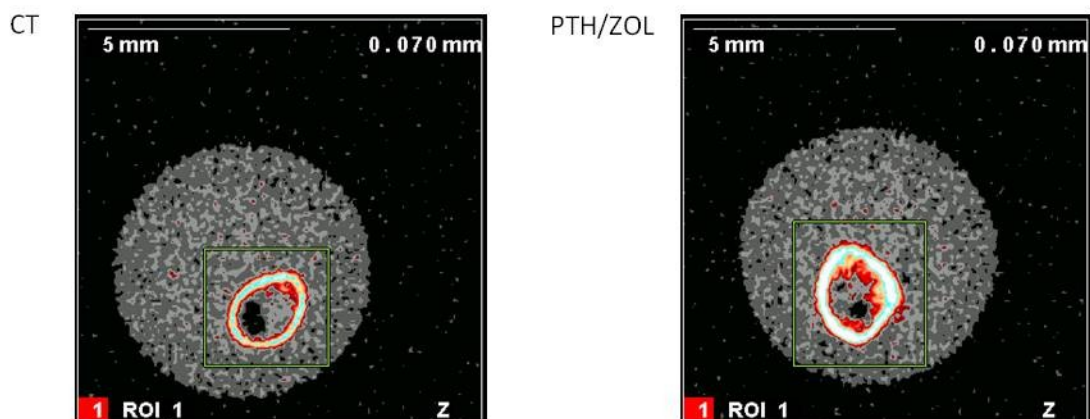


Abb.III.2.32. **pQCT Bilder der Femora.** pQCT Aufnahmen von unbehandelten bzw. mit Parathormon und Zoledronsäure behandelten Tieren.

Die pQCT Bilder legten bereits die Vermutung nahe, dass die Tiere, die mit Zoledronsäure und Parathormon behandelt wurden, eine höhere Knochendichte als Kontrolltiere aufweisen.

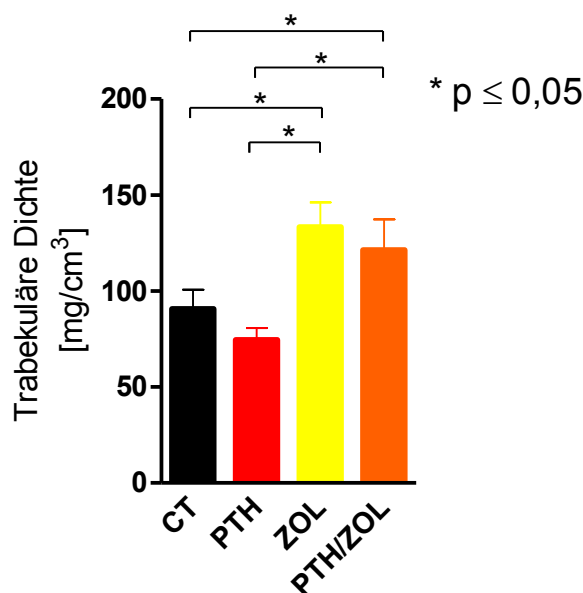


Abb.III.2.33. **pQCT der Femora nach Kontroll, PTH, ZOL oder PTH/ZOL Behandlung.** Die Knochendichten der Femora der Tiere der verschiedenen Gruppen wurden mittels pQCT gemessen.

Die nach Betrachten der Röntgen- und pQCT- Bilder entstandene Vermutung, dass diejenigen Gruppen, die mit Zoledronsäure, bzw. mit Parathormon und Zoledronsäure behandelt wurden, eine signifikant höhere Knochendichte im trabekulären Bereich des Knochens aufwiesen, bestätigte sich (CT: 90,7±10,02, n=8 vs. PTH: 74,48±6,17, n=6, p=ns; ZOL: 133,4±12,82, n=6 vs. CT und vs. PTH p<0,05; PTH/ZOL: 121,3±15,94, n=5 vs. CT und vs. PTH [mg/cm³], p<0,05). Die Daten sind zusammen mit den durchschnittlichen Femurlängen der verschiedenen Gruppen der Tiere, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (p=ns) zur besseren Übersicht in Tabelle III.2.2. zusammengefasst.

Tab.III.2.2. **Übersicht über die Daten zur pQCT Messung nach keiner, PTH, ZOL oder PTH/ZOL Behandlung.** Die Tiere der verschiedenen Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Länge der Femora auf. Unterschiede in der trabekulären Knochendichte (BMD, bone mineral density [engl.]) sind in Abb.III.2.33. dargestellt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean [engl.], Standardfehler des Mittelwerts).

	CT	PTH	ZOL	PTH/ZOL
Probenanzahl	8	6	6	5
Femurlänge [mm]	10,35 \pm 0,32	10,75 \pm 0,26	10,89 \pm 0,13	10,53 \pm 0,25
Trabekuläre Knochendichte [mg/cm³]	90,7 \pm 10,02	74,48 \pm 6,17	133,4 \pm 12,82	121,3 \pm 15,94

III.2.4.2.3. Histomorphometrische Untersuchung der Knochen

Die Unterschiede in der Knochendichte können auf verschiedene Ursachen, wie verminderter bzw. verstärkter Knochenaufbau oder verminderter bzw. verstärkter Knochenabbau, zurückgeführt werden. Um diese Ursachen und die beteiligten Zelltypen zu untersuchen, wurden je eine Tibia der Mäuse in Plastik eingebettet, 5 μ m dicke Schnitte angefertigt und diese histomorphometrisch untersucht.

III.2.4.2.3.1. Dynamische Histomorphometrie

Zur Bestimmung der Knochenbildung während der Behandlungszeit wurde den Tieren drei Tage sowie einen Tag vor Tötung Calcein injiziert. Dieser Mineralisationsmarker kann aufgrund seiner Fluoreszenz nachgewiesen werden und markiert Knochenabschnitte, an denen Knochen mineralisiert, da Calcein auf Grund seiner hohen Affinität zu Calcium mit eingebaut wird. Da den Tieren zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Calcein verabreicht wurde, ist eine dynamische Histomorphometrie ermöglicht. Eine einfache Calceinmarkierung (in Form einer Einzelbande) entsteht, wenn zu einem der beiden Injektionszeitpunkte Knochen mineralisiert wurde. Eine Doppelmarkierung (in Form einer Doppelbande siehe Abb.III.2.34., C) erscheint, wenn zu beiden Injektionszeitpunkten Knochen mineralisiert wurde. Der Abstand zwischen beiden Markierungen stellt somit den Zuwachs an neumineralisiertem Knochen (innerhalb der Zeit zwischen den einzelnen Injektionen) dar. Zur Untersuchung dieser Parameter wurden die Knochenschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (siehe Abb.III.2.34., A-C) und mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet.

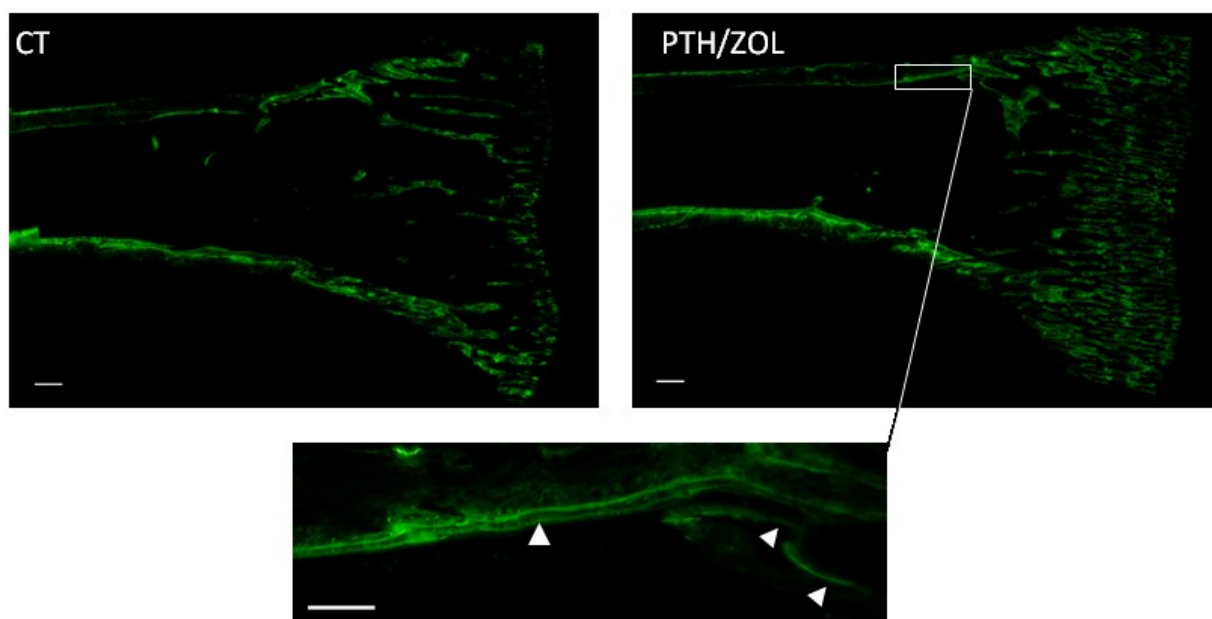


Abb.III.2.34. Calceinmarkierung der sekundären Spongiosa in unbehandelten Mäusen verglichen mit der in Mäusen nach PTH/ZOL Behandlung. Die Tiere, die mit PTH/ZOL behandelt wurden, zeigten eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die Kontrolltiere. Der rechteckige Ausschnitt von PTH/ZOL ist in der unteren Abbildung vergrößert dargestellt. Zu erkennen sind hier von links nach rechts durch weiße Pfeile markiert, eine Doppelmarkierung, keine Markierung und eine Einzelmarkierung. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m.

Bereits beim ersten Betrachten der Färbungen fiel wieder die verstärkte Anzahl trabekulären Knochens bei der Gruppe auf, die mit der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure behandelt wurde. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse der Auswertung in einer Tabelle (Tabelle III.2.3.) zusammengefasst.

Tab.III.2.3. Übersicht über die Daten der dynamischen Histomorphometrie der sekundären Spongiosa der PTH/ZOL behandelten Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Dargestellt sind die Werte verschiedener Parameter der dynamischen Histomorphometrie. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean [engl.], Standardfehler des Mittelwerts).

	Kontrolle	PTH/ZOL behandelt
Probenanzahl	6	5
Oberfläche mit einfacher Calceinmarkierung [mm]	1,58 \pm 0,46	4,73 \pm 1,00 (p \leq 0,05)
Oberfläche mit doppelter Calceinmarkierung [mm]	3,42 \pm 0,78	7,85 \pm 1,52 (p \leq 0,05)
Mineralisierte Oberfläche [mm]	4,35 \pm 1,00	10,50 \pm 2,04 (p \leq 0,05)

Es zeigte sich, dass in der Gruppe der mit der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure behandelten Tiere die Werte der mineralisierten Oberfläche signifikant erhöht waren (CT: 4,35 \pm 1,00, n=6 vs. PTH/ZOL: 10,50 \pm 2,04 [mm], n=5 p<0,05).

III.2.4.2.3.2. Statische Histomorphometrie

Für die statische Histomorphometrie wurden dieselben Schnitte verwendet, wie für die dynamische. Diese wurden nachdem sie photographiert waren nach Masson-Goldner gefärbt und anschließend an einem Mikroskop im Durchlicht photographiert. Somit konnten die statische und die dynamische Histomorphometrie kombiniert betrachtet und ausgewertet werden. Durch die Masson-Goldner Färbung erscheint mineralisierter Knochen grün, die Zellen des Knochenmarks rotbraun und Osteoid rosa. Bei Osteoid handelt es sich um weiche, von den Osteoblasten neu gebildete Matrix, die noch nicht mineralisiert wurde.

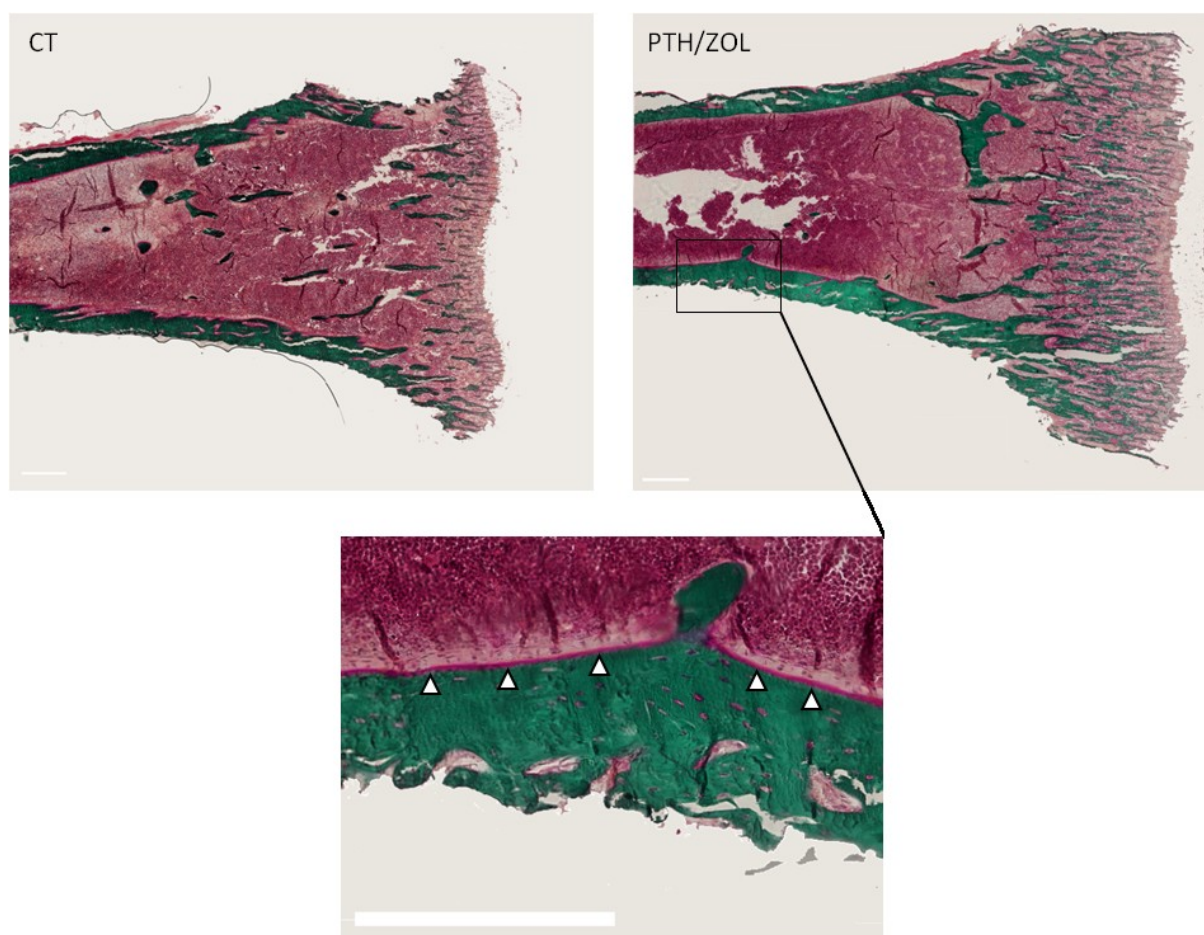


Abb.III.2.35. **Masson-Goldner Färbung von Tibiae un behandelter Mäuse verglichen mit denen von Mäusen nach PTH/ZOL Behandlung.** Abgebildet ist die Masson-Goldner Färbung von Knochen einer Kontrollmaus (CT) und einer mit PTH/ZOL behandelten (PTH/ZOL) Maus. Vergrößert ist im unteren Bild der rechteckige Ausschnitt aus PTH/ZOL, hier ist das Osteoid (dunkelrosa, Pfeile) erkenntlich. Mineralisierter Knochen erscheint in dieser Färbung grün, die Zellen des Knochenmarks braunrot und Osteoid rosa. Die Maßbalken entsprechen einer Länge von 100µm.

Anhand der Masson-Goldner Färbung wurden mit Hilfe des Programms ImageJ verschiedene Parameter des Knochenbaus ausgezählt und vermessen.

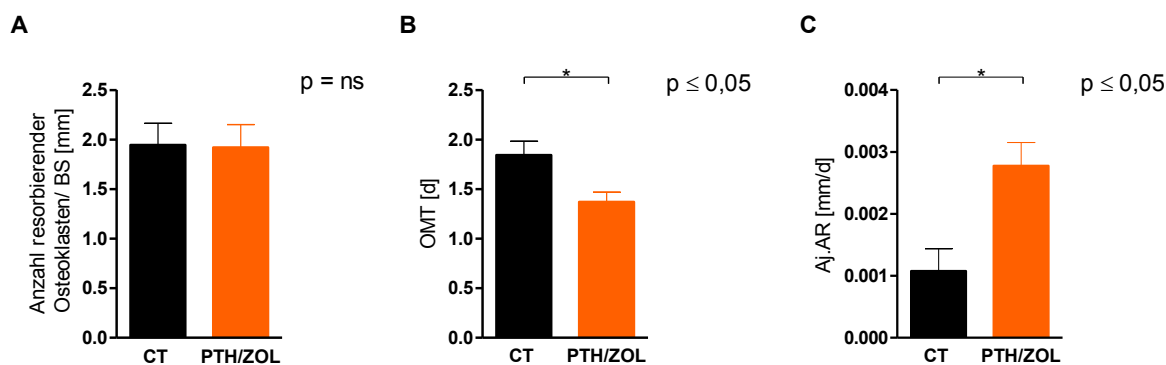


Abb.III.2.36. **Histologische Untersuchungen der sekundären Spongiosa nach PTH/ZOL Behandlung.** Abgebildet ist die Anzahl resorbierender Osteoklasten pro Knochenoberfläche (A), die Reifungszeit des Osteoid (OMT, osteoid maturation time [engl.]) und die angepasste Ablagerungsrate in mm/Tag (AjAR, adjusted apposition rate [engl.])

Die Auswertung der gefärbten Schnitte ergab, dass eine Behandlung mit der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl der resorbierenden Osteoklasten im Vergleich zu Kontrolltieren führt (**Anzahl resorbierender Osteoklasten:** CT: $1,94 \pm 0,22$, $n=6$ vs. PTH/ZOL: $1,92 \pm 0,23$, $n=5$ [resorbierende Osteoklasten/mm], $p < 0,05$). Weiterhin konnte bei den Tieren, die mit der Kombination PTH/ZOL behandelt wurden, eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren signifikante Verminderung der benötigten Zeit zur Reifung des Osteoids (osteoid maturation time [engl.]), das heißt eine Verstärkung der Reifung des Osteoids und eine signifikante Erhöhung der angepassten Ablagerungsrate gefunden werden (adjusted apposition rate [engl.]) (**Osteoid maturation time:** CT: $1,84 \pm 0,14$, $n=5$ vs. PTH/ZOL: $1,37 \pm 0,10$, $n=5$ [mm/Tag], $p < 0,05$; **Adjusted apposition rate:** CT: $0,0010 \pm 0,00036$, $n=6$ vs. PTH/ZOL: $0,0028 \pm 0,00037$, $n=4$ [mm/Tag], $p < 0,05$). Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Osteoblasten verstärkt aktiviert sind.

III.2.4.2.4. Untersuchung der lokalen Umgebung des Knochenmarks

Da sich in der mit Parathormon und Zoledronsäure behandelten Gruppe signifikant mehr Tumorzellen im Knochenmark einnisteten, wurde mit Hilfe eines ELISAs überprüft, ob dieser Effekt auf eine erhöhte Fibronektinmenge im Knochenmark zurückzuführen war.

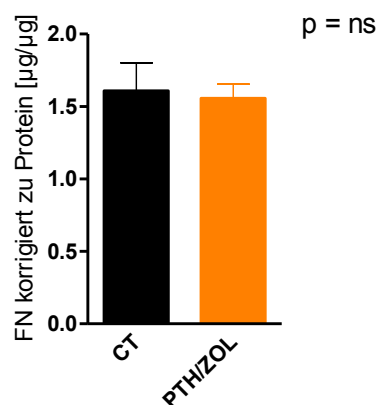


Abb.III.2.30. **Fibronectingehalt im Knochenmark von Kontrolltieren und Tieren nach PTH/ZOL Behandlung.** Dargestellt ist der Fibronectingehalt im Knochenmark der Tiere, der zum Gesamtproteingehalt korrigiert wurde.

Es zeigte sich, dass sich der Fibronektingehalt im Knochenmark der beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschied (CT: $1,61 \pm 0,19$, $n=6$ vs $1,56 \pm 0,098$, $n=9$, $p=ns$).

Um die Veränderungen im Knochenmark weiter zu charakterisieren, untersuchten wir die Zytokinumgebung mit Hilfe einer Multiplex Analyse.

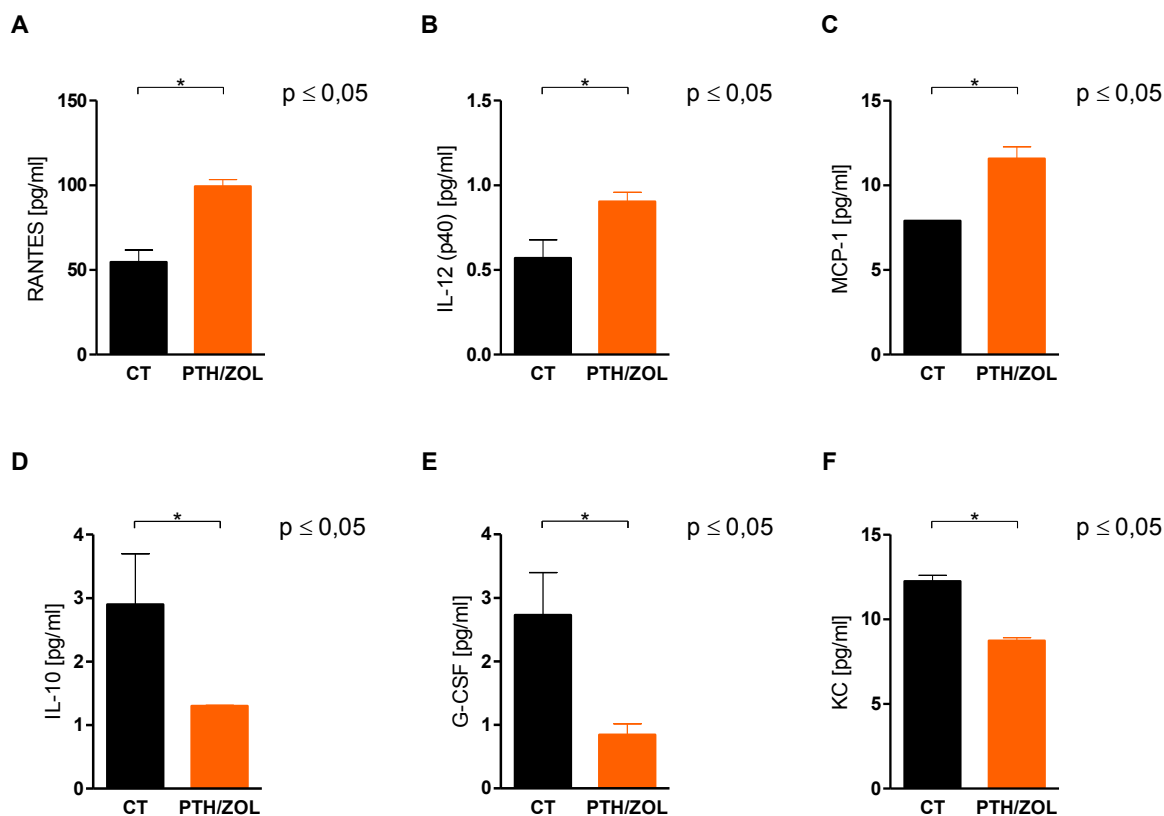


Abb.III.2.37. **Multiplex Analyse von unbehandelten Kontrolltieren verglichen mit Mäusen die mit PTH/ZOL behandelt wurden.** Das Knochenmark der Mäuse wurde auf unterschiedliche Zytokingehalte untersucht. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zytokinmenge von RANTES (A), IL-12 (p40) (B), MCP-1 (C), IL-10 (D), G-CSF (E), und KC (F).

Es zeigte sich, dass im Knochenmark der mit PTH und ZOL behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen eine Vielzahl von Zytokinen signifikant verändert war.

Die Analyse der Zytokin-Proteinexpression im Knochenmark mittels Multiplex Analyse ergab, dass in der Gruppe, die mit PTH und ZOL behandelt wurde, sowohl RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted [engl.]), als auch IL-12 (p40) (Interleukin 12 (p40)) als auch MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1 [engl.]) erhöht waren (RANTES: CT: 55 ± 7 , $n=2$, PTH/ZOL: 99 ± 4 , $n=2$, $p \leq 0,05$; IL-12 (p40): CT: $0,6 \pm 0,1$, $n=3$, PTH/ZOL: $0,9 \pm 0,1$, $n=3$, $p \leq 0,05$; MCP-1: CT: $7,9 \pm 0,1$, $n=2$, PTH/ZOL: $11,6 \pm 0,7$ [pg/ml], $n=3$, $p \leq 0,05$).

Weiterhin zeigte sich, dass die Zytokine IL-10 (Interleukin 10), G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor [engl.]) und KC (keratinocyte chemoattractant [engl.]) in der Gruppe der mir PTH und ZOL behandelten Tiere signifikant vermindert waren (IL-10: CT: 55 ± 7 , $n=2$, PTH/ZOL: 99 ± 4 , $n=2$, $p \leq 0,05$; G-CSF: CT: $0,6 \pm 0,1$, $n=3$, PTH/ZOL: $0,9 \pm 0,1$, $n=3$, $p \leq 0,05$; KC: CT: $7,9 \pm 0,1$,

n=2, PTH/ZOL: 11,6±0,7 [pg/ml], n=3, p≤0,05). Eine Übersicht über die untersuchten Zytokine gibt Tabelle III.2.4.

Tab.III.2.4. **Multiplex Analyse von unbehandelten Kontrollen verglichen mit Mäusen die mit PTH/ZOL behandelt wurden.** In der linken Spalte ist der Name des untersuchten Zytokins dargestellt und rechts daneben die in den entsprechenden Gruppen gefundene Menge in pg/ml. Die Werte sind angegeben als Mittelwert±SEM (standard error of the mean [engl.], Standardfehler des Mittelwerts).

Zytokin	CT	PTH/ZOL
TNF- α	15,97±2,28, n=3	17,57±1,46, n=3
IL- 1b	151,2±23,68, n=3	143,9±32,4, n=3
IL- 3	0,55±0,050, n=3	0,6100±0,17, n=3
IL- 5	1,96±0,16, n=3	2,95±0,72, n=3
IL- 12 (p70)	0,54±0,45, n=2	1,00±0,18, n=3
IL- 13	4,50, n=1	4,50±0,00, n=2
IL- 17	1,48±0,17, n=3	1,44±0,13, n=3
Eotaxin	191±31,73, n=3	207,80 ±65,2, n=2
IFN- g	0,77±0,18, n=3	0,82±0,13, n=3
MIP- 1a	7,40±1,65, n=3	7,60±1,85, n=3
MIP- 1b	1,54±0,44, n=3	1,44±0,13, n=3
IL- 1a	0,41±0,10, n=3	0,82±0,17, n=3
VEGF	782,7±84,32, n=3	815,2±26,61, n=3

III.2.4.2.5. Untersuchung der Zytokinumgebung auf RNA Ebene mit qPCR

Um die Herkunft der Zytokine genauer zu untersuchen, wurde eine qPCR durchgeführt, mit deren Hilfe die Expression von Zytokin RNA analysiert werden sollte. Da gezeigt wurde, dass MCP-1 die Rekrutierung von Makrophagen stimuliert [392, 393] und diese zusammen mit stimulierten B-Zellen die Hauptproduzenten von IL-12 sind [394], sollte herausgefunden werden, ob die gesteigerte MCP-1 Konzentration auf eine gesteigerte MCP-1 Expression zurückzuführen war, die auch zu einer gesteigerten IL-12 Expression auf RNA Ebene führte. Darüber hinaus wurde auch SDF-1 (Stromal derived growth factor [engl.]) untersucht, da dieses Zytokin eine wichtige Rolle im Einnistungsprozess (siehe Abschnitt I.1.2.2.5. und I.1.2.2.6.) von Tumorzellen spielt, von der Multiplex Analyse jedoch nicht erfasst wurde.

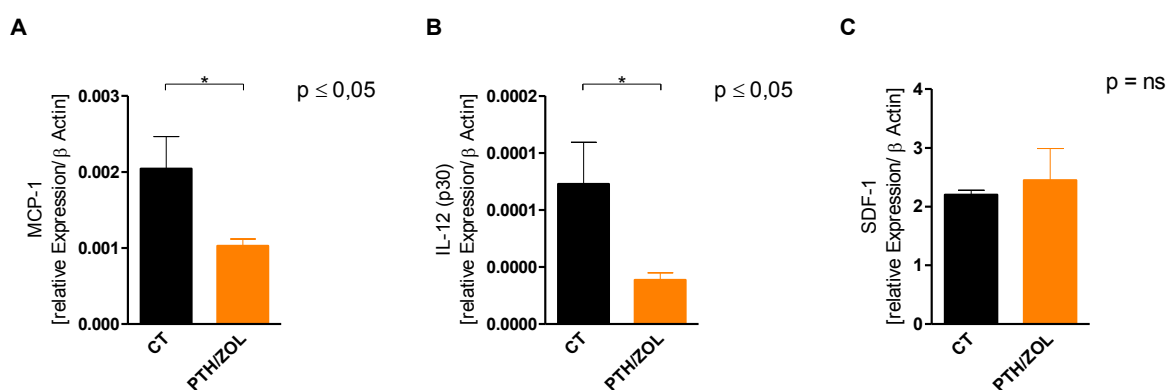


Abb.III.2.38. **QPCR Analyse von unbehandelten Kontrollen verglichen mit Mäusen die mit PTH/ZOL behandelt wurden.** Analysiert wurden die Expression von MCP-1 RNA (A), IL-12 RNA (B) und SDF-1 RNA (C).

In dem Knochenmark der Gruppe der Tiere, die mit der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure behandelt wurden, wurde signifikant weniger RNA der Zytokine MCP-1 und IL-12 gefunden (**MCP-1**: CT: $0,00204 \pm 0,000427$, $n=9$, PTH/ZOL: $0,00103 \pm 0,000089$, $n=8$, $p \leq 0,05$; **IL-12 (p40)**: CT: $0,000123 \pm 0,0000366$, $n=5$, PTH/ZOL: $0,0000387 \pm 0,00000607$ [relative Expression/ β -Actin], $n=5$, $p \leq 0,05$);). Da aber von beiden Zytokinen höhere Konzentrationen im Knochenmark der mit PTH und ZOL behandelten Tiere gefunden werden konnten, bedeutet dies, dass die Translation dieser Zytokine verstärkt oder deren Abbau vermindert ist. Die gesteigerte IL-12 Konzentration konnte somit nicht durch die erhöhte MCP-1 Konzentration erklärt werden. Die Expression der RNA des Zytokins SDF-1 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gruppen (**SDF-1**: CT: $2,20 \pm 0,077$, $n=5$, PTH/ZOL: $2,55 \pm 0,87$ [relative Expression/ β -Actin], $n=5$, $p=ns$).

Somit konnte ein Einfluss der extrazellulären Matrix und des Fibronektins auf die Einnistung von Tumorzellen untersucht werden. Allerdings hatte die Ausschaltung von Fibronektin in verschiedenen Organen der Tiere ebenso wie die Bildung eines Hämatoms keinen Einfluss auf die Einnistung von Tumorzellen. Die Ausschaltung des zellendogenen Fibronektins der Tumorzellen führte hingegen zu einer verminderten Einnistung. Dieser Effekt könnte im Zusammenhang mit einer verstärkten eCadherin Produktion und somit einer erhöhten Angreifbarkeit durch Immunzellen gestanden haben. Auch die pharmakologische Behandlung der Tiere mit der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure führte zu einer Veränderung in der Einnistung, jedoch zu einer Erhöhung. Dieser Effekt konnte nicht auf eine veränderte Fibronektinkonzentration sondern vielmehr auf eine veränderte Zytokinumgebung im Knochenmark zurückgeführt werden.

IV. Diskussion

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Tiere, bei denen eine Leberfibrose induziert worden war, mit dem Peptid pUR4b behandelt, welches die Assemblierung einer Fibronectinmatrix verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe des Peptids pUR4b während der Fibrosebildungsphase den Aufbau einer fibrotischen kollagenhaltigen Matrix verminderte. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass das Peptid pUR4b auch bei Gabe nach Beendigung der Fibrosebildung den Anteil des fibrotischen Narbengewebes verringerte. Eine Untersuchung der beteiligten Zellen zeigte eine reduzierte Anzahl entzündlicher Zellen, die zum Teil für den Effekt mitverantwortlich sein könnten. Einige inflammatorische Zellen bilden profibrotische Faktoren wie z.B. TGF- β und könnten somit den Aufbau extrazellulärer Matrix beschleunigen. Die Lebern der mit pUR4b behandelten Tiere enthielten weniger Gesamt- und auch weniger aktives TGF- β als unbehandelte fibrotische Mäuse. Die Anzahl der aktivierten hepatischen Stellatezellen wurde jedoch nicht beeinflusst. *In vitro* Versuche zeigten, dass der Aufbau eines Fibronectinnetzwerks durch hepatische Stellatezellen in Anwesenheit des Peptids pUR4b gestört war. Dieses gestörte Fibronectinnetzwerk könnte zum einen zu der verminderten Anlagerung von fibrotischem Narbengewebe und auf der anderen Seite zu einer verminderten Speicherung und Freisetzung des TGF- β s geführt haben, wodurch insgesamt weniger TGF- β vorhanden und infolgedessen die Kollagenablagerung zusätzlich vermindert war.

In dem darauf folgenden Teil der Arbeit wurde der Einfluss der extrazellulären Matrix und insbesondere des Fibronectins auf den Einnistungsprozess von Tumorzellen untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe konditioneller Knockout-Mäuse der Einfluss des zirkulierenden, des durch Osteoblasten und Osteozyten gebildeten und des zirkulierenden und von Zellen des Knochenmarks gebildeten Fibronectin untersucht. Unseren Ergebnissen zufolge wurde die Einnistung von Tumorzellen durch die Ausschaltung des Fibronectins in diesen Bereichen nicht beeinflusst. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des endogen produzierten Fibronectins der Tumorzellen zu einer Verminderung der Einnistung führte. Dies konnte zum Teil auf eine verstärkte eCadherin Expression und eine verstärkte Assoziation mit Zellen des Immunsystems zurückgeführt werden. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass ein Hämatom im Knochen die Einnistung von Tumorzellen sowie die anschließende Entwicklung eines Tumors nicht beeinflusst. Auch konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass eine pharmakologische Modifikation der osteoblastischen Nische durch die kombinierte Behandlung mit Parathormon und Zoledronsäure zu einer erhöhten Einnistung von Tumorzellen führte. Dieser Effekt wurde begleitet von einer erhöhten Aktivität der Osteoblasten und einer veränderten Zytokinumgebung.

IV.1. Die Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere des Matrixproteins Fibronektin bei der Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose

IV.1.1. Verschiedene Modelle der Leberfibrose

Die Leberfibrose ist ein vernarbender Wundheilungsprozess, der als Resultat verschiedener anhaltender Entzündungsvorgänge in der Leber auftritt [395], die durch vielfältige Faktoren ausgelöst werden können. In den westlichen Industrieländern ist die häufigste Ursache der Leberfibrose Alkoholmissbrauch [396], der in für über 50% der in der heutigen Zeit auftretenden Leberfibrosen verantwortlich gemacht wird [397]. Weitere Hauptursachen in diesen Regionen sind eine chronische Hepatitis C Infektion und die nichtalkoholische Steatohepatitis [180], die der alkoholischen Steatohepatitis ähnelt [398].

Da die Leberfibrose eine komplexe Erkrankung ist, die *in vitro* nicht nachgeahmt werden kann, wurde zur deren Untersuchung und zu deren besserem Verständnis auf ein Mausmodell zurückgegriffen. Es gibt verschiedene Modelle mit denen Leberfibrosen in der Maus hervorgerufen werden können. Bei einer Gallengangligatur werden Ligaturen an den Gallengängen vorgenommen, in deren Folge biomechanischer Stress auftritt, der zur verstärkten Proliferation und Expansion bilärer Epithelzellen [399, 400] und einer starken Aktivierung hepatischer Stellatezellen im Bereich um die Gallengänge führt [401]. Da bei dieser Methode jedoch ein operativer Eingriff vorgenommen werden muss, wird oftmals das Modell der Fibroseinduktion durch Chemikalien bevorzugt. Eine Leberfibrose die durch die Chemikalie Dimethylnitrosamin (DMN) oder die Chemikalie Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) hervorgerufen wurde, ähnelt am ehesten einer fibrotischen Erkrankung beim Menschen, die durch Alkohol oder chronische Hepatitis C ausgelöst wurde [402]. Daher wurden diese Chemikalien für die Entwicklung einer Fibrose gewählt. In beiden Modellen sind sowohl aktivierte Kupferzellen als auch eine erhöhte TGF- β Konzentration an der Aktivierung der hepatischen Stellatezellen beteiligt [188, 403], die letztendlich zu der Entstehung einer Fibrose beitragen. Obwohl beide Chemikalien zwar Leberfibrosen in der Maus hervorrufen, können diese jedoch nur als Modell betrachtet, und nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden.

Da der Kollagengehalt der Lebern der behandelten Tiere auch nach Beendigung der Fibroseinduktion über eine Dauer von zwei Wochen nicht abnahm, lässt sich daraus schließen, dass mit beiden Chemikalien eine über diesen Zeitraum stabile Fibrose induziert werden konnte. Aufgrund der kürzeren Dauer einer Fibroseinduktion mit DMN (siehe Abschnitt II.3.2.1.) wurde diese Chemikalie für die Versuche gewählt. Ein weiterer Vorteil war die einfachere Handhabung des DMN, da das CCl₄ vor den Injektionen in Öl aufgenommen werden musste, wodurch Injektionen mit dieser Chemikalie erschwert waren. Da die Leberfibrose jedoch ein komplexer Prozess ist und es sich bei der Fibrosierung mit der Chemikalie DMN nur um ein Modell handelt, wurden wichtige

Ergebnisse mit dem CCl₄ Modell überprüft. Nach dem Ende der Fibroseinduktion konnte zunächst durch Sirius-Rot Färbungen gezeigt werden, dass die Fibrosebildung erfolgreich war.

IV.1.2. Effekte des Peptids pUR4b bei einer Leberfibrose *in vivo*

IV.1.2.1. Effekte des Peptids pUR4b auf die Matrixbildung der Leber

Eine Fibrose ist durch die erkennbare Ablagerung von extrazellulärer Matrix in der Leber definiert [166]. Daher wurde zunächst die Matrixbildung der Leber untersucht. Ein biochemischer Versuch zur Hydroxyprolinegehaltbestimmung bestätigte, dass der Kollagengehalt in den fibrotischen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die fibrotischen Tiere die während der Fibrosebildungsphase mit pUR4b behandelt wurden signifikant weniger Kollagen in ihre Lebern eingelagert hatten als fibrotische Kontrolltiere. Die verminderte Ablagerung von Kollagen lässt auf eine verminderte extrazelluläre Matrix und damit auf ein vermindertes Narbengewebe schließen, da beide in erster Linie aus Kollagen aufgebaut sind. Die Färbungen mit dem matrixspezifischen Farbstoff Sirius-Rot 3fb bestätigte diese Vermutung. Weitere Untersuchungen mit Fluoreszenzfärbungen gegen Kollagen und Fibronectin verdeutlichten, dass beide Matrixproteine in den mit pUR4b behandelten Tieren weniger stark als in den fibrotischen Kontrollgruppen auftraten.

Dieses Resultat könnte eine direkte Folge des negativen Effekts von pUR4b auf die Bildung eines Fibronectinnetzwerks sein [316]. Bereits im Jahre 1979 schlugen Mosher *et al.* vor, dass Fibronectin als Gerüst für die Kollagenfaserbildung dient [96] und neuere Untersuchungen zeigten, dass die Anlagerung des Kollagens, der des Fibronectins räumlich und zeitlich nachfolgt [165]. Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass Fibronectin für den Aufbau einer Kollagenmatrix und damit einer extrazellulären Matrix benötigt wird [55, 362, 363, 404]. Auch viele andere Matrixproteine wie z.B. Fibrillin, Fibulin, latent TGF- β binding protein (LTBP) und Tenascin-C benötigen Fibronectin, um in die extrazelluläre Matrix eingebaut zu werden (siehe I.1.2.1.3.1.) [51-55]. Daher ist es wahrscheinlich, dass ein durch pUR4b gestörtes Fibronectinnetzwerk auch den Aufbau der extrazellulären Matrix stört. Da diese im Falle einer Leberfibrose als exzessives Narbengewebe das Krankheitsbild charakterisiert [395], könnte der fehlende Aufbau der überschüssigen extrazellulären Matrix das Krankheitsbild verbessern. Siegmund *et al.* [395] sehen es als Ziel der Fibroseforschung, das Voranschreiten der Bildung des Narbengewebes zu verhindern bzw. rückgängig zu machen.

Auch bei denjenigen Tieren, denen erst nach Ende der Fibrosebildungsphase pUR4b gegeben wurde, zeigten sich verminderte Kollagenablagerungen in den Lebern der Mäuse im Vergleich zu unbehandelten fibrotischen Tieren. Die Untersuchungen von Leberschnitten der mit pUR4b behandelten Tiere zeigten, verglichen mit denen fibrotischer Kontrollen, eine verminderte Färbung durch den Matrixmarker Sirius-Rot und eine schwächere Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen

und Fibronectin. Somit konnte gezeigt werden, dass eine bereits bestehende exzessive Matrix wieder abgebaut werden kann. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich der Umbau der extrazellulären Matrix. In einem gesunden Organismus erfolgen Abbau und Neusynthese der extrazellulären Matrix zeitgleich und genau geregelt, wodurch ein Gleichgewicht zwischen Matrixbildung und Matrixumbau entsteht [405]. Lange Zeit wurde eine Leberfibrose als statischer Prozess gesehen, eine Hypothese, die sich jedoch als falsch herausstellte, da gezeigt werden konnte, dass auch eine fortgeschrittene Leberfibrose potentiell reversibel ist [406]. Da das Peptid pUR4b den Aufbau eines Fibronectinnetzwerks beeinträchtigt, kann es eine Störung des Fibronectinnetzwerks nur dann hervorrufen, wenn dieses nicht statisch ist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass dieser Umbau auch dann noch möglich ist, wenn die Fibrose vor Behandlungsbeginn weit vorangeschritten ist, da zumindest bei manchen Lebererkrankungen ein Punkt erreicht werden kann, ab dem eine Regression der Fibrose nicht mehr möglich ist [160]. Bei der weiteren Zerstörung des Lebergewebes kommt es nämlich zu einer irreversiblen Knotenbildung (Zirrhose) und einer Veränderung der Vaskulatur, welche die Mikroarchitektur der Leber beeinflussen, so dass diese auch nach Abbau des fibrotischen Gewebes nicht mehr wiederhergestellt werden kann [199, 407, 408].

Da sich in den Gruppen, die während der Fibroseinduktion, und denjenigen, die erst nach der Fibroseinduktion mit Peptiden behandelt wurden, weitestgehend gleiche Ergebnisse zeigten, werden sie im Folgenden gemeinsam besprochen. In einigen Fällen, in denen speziell darauf hingewiesen wird, werden sie jedoch getrennt abgehandelt.

IV.1.2.2. Effekte des Peptids pUR4b auf den Gesundheitszustand der Tiere

Der Gesundheitszustand der Tiere ist nur schwer an äußeren Anzeichen auszumachen. Meist ist ein struppiges Fell, welches auf mangelnde Fellpflege zurückzuführen ist, ein Hinweis auf einen schlechten Allgemeinzustand. Da sich dies jedoch nicht in quantifizierbaren Daten ausdrücken lässt, wurde das Gewicht der Mäuse wöchentlich gemessen, protokolliert und ausgewertet. Der Gewichtsverlust während der Dauer der Fibroseinduktion ist ein deutliches Zeichen für eine Erkrankung der Tiere. In der Gruppe, bei der die Peptidbehandlung erst nach der Fibrosebildungsphase vorgenommen wurde, ist eine langsame Normalisierung des Gewichts nach der Beendigung der Fibroseinduktion zu beobachten. Das Gewicht ist jedoch kein eindeutiger Marker für den Gesundheitszustand der Tiere. Es könnte ebenso gut möglich sein, dass der Gewichtsverlust auf andere Wirkmechanismen der gegebenen Chemikalie zurückzuführen ist. Es wäre so z.B. möglich, dass diese eine Appetitlosigkeit bei den Tieren hervorruft und der Gewichtsverlust hierdurch zu erklären ist. Ein Hinweis hierfür wäre, wenn sich nach Absetzen des DMN über einen Zeitraum von zwei Wochen das Gewicht normalisieren würde, obwohl die Fibrose gleich bliebe.

Weiterhin wurde versucht, auch über den Albuminlevel im Blut der Tiere Rückschlüsse auf deren Gesundheitszustand zu ziehen, da die Albuminkonzentration durch eine Störung der Proteinsyn-

these der Leber erniedrigt sein kann [328]. Die Albuminwerte im Blut der Tiere, die während der Fibrose die Behandlung mit Peptid (bzw. entsprechend NaCl) erhielten, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu denen der fibrotischen Tiere und denen der gesunden Kontrollgruppe. Dies ist ein Anzeichen für eine leichte, noch nicht fortgeschrittene Leberfibrose [369], welche in diesem Ansatz erwünscht war. Die Albuminkonzentrationen der Tiere, die erst nach der Fibroseinduktion mit den Peptiden (bzw. entsprechend NaCl) behandelt wurden, wurden nicht analysiert, da auch in diesem Fall von einer moderaten Fibrose auszugehen war, und die Fibroseinduktion analog zur erstgenannten Gruppe verlief. Darüber hinaus beträgt die Halbwertszeit von murinem Albumin ca. ein bis zwei Tage [409-411], wodurch nach der zweiwöchigen Behandlungszeit mit Peptiden, in der keine Fibroseinduktion mehr stattfand, keine Unterschiede in den Albuminkonzentrationen im Blut der Tiere zu erwarten waren. Die Halbwertszeit von Albumin beim Menschen hingegen beträgt ca. 20 Tage [412], wodurch dieser Parameter beim Menschen eventuell besser dafür geeignet ist eine Aussage über die Leberfunktion zu treffen.

Eine bessere Evaluation des Gesundheitszustandes der Tiere könnte über verschiedene Serumparameter wie z.B. den Transaminasen AST und ALT erfolgen. Das Problem hierbei ist jedoch, dass eine automatisierte Verarbeitung der Proben zur Erhebung dieser Parameter relativ große Mengen an Blut benötigt, die man nur durch das Zusammenfügen des Serums mehrerer Tiere erhält und demnach entsprechend große Tiergruppen erforderlich wären.

IV.1.2.3. Effekte des Peptids pUR4b auf unterschiedliche Zellen in der Leber

IV.1.2.3.1. Effekte des Peptids pUR4b auf die entzündlichen Zellen

Die entzündlichen Zellen können die Entwicklung einer Leberfibrose beeinflussen. Insbesondere die Makrophagen der Leber, die sogenannten Kupfferzellen, sind Mediatoren einer Leberfibrose, da sie bei einer Schädigung des Leberparenchyms in den Dissé-Raum migrieren und daraufhin profibrotische Faktoren abgeben [180, 413-415]. Verschiedene Zytokine, im Speziellen TGF- β , durch dessen Bildung die Aktivierung der Stellatezellen, Matrix Synthese und Zellproliferation stimuliert werden kann, spielen hierbei eine wichtige Rolle [173]. Auch einwandernde inflammatorische Zellen geben profibrotische Zytokine ab [413] und können somit eine Fibrose beeinflussen.

Es zeigte sich, dass in den mit pUR4b behandelten Gruppen signifikant weniger entzündliche Zellen gefunden wurden, als in den anderen fibrotischen Gruppen. Grundsätzlich könnte dies eine Erklärung für die verminderte Matrixmenge bei den mit pUR4b behandelten Tieren sein, da somit weniger profibrotische Substanzen abgegeben und hierdurch weniger hepatische Stellatezellen aktiviert worden sein könnten. Die Zählung der aktivierten hepatischen Stellatezellen (siehe IV.1.1.2.2.) zeigte jedoch, dass deren Anzahl nicht beeinflusst war. Dies könnte als Hinweis dienen, dass die aktivierten Stellatezellen nicht ausschlaggebend für den Effekt des Peptids sind. Da

eine verminderte Anzahl von Kupfferzellen eventuell weniger TGF- β abgibt, könnte dies eine Erklärung für eine verminderte Kollagenablagerung in der Leber der pUR4b behandelten Tiere sein, da TGF- β den Aufbau von extrazellulärer Matrix erhöhen kann [416]. TGF- β greift nämlich in die transkriptionelle Regulation von Genen ein, die für die Produktion von Matrixkomponenten benötigt werden [417].

Es ist möglich, dass die verminderte Anzahl der entzündlichen Zellen nicht alleine auf die Makrophagen der Leber, sondern auch auf weitere Leukozyten zurückzuführen ist. Diese wandern nämlich zunächst durch eine integrinvermittelte Bindung an das Endothel der Leber ein [418, 419], ein Prozess, der durch das Fehlen einer intakten Fibronektinmatrix erschwert sein könnte. Der Erstkontakt mit dem Endothel ist bei Entzündungen unter anderem durch $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ Integrin vermittelt [420, 421], beides Zelloberflächenrezeptoren für Fibronektin (siehe Abbildung I.2.). Neben den Makrophagen sezernieren auch andere Leukozyten verschiedene profibrotische Faktoren wie z.B. TGF- β [422].

Es wäre somit interessant, die unterschiedlichen inflammatorischen Zellen genauer zu charakterisieren. Dies wäre weiterhin von Bedeutung, da Kupfferzellen, obwohl sie an der Vermittlung einer Fibrose beteiligt sind, auch antifibrotische Effekte ausüben können. Es konnte nämlich in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass Kupfferzellen Matrix-Metalloprotease 13 produzieren und dadurch in der Lage sind die extrazelluläre Matrix abzubauen [423]. Ein möglicher Einfluss des Peptids auf die Kupfferzellen ist in dem hier untersuchten Modell daher nicht auszuschließen.

IV.1.2.3.2. Einfluss des Peptids pUR4b auf die hepatischen Stellatezellen *in vivo*

Die hepatischen Stellatezellen sind hauptverantwortlich für die Ablagerung von Kollagen und den Aufbau fibrotischen Narbengewebes [424]. Aufgrund des verminderten Kollagengehalts und der verminderten Matrixmenge der mit pUR4b behandelten Tieren im Vergleich zu den anderen fibrotischen Gruppen, drängte sich daher die Frage auf, ob diese Gruppe überhaupt eine Fibrose induzierte, oder ob das Peptid pUR4b durch direkte oder indirekte Effekte die Aktivierung der hepatischen Stellatezellen und damit deren Fibronektin- und Kollagenproduktion beeinträchtigte.

Eine Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen gegen α -sma zeigte jedoch zwischen den verschiedenen fibrotischen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der α -sma positiven Zellen. Darüber hinaus wurden in allen fibrotischen Gruppen signifikant mehr aktivierte hepatische Stellatezellen gefunden als in den nichtfibrotischen Kontrolltieren, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die Fibroseinduktion funktionierte. Da bei den mit pUR4b behandelten Gruppen sowohl in den biochemischen Nachweismethoden als auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen geringere Kollagenmengen als in den anderen fibrotischen Gruppen gefunden wurden, weist dies darauf hin, dass der Kollageneinbau bei diesen Gruppen gestört ist und dieser Effekt von den hepatischen Stellatezellen unabhängig ist. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass

das Peptid pUR4b die aktivierten hepatischen Stellatezellen beeinflusst und diese dadurch nicht mehr in der Lage sind Kollagen zu produzieren. Diese Hypothese ließe sich durch einen *in vitro* Versuch überprüfen, bei dem die Kollagenexpression von sowohl aktivierten hepatischen Stellatezellen als auch mit pUR4b behandelten, aktivierten hepatischen Stellatezellen auf RNA Ebene bestimmt und daraufhin verglichen wird.

IV.1.2.3.3. Einfluss des Peptids PUR4b auf die Bildung einer Fibronektinmatrix durch hepatische Stellatezellen *in vitro*

Da gezeigt werden konnte, dass die Matrixproduktion bei den mit pUR4b behandelten Tieren geringer war als bei fibrotischen Tieren der anderen Gruppen, sollte die Reaktion der hepatischen Stellatezellen auf dieses Peptid *in vitro* untersucht werden. Der Gesamtfibronektin Gehalt der mit pUR4b behandelten hepatischen Stellatezellen war im Vergleich zu den mit III11c behandelten Kontrollzellen signifikant vermindert. Bei einer genaueren Untersuchung zeigte sich, dass diese Verminderung aus einer verringerten Deoxycholat löslichen sowie einer verminderten Deoxycholat unlöslichen Fraktion, also dem Fibronektin aus der Matrix, resultierte. Der Fibronektin Gehalt in den Medienüberständen der mit pUR4b behandelten Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen jedoch signifikant erhöht. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass das von den Zellen produzierte Fibronektin nicht in die Matrix eingebaut werden konnte. Fibronektin wird relativ schnell umgebaut [425] und kann innerhalb relativ kurzer Zeiträume von 8-24 Stunden aus dem Gewebe abgebaut werden [426]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fibronektin in den Zellen eine Halbwertszeit von ca. 3,47h [427] besitzt und die Halbwertszeit von Plasmafibronektin 21h beträgt [428]. Daher könnte der verringerte Gesamtfibronektin Gehalt darauf zurückzuführen sein, dass das von den Zellen sezernierte aber nicht in die Matrix eingebaute Fibronektin während der dreitägigen Kultivierungszeit katabolisiert wurde.

IV.1.2.3.4. Effekte des Peptids pUR4b auf das Zytokin TGF- β

Die Untersuchung von Leberlysaten zeigte, dass der Gesamtgehalt des TGF- β s in den Lebern der mit pUR4b behandelten Tiere im Vergleich zu den anderen fibrotischen Tieren signifikant vermindert war. Da der Großteil dieses Zytokins jedoch in einem Komplex in der extrazellulären Matrix gebunden und somit inaktiv vorliegt [429], wurde ebenfalls der Anteil des biologisch aktiven TGF- β s analysiert. Auch hiervon fanden sich in den Lebern der mit pUR4b behandelten Tiere geringere Anteile als in denen der anderen fibrotischen Tiere. Der verminderte Anteil des Gesamt und des aktiven TGF- β s könnte durch die im Vergleich zu den anderen fibrotischen Gruppen verminderte Anzahl der inflammatorischen Zellen erklärt werden, da diese unter anderem TGF- β als profibrotisches Zytokin abgeben. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die beeinträchtigte Fibronektinmatrix der mit pUR4b behandelten Tiere die Speicherung und Freisetzung des TGF- β s reduzierte. Fibronektin ist nämlich sowohl für die Bildung als auch für die Aufrechterhaltung des Komplexes, in dem TGF- β gespeichert wird, unerlässlich [52]. Auch für die Freisetzung

des aktiven TGF- β s ist Fibronectin von Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass hierfür eine Bindung des Komplexes an die extrazelluläre Matrix über $\alpha_v\beta_6$ benötigt wird [430].

Es ist somit möglich, dass aus der verminderten TGF- β Menge eine verminderte Regulierung der Smad und MAPK Signaltransduktionswege resultiert und diese letztendlich zu einer verminderten Kollagenproduktion führt. Unter anderem induziert TGF- β die Expression einer Fibronectin Spleißvariante mit der EDA Domäne [431, 432], die verantwortlich für die durch TGF- β ausgelöste Kollagen Typ I Produktion ist [433]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass TGF- β insbesondere in gebundener Form die extrazelluläre Matrixproduktion endothelialer Zellen verstärkt [416] und die Produktion von Proteaseinhibitoren stimuliert, die den enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) verhindern [417]. Darüber hinaus verhindert eine Inhibierung von TGF- β das Voranschreiten einer Leberfibrose, fördert die Regeneration von Hepatozyten [370] und erhält die Funktion der Leber aufrecht [434]. Es besteht somit die Möglichkeit, dass diese Effekte die Wirkung des Peptids pUR4b durch positive Rückkopplung verstärken. Je weniger Fibronectinmatrix in der Leber vorhanden ist, desto weniger Kollagen kann sich daran anlagern und desto geringer ist die Fibrose. Darüber hinaus bringt die durch pUR4b verringerte Fibronectinmatrix eine Verminderung der TGF- β Konzentration in der Leber mit sich, welche entweder auf einer verminderten Anzahl entzündlicher Zellen oder einer beeinträchtigten Speicherung und Freisetzung des TGF- β s beruht. Dies resultiert wiederum aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen in einer Verminderung der Schwere der Fibrose. Ergebnisse einer anderen Arbeit aus unserer Gruppe zeigten zwar eine verstärkte Leberfibrose bei der kombinierten konditionellen Ausschaltung des Fibronectins der Hepatozyten, der Endothelzellen und der hepatischen Stellatezellen, jedoch konnten Effekte in diesem Modell auf eine verstärkte Aktivierung der Stellatezellen zurückzuführen sein [193]. In unserem Modell jedoch führte die Gabe des Peptids pUR4b zu keiner Veränderung der Aktivierung der hepatischen Stellatezellen, sondern wurde von einer verminderten Anzahl entzündlicher Zellen begleitet. Daher ist es wahrscheinlich, dass beiden Modellen unterschiedliche Wirkmechanismen zu Grunde liegen.

Die Verminderung des exzessiven Matrixgewebes durch die Gabe des Peptids pUR4b konnte auch in einem Modell mit einer durch CCl₄ induzierten Leberfibrose an kleineren Gruppen beobachtet werden. Jedoch war dieser Effekt nur bei denjenigen Tieren signifikant, die während der Fibrosebildungsphase behandelt wurden. Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte des Peptids pUR4b von der Art der Fibroseinduktion zumindest teilweise unabhängig sind. Die Untersuchungen einzelner Zelltypen in diesem Modell zeigten, dass die Gabe von pUR4b zwar zu einer leichten Verminderung der entzündlichen Zellen führte, diese jedoch nicht signifikant war. Diese Beobachtung kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass beiden Modellen ein ähnlicher Wirkmechanismus zu Grunde liegt. Die Auswertung der aktivierten Stellatezellen der Tiere, die während der Fibroseinduktion mit pUR4b (bzw. NaCl) behandelt wurde, zeigte auch keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen, jedoch war ein Trend zu einer

verstärkten Anzahl dieser Zellen in den mit CCl_4 behandelten Tieren zu beobachten. Da die mit pUR4b behandelten Tiere diesen Trend nicht zeigten, ist somit nicht auszuschließen, dass das Peptid pUR4b in diesem Modell auch die Aktivierung der hepatischen Stellatezellen veränderte. Die Tiere, die erst nach der Fibrosebildungsphase mit pUR4b (bzw. NaCl) behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der aktivierten hepatischen Stellatezellen. Hieraus lässt sich schließen, dass die aktivierten Stellatezellen während der zwei Wochen der Peptidbehandlung, in denen keine schädigenden Effekte mehr auf die Leber einwirkten, wieder zu ihrem inaktiven Phänotyp zurückkehrten. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für den schwächeren (nicht signifikanten) Effekt des pUR4b auf die Verminderung des Matrixgewebes bei der Behandlung nach der Fibrosebildungsphase sein, da sich auch das Narbengewebe der fibrotischen CCl_4 Gruppe in dieser Zeit zurückgebildet haben könnte.

IV.1.3. Mögliche pharmakologische Nutzung des Peptids pUR4b

Es konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Matrix und insbesondere die Bildung einer Fibronektinmatrix für den Aufbau von Narbengewebe im Falle einer Leberfibrose benötigt wird. Das Peptid pUR4b konnte die Bildung von Narbengewebe erfolgreich vermindern und rückgängig machen, indem es die Bildung einer Fibronektinmatrix verhinderte.

Die meisten pharmakologischen Ansätze zur Prävention einer Leberfibrose versuchen die Entzündung zu vermindern, um dadurch den Aufbau der extrazellulären Matrix durch die hepatischen Stellatezellen zu verhindern [166, 180]. Unser Ansatz hingegen zeigt, dass auch ein von bestimmten Zelltypen unabhängiges Modulieren der extrazellulären Matrix eine Fibrose vermindern kann. Hervorzuheben ist außerdem, dass in diesem Ansatz die Fibrose vermindert werden konnte, obwohl eine fibroseinduzierende Substanz weiter auf den Organismus einwirkte. Da das pUR4b Peptid nur den Einbau des Fibronektins stört, wäre ausschließlich im Falle von Umbauprozessen der Matrix wie z.B. bei Wundheilungsprozessen mit schädigenden Nebenwirkungen zu rechnen. Diese könnten jedoch durch ein rechtzeitiges Absetzen der Peptidgabe verhindert werden.

IV.2. Der Einfluss der extrazellulären Matrix bei der Einnistung von Tumorzellen in die Stammzellnische im Knochen

IV.2.1. Das Metastasierungsmodell

Die Einnistung von Tumorzellen in den Knochen ist ein komplexer Prozess, für dessen Erforschung Tiermodelle benötigt werden [349]. Das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und lokaler Begebenheiten im Organismus kann *in vitro* nicht nachgeahmt werden. Daher sollte die Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere die des Matrixproteins Fibronektin auf die Einnistung von Tumorzellen bei Tumorerkrankungen in Tierversuchen geklärt werden.

Zurzeit gibt es verschiedene Modelle zur Untersuchung der Metastasierung *in vivo*. Man unterscheidet zwischen Transplantationen, bei denen die Tumorzellen und der Empfänger des Tumors (der Wirt) genetisch der gleichen Spezies angehören. In diesem Falle spricht man von syngenem Tumormodellen. Bei Xenograftmodellen hingegen gehören der Wirt und die Tumorzellen unterschiedlichen Spezies an. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass immundefiziente Tiere genutzt werden müssen, um eine Immun- und Abwehrreaktion, die zur Abstoßung der artfremden Zellen führen könnte, zu unterbinden. Hierdurch können als Folge kaum Aussagen über den Einfluss des Immunsystems auf den Metastasierungsprozess getroffen werden. Auf der anderen Seite ist das Extrapolieren von Erkenntnissen, die im syngenem Modell gewonnen werden, durch die Unterschiede des humanen und murinen Immunsystems kaum oder nur stark begrenzt möglich [435]. Der Vorteil von Xenograftmodellen liegt jedoch darin, dass man humane Tumorzellen in Mäuse übertragen und dadurch gewonnene Erkenntnisse leichter auf die Situation im Menschen beziehen kann.

In der hier vorliegenden Arbeit entschieden wir uns daher für das Xenograftmodell. Für die Xenotransplantation können die Zellen entweder intrakardial oder direkt in die Tibia oder den Femur injiziert werden. Auch können Zellen in das Fettpolster der Mamdrüse oder auf einem Träger implantiert werden [436, 437]. Da die Einnistung der Tumorzellen untersucht werden sollte, eignete sich die intrakardiale Injektion in das linke Herzventrikel, zumal ausschließlich in diesem Modell die Zellen direkt über die Blutzirkulation in das Zielorgan (das Knochenmark) gelangen. Die Tumorzellen passieren zunächst alle anderen Organe bevor sie zur Lunge gelangen. Dadurch minimiert diese Art der Zellapplikation die Filtration der Tumorzellen (Durchmesser ca. 20-30µm) durch die Lungenkapillaren (Durchmesser ca. 8µm) bei deren ersten Durchlaufen des murinen Kreislaufs [268]. Infolgedessen haben mehr Zellen die Möglichkeit das Knochenmark zu erreichen [376].

IV.2.2. Applikation der Tumorzellen

Zur Untersuchung der Einnistung der Tumorzellen wurden den Tieren eine definierte Anzahl dieser Zellen intrakardial appliziert. Die erfolgreiche Verabreichung der Zellen wurde durch die Biolumineszenzbildgebung bestätigt. Direkt nach der Injektion verteilen sich die Tumorzellen in der gesamten Maus, wobei Anhäufungen von Zellen in stark durchbluteten Organen wie Lunge, Gehirn, Leber, Milz und Nieren beobachtet werden konnten. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt noch in der Blutzirkulation des Tieres befinden und noch nicht in das Gewebe eingedrungen waren. 24 Stunden nach der Injektion waren keine Tumorzellen mehr nachzuweisen. Man geht davon aus, dass nach dieser Zeit die meisten Tumorzellen unter anderem durch Apoptose abgestorben sind [436, 438-440]. Es ist jedoch anzunehmen, dass nicht alle Tumorzellen zugrunde gehen, da sich nach einer längeren Zeitspanne Tumore entwickeln. Möglicherweise können einige dieser überlebenden Zellen nicht aufgefunden werden, da sie metabolisch inaktiv sind [436]. Darüber hinaus ist die Sensitivität der Biolumineszenzbildgebung begrenzt, so dass geringe Zellzahlen nicht detektiert werden können.

IV.2.3. Detektion der eingemisteten Tumorzellen

Zum Nachweis der verbliebenen humanen Tumorzellen verwendeten wir ein qPCR Modell, bei dem wir uns die hochrepetitive Alu Sequenz zunutze machten, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen (siehe II.4.3.7.). Dies war erforderlich, da die injizierten Tumorzellen den in der Maus vorkommenden murinen Zellen zahlenmäßig weit unterlegen waren. Zunächst sollte festgestellt werden, welche Menge an Tumorzellen injiziert werden musste, um diese in unserem Modell nachweisen zu können. Bei allen Tieren, denen Tumorzellen injiziert wurden, fanden sich, unabhängig von der applizierten Zellmenge signifikant mehr Zellen als bei Kontrolltieren. Wir entschieden uns für $0,1 \times 10^6$ Zellen für die weiteren Versuche, auch aufgrund der Tatsache, dass diese Anzahl in unserem Labor bereits für Versuche genutzt wurde [337] und die Ergebnisse somit besser vergleichbar waren. Weiterhin unklar war jedoch, welcher Zeitpunkt für die Untersuchung der Einnistung am geeignetsten war. Die eingemisteten Zellen wurden zu den Zeitpunkten 4h, 24h und eine Woche nach intrakardialer Injektion untersucht. Sowohl 4h als auch 24h nach der Injektion konnten humane Zellen nachgewiesen werden. Eine Woche nach der Injektion konnten jedoch nicht signifikant mehr eingemistete Zellen als bei gesunden Kontrolltieren gefunden werden, obwohl auch hier eine Erhöhung erwartet wurde. Darüber hinaus ist dieser Zeitpunkt für weitere Untersuchungen wahrscheinlich etwas zu spät gewählt, da intrakardial injizierte Zellen im Knochenmark nach etwa 72 Stunden beginnen zu proliferieren [376] und beobachtete Effekte daher eventuell nicht auf die Einnistung, sondern auf das darauf folgende Wachstum der Zellen zurückzuführen wären. Da es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der gefundenen Tumorzellen nach 4 und nach 24 Stunden gab, wählten wir aus logistischen Gründen für die weiteren Untersuchungen den Zeitpunkt 24h nach der intrakardialen Injektion. Die Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt Zellen gefunden wurden, bestätigt, dass diese Methode entweder sensitiver ist

als die Biolumineszenzmessung oder dass die nach 24h in der Maus verbliebenen Tumorzellen metabolisch inaktiv sind und daher ausschließlich mit der qPCR detektiert werden konnten.

IV.2.4. Lokalisation der Tumorzellen im Knochen

In den Epiphysen der Knochen wurden signifikant mehr Tumorzellen gefunden, als in den Diaphysen. Man geht davon aus, dass sich in diesen Bereichen des Knochens die hämatopoetischen Stammzellnischen befinden [248, 441]. Somit ist unser Modell dazu geeignet, die Einnistung von Tumorzellen in die Stammzellnischen zu untersuchen.

Eine Einnistung von Tumorzellen in diese Bereiche wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Die Metaphysen sind die trabekulären Bereiche der Knochen, in denen stärkerer Knochenumbau als in den kortikalen Arealen der Knochen stattfindet [442]. Besonders bei jungen Mäusen sind diese aktiven Remodelingprozesse stark ausgeprägt [436]. Hierdurch werden Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt, die chemotaktisch auf Tumorzellen wirken [273]. Auch die Osteoblasten, die in diesen Bereichen vermehrt auftreten, und auch die Zellen des Knochenmarks sezernieren Wachstumsfaktoren, Zytokine und chemotaktisch wirkende Faktoren [443, 444]. Dies, die starke Durchblutung [445] und die fenestrierten Sinusoide an diesen Stellen [446], im Gegensatz zu den durch Gefäße geprägten Blutfluss in den Diaphysen [376], könnten die Metastasierung in diese Knochenabschnitte begünstigt haben. Darüber hinaus ist die Blutflussrate in den Sinusoiden weniger als 10% im Vergleich zu derjenigen, die in Kapillaren oder anderen Gefäßen vorliegt [447]. Somit ist es für die Tumorzellen möglicherweise einfacher an das Endothel zu adhären, da sie nicht vom Blutstrom weitergerissen werden und zusätzlich schwächeren Scherkräften ausgesetzt sind.

IV.2.5. Der Einfluss der Ausschaltung des Fibronektins in verschiedenen Zelltypen und Organen auf die Einnistung von Tumorzellen

Verschiedene Gruppen konnten den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Einnistung von Tumorzellen in die Stammzellnische zeigen [131, 448]. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Umgebung der Stammzellnische modifiziert wird, noch bevor die Tumorzellen dort eintreffen. Primärtumore, aber auch zirkulierende Tumorzellen sezernieren hierbei Faktoren, die die Stammzellnischen modifizieren, um diese auf die Einnistung vorzubereiten [449]. Die so entstandene praemetastatische Nische zeichnet sich durch Veränderungen in der Zellpopulation aber auch durch eine veränderte Matrixzusammensetzung aus. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die durch den Tumor sezernierten Faktoren zu einer erhöhten Bildung der Matrixproteine Periostin, Tenascin-C und Fibronektin in der Nische führen, welche die Einwanderung verschiedener tumorassoziierter Zellen mit sich bringt [450-452]. Die Bedeutung der tumorassozierten Zellen wird beim Betrachten einer Studie ersichtlich, in der vor Kurzem gezeigt werden

konnte, dass Tumore durch die Regulation tumorassoziierte Zellen sogar in der Lage sind, den Knochenphänotyps zu beeinflussen [453].

Da eine Ausschaltung von Fibronectin auf Grund verschiedener Defekte wie z.B. einer gestörten Gefäßentwicklung zum Versterben der Embryos *in utero* führt, wurden konditionelle Knockout-Mäuse verwendet, deren Fibronectin Gen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren stand. Zur Untersuchung des Einflusses des Fibronectins auf die Einnistung von Tumorzellen wurden Tiere mit dem Alb-, mit dem Col- mit dem Mx- und dem Mx/Col-Promotor verwendet.

Zunächst sollte die Rolle des zirkulierenden Fibronectins auf die Einnistung untersucht werden, da zirkulierendes lösliches Plasmafibronektin in die extrazelluläre Matrix des Knochens eingebaut wird [57]. Hierzu wurde der Alb-Promotor verwendet, der in den Hepatozyten der Leber aktiv ist und daher das Fibronectin in der Zirkulation ausschaltet. Es konnte mit Hilfe eines ELISAs gezeigt werden, dass bei den Tieren mit Alb-Promotor das Fibronectin in der Zirkulation zu ca. 95% ausgeschaltet, das Fibronectin im Knochenmark jedoch nicht beeinträchtigt war. Mit Hilfe von Tieren mit dem Col-Promotor, der in Osteoblasten und Osteoklasten aktiv ist, sollte die Auswirkung der Ausschaltung des Fibronectins in diesen Zellen untersucht werden. Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass ca. 35-40% der Osteoblasten ausgeschaltet waren. Da der Mx-Promotor sowohl in der Zirkulation als auch im Knochenmark aktiv ist, wurde die Ausschaltung in der Zirkulation mit einem ELISA überprüft, der eine Ausschaltung von 92% ergab. Darüber hinaus wurde im Knochenmark eine Ausschaltung von ca. 85% erreicht, die mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden konnte. Auch wurde die Ausschaltung einzelner verschiedener Zelltypen des Knochenmarks mit der durchflusszytometrischen Analyse und für die Sinusoide und Endothelzellen auch mit Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt. Da der Mx-Promotor durch die Gabe von der synthetischen Doppelstrang RNA plpC (polyinosinic-polycytidylic acid) induziert wird, wurde deren Einfluss auf das Immunsystem mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse untersucht, um mögliche Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen. Diese konnte belegen, dass die plpC Injektionen keinen Einfluss auf das Immunsystem der Tiere haben. Die hierbei gefundene niedrige Anzahl der CD3⁺ Zellen ist eine Folge der Immuninsuffizienz der Tiere. Um die Ausschaltung der Zellen des Knochenmarks gegebenenfalls zu verstärken wurden Tiere mit Mx-Promotor mit Tieren mit Col-Pomotor verpaart, wodurch Mäuse mit einem Mx/Col-Promotor entstanden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Fibronectins keinen Einfluss auf die Einnistung von Tumorzellen in das Knochenmark hatte. Sowohl bei der Ausschaltung von Fibronectin in der Zirkulation (Alb), als auch bei der Ausschaltung von Fibronectin in den Osteoblasten/Osteozyten, als auch der von Fibronectin in Knochenmark und Zirkulation, als auch der in Knochenmark und Zirkulation und Osteoblasten/Osteozyten konnten keine signifikanten Effekte auf das Einnistungsverhalten der Tumorzellen gefunden werden. Da andere *in vivo* Experimente

unserer Arbeitsgruppe bei der Ausschaltung von Umgebungsfibronectin nach einigen Wochen eine geringere Tumorlast zeigten [146], ist es wahrscheinlich, dass dieser Effekt nicht auf einer verminderten Einnistung, sondern auf vermindertem Tumorwachstum bei eingeschränktem Umgebungsfibronectin beruht.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass bestehende Effekte übersehen wurden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Alb-Promotor das Fibronectin nur zu ca. 95% in der Zirkulation, der Mx-Promotor zu 92% in der Zirkulation und 85% in den Zellen des Knochenmarks und der Col-Promotor ca. 35-40% in den Osteoblasten ausschaltete. Eventuell gewährleistete das restliche, von den nicht ausgeschalteten Zellen gebildete Fibronectin eine erfolgreiche Einnistung.

IV.2.6. Einfluss des zellendogenen Fibronectins auf die Einnistung von Tumorzellen

Da auch die Tumorzellen selbst Fibronectin produzieren, sollte untersucht werden, ob tumorzellendogenes Fibronectin für eine erfolgreiche Einnistung in die Stammzellnische benötigt wird. Eine langfristige, stabile und konstante Ausschaltung dieses Proteins in den Tumorzellen wurde durch den Einsatz von RNA-Interferenz ermöglicht [337].

Die Ausschaltung der endogenen Fibronectinproduktion der Tumorzellen (MDA-KD) führte zu einer signifikanten Verminderung der Einnistung im Vergleich zu Kontrollzellen (MDA-CT). Damit konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Fibronectins der Tumorzellen einen Einfluss auf die Einnistung der Tumorzellen hat. Die Anzahl der eingenisteten Tumorzellen reduzierte sich bei der Ausschaltung des endogenen Fibronectins um ca. 70%. Dies stimmt mit anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe überein, in denen bei der Ausschaltung des tumorzeleigenen Fibronectins eine 70%ige Verringerung der Anzahl der induzierten Tumore gezeigt werden konnte [337]. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Beobachtung auf die verringerte Einnistung der Tumorzellen zurückzuführen ist.

Bei einem metastasierenden Primärtumor gelangen täglich bis zu über 1×10^7 Zellen in den Blutstrom, aber nur weniger als 0,1% hiervon sind in der Lage Sekundärtumore zu bilden [445]. Auch in diesem Modell sterben ein Großteil der Knockdown-Tumorzellen ab, bevor der zukünftige Ort der sekundären Metastase (in diesem Fall das Knochenmark) erreicht wird. Dies liegt unter anderem an auftretenden Scherkräften im Blutstrom und Einflüssen des Immunsystems (siehe I.1.2.1.4.2.). Eine starke Adhäsion der Tumorzellen an Komponenten der extrazellulären Matrix bzw. an Endothelzellen wäre somit vorteilhaft für das Überleben der Tumorzellen, die somit den schädigenden Einflüssen der Blutzirkulation entgehen könnten.

Die verminderte Einnistung der Tumorzellen, bei denen endogenes Fibronectin ausgeschaltet war, konnte jedoch *in vitro* nicht auf eine verminderte Adhäsion der Tumorzellen an extrazelluläre Matrixkomponenten zurückgeführt werden. Es zeigte sich vielmehr, dass ebendiese Zellen sogar stärker an Komponenten der extrazellulären Matrix adhärten, als Kontrollzellen. Auch an geladenen Oberflächen (Glas, Plastik) und an Endothel- und Knochenmarkzellen adhärten die Knockdown-Zellen stärker. Ausschließlich bei sehr hohen Mengen Kollagen (100µg/Vertiefung) adhärten die Zellen der MDA-KD Linie signifikant schlechter als Kontrollzellen. Dieser Effekt war jedoch bei einer Reduzierung der Kollagenkonzentration auf 1µg/Vertiefung nicht mehr zu beobachten. Um zusätzlich zu untersuchen, ob die KD-Zellen eine veränderte Adhäsionseigenschaft an Knochenmarkzellen zeigten, bei denen Fibronectin ausgeschaltet war, wurde die Adhäsion auf Knochenmarkzellen einer Mx-Maus durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine verstärkte Adhäsion der KD-Tumorzellen. Diese verstärkte Adhäsion kann teilweise auf die verstärkte eCadherin Expression der MDA-KD Zellen zurückgeführt werden.

Zirkulierende Tumorzellen bilden sowohl Aggregate mit anderen Zellen [125, 454] als auch mit Tumorzellen selbst [127, 128]. Diese Aggregatbildung kann zu einem Steckenbleiben der Tumorzellen in Kapillaren führen, wodurch die Extravasation erleichtert würde. Man geht davon aus, dass sich die Einnistung aus einer Mischung von aktivem Adhären der Tumorzellen an Gefäße und passivem Steckenbleiben der Tumorzellen in den kleinen Gefäßen zusammensetzt [455]. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Zellen der MDA-KD Linie vermindert im Knochenmark der Femora der Tiere gefunden wurden, da sie auf Grund ihrer gesteigerten Adhäsion und Aggregatbildung in der Lage gewesen sein könnten in anderen Organen verstärkt zu adhären bzw. steckenbleiben. Von besonderem Interesse sind hierbei stark durchblutete Organe, in denen mit Hilfe der Biolumineszenzmessung schon direkt nach der Injektion eine verstärkte Ansammlung von Tumorzellen beobachtet werden konnte.

In vivo Untersuchungen zeigten jedoch, dass nach einer Zeitspanne von vier Stunden nach intrakardialer Injektion weniger Zellen der MDA-KD Linie als Zellen der MDA-CT Linie in Knochenmark, Leber, Milz und Niere, gefunden werden konnten, obwohl die gleiche Anzahl an Zellen injiziert worden war und dass bei beiden Zelllinien im Knochenmark weniger Zellen gefunden wurden als in den anderen Organen. Dies weist daraufhin, dass zu den frühen Zeitpunkten der Einnistung ein Großteil der Tumorzellen in diesen stark durchbluteten Organen [386] steckenbleibt und nur wenige in dem schwächer durchbluteten Knochenmark. Es ist wahrscheinlich, dass die Tumorzellen, die fast ausschließlich Metastasen in den Knochen bilden, in den anderen Organen keine längeren Zeitspannen überleben können. Trotzdem konnte hierdurch nicht erklärt werden, warum die Anzahl der gefundenen MDA-KD Zellen geringer war als die der MDA-CT Zellen. Bei weiteren Untersuchungen dieses Sachverhalts konnte gezeigt werden, dass direkt im Anschluss an die intrakardialen Injektionen (5 Minuten danach) die Zellen der MDA-KD Linie verstärkt an die Zellen des Immunsystems adhärten. In der Leber konnten signifikant mehr KD-Zellen, die mit

den Zellen des Immunsystems assoziiert waren, gefunden werden, als KD-Zellen, die mit Zellen der immunzellfreien Fraktion zusammenhingen. Im Knochenmark jedoch konnten diese Ergebnisse mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse nicht nachgewiesen werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die durchflusszytometrische Analyse zum Detektieren dieser Effekte zu ungenau ist, zumal mit der sensitiveren Alu qPCR Methode auch hier signifikant mehr MDA-KD Zellen, die mit dem Immunsystem assoziiert waren, als KD-Zellen, die mit anderen Zellen des Knochenmarkts assoziiert waren, gezeigt werden konnten. Die Zellen der MDA-CT Linie assoziierten sich hingegen in keinem untersuchten Organ signifikant verstärkt mit den Zellen des Immunsystems. Die Milz war das einzige Organ, in dem sich MDA-KD Zellen stärker mit Zellen der immunzellfreien Fraktion als mit Immunzellen assoziierten. Hier waren nur ca. 45% der MDA-KD Zellen mit Immunzellen assoziiert, jedoch lag dieser Wert bei den MDA-CT Zellen nur bei ca. 28%. Aufgrund der verstärkten Assoziation der MDA-KD Zellen mit den Zellen des Immunsystems kann davon ausgegangen werden, dass die MDA-KD Zellen verstärkt zerstört werden. Dies würde erklären, weshalb bereits 4 Stunden nach der Injektion in allen untersuchten Organen weniger MDA-KD Zellen als MDA-CT Zellen gefunden wurden.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass eine verstärkte eCadherin Expression von MDA-MB-231 Zellen zu einer verringerten Bildung osteolytischer Metastasen führt [273] und eine verringerte Expression mit einem erhöhten Invasionspotential von Brustkrebs korreliert [456]. Die Gründe hierfür sind jedoch weitestgehend unbekannt. Es wird überlegt, ob dieser Effekt auf einer verstärkten Zell-Zell Adhäsion der Tumorzellen beruht [457]. Die in dieser Arbeit gefundenen Effekte unterstützen diese Hypothese. Jedoch ist die Ursache dieses Zusammenhangs noch unklar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen der MDA-MB-231 Linie mehr eCadherin exprimieren, wenn sie nicht mehr in der Lage sind eigenes Fibronectin zu bilden. Diese Erkenntnis wird dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass die eCadherin Expression negativ von Fibronectin beeinflusst wird [458].

In einer weiteren von uns durchgeführten Untersuchung der Immunzellen zeigte sich, dass für deren verstärkte Bindung an Tumorzellen weder Nk-Zellen noch Makrophagen verantwortlich waren. Ein weiterer Zelltyp der untersucht werden sollte, sind die dendritischen Zellen. Es gibt nämlich Hinweise darauf, dass dendritische Zellen Integrin $\alpha_E\beta_7$ exprimieren, welches mit eCadherin und dadurch auch mit eCadherin exprimierenden Tumorzellen interagiert [459]. Auf dem gleichen Wege sind auch T-Zellen in der Lage eCadherin exprimierende Tumorzellen zu erfassen und zu beseitigen [459]. Da in unserem Modell jedoch athymische Nacktmäuse verwendet wurden, ist der Einfluss der T-Zellen in dieser Untersuchung nicht repräsentiert.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die Ausschaltung von dem endogenen Fibronectin zu einer verminderten Einnistung von Tumorzellen in das Knochenmark führt. Dies ist

wahrscheinlich auf eine verstärkte Interaktion mit Immunzellen zurückzuführen, die die Tumorzellen eventuell über eine eCadherin - $\alpha_E\beta_7$ Bindung erfassen und beseitigen.

Darüber hinaus sind diese Untersuchungen ein Beispiel dafür, dass *in vitro* gewonnene Daten nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen werden können. Obwohl die Zellen der MDA-KD Linie *in vitro* verstärkt an verschiedenen Oberflächen adhärirten, wurden *in vivo* weniger adhärirte Zellen in den Organen gefunden. Im lebenden Organismus werden Vorgänge wie die Einnistung von Tumorzellen von einer Reihe verschiedener Faktoren wie z.B. dem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und den Einflüssen des Immunsystems beeinflusst, die sich *in vitro* kaum und nur unzureichend nachahmen lassen.

IV.2.7. Der Einfluss eines Hämatoms auf die Einnistung von Tumorzellen und die Entwicklung von Tumorerläsionen

Die hämatopoetische Stammzellnische verlagert ihre Position im Organismus während der Entwicklung mehrfach. Zunächst befindet sie sich im Dottersack, wandert dann in die Leber und verlagert ihre Position kurz vor der Geburt in das Knochenmark [460]. Diese Migration in eine Umgebung, die ihre Einnistung, ihre Wiederbesiedelung und ihre Selbsterneuerung unterstützt, führte zu der Hypothese, dass Tumorzellen, die in das Knochenmark metastasieren diesen etablierten Weg der Einnistung der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) imitieren. So konnte nachgewiesen werden, dass Brust- und Prostata- Krebszellen für ihre Einnistung die gleichen Chemokingradienten nutzen wie HSCs [461-463]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellen, die aus metastatischen Läsionen isoliert wurden, Rezeptoren für Annexin II gefunden wurden. Dieses Protein wird von Osteoblasten und Endothelzellen exprimiert und reguliert die Adhäsion, die Einnistung und das Anwachsen der HSCs [464].

Die Schädigung von Gewebe führt in vielen Organen zu einem Ansteigen der Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen, welche nachweisbare Effekte auf die Migration und Wiederbesiedelung durch Stammzellen haben [465]. Auf Grund der Parallelen zwischen der Einnistung der Stammzellen und der der Tumorzellen liegt der Gedanke nahe, dass eine Verletzung auch die Einnistung von Tumorzellen beeinflussen könnte. Im Falle einer Fraktur entwickelt sich ein Hämatom, in dem die Gerinnungskaskade aktiviert wird. Der Thrombus besteht hauptsächlich aus Thrombozyten, Leukozyten, einem Netzwerk aus Fibronectin und Fibrinogen [93, 94] und beinhaltet verschiedene Proteine der terminalen Gerinnungskaskade wie z.B. Thrombin und Faktor XIII. Thrombozyten produzieren stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) [288], das vermutlich die Einnistung von Stammzellen und Krebszellen im Knochenmark vermittelt [461]. Auch Fibronectin, das in der praemetastatischen Nische hochreguliert ist, erleichtert Tumorzellen die Einnistung in diese [450]. Darüber hinaus unterstützen die Proteine Thrombin, Faktor XIII und Fibrinogen den Metastasierungsprozess [290-292].

Somit beeinflusst die Bildung eines Hämatoms im Knochenmark die lokale Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und der Stammzellnische. Daher wurde untersucht, wie die durch ein Blutgerinnsel hervorgerufenen Veränderungen die Etablierung oder das Wachstum von Tumoren *in vivo* beeinflussen. Veröffentlichungen zu diesem Sachverhalt gibt es bisher nicht. Jedoch liegen Beobachtungsberichte vor, welche die Vermutung aufwerfen, dass die Gerinnselbildung die Etablierung von Tumoren erleichtert [466]. Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass einzelne Proteine, die in einem Blutgerinnsel vorkommen, die Tumorbildung unterstützen [288, 290-292, 450].

IV.2.7.1. Die Hämatominduktion

Für die Bildung eines Hämatoms wurde die intratibiale Bohrung gewählt. Diese Methode hatte im Vergleich zu der gezielten Fraktur eines Knochens der Tiere mehrere Vorteile. Zunächst ist die Belastung für die Tiere bei einer intratibialen Bohrung wesentlich geringer, da der Knochen nur partiell verletzt wird. Desweiteren wären durch das Brechen der Knochen Komplikationen wie ein Splittern der Knochen nicht ausgeschlossen. Neben einer starken Belastung der Tiere würde dies auch zu einer schlechten Reproduktion der Versuche führen. Obwohl verhältnismäßig genaue Geräte zum akkuraten Brechen von murinen Knochen existieren und diese eine hohe Reproduzierbarkeit versprechen, treten hierbei verschiedene Bruchtypen auf. Überdies kann mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10% der Bruch irrtümlich in einem nicht erwünschten Bereich des Knochens liegen [467]. Da durch die Nutzung der intratibialen Bohrung auch Vergleiche zu Tumormodellen gezogen werden können, bei denen die Tumorzellen intratibial injiziert werden, entschieden wir uns für dieses Modell. Ein weiterer Vorteil dieses Modelles bestand darin, dass durch das Ausspülen des Knochenmarks eine Verletzung dieses Organs sichergestellt werden konnte.

Die histologischen Untersuchungen zeigten bereits 5 Minuten nach der Intervention eine deutliche Hämatombildung im Knochenmark in der Region zwischen den Bohrungen.

IV.2.7.2. Der Einfluss eines Hämatoms auf die Einnistung von Tumorzellen

Die Analyse der quantitativen PCR zeigte, dass in den rechten Tibiae, in denen kein Blutgerinnsel entstanden war, ebenso viele Tumorzellen waren, wie in den linken, bei denen sich ein Hämatom gebildet hatte. Somit konnte belegt werden, dass das Hämatom keine Auswirkungen auf die Einnistung von Tumorzellen hatte und sich eine Zerstörung der Knochenmarkarchitektur nicht negativ auf die Einnistung von Tumorzellen auswirkt. Daher könnte angenommen werden, dass die Einnistung von Tumorzellen weniger von bestimmten Zelltypen der Nische sondern vielmehr von den Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der Umgebung abhängig ist. Es ist allerdings durchaus möglich, dass in der Region der Blutgerinnsel ein erhöhter Gehalt an chemotaktisch wirkenden Substanzen (wie z.B. SDF-1, siehe oben) vorlag, der einen möglichen Effekt durch die Zerstörung der normalen Architektur des Knochenmarks ausgeglichen haben könnte.

IV.2.7.3. Der Einfluss eines Hämatoms auf das Tumorwachstum

Um im Weiteren zu untersuchen, ob die durch das Hämatom veränderte Knochenmarkumgebung einen Einfluss auf das Wachstum von Tumoren ausübte, wurde die Tumorentwicklung mit Hilfe der Biolumineszenzmessungen longitudinal beobachtet und ausgewertet. Diese Methode ist für die *in vivo* longitudinale Beobachtung und Evaluierung von Tumorzellen in Mäusen geeignet. Das mit einer Wellenlänge von 530-640nm emittierte Licht der Tumorzellen ist in der Lage mehrere Zentimeter Gewebe zu durchdringen [468], weshalb auch Tumore im Knochen beobachtet werden können.

Ein Teil der eingenisteten Zellen kann metabolisch inaktiv im Organismus verbleiben [268, 469], apoptotisch absterben [440] oder durch das Immunsystem des Wirts zerstört werden [268]. Auch Mikrometastasen (mit einer Größe von weniger als 1mm³) können in einem inaktiven Zustand verbleiben bzw. wieder absterben [469]. Daher bestand die Möglichkeit, dass sich in der Gruppe mit dem Hämatom durch den Einfluss verschiedener Zytokine und Proteine der Gerinnungskaskade unterschiedlich viele der eingenisteten Zellen zu Tumoren entwickelten.

Die vorliegende Arbeit konnte jedoch belegen, dass sich in der Gruppe mit Hämatombildung durchschnittlich in etwa gleich viele Tumore bildeten wie bei den Kontrolltieren. Weiterhin bildeten die Tiere mit Hämatombildung an der Stelle des Blutgerinnsels nicht signifikant mehr Tumore als Kontrollen ohne Blutgerinnsel an einer vergleichbaren Stelle. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bildung eines Blutgerinnsels keinen Einfluss auf die spätere Bildung einer Sekundärmetastase hat. Die longitudinale Auswertung der Daten zeigte, dass das Hämatom weiterhin keinen Einfluss auf die Tumorgöße und die Geschwindigkeit des Tumorwachstums ausübte. Dies kann jedoch auch darauf zurück zu führen sein, dass die Blutgerinnsel bis zur Bildung der Metastasen schon bereits vollständig aufgelöst sind [470].

IV.2.7.4. Bestätigung der Biolumineszenzdaten durch eine radiographische Analyse

Die radiographische Analyse wurde nicht zur Evaluierung der Tumoranzahl genutzt, sondern zur Bestätigung der Ergebnisse der Analyse der Biolumineszenzbildgebung. Die Auswertung der Röntgenbilder lässt nämlich nur Rückschlüsse auf die durch die Tumore verursachte Osteolyse zu, dokumentiert jedoch im Gegensatz zur Biolumineszenzbildgebung nicht die eigentliche Tumorbilastung [471]. Die Analyse dieser Daten wurde in Woche 7 durchgeführt, da die Osteolyse erst in den späten Phasen der Tumorentwicklung radiologisch detektiert und ausgewertet werden kann [356]. Die Osteolyse tritt als Folge der von Tumorzellen sezernierten osteoresorptiven Zytokinen auf und ist bei kleineren Tumoren radiographisch nicht zu erkennen. Die radiographische Analyse der Tiere zeigte jedoch, dass in beiden Gruppen gleichgroße Flächen der Knochen durch Osteolyse betroffen waren. Dies bestätigt die Daten, die durch die Biolumineszenzmessungen erhalten worden waren, da die Fläche der osteolytischen Läsionen zumindest bei größe-

ren Tumoren Rückschlüsse auf die Größe des Osteolyse verursachenden Tumors zulässt. Weiterhin kann somit ausgeschlossen werden, dass die Tumorzellen im Laufe der Zeit ihre Luziferase Aktivität verloren und dadurch eine geringere Biolumineszenz aufwiesen.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass die Bildung eines Blutgerinnsels die Einnistung von Tumorzellen nicht begünstigt und das spätere Wachstum nicht beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass eine Fraktur und die daraus resultierende Hämatombildung die Wahrscheinlichkeit einer neuen Metastasenbildung nicht erhöht. Damit widerspricht dieses Ergebnis beobachteten Einzelfällen beim Menschen [466].

IV.2.8. Der Einfluss einer pharmakologischen Modifikation der osteoblastischen Nische auf die Einnistung von Tumorzellen

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die osteoblastische Nische aktiviert werden, um herauszufinden, ob und wie diese Nische die Einwanderung und Besetzung von Tumorzellen in das Knochenmark beeinflusst. Um dies zu erreichen wurden die Mäuse mit Parathormon behandelt [472]. Da Parathormon zusammen mit anderen Hormonen auch für die Steuerung der Fibronektinproduktion verantwortlich ist, kann die Gabe dieses Hormons zu einer gesteigerten Fibronektinbildung führen [388]. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass PTH die Fibronektinproduktion von Osteoblasten in Zellkultur erhöht [473]. Andere Gruppen fanden in *in vitro* Versuchen, dass Chondrozyten ihre Fibronektin und Kollagenproduktion als Antwort auf eine Parathormongabe erhöhten [474]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Parathormon bei ovariectomierten Tieren zu einer Erhöhung der Konzentration des zirkulierenden Fibronektins führte [475]. Eine Parathormonbehandlung kann jedoch auch ungewollt zu einer Aktivierung der Osteoklasten führen [346] und es gibt Hinweise darauf, dass aktive Osteoklasten durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren begünstigend auf die Tumorbildung im Knochenmark wirken [476, 477]. Um dieser Aktivierung der Osteoklasten entgegen zu wirken wurden die Mäuse zusätzlich mit Zoledronsäure behandelt, welche zu einer Inaktivierung der Osteoklasten führt [301, 478]. Das Endergebnis sollte eine reine Aktivierung der osteoblastischen Nische sein, womit die Rolle dieser Nische bei der Metastasierung von Tumorzellen in das Knochenmark geklärt werden sollte.

Da die beiden verwendeten Substanzen bereits in der Behandlung von Osteoporose (PTH und Zoledronsäure [479]) oder Krebskomplikationen (Zoledronsäure [480]) beim Menschen klinische Anwendung finden, könnten außerdem Erkenntnisse über eine gleichzeitige Anwendung dieser zugelassenen Medikamenten bei Krebspatienten gewonnen werden.

IV.2.8.1. Die Lokalisation der eingestueteten Zellen im Knochen

Im Knochenmark wurden insgesamt signifikant mehr eingestuetete Tumorzellen gefunden als am Knochen. Dies könnte darauf hin deuten, dass die in diesem Teil der Arbeit untersuchten Effekte

eventuell gar nicht in der osteoblastischen Nische, die sich am Endosteum befindet, stattfinden, sondern in der vaskulären Nische, die weiter im Knochenmark vermutet wird. Weiterhin könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die endosteale und die vaskuläre Nische zwei unterschiedliche Entitäten darstellen. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass dieses Ergebnis eine Folge der Knochenpräparation ist. Es ist stark anzunehmen, dass beim Ausspülen des Knochenmarks nicht nur Zellen der vaskulären Nische, sondern (zumindest teilweise) auch Zellen der endostealen Nische mit ausgespült wurden. Daher könnten die nach dem Ausspülen an den Knochen verbliebenen Zellen eventuell Zellreste von Zellen der endostealen Nische darstellen, ohne jedoch die gesamte Nische zu repräsentieren. Mit Hilfe serieller Schnitte und einer entsprechenden Färbung der Tumorzellen wäre es möglich gewesen diese Frage ausreichend zu klären. Da aber im Vergleich zu den Knochenmarkzellen nur sehr wenige Tumorzellen im Knochen vorhanden sind, wäre ein solches Vorgehen sehr arbeits- und zeitintensiv.

IV.2.8.2. Effekt des Parathormons auf die Einnistung von Tumorzellen

Die Behandlung der Tiere mit Parathormon führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Verminderung der Einnistung von Tumorzellen. Die osteoanabole Wirkung des Parathormons beruht auf einer Erhöhung der Osteoblastenzahl [481] (siehe I.3.3.1.1.) und es konnte gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen Tumorzellen und den Zellen der osteoblastischen Nische die maligne Entwicklung von Tumoren beeinflussen [482]. Shiozawa und Kollegen konnten nachweisen, dass eine mehrwöchige Gabe von Parathormon die Anzahl hämatopoetischer Stammzellnischen erhöht [247, 483] und somit indirekt zu einer erhöhten Anzahl einnistender Tumorzellen führt [280]; eine Verkleinerung der Nische hingegen verminderte die Disseminierung von Tumorzellen. Daher war unser Ergebnis zunächst überraschend. Im Gegensatz zu unserem Ansatz, in dem die eingemisteten Zellen 24 Stunden nach der intrakardialen Injektion untersucht wurden, nutzte die Gruppe um Shiozawa in ihrem Versuch einen Aufbau, bei dem die Tumorzellen von einem Primärtumor aus disseminierten. Die eingemisteten Tumorzellen wurden erst drei Wochen nach Implantation des Primärtumors untersucht. Es ist daher möglich, dass das Parathormon in diesem Modell ein beschleunigtes Wachstum oder eine stärkere Metastasierung des Primärtumors bewirkte, wodurch nach dem Ablauf der drei Wochen vermehrt Tumorzellen in den Knochen gefunden werden konnten. Darüber hinaus erfolgte in dem hier vorgestellten Modell die Parathormongabe über einen wesentlich kürzeren Zeitraum von vier Tagen, und es besteht die Möglichkeit dass dieser Zeitraum für eine Verminderung der Einnistung nicht ausreicht. Es gibt nämlich Hinweise darauf, dass die Knochenbildung bereits differenzierter Osteoblasten durch die Gabe von PTH nicht erhöht wird [484]. Weil aber die Ausdifferenzierung neuer Osteoblasten ca. 3-6 [485] Tage benötigt und antiapoptotische Effekte bei der durchschnittlichen Lebenszeit eines Osteoblasten von 10-12 Tagen [486, 487] eventuell auch erst nach längerer Zeit ersichtlich werden, ist es möglich, dass die osteoanabolen Effekte aufgrund der Kürze der PTH Gabe in unserem Modell nicht erreicht wurden. Diese Überlegung wird dadurch unterstützt, dass sich die Knochendichte der mit Parathormon behandelten Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren nicht signi-

fikant unterschied und die tägliche Gabe von Parathormon im Grunde zu einer Steigerung der Knochenbildung und der Knochenmasse führen sollte [488]. Der ausbleibende Anstieg der Knochendichte könnte jedoch auch dadurch erklärt werden, dass sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten stimuliert wurden. Somit könnte das Parathormon zwar osteoanabolisch gewirkt haben, dieser Effekt jedoch durch eine stärkere resorptive Wirkung der Osteoklasten überschattet worden sein.

IV.2.8.3. Effekt der Zoledronsäurebehandlung auf die Einnistung von Tumorzellen

Die Behandlung mit Bisphosphonaten ist seit einigen Jahren eine gängige Therapieoption bei Knochenmetastasen [489]. Das Hauptziel dieser Therapie ist, durch die Inhibierung der Osteoklasten, die Zerstörung der Knochen zu vermindern und die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu steigern [480]. Hierbei wird der Nährboden („soil“) modifiziert, die Tumorzellen („seeds“) jedoch nicht beeinflusst [268].

Der Erfolg der Zoledronsäurebehandlung ließ sich durch radiographische und pQCT Analysen bestätigen, in denen ein signifikanter Anstieg der Knochendichte der mit ZOL behandelten Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren und mit PTH behandelten Tieren beobachtet werden konnte. Somit ist die verminderte Knochendichte vermutlich auf eine verminderte Knochenresorption zurückzuführen. Es wird überlegt, ob Tumorzellen aufgrund der aus der verringerten Resorption resultierenden geringeren Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine weniger günstige Umgebung für ihre Ansiedlung finden [390]. Man hat herausgefunden, dass Bisphosphonate auch die Oberflächen der Knochenmatrix und damit das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen an diese *in vitro* vermindern [490] bzw. verhindern [391] können. Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Zoledronsäure auch die Tumorzellen negativ beeinflusst, indem sie deren Proliferation vermindert und deren Apoptose induziert [491, 492]. Andere Gruppen beobachteten, dass die Gabe von Zoledronsäure, vor der Induktion einer Tumorerkrankung im Mausmodell, zu einer Verminderung der Metastasenbildung führt. Bei bestehenden Metastasen konnte eine Verminderung des Voranschreitens der Osteolyse und eine Inhibierung des Voranschreitens bestehender Läsionen beobachtet werden [359, 493].

Daher ist es überraschend, dass in der Gruppe der mit Zoledronsäure behandelten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nur eine leichte (nicht signifikante) Verminderung der Einnistung der Tumorzellen gesehen werden konnte. Bei einer bestehenden Metastase können die Effekte der Zoledronsäure zum Teil jedoch auf deren antiangiogene Wirkung [494-496] zurückgeführt werden. Durch eine fehlende Versorgung des Tumors mit Blut bzw. Nährstoffen, wird dieser in seinem Wachstum eingeschränkt, wodurch die Weiterentwicklung eines bestehenden Tumors verhindert wird. Auch die Verminderung der Metastasenbildung durch Bisphosphonatgabe vor der Tumorinduktion kann durch diesen Effekt erklärt werden. In unserem Experiment wird jedoch

die Einnistung zu einem Zeitpunkt untersucht, an dem die Vaskularisierung noch keine Rolle spielt, da die Zellen noch nicht proliferieren. In den Modellen, bei denen die Verminderung der Metastasenbildung durch Bisphosphonate beobachtet wurde, geschah dies anhand von Biolumineszenzmessungen [359] oder radiographischen Analysen bzw. histomorphometrischen Untersuchungen (an Tag 22 bzw. 28 nach Tumoringjektion) [493, 497]. Dadurch wird die Anzahl der Tumore erst zu einem späteren Zeitpunkt (bei bereits entstandenem Tumor) evaluiert und hiermit Rückschlüsse auf die Einnistung gezogen. In einem solchen Modell wird übersehen, dass eine kleinere Anzahl an Tumoren im Vergleich zu Kontrollen von der tatsächlichen Einnistung unabhängig sein könnte. Es wäre möglich, dass sich wie von uns beobachtet, in etwa gleich viele Zellen in den Kontrollen und den mit Zoledronsäure behandelten Tieren einnisten. Da ZOL jedoch einen antiangiogenen Effekt ausübt, besteht die Möglichkeit, dass sich bei der mit ZOL behandelten Gruppe nur weniger Tumore von über 1mm^3 entwickeln, da sie ab dieser Größe nur durch eine Neuvaskularisation, die die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet, weiter wachsen können [498, 499]. Somit ist es möglich, dass die durch die reduzierte Knochenresorption verminderte Freisetzung von tumorfördernden Substanzen nur eine geringere Rolle in der Entwicklung der Tumore spielt, und die fehlende Vaskularisierung hauptverantwortlich für dieses Phänomen ist. Dieser Zusammenhang könnte in einem weiteren Experiment untersucht werden, in dem die Gabe von Zoledronsäure von einer gleichzeitigen Gabe vaskularisierungsfördernder Substanzen begleitet wird. Sollten sich bei den mit ZOL und vaskularisierungsfördernden Substanzen behandelten Tieren keine Unterschiede zu den Kontrollen, aber eine im Vergleich zu ausschließlich mit Zoledronsäure behandelten Tieren verminderte Metastasenbildung zeigen, wäre dies ein noch stärkerer Hinweis, dass der antimetastatische Effekt der Zoledronsäure nicht auf eine verminderte Einnistung von Tumorzellen, sondern auf die verminderte Vaskularisierung zurückzuführen ist.

Darüber hinaus fördert Zoledronsäure die Immunantwort durch T-Zellen [500] und mögliche antimetastatische Effekte könnten auch durch das Immunsystem bedingt sein. Da die hier verwendeten athymischen immuninsuffizienten Mäuse keine reifen T-Zellen besitzen, ist es möglich, dass das Mausmodell in diesem Falle einige Effekte nicht widerspiegelt und daher nicht auf die Situation im Menschen extrapoliert werden sollte.

IV.2.8.4. Effekt der Kombination aus Parathormon und Zoledronsäure auf die Einnistung von Tumorzellen

Die Untersuchung der Einnistung von Tumorzellen bei der Gruppe die mit einer Kombination aus PTH und ZOL behandelt wurde, zeigte, dass sich bei diesen signifikant mehr Tumorzellen im Knochen einnisteten als bei denen, die nur mit PTH oder nur mit ZOL oder gar nicht (CT) behandelt wurden. Da die Analyse der alleinigen Anwendung der beiden Medikamente keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der eingnisteten Tumorzellen erzeugte, konnte dieses Ergebnis nur als synergetischer Effekt beider Medikamente interpretiert werden. Insbesondere,

da die Untersuchung des Knochens zeigte, dass die Substanzen die erwartete Wirkung ausübten. Die radiographische Analyse der Knochen zeigte nämlich eine sichtbar höhere Knochendichte dieser Gruppe, im Vergleich zu der Kontrollgruppe oder der mit PTH behandelten Gruppe. Diese Beobachtung konnte durch die Untersuchung der Knochendichte mit Hilfe der pQCT bestätigt werden.

Da in erster Linie geklärt werden sollte, weshalb die kombinierte Gabe von Parathormon und Zoledronsäure zu einer erhöhten Einnistung von Tumorzellen geführt hatte, wurden die Knochen der Tiere dieser Gruppe zunächst histomorphometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass die Tibiae dieser Mäuse eine signifikant größere mineralisierte Oberfläche aufwiesen als die der unbehandelten Kontrolltiere. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dies auf eine verstärkte Aktivität der Osteoblasten zurückzuführen war.

IV.2.8.4.1. Die Auswirkungen der kombinierten Gabe von PTH und ZOL auf die Fibronektin- und Zytokinumgebung des Knochenmarks

Eine Analyse des Fibronektin Gehaltes im Knochenmark der mit der Kombination aus PTH und ZOL behandelten Tiere und der Kontrolltiere ergab, entgegen unserer Erwartungen, keine signifikanten Unterschiede. Es ist daher wahrscheinlich, dass PTH die Fibronektinkonzentration erst bei einer längeren Behandlungsdauer beeinflusst.

Da Osteoblasten auch Zytokine produzieren [501], die die Einnistung von Tumorzellen beeinflussen können und sowohl Parathormon [502, 503] als auch Zoledronsäure [478] Auswirkungen auf die Expression einiger Zytokine haben, welche die Einnistung von Stammzellen und Tumorzellen begünstigen könnten wurde die Zytokinumgebung des Knochenmarks untersucht.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass einige Zytokine im Knochenmark der mit der Kombination aus PTH und ZOL (PTH/ZOL) behandelten Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren verändert waren. Die Zytokine Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1, auch CCL2, C-C motif ligand 2 [engl.]), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted [engl.], auch CCL5, C-C motif ligand 5 [engl.]) und IL-12 (Interleukin 12) waren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht, die Zytokine IL-10 (Interleukin 10), G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor [engl.]) und KC (keratinocyte chemoattractant [engl.], auch CXCL1/2) signifikant vermindert. Wir gehen davon aus, dass die veränderte Zytokinumgebung für die erhöhte Einnistung von Tumorzellen verantwortlich ist.

IV.2.8.4.2. Der Einfluss der Zytokinumgebung des Knochenmarks auf die Einnistung von Tumorzellen

Einige Zytokine haben eine chemotaktische Wirkung auf Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass zwei Brustkrebslinien (MCF-7, ZR-75-1) *in vitro* eine chemotaktische Antwort auf MCP-1 zeigten und sich ihre Migration um das 2- bis 3- fache steigerte [504]. Auch RANTES veranlasste eine chemotaktische Antwort einer Brustkrebslinie (MCF-7) *in vitro* [504, 505]. Da beide Zytokine in signifikant höheren Konzentrationen im Knochenmark der mit PTH/ZOL behandelten Tiere gefunden wurde, besteht die Möglichkeit, dass auch die Tumorzellen der MDA-MB-231 Linie auf diese chemotaktisch reagieren und sich daher verstärkt im Knochenmark einnisten. Darüber hinaus konnten in der mit PTH und ZOL behandelten Gruppe eine signifikant niedrigere Konzentration von G-CSF im Knochenmark gefunden werden als in Kontrolltieren. G-CSF veranlasst Neutrophile proteolytische Enzyme wie Elastase, CathepsinG, MMP-2 und MMP-9 abzugeben, wodurch SDF-1 (stromal derived factor 1 [engl.]) durch Abspaltung der NH₂ terminalen Signal Sequenz inaktiviert wird und hämatopoietische Stammzellen (HSCs) mobilisiert werden [256]. Obwohl die Tumorzellen mit den hämatopoietischen Stammzellen um die Nischenplätze konkurrieren, zeigten Shiozawa *et al.*, dass Tumorzellen sich ähnlich wie die Stammzellen verhalten und G-CSF zu einer Mobilisierung von Tumorzellen aus der Stammzellnische in die Blutzirkulation führte [280]. Daher könnte die niedrigere G-CSF Konzentration im Knochenmark der Gruppe der mit PTH/ZOL behandelten Tiere das Verbleiben der Tumorzellen in der Stammzellnische und somit eine Einnistung erleichtert haben.

Verschiedene Zytokine wirken prometastatisch und können die Einnistung von Tumorzellen erleichtern. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass ein RANTES Rezeptor Antagonist *in vivo* Tumorwachstum reduzieren konnte [506]. Klinische Studien zeigten, dass RANTES bei Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen höher exprimiert war und eine signifikante Korrelation mit der Schwere der Krankheit besteht. Dies weist auf eine Beteiligung von RANTES an der Progression von Brustkrebs hin [507]. Man vermutet, dass auch das Zytokin KC, welches das murine Homolog zu dem humanen GRO (growth-regulated oncogene [engl.]) ist [508, 509], zu einer pro-inflammatorischen Mikroumgebung beiträgt, die die Invasion von Tumorzellen fördert [508]. Im Gegensatz hierzu wirken andere Zytokine wie z.B. IL-12 antimetastatisch. Die antimetastatische Wirkung wird im Falle von IL-12 jedoch durch T-Zellen vermittelt. Daher ist unser Modell nicht geeignet um eventuelle Effekte des IL-12 zu untersuchen, da darin athymische Nacktmäuse genutzt werden, die keine reifen T-Zellen bilden können. Somit könnte die erhöhte RANTES Konzentration in dem Knochenmark der mit der Kombination aus PTH und ZOL behandelten Tiere die Einnistung von Tumorzellen erleichtert haben. Das Zytokin KC wurde zwar verstärkt in den Kontrolltieren gefunden, führte in diesen jedoch zu keiner verstärkten Einnistung von Tumorzellen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass etwaige Effekte durch Effekte anderer Zytokine überdeckt wurden.

Auch das Wachstum von Tumorzellen kann durch Zytokine beeinflusst werden. So wird vermutet, dass KC die Proliferation von Tumorzellen fördert [508]. Darüber hinaus führt MCP-1 zu einer erhöhten Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten [393]. Im Gegensatz hierzu vermindert das von myeloiden Zellen und Lymphozyten produzierte IL-10 die Infiltration des Tumors mit Makrophagen. Es konnte belegt werden, dass IL-10 transfizierte Zellen, die vom Brust Adenokarzinom der Maus abstammen, eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums zeigten [510] und es gibt Beispiele, dass erhöhte Level von IL-10 mit einer günstigeren Prognose korrelieren [511]. Somit kommt es zu einer erhöhten Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen durch MCP-1 bei den mit PTH und ZOL behandelten Tieren, bei einer gleichzeitigen Verminderung der Makrophagen in den Kontrolltieren durch IL-10. Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass tumorassoziierte Makrophagen die Progression eines Tumors fördern [512-514]. Allerdings spielt der Aspekt des Tumorwachstums in unserem Modell keine Rolle, da die Tiere bereits 24h nach Injektion der Tumorzellen getötet werden, und innerhalb dieses kurzen Zeitraumes in dem *in vivo* Modell noch keine Proliferation stattfindet [376].

Desweiteren können durch Zytokine auch Effekte auf die Angiogenese vermittelt werden. So konnte gezeigt werden, dass MCP-1 die Angiogenese stimuliert [393] und man vermutet, dass auch KC die Entwicklung von Gefäßen fördert [515]. IL-12 hingegen besitzt eine antiangiogene Wirkung. Da die MCP-1 Konzentration in der mit PTH/ZOL behandelten Gruppe und IL-12 in der Kontrollgruppe erhöht ist, könnte dies zu einer verstärkten Angiogenese in der PTH/ZOL Gruppe führen, obwohl die KC Konzentration in der PTH/ZOL erniedrigt war, was diesem Effekt entgegen wirken würde. Allerdings spielen auch Effekte, die auf der Angiogenese beruhen in dem hier vorgestellten Modell keine Rolle, da innerhalb der kurzen Zeitspanne bis zur Probenentnahme keine Angiogenese stattfindet, welche einen Tumor positiv beeinflussen könnte. In einem anderen Modell könnte eine verstärkte Angiogenese das Tumorwachstum jedoch unterstützen.

Es ist wahrscheinlich, dass die erhöhte Einnistung von Tumorzellen bei den mit PTH und ZOL behandelten Tieren aus einem Zusammenspiel der Konzentrationsveränderung verschiedener Zytokine resultiert. Hierbei spielte vermutlich eine durch MCP-1 und RANTES hervorgerufene erhöhte Chemotaxis der Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Um die Einflüsse einzelner Zytokine *in vivo* zu untersuchen, könnte man Knochenmatrices mit den entsprechenden Zytokinen in Mäuse implantieren und nach intrakardialer Injektion und Tumorbildung die Einnistung in den Implantaten evaluieren. Darüber hinaus ist es durchaus möglich, dass noch eine Reihe weiterer, hier nicht untersuchter Zytokine eine Rolle bei der Einnistung von Tumorzellen spielen. Eventuell sind hierbei sogar bisher unbekannte Zytokine beteiligt. Eine Proteom-Analyse entsprechend präparierter Proben könnte hierüber Klarheit verschaffen.

Da SDF-1 eine entscheidende Rolle bei der Einnistung von Tumorzellen spielt [461-463], wäre es interessant, die Konzentration des aktiven SDF-1 zu untersuchen. Eine qPCR Analyse zeigte auf

der RNA Ebene keine Unterschiede zwischen den Gruppen, jedoch sollte in der PTH/ZOL Gruppe mit der signifikant niedrigeren G-CSF Konzentration eine höhere Konzentration an aktivem SDF-1 vorliegen, da G-CSF SDF-1 inaktiviert.

IV.2.8.4.3. Mögliche Gründe für eine veränderte Zytokinumgebung

Da in der Gruppe der mit PTH/ZOL behandelten Tiere signifikant weniger RNA Expression der Zytokine MCP-1 und IL-12 gefunden wurde, auf Proteinlevel jedoch eine signifikant höhere Konzentration vorlag, wäre es denkbar, dass die kombinierte Gabe von PTH und ZOL dazu führt, dass beide Substanzen die Translation dieser Zytokine verstärken, bzw. deren Abbau vermindern.

Zoledronsäure verhindert die Prenylierung (das kovalente Anhängen einer hydrophoben Prenylgruppe (entweder Farnesyl oder Geranylgeranyl)) von Proteinen. Dies geschieht durch die Inhibition von Farnesyldiphosphatsynthase, deren Metabolit Geranylgeranyldiphosphat für die Prenylierung benötigt wird [478]. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass die Inhibierung der Prenylierung zu einer erhöhten Zytokinproduktion führen kann. So konnten Kahn *et al.* bei Geranylgeranyltransferase defizienten Mäusen eine erhöhte Zytokinproduktion durch Makrophagen beobachten [516] und eine andere Gruppe konnte nachweisen, dass Zoledronsäure durch die Inhibierung der Prenylbildung die Interferon Produktion von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen induzierte [517]. Jedoch bleibt die Frage ungeklärt, welche Proteine, denen eine Geranylgeranylisierung fehlt, für die erhöhte Zytokinproduktion verantwortlich sind und warum diese Effekte auftreten [518]. Es ist möglich, dass die Inhibierung der Prenylierung in unserem Modell verschiedene Zelltypen und dadurch die Zytokinkonzentrationen im Knochenmark beeinflusste. Da der Effekt der erhöhten Einnistung der Tumorzellen nur in den mit Parathormon und Zoledronsäure behandelten Tieren auftrat, ist anzunehmen, dass durch Parathormon stimulierte Zellen, in Reaktion auf die Inhibierung der Prenylierung, die Zytokinumgebung veränderten. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte man in dem Versuch Zoledronsäure durch eine Substanz wie z.B. Geranylgeranyltransferaseinhibitoren [519] ersetzen. Sollten sich auch hierbei eine erhöhte Einnistung finden, wäre dies ein Hinweis, dass die angestellten Überlegungen zutreffen.

Die Effekte von Zytokinen auf intrazelluläre Signale und die Gentranskription werden in vielen Fällen durch die kleinen monomeren GTPasen vermittelt [520]. Diese Proteine sind für die Übertragung extrazellulärer proliferativer Signale in das Zytoplasma und den Zellkern von entscheidender Bedeutung [521]. Darüber hinaus müssen diese Proteine prenyliert werden, um ihre Funktion ausüben zu können. Man könnte daher annehmen, dass die Inhibition der Prenylierung dieser Rezeptoren zu einer Erhöhung der Konzentration einiger durch PTH stimulierter Zytokine im Knochen führt, da diese nicht in der Lage sind an ihre Rezeptoren zu binden. Somit könnte diese erhöhte Konzentration die Einnistung von Tumorzellen in das Knochenmark erleichtern.

Es wäre weiterhin möglich, dass Zoledronsäure die Wirkung von Parathormon modifiziert. Der Rezeptor für das Parathormon gehört nämlich zu den G Protein gekoppelten Rezeptoren [522]. Diese müssen post-transkriptional am Carboxy-Terminus prenyliert werden um in der Zellmembran verankert zu werden und dadurch ihre biologische Aktivität zu erlangen [523, 524]. Es ist daher also denkbar, dass Funktionen des PTH Rezeptors, welcher die Prenylierung benötigt, durch die Verwendung von ZOL beeinträchtigt wurden. Dies könnte darauf schließen lassen, dass die von PTH induzierte Zytokinproduktion eventuell auch von einer Prenylierung abhängig ist.

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass Zoledronsäure die Apoptose von Tumorzellen induziert [525-527] [528]. Aus diesem Grund und da Ras Proteine darüber hinaus grundlegende Kontrolle über Zellproliferation und Gen Transkription ausüben, werden Prenylierungsinhibitoren in klinischen Versuchen bei Krebs eingeführt. Da Chemokine einen großen Einfluss auf abnormale Proliferation und Fibrogenese haben, wird überlegt, dass eine Inhibition der Prenylierung diese Effekte vermindern könnte [521]. Da in dem hier vorgestellten Modell jedoch keine Proliferation stattgefunden hatte, spielen hierfür solche Überlegungen keine Rolle.

Letztendlich könnte die veränderte Zytokinumgebung auch auf ein Zusammenspiel der Osteoblasten bzw. Osteoklasten zurückgeführt werden. Da es nur sehr schwer möglich ist, solche Effekte *in vivo* zu untersuchen, könnte man in einem *in vitro* Versuch Osteoblasten und Osteoklasten kokultivieren, sie entsprechend mit der Kombination von PTH und ZOL behandeln und daraufhin in Transwell-assays die Migration von Tumorzellen und in den Medienüberständen die Zytokinkonzentrationen untersuchen. Somit könnte ein direkter Effekt von PTH und ZOL auf die Osteoblasten und die Osteoklasten bestätigt, und die erhöhte Tumorzelleinnistung darauf zurückgeführt werden. Man hätte somit auch einen Hinweis auf die für die veränderte Zytokinumgebung verantwortlichen Zellen.

Zusammenfassend erörterte dieser Teil der Arbeit den Einfluss des Fibronektins und der extrazellulären Matrix auf die Einnistung von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die konditionelle Ausschaltung des Fibronektins in verschiedenen Zellen oder Organen keinen Einfluss auf die Einnistung von Tumorzellen ausübte. Auch ein aus der Verletzung des Knochens resultierendes Hämatom beeinträchtigte weder die Einnistung von Tumorzellen noch das spätere Wachstum von Tumoren. Eine Ausschaltung des tumorendogenen Fibronektins führte jedoch zu einer signifikanten Verminderung der Einnistung von Tumorzellen. Dies könnte im Zusammenhang mit einer durch das Fehlen des Fibronektins erhöhten eCadherin Expression stehen, welche die Tumorzellen möglicherweise anfälliger für Zellen des Immunsystems gemacht haben. Die hierfür verantwortlichen Immunzellen konnten noch nicht identifiziert werden, es besteht jedoch die Vermutung, dass es sich hierbei um dendritische Zellen handeln könnte. Eine pharmakologische Erweiterung der osteoblastischen Nische durch die kombinierte Gabe von Parathormon und Zoledronsäure führte zu keiner Veränderung des Fibronektinergehalts im Knochenmark der Tiere. Es

konnte jedoch eine erhöhte Einnistung von Tumorzellen in das Knochenmark dieser Tiere beobachtet werden, die vermutlich auf eine durch einen synergetischen Effekt von Parathormon und Zoledronsäure veränderte Zytokinumgebung zurückzuführen ist.

V. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle der extrazellulären Matrix und insbesondere des Proteins Fibronectin bei der Leberfibrose und bei der Einnistung von Tumorzellen in die Stammzellnische im Knochenmark.

Hierfür wurde in einem Fibrosemodell das Peptid pUR4b verwendet, welches die Assemblierung einer Fibronectinmatrix verhindert. Bei der Verwendung dieses Peptids während und nach der Induktion einer Leberfibrose durch die Chemikalie Dimethylnitrosamin konnte eine Verminderung der Kollagenmenge (und damit des fibrotischen Narbengewebes) in der Leber im Vergleich zu fibrotischen Kontrolltieren beobachtet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von der Aktivierung der hepatischen Stellatezellen ist, jedoch zum Teil von einer verminderten Anzahl entzündlicher Zellen abhängig sein könnte. Eine verminderte Bildung von Gesamt- und aktivem TGF- β , welche zum Teil auf Effekte der verringerten Zahl der inflammatorischen Zellen zurückzuführen sein könnte, unterstützt den Effekt des verminderten Aufbaus von Narbengewebe. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass hepatische Stellatezellen bei einer Behandlung mit pUR4b weniger Fibronectin in die extrazelluläre Matrix einbauten als unbehandelte hepatische Stellatezellen. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass das Peptid pUR4b den Aufbau einer Fibronectinmatrix verhinderte bzw. verminderte, wodurch die Ablagerung anderer Komponenten der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen gestört war und es daher zu einem Rückgang des fibrotischen Narbengewebes kam.

Für die Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Matrix und des Fibronectins bei der Einnistung von Tumorzellen wurde zunächst das Fibronectin mit Hilfe konditioneller Knockout-Mäuse in verschiedenen Zellen bzw. Organen der Tiere ausgeschaltet. Weder die Ausschaltung des zirkulierenden, noch des durch Osteoblasten und Osteozyten gebildeten, noch des zirkulierenden und von Zellen des Knochenmarks gebildeten Fibronectins beeinträchtigte die Einnistung von Tumorzellen. Auch die Bildung eines Hämatoms im Knochen hatte weder einen Einfluss auf die Einnistung von Tumorzellen noch auf die spätere Tumorentwicklung. Die Ausschaltung des tumorzellendogenen Fibronectins führte hingegen zu einer signifikant verminderten Einnistung von Tumorzellen. Diese ist wahrscheinlich auf die verstärkte Affinität dieser Tumorzellen zu Zellen des Immunsystems zurückzuführen. Diese Beobachtung konnte zum Teil durch eine verstärkte eCadherin Expression erklärt werden, welche die Bindung an verschiedene Zellen des Immunsystems vermittelt. Eine Untersuchung der osteoblastischen Stammzellnische durch die kombinierte Gabe von Parathormon und Zoledronsäure führte zu keiner Veränderung der Fibronectinkonzentration innerhalb des Knochenmarks der behandelten Tiere. Dennoch nisteten sich in dem Knochenmark der mit Parathormon und Zoledronsäure behandelten Tiere signifikant mehr Tumorzellen ein als in dem von Kontrolltieren. Dieser Effekt konnte auf einen synergetischen Effekt von Parathormon und Zoledronsäure zurückgeführt werden, der zu einer gesteigerten Osteoblastenaktivität und Änderungen der Zytokinkonzentrationen im Knochenmark führte.

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Veränderung der extrazelluläre Matrix und insbesondere des Proteins Fibronectin bei Leberfibrose zu einem veränderten Krankheitsbild führt und die Einnistung von Tumorzellen in das Knochenmark beeinflusst.

VI. Summary

This PhD thesis discusses the role of the extracellular matrix and in particular the protein fibronectin in liver fibrosis and in the homing of tumor cells into the stem cell niche of the bone marrow.

For this purpose, the peptide pUR4b which prevents the assembly of a fibronectin matrix was administered to fibrotic mice. When applying this peptide during and after the induction of hepatic fibrosis by the chemical dimethylnitrosamine, a reduction in the amount of collagen (and thus of fibrotic scar tissue) in the liver was observed compared to fibrotic control animals. This effect could be shown to be independent of the activation of hepatic stellate cells, but might be influenced by a reduced number of inflammatory cells. A reduced synthesis of total and active TGF- β , which in part might be due to effects of the reduced number of inflammatory cells, supports the effect of the reduced deposition of scar tissue. In vitro studies showed, that the hepatic stellate cells incorporated less fibronectin into the extracellular matrix when treated with pUR4b. Overall, the data indicate that the peptide pUR4b prevented or reduced the establishment of a fibronectin matrix, which disturbed the deposition of other extracellular matrix components such as collagens and therefore resulted in a decrease of fibrotic scar tissue.

For the investigation of the influence of the extracellular matrix and the protein fibronectin in the homing process of tumor cells, the fibronectin was initially deleted in various cells and organs of the animals by using conditional knockout mice. Neither the elimination of the circulating fibronectin nor of the fibronectin produced by the osteoblasts and osteocytes, nor of the circulating fibronectin and the one produced by bone marrow cells impaired the homing of tumor cells. The formation of a hematoma in the bone had neither an effect on the homing of tumor cells nor on the subsequent tumor development. Deletion of fibronectin in the tumor cells, however, significantly reduced the homing of tumor cells. This is probably due to the increased affinity of these tumor cells to cells of the immune system. This observation can be partly explained by an increased expression of eCadherin, which mediates binding to various cells of the immune system. An examination of the osteoblastic stem cell niche by the combined administration of parathyroid hormone and zoledronic acid did not alter the concentration of fibronectin within the bone marrow of treated animals. However, significantly more tumor cells homed in the bone marrow of animals treated with parathyroid hormone and zoledronic acid compared to that of control animals. This effect could be attributed to a synergistic effect of parathyroid hormone and zoledronic acid, which led to increased osteoblast activity and changes in the cytokine levels in the bone marrow.

In summary, it was found that altering the extracellular matrix and in particular the protein fibronectin in various diseases, leads to an altered clinical picture and influences the homing of tumor cells to the bone marrow.

VII. Literaturverzeichnis

1. Asad, S., et al., *The Extracellular Matrix (Facts Book)*. 1998, Printed in Great Britain: Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers).
2. Rutka, J.T., et al., *The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function*. J Neurosurg, 1988. **69**(2): p. 155-70.
3. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 793-805.
4. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.
5. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
6. Adams, J.C. and F.M. Watt, *Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes*. Nature, 1989. **340**(6231): p. 307-9.
7. Ben-Ze'ev, A., et al., *Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2161-5.
8. Streuli, C.H. and M.J. Bissell, *Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1405-15.
9. Wight, T.N. and S. Potter-Perigo, *The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(6): p. G950-5.
10. Sottile, J., *Regulation of angiogenesis by extracellular matrix*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(1): p. 13-22.
11. Eisenbeiss, C., et al., *Influence of body water distribution on skin thickness: measurements using high-frequency ultrasound*. Br J Dermatol, 2001. **144**(5): p. 947-51.
12. Friedman, S.L., *Cytokines and fibrogenesis*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 129-40.
13. Schonherr, E. and H.J. Hausser, *Extracellular matrix and cytokines: a functional unit*. Dev Immunol, 2000. **7**(2-4): p. 89-101.
14. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 423-8.
15. Yurchenco, P.D. and B.L. Patton, *Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(12): p. 1277-94.
16. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.
17. Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer, *Assembly of fibronectin extracellular matrix*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 397-419.
18. Bollyky, P.L., et al., *Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 744-7.
19. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
20. Shrivastava, A., et al., *An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 25-34.
21. Schonherr, E., et al., *Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8877-83.
22. Yamada, K.M., *Fibronectin peptides in cell migration and wound repair*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1507-9.
23. Danen, E.H. and A. Sonnenberg, *Integrins in regulation of tissue development and function*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 471-80.
24. Reichardt, L.F. and K.J. Tomaselli, *Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development*. Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 531-70.
25. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3861-3.
26. McKeown-Longo, P.J. and D.F. Mosher, *Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 466-72.
27. Potts, J.R. and I.D. Campbell, *Fibronectin structure and assembly*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 648-55.
28. Sakai, T., et al., *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, 2001. **7**(3): p. 324-30.

29. Mosher, D.F., *Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor*. J Biol Chem, 1975. **250**(16): p. 6614-21.
30. Mosesson, M.W., A.B. Chen, and R.M. Huseby, *The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features*. Biochim Biophys Acta, 1975. **386**(2): p. 509-24.
31. Leahy, D.J., I. Aukhil, and H.P. Erickson, *2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region*. Cell, 1996. **84**(1): p. 155-64.
32. Erickson, H.P., *Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10114-8.
33. Hynes, R.O., *The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2588-90.
34. Shaub, A., *Unravelling the extracellular matrix*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. E173-5.
35. Kornblihtt, A.R., K. Vibe-Pedersen, and F.E. Baralle, *Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3218-22.
36. Schwarzbauer, J.E., C.S. Spencer, and C.L. Wilson, *Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 2): p. 3445-53.
37. Hynes, R.O., ed. *Fibronectins*. 1990, Springer-Verlag, New York.
38. Leiss, M., et al., *The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(5): p. 502-7.
39. Altroff, H., et al., *The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38885-92.
40. Manabe, R., et al., *Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 295-307.
41. Manabe, R., N. Oh-e, and K. Sekiguchi, *Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5919-24.
42. Guan, J.L. and R.O. Hynes, *Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1*. Cell, 1990. **60**(1): p. 53-61.
43. Mould, A.P., et al., *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*. J Biol Chem, 1991. **266**(6): p. 3579-85.
44. Wayner, E.A., et al., *Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin*. J Cell Biol, 1989. **109**(3): p. 1321-30.
45. Komoriya, A., et al., *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*. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 15075-9.
46. Schwarzbauer, J.E., et al., *Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region*. Cell, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 421-31.
47. Kusano, Y., et al., *Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin*. Exp Cell Res, 2000. **256**(2): p. 434-44.
48. Woods, A., et al., *Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 2000. **374**(1): p. 66-72.
49. Jalkanen, S. and M. Jalkanen, *Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin*. J Cell Biol, 1992. **116**(3): p. 817-25.
50. Mosher, D.F., ed. *Biology of Extracellular Matrix: Fibronectin*. 1989, Academic Press, California.
51. Chung, C.Y. and H.P. Erickson, *Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 12): p. 1413-9.
52. Dallas, S.L., et al., *Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18871-80.
53. Kadler, K.E., A. Hill, and E.G. Canty-Laird, *Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(5): p. 495-501.
54. Sabatier, L., et al., *Fibrillin assembly requires fibronectin*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 846-58.
55. Sottile, J. and D.C. Hocking, *Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3546-59.

56. Moretti, F.A., et al., *A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28057-62.
57. Bentmann, A., et al., *Circulating Fibronectin Affects Bone Matrix While Osteoblast Fibronectin Modulates Osteoblast Function*. J Bone Miner Res, 2009.
58. Mao, Y. and J.E. Schwarzbauer, *Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process*. Matrix Biol, 2005. **24**(6): p. 389-99.
59. Magnusson, M.K. and D.F. Mosher, *Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(9): p. 1363-70.
60. Wu, C., et al., *The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21883-8.
61. Wennerberg, K., et al., *Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 227-38.
62. McDonald, J.A., et al., *Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 2957-67.
63. Fogerty, F.J., et al., *Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies*. J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 699-708.
64. Akiyama, S.K., et al., *Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization*. J Cell Biol, 1989. **109**(2): p. 863-75.
65. Yang, J.T., H. Rayburn, and R.O. Hynes, *Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice*. Development, 1993. **119**(4): p. 1093-105.
66. Wu, C., et al., *Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix*. Cell, 1995. **83**(5): p. 715-24.
67. Yang, J.T. and R.O. Hynes, *Fibronectin receptor functions in embryonic cells deficient in alpha 5 beta 1 integrin can be replaced by alpha V integrins*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(11): p. 1737-48.
68. Zhang, Q. and D.F. Mosher, *Cross-linking of the NH2-terminal region of fibronectin to molecules of large apparent molecular mass. Characterization of fibronectin assembly sites induced by the treatment of fibroblasts with lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33284-92.
69. George, E.L., et al., *Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin*. Development, 1993. **119**(4): p. 1079-91.
70. Boucaut, J.C., et al., *Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation*. Int J Dev Biol, 1990. **34**(1): p. 139-47.
71. Winklbauer, R. and M. Nagel, *Directional mesoderm cell migration in the Xenopus gastrula*. Dev Biol, 1991. **148**(2): p. 573-89.
72. Yost, H.J., *Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix*. Nature, 1992. **357**(6374): p. 158-61.
73. Linask, K.K. and J.W. Lash, *A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. II. Rotation of the heart-forming region during different stages and its effects*. Dev Biol, 1988. **129**(2): p. 324-9.
74. Francis, S.E., et al., *Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(6): p. 927-33.
75. Larsen, M., et al., *The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 463-71.
76. Vakonakis, I. and I.D. Campbell, *Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(5): p. 578-83.
77. Han, S.W. and J. Roman, *Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF-kappa B*. Oncogene, 2006. **25**(31): p. 4341-9.
78. Williams, C.M., et al., *Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3185-92.
79. Cowles, E.A., L.L. Brailey, and G.A. Gronowicz, *Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(4): p. 725-37.
80. Davis, G.E. and D.R. Senger, *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. Circ Res, 2005. **97**(11): p. 1093-107.

81. Aguirre-Ghiso, J.A., et al., *Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 863-79.
82. Sottile, J., D.C. Hocking, and P.J. Swiatek, *Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 19)**: p. 2933-43.
83. Zhang, Z., et al., *The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 6161-5.
84. Nishida, T., et al., *Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ*. J Cell Biol, 1983. **97**(5 Pt 1): p. 1653-7.
85. Donaldson, D.J., et al., *Location of a fibronectin domain involved in newt epidermal cell migration*. J Cell Biol, 1985. **101**(1): p. 73-8.
86. Ivanoff, J., T. Talme, and K.G. Sundqvist, *The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata*. Immunology, 2005. **114**(1): p. 53-62.
87. Pozzi, A., et al., *Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(12): p. 1318-33.
88. Wolfram, D., et al., *Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management*. Dermatol Surg, 2009. **35**(2): p. 171-81.
89. Midwood, K.S., et al., *Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2006. **11**(1): p. 73-8.
90. Clark, R.A., *Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin*. J Invest Dermatol, 1990. **94**(6 Suppl): p. 128S-134S.
91. Norris, D.A., et al., *Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes*. J Immunol, 1982. **129**(4): p. 1612-8.
92. Clark, R.A., et al., *Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 12115-23.
93. Ni, H., et al., *Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2415-9.
94. Grinnell, F., R.E. Billingham, and L. Burgess, *Distribution of fibronectin during wound healing in vivo*. J Invest Dermatol, 1981. **76**(3): p. 181-9.
95. Mosher, D.F., *Action of fibrin-stabilizing factor on cold-insoluble globulin and alpha2-macroglobulin in clotting plasma*. J Biol Chem, 1976. **251**(6): p. 1639-45.
96. Mosher, D.F. and P.E. Schad, *Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa*. J Clin Invest, 1979. **64**(3): p. 781-7.
97. Grinnell, F. and T.V. Phan, *Deposition of fibronectin on material surfaces exposed to plasma: quantitative and biological studies*. J Cell Physiol, 1983. **116**(3): p. 289-96.
98. Takashima, A., R.E. Billingham, and F. Grinnell, *Activation of rabbit keratinocyte fibronectin receptor function in vivo during wound healing*. J Invest Dermatol, 1986. **86**(5): p. 585-90.
99. Knox, P., S. Crooks, and C.S. Rimmer, *Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots*. J Cell Biol, 1986. **102**(6): p. 2318-23.
100. Brown, L.F., et al., *Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing*. Am J Pathol, 1993. **142**(3): p. 793-801.
101. Clark, R.A.F., *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 1996, New York: Plenum Press.
102. Pschyrembel, W., *Klinisches Wörterbuch*. 258., neu bearbeitete Auflage. 1998, Berlin: Walter de Gruyter.
103. Alison, M.R., *The Cancer Handbook*. 2002, London: Nature Publishing Group.
104. Bacac, M. and I. Stamenkovic, *Metastatic cancer cell*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 221-47.
105. Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev, *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. J Clin Invest, 2002. **109**(8): p. 987-91.
106. Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs, *Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, 2003. **112**(4): p. 535-48.
107. Liotta, L.A. and E. Kohn, *Anoikis: cancer and the homeless cell*. Nature, 2004. **430**(7003): p. 973-4.
108. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
109. Akiyama, S.K., K. Olden, and K.M. Yamada, *Fibronectin and integrins in invasion and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1995. **14**(3): p. 173-89.
110. Ruoslahti, E., *Fibronectin in cell adhesion and invasion*. Cancer Metastasis Rev, 1984. **3**(1): p. 43-51.

111. Kapila, Y.L., et al., *The heparin-binding domain and V region of fibronectin regulate apoptosis by suppression of p53 and c-myc in human primary cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8482-91.
112. Kamarajan, P. and Y.L. Kapila, *An altered fibronectin matrix induces anoikis of human squamous cell carcinoma cells by suppressing integrin alpha v levels and phosphorylation of FAK and ERK*. Apoptosis, 2007. **12**(12): p. 2221-31.
113. Lauwaet, T., et al., *Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms*. Microbes Infect, 2000. **2**(8): p. 923-31.
114. Pecorino, L., *Molecular Biology of Cancer*. second edition. 2008, Oxford: Oxford University Press.
115. Werb, Z., et al., *Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression*. J Cell Biol, 1989. **109**(2): p. 877-89.
116. Klein, T. and R. Bischoff, *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases*. Amino Acids, 2011. **41**(2): p. 271-90.
117. Kleiner, D.E. and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases and metastasis*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43 Suppl**: p. S42-51.
118. Labat-Robert, J., *Fibronectin in malignancy*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(3): p. 187-95.
119. Harms, J.F., et al., *A small molecule antagonist of the alpha(v)beta3 integrin suppresses MDA-MB-435 skeletal metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(2): p. 119-28.
120. Humphries, M.J., K. Olden, and K.M. Yamada, *A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells*. Science, 1986. **233**(4762): p. 467-70.
121. Mitjans, F., et al., *An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 8)**: p. 2825-38.
122. Felding-Habermann, B., et al., *Integrin activation controls metastasis in human breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1853-8.
123. Brooks, P.C., et al., *Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1815-22.
124. Fidler, I.J., *Cancer biology is the foundation for therapy*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(9): p. 1036-9.
125. Walz, D.A. and J.W. Fenton, *The role of thrombin in tumor cell metastasis*. Invasion Metastasis, 1994. **14**(1-6): p. 303-8.
126. Karpatkin, S., C. Ambrogio, and E. Pearlstein, *The role of tumor-induced platelet aggregation, platelet adhesion and adhesive proteins in tumor metastasis*. Prog Clin Biol Res, 1988. **283**: p. 585-606.
127. Updyke, T.V. and G.L. Nicolson, *Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential*. Clin Exp Metastasis, 1986. **4**(4): p. 273-84.
128. Glinsky, V.V., et al., *Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3805-11.
129. Im, J.H., et al., *Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8613-9.
130. Kramer, R.H., R. Gonzalez, and G.L. Nicolson, *Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells*. Int J Cancer, 1980. **26**(5): p. 639-45.
131. Malanchi, I., et al., *Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization*. Nature, 2012. **481**(7379): p. 85-9.
132. Gao, D., et al., *Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis*. Science, 2008. **319**(5860): p. 195-8.
133. Malik, G., et al., *Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4327-34.
134. Yao, E.S., et al., *Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 659-64.
135. Lal, A., et al., *A public database for gene expression in human cancers*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5403-7.
136. Gaggioli, C., et al., *HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1423-33.
137. Kapila, Y.L., J. Niu, and P.W. Johnson, *The high affinity heparin-binding domain and the V region of fibronectin mediate invasion of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18932-8.

138. Newton, S., et al., *Inhibition of experimental metastasis of human breast-carcinoma cells in athymic nude-mice by anti-alpha(5)beta(1) fibronectin receptor integrin antibodies*. *Int J Oncol*, 1995. **6**(5): p. 1063-70.
139. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. *Lancet*, 1889. **1**: p. 571-573.
140. Liotta, L.A., C.N. Rao, and U.M. Wewer, *Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane*. *Annu Rev Biochem*, 1986. **55**: p. 1037-57.
141. Stewart, D.A., C.R. Cooper, and R.A. Sikes, *Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 2.
142. Boudreau, N. and M.J. Bissell, *Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(5): p. 640-6.
143. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
144. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 524-9.
145. Eddy, A.A., *Molecular basis of renal fibrosis*. *Pediatr Nephrol*, 2000. **15**(3-4): p. 290-301.
146. Hackl, N.J., et al., *Circulating fibronectin isoforms predict the degree of fibrosis in chronic hepatitis C*. *Scand J Gastroenterol*, 2010. **45**(3): p. 349-56.
147. Rehner, G. and H. Daniel, *Die Leber als multifunktionelles Organ*, in *Biochemie der Ernährung*. 2010, Spektrum Akademischer Verlag. p. 409-492.
148. Frimmer, M., *Die Leber als Kläranlage*. *Biologie in unserer Zeit*, 1982. **12**(6): p. 168-172.
149. Sasse, D., U.M. Spornitz, and I.P. Maly, *Liver architecture*. *Enzyme*, 1992. **46**(1-3): p. 8-32.
150. Jungermann, K., *[Regulation of liver functions by autonomic hepatic nerves]*. *Naturwissenschaften*, 1989. **76**(12): p. 547-59.
151. Jungermann, K., *[Metabolic zonation of liver parenchyma. Regulation of the glucostat of the liver]*. *Naturwissenschaften*, 1985. **72**(2): p. 76-84.
152. Protzer, U., M.K. Maini, and P.A. Knolle, *Living in the liver: hepatic infections*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 201-13.
153. Rappaport, A.M., et al., *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology*. *Anat Rec*, 1954. **119**(1): p. 11-33.
154. Preuss, F. and W. Fricke, *Comprehensive schemata on the histology of the liver with consequences in terminology*. *J Morphol*, 1979. **162**(2): p. 211-9.
155. Wisse, E., et al., *The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse*. *Hepatology*, 1985. **5**(4): p. 683-92.
156. Kisseleva, T. and D.A. Brenner, *Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22 Suppl 1**: p. S73-8.
157. Gartner and Hiatt, *Color Atlas of histology*. 2nd ed. Vol. Chapter 18, Digestive System III: Glands. 2007: Saunders/Elsevier. p. 416-434.
158. Friedman, S.L., *Liver fibrosis -- from bench to bedside*. *J Hepatol*, 2003. **38 Suppl 1**: p. S38-53.
159. Povero, D., et al., *Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process*. *Histol Histopathol*, 2010. **25**(8): p. 1075-91.
160. Wasmuth, H.E. and C. Trautwein, *[Liver fibrosis : clinics, diagnostics and management]*. *Internist (Berl)*, 2010. **51**(1): p. 14-20.
161. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
162. Gressner, A.M. and E. Yagmur, *Aspekte der Pathogenese, Therapie und Diagnostik der Leberfibrose*. *Laboratoriums Medizin*, 2003. **27**(11-12): p. 423-430.
163. Lin, X.Z., et al., *Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **13**(1): p. 75-80.
164. Schuppan, D., *Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins*. *Semin Liver Dis*, 1990. **10**(1): p. 1-10.
165. Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta, *The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. **423**(2): p. 77-84.
166. Bedossa, P. and V. Paradis, *Liver extracellular matrix in health and disease*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 504-15.
167. Bissell, D.M., et al., *Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes. Role of basement-membrane matrix*. *Mol Biol Med*, 1990. **7**(2): p. 187-97.

168. Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta, *The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. **423**(1): p. 1-11.
169. Gressner, A.M., *Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules*. Z Gastroenterol, 1992. **30** Suppl 1: p. 5-16.
170. Grigorescu, M., *Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis*. J Gastrointest Liver Dis, 2006. **15**(2): p. 149-59.
171. Wells, R.G., *Function and metabolism of collagen and other extracellular matrix proteins*, in *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, 3rd Edition*, J. Rhodes, et al., Editors. 2007, Wiley-Blackwell. p. 264-273.
172. Moreira, R.K., *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(11): p. 1728-34.
173. Kershenovich Stalnikowitz, D. and A.B. Weissbrod, *Liver fibrosis and inflammation. A review*. Ann Hepatol, 2003. **2**(4): p. 159-63.
174. Malarkey, D.E., et al., *New insights into functional aspects of liver morphology*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(1): p. 27-34.
175. McGuire, R.F., et al., *Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver*. Hepatology, 1992. **15**(6): p. 989-97.
176. Loguercio, C. and A. Federico, *Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(1): p. 1-10.
177. Canbay, A., et al., *The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic*. Z Gastroenterol, 2005. **43**(2): p. 211-7.
178. Riemann, *Gastroenterologie - das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. 2010, Stuttgart: Thieme.
179. Faouzi, S., et al., *Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49077-82.
180. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
181. Wake, K., *"Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A*. Am J Anat, 1971. **132**(4): p. 429-62.
182. Cassiman, D., et al., *Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 148-58.
183. Gressner, A.M., *Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis*. Gut, 1994. **35**(10): p. 1331-3.
184. Friedman, S.L. and M.B. Bansal, *Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy?* Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S82-8.
185. Friedman, S.L., *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 125-72.
186. Knittel, T., et al., *Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 153-67.
187. Kharbanda, K.K., et al., *Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells*. J Hepatol, 2004. **41**(1): p. 60-6.
188. Roberts, R.A., et al., *Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis*. Toxicol Sci, 2007. **96**(1): p. 2-15.
189. Hyytiainen, M., C. Penttinen, and J. Keski-Oja, *Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2004. **41**(3): p. 233-64.
190. Saharinen, J. and J. Keski-Oja, *Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(8): p. 2691-704.
191. Unsold, C., et al., *Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 187-197.
192. Zilberberg, L., et al., *Specificity of latent TGF-beta binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin*. Journal of Cellular Physiology: p. n/a-n/a.
193. Kawelke, N., et al., *Fibronectin protects from excessive liver fibrosis by modulating the availability of and responsiveness of stellate cells to active TGF-beta*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e28181.
194. Gressner, O.A. and A.M. Gressner, *Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases*. Liver Int, 2008. **28**(8): p. 1065-79.
195. Bissell, D.M., *Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer*. Exp Mol Med, 2001. **33**(4): p. 179-90.

196. Bissell, D.M., et al., *Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation.* J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 447-55.
197. Arthur, M.J., *Collagenases and liver fibrosis.* J Hepatol, 1995. **22**(2 Suppl): p. 43-8.
198. Gines, P., et al., *Management of cirrhosis and ascites.* N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1646-54.
199. Iredale, J.P., *Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 539-48.
200. Albanis, E. and S.L. Friedman, *Antifibrotic agents for liver disease.* Am J Transplant, 2006. **6**(1): p. 12-9.
201. Geerts, A., et al., *Immunogold localization of procollagen III, fibronectin and heparan sulfate proteoglycan on ultrathin frozen sections of the normal rat liver.* Histochemistry, 1986. **84**(4-6): p. 355-62.
202. Jarnagin, W.R., et al., *Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis.* J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2037-48.
203. Kato, R., et al., *The fibronectin-derived antiadhesive peptides suppress the myofibroblastic conversion of rat hepatic stellate cells.* Exp Cell Res, 2001. **265**(1): p. 54-63.
204. Gressner, A.M. and M.G. Bachem, *Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis.* Semin Liver Dis, 1990. **10**(1): p. 30-46.
205. Ramadori, G., *The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell.* Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1991. **61**(3): p. 147-58.
206. Rodriguez-Juan, C., et al., *Fibronectin increases survival of rat hepatic stellate cells--a novel profibrogenic mechanism of fibronectin.* Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 271-82.
207. Arnett, T., *Regulation of bone cell function by acid-base balance.* Proc Nutr Soc, 2003. **62**(2): p. 511-20.
208. Soldner, E. and G. Herr, *Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien.* Trauma und Berufskrankheit, 2001. **3**(4): p. 256-269.
209. J. Jerosch, A. Bader, and G. Uhr, *Knochen. Curasan Taschenatlas Spezial.* 2002, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
210. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, Il, *Bone remodeling.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
211. Long, F., *Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(1): p. 27-38.
212. Phan, T.C., J. Xu, and M.H. Zheng, *Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease.* Histol Histopathol, 2004. **19**(4): p. 1325-44.
213. Robey, P.G., et al., *Structure and molecular regulation of bone matrix proteins.* J Bone Miner Res, 1993. **8 Suppl 2**: p. S483-7.
214. Malaval, L., et al., *Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro.* J Cell Biochem, 1999. **74**(4): p. 616-27.
215. Jaiprakash, A., et al., *Phenotypic characterization of osteoarthritic osteocytes from the sclerotic zones: a possible pathological role in subchondral bone sclerosis.* Int J Biol Sci, 2012. **8**(3): p. 406-17.
216. Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte.* J Bone Miner Res, 2011. **26**(2): p. 229-38.
217. Burger, E.H., J. Klein-Nulend, and T.H. Smit, *Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal.* J Biomech, 2003. **36**(10): p. 1453-9.
218. Jilka, R.L., et al., *Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards.* J Bone Miner Res, 2007. **22**(10): p. 1492-501.
219. Reponen, P., et al., *High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development.* J Cell Biol, 1994. **124**(6): p. 1091-1102.
220. Delaisse, J.M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities.* Microsc Res Tech, 2003. **61**(6): p. 504-13.
221. Inui, T., et al., *Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption.* J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8109-12.
222. Igarashi, Y., M.Y. Lee, and S. Matsuzaki, *Acid phosphatases as markers of bone metabolism.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **781**(1-2): p. 345-58.
223. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone.* J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
224. Turner, C.H., *Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli.* Bone, 1998. **23**(5): p. 399-407.
225. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.* Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.

226. Frost, H.M., *Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal*. Anat Rec, 1987. **219**(1): p. 1-9.
227. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 455-98.
228. Raisz, L.G., *Physiology and pathophysiology of bone remodeling*. Clin Chem, 1999. **45**(8 Pt 2): p. 1353-8.
229. Eriksen, E.F., *Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease*. Endocr Rev, 1986. **7**(4): p. 379-408.
230. Baron, R. and E. Hesse, *Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(2): p. 311-25.
231. Pixley, F.J. and E.R. Stanley, *CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(11): p. 628-38.
232. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
233. Hodge, J.M., M.A. Kirkland, and G.C. Nicholson, *Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis*. J Cell Biochem, 2007. **102**(3): p. 759-68.
234. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 389-406.
235. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
236. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3597-602.
237. Galli, C., G. Passeri, and G.M. Macaluso, *Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation*. J Dent Res, 2010. **89**(4): p. 331-43.
238. Goldring, S.R. and M.B. Goldring, *Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 133-4.
239. Robling, A.G., et al., *Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5866-75.
240. Moustafa, A., et al., *The mouse fibula as a suitable bone for the study of functional adaptation to mechanical loading*. Bone, 2009. **44**(5): p. 930-5.
241. Matsuo, K., *Osteocytes communicate with osteoclast lineage cells via RANKL*. IBMS BoneKEy, 2012. **9**.
242. Li, L. and T. Xie, *Stem cell niche: structure and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 605-31.
243. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
244. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.
245. Li, L. and W.B. Neaves, *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4553-7.
246. Zhang, J. and L. Li, *Stem cell niche: microenvironment and beyond*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9499-503.
247. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
248. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
249. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
250. Bottero, V., S. Withoff, and I.M. Verma, *NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 785-97.
251. Taichman, R.S., *Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2631-9.
252. Miura, Y., et al., *Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2428-36.
253. Shiozawa, Y., et al., *The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 941-50.
254. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.

255. Butler, J.M., H. Kobayashi, and S. Rafii, *Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(2): p. 138-46.
256. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 349-56.
257. Guerrouahen, B.S., I. Al-Hijji, and A.R. Tabrizi, *Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia*. Stem Cells Int. **2011**: p. 375857.
258. Balduino, A., et al., *Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations*. Cell Tissue Res, 2005. **319**(2): p. 255-66.
259. Kaplan, R.N., B. Psaila, and D. Lyden, *Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells*. Trends Mol Med, 2007. **13**(2): p. 72-81.
260. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
261. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
262. Beachy, P.A., S.S. Karhadkar, and D.M. Berman, *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 324-31.
263. Trumpp, A. and O.D. Wiestler, *Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin*. Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(6): p. 337-47.
264. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1655-64.
265. Krishnamurthy, S., et al., *Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer*. Cancer, 2010. **116**(14): p. 3330-7.
266. Alix-Panabieres, C., S. Riethdorf, and K. Pantel, *Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5013-21.
267. Mundy, G.R., *Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 584-93.
268. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
269. Bussard, K.M., C.V. Gay, and A.M. Mastro, *The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone?* Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 41-55.
270. Coleman, R.E., *Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 2): p. 6243s-6249s.
271. Akhtari, M., et al., *Biology of breast cancer bone metastasis*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(1): p. 3-9.
272. Mishra, A., et al., *Homing of Cancer Cells to the Bone*. Cancer Microenviron, 2011. **4**(3): p. 221-35.
273. Yoneda, T., *Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone*. J Orthop Sci, 2000. **5**(1): p. 75-81.
274. Fidler, I.J., *Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6130-8.
275. Kang, Y., et al., *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 537-49.
276. Hauschka, P.V., et al., *Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose*. J Biol Chem, 1986. **261**(27): p. 12665-74.
277. Pfeilschifter, J. and G.R. Mundy, *Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 2024-8.
278. Mundy, G.R., S. DeMartino, and D.W. Rowe, *Collagen and collagen-derived fragments are chemotactic for tumor cells*. J Clin Invest, 1981. **68**(4): p. 1102-5.
279. Orr, W., et al., *Chemotactic responses of tumor cells to products of resorbing bone*. Science, 1979. **203**(4376): p. 176-9.
280. Shiozawa, Y., et al., *Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1298-312.
281. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
282. Gailit, J. and R.A. Clark, *Wound repair in the context of extracellular matrix*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 717-25.
283. Brown, L.F., et al., *Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma*. Am J Pathol, 1988. **130**(3): p. 455-65.
284. Yeo, T.K., L. Brown, and H.F. Dvorak, *Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors*. Am J Pathol, 1991. **138**(6): p. 1437-50.

285. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.* N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
286. Liaw, L. and H.C. Crawford, *Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression.* Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(7): p. 805-12.
287. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.* J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
288. Jin, D.K., et al., *Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes.* Nat Med, 2006. **12**(5): p. 557-67.
289. Nierodzik, M.L., A. Klepfish, and S. Karparkin, *Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo.* Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 282-90.
290. Nierodzik, M.L. and S. Karparkin, *Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype.* Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 355-62.
291. Palumbo, J.S., et al., *Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells.* Blood, 2000. **96**(10): p. 3302-9.
292. Palumbo, J.S., et al., *Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function.* J Thromb Haemost, 2008. **6**(5): p. 812-9.
293. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass.* Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-55.
294. Fujita, T., *Parathyroid hormone--quo vadis?* Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1988. **64**(12): p. 1250-7.
295. Dobnig, H. and R.T. Turner, *The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats.* Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4607-12.
296. Frolik, C.A., et al., *Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure.* Bone, 2003. **33**(3): p. 372-9.
297. Qin, L., L.J. Raggatt, and N.C. Partridge, *Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism.* Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(2): p. 60-5.
298. Deal, C. and J. Gideon, *Recombinant human PTH 1-34 (Forteo): an anabolic drug for osteoporosis.* Cleve Clin J Med, 2003. **70**(7): p. 585-6, 589-90, 592-4 passim.
299. Gunness-Hey, M. and J.M. Hock, *Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone.* Metab Bone Dis Relat Res, 1984. **5**(4): p. 177-81.
300. Jilka, R.L., *Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH.* Bone, 2007. **40**(6): p. 1434-46.
301. Nishida, S., et al., *Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow.* Bone, 1994. **15**(6): p. 717-23.
302. Keller, H. and M. Kneissel, *SOST is a target gene for PTH in bone.* Bone, 2005. **37**(2): p. 148-58.
303. O'Brien, C.A., et al., *Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes.* PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2942.
304. Eriksen, E.F., *Cellular mechanisms of bone remodeling.* Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(4): p. 219-27.
305. Cosman, F., et al., *Response of the parathyroid gland to infusion of human parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)]: demonstration of suppression of endogenous secretion using immunoradiometric intact PTH-(1-84) assay.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(6): p. 1345-51.
306. Tam, C.S., et al., *Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration.* Endocrinology, 1982. **110**(2): p. 506-12.
307. Fleisch, H., R.G. Russell, and M.D. Francis, *Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo.* Science, 1969. **165**(3899): p. 1262-4.
308. Clezardin, P., *Anti-tumour activity of zoledronic acid.* Cancer Treat Rev, 2005. **31 Suppl 3**: p. 1-8.
309. Papapoulos, S.E., *Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited.* Bone, 2006. **38**(5): p. 613-6.
310. Nancollas, G.H., et al., *Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite.* Bone, 2006. **38**(5): p. 617-27.
311. Fleisch, H., *Bisphosphonates: mechanisms of action.* Endocr Rev, 1998. **19**(1): p. 80-100.

312. van Beek, E., et al., *Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(12): p. 1875-82.
313. Rogers, M.J., *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(32): p. 2643-58.
314. Dunford, J.E., et al., *Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **296**(2): p. 235-42.
315. Coxon, F.P. and M.J. Rogers, *The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function*. Calcif Tissue Int, 2003. **72**(1): p. 80-4.
316. Tomasini-Johansson, B.R., et al., *A 49-residue peptide from adhesin F1 of Streptococcus pyogenes inhibits fibronectin matrix assembly*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23430-9.
317. Constandinou, C., N. Henderson, and J.P. Iredale, *Modeling liver fibrosis in rodents*. Methods Mol Med, 2005. **117**: p. 237-50.
318. Tsukamoto, H., M. Matsuoka, and S.W. French, *Experimental models of hepatic fibrosis: a review*. Semin Liver Dis, 1990. **10**(1): p. 56-65.
319. Jenkins, S.A., et al., *A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat*. J Hepatol, 1985. **1**(5): p. 489-99.
320. George, J. and G. Chandrakasan, *Biochemical abnormalities during the progression of hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine*. Clin Biochem, 2000. **33**(7): p. 563-70.
321. Oh, S.W., et al., *Anti-fibrotic effects of a methylenedioxybenzene compound, CW209292 on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(8): p. 1364-70.
322. Nomura, F. and C.S. Lieber, *Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **100**(1): p. 131-7.
323. Setshedi, M., J.R. Wands, and S.M. Monte, *Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(3): p. 178-85.
324. Fernandez-Munoz, D., et al., *Systemic and splanchnic hemodynamic disturbances in conscious rats with experimental liver cirrhosis without ascites*. Am J Physiol, 1985. **249**(3 Pt 1): p. G316-20.
325. Moshage, H., A. Casini, and C.S. Lieber, *Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes*. Hepatology, 1990. **12**(3 Pt 1): p. 511-8.
326. Niemela, O., et al., *Covalent protein adducts in the liver as a result of ethanol metabolism and lipid peroxidation*. Lab Invest, 1994. **70**(4): p. 537-46.
327. Madden, J.W., P.M. Gertman, and E.E. Peacock, Jr., *Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease*. Surgery, 1970. **68**(1): p. 260-7; discussion 267-8.
328. Lee, M.H., S. Yoon, and J.O. Moon, *The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(1): p. 72-6.
329. Yoshida, T., et al., *SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1701-7.
330. Berg, R.A., *Determination of 3- and 4-hydroxyproline*. Methods Enzymol, 1982. **82 Pt A**: p. 372-98.
331. Neuman, R.E. and M.A. Logan, *The determination of hydroxyproline*. J Biol Chem, 1950. **184**(1): p. 299-306.
332. Woessner, J.F., Jr., *The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid*. Arch Biochem Biophys, 1961. **93**: p. 440-7.
333. Puchtler, H., F.S. Waldrop, and L.S. Valentine, *Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA*. Beitr Pathol, 1973. **150**(2): p. 174-87.
334. Geerts, A., et al., *Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting*. Hepatology, 1998. **27**(2): p. 590-8.
335. Wierzbicka-Patynowski, I., Y. Mao, and J.E. Schwarzbauer, *Analysis of fibronectin matrix assembly*. Curr Protoc Cell Biol, 2004. **Chapter 10**: p. Unit 10 12.
336. Kanters, S.D., et al., *Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes*. Diabetes Care, 2001. **24**(2): p. 323-7.
337. Hackl, N., *Die Rolle des Fibronektins bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren. [Dissertation]*. 2010, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
338. Abe, M., et al., *An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct*. Anal Biochem, 1994. **216**(2): p. 276-84.
339. Postic, C. and M.A. Magnuson, *DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 149-50.

340. Postic, C., et al., *Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 305-15.
341. Pinkert, C.A., et al., *An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice*. Genes Dev, 1987. **1**(3): p. 268-76.
342. Rossert, J., H. Eberspaecher, and B. de Crombrughe, *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*. J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1421-32.
343. Dacquin, R., et al., *Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast*. Dev Dyn, 2002. **224**(2): p. 245-51.
344. Constien, R., et al., *Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line*. Genesis, 2001. **30**(1): p. 36-44.
345. Jilka, R.L., et al., *Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 439-46.
346. Bellido, T., et al., *Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50259-72.
347. Clezardin, P., *Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class*. Bone, 2011. **48**(1): p. 71-9.
348. Watson, S.A. and T.M. Morris, *Theoretical Considerations in Using Animal Models of Metastasis and Brief Methodology for In Vivo Colorectal Cancer Models in SCID and Nude Mice*. 2001. p. 195-204.
349. Arguello, F., R.B. Baggs, and C.N. Frantz, *A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow*. Cancer Res, 1988. **48**(23): p. 6876-81.
350. Sadikot, R.T. and T.S. Blackwell, *Bioluminescence imaging*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(6): p. 537-40, 511-2.
351. McBride, C., D. Gaupp, and D.G. Phinney, *Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR*. Cytotherapy, 2003. **5**(1): p. 7-18.
352. Mighell, A.J., A.F. Markham, and P.A. Robinson, *Alu sequences*. FEBS Lett, 1997. **417**(1): p. 1-5.
353. Houck, C.M., F.P. Rinehart, and C.W. Schmid, *A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome*. J Mol Biol, 1979. **132**(3): p. 289-306.
354. Lee, R.H., et al., *A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2153-61.
355. Havens, A.M., et al., *An in vivo mouse model for human prostate cancer metastasis*. Neoplasia, 2008. **10**(4): p. 371-80.
356. Wetterwald, A., et al., *Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 1143-53.
357. Buijs, J.T., et al., *BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 1047-57.
358. Cailleau, R., et al., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(3): p. 661-74.
359. van der Pluijm, G., et al., *Interference with the microenvironmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7682-90.
360. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
361. Sommaggio, R., et al., *Multiple receptors trigger human NK cell-mediated cytotoxicity against porcine chondrocytes*. J Immunol. **188**(5): p. 2075-83.
362. Velling, T., et al., *Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37377-81.
363. McDonald, J.A., D.G. Kelley, and T.J. Broekelmann, *Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix*. J Cell Biol, 1982. **92**(2): p. 485-92.
364. Kliment, C.R., et al., *A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(4): p. 349-55.
365. Ensenberger, M.G., D.S. Annis, and D.F. Mosher, *Actions of the functional upstream domain of protein F1 of Streptococcus pyogenes on the conformation of fibronectin*. Biophys Chem, 2004. **112**(2-3): p. 201-7.

366. Wang, H., Y. Zhang, and R.O. Heuckeroth, *PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA*. FEBS Lett, 2007. **581**(16): p. 3098-104.
367. Bioulac-Sage, P., et al., *Nerves and perisinusoidal cells in human liver*. J Hepatol, 1990. **10**(1): p. 105-12.
368. Schuppan, D. and N.H. Afdhal, *Liver cirrhosis*. Lancet, 2008. **371**(9615): p. 838-51.
369. Clouthier, D.E., S.A. Comerford, and R.E. Hammer, *Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2697-713.
370. Nakamura, T., et al., *Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats*. Hepatology, 2000. **32**(2): p. 247-55.
371. Kawelke, N., *Die Rolle von Fibronektin in der Leber und im Knochen [Dissertation]*. 2009, Universität: Kassel.
372. Cuddy, A.C., C. Qiu, and S. Gerecht, *Breast cancer cell-derived matrix supports vascular morphogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012.
373. Maity, G., et al., *Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity*. Tumour Biol, 2011. **32**(1): p. 129-38.
374. Pathak, A. and S. Kumar, *Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness*. Integr Biol (Camb), 2011. **3**(4): p. 267-78.
375. Guise, T.A., et al., *Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis*. J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1544-9.
376. Phadke, P.A., et al., *Kinetics of metastatic breast cancer cell trafficking in bone*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1431-40.
377. Scott, L.M., G.V. Priestley, and T. Papayannopoulou, *Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(24): p. 9349-60.
378. Chung, D.J., et al., *Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 20): p. 4187-98.
379. Singh, R.J., et al., *Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 39-49.
380. Chiang, H.Y., et al., *Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(7): p. 1074-9.
381. Kumazaki, T., M. Kobayashi, and Y. Mitsui, *Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts*. Exp Cell Res, 1993. **205**(2): p. 396-402.
382. Wong, A.S. and B.M. Gumbiner, *Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1191-203.
383. Chatelain, R., et al., *IL-10 inhibits ICAM-1 expression on human Langerhans cells but not on keratinocytes, dermal endothelial cells or fibroblasts*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(9): p. 477-82.
384. Wollenberg, A., et al., *Demonstration of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/CD23 in psoriatic epidermis: inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) but not Langerhans cells are the relevant CD1a-positive cell population*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(9): p. 517-21.
385. Huang, H.J., et al., *Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma*. Mucosal Immunol. **4**(5): p. 519-27.
386. Gjedde, S.B. and A. Gjeode, *Organ blood flow rates and cardiac output of the BALB/c mouse*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1980. **67**(4): p. 671-674.
387. Suva, L.J., et al., *Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation*. J Bone Miner Res, 1993. **8**(3): p. 379-88.
388. Young, M.F., *Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis*. Osteoporos Int, 2003. **14 Suppl 3**: p. S35-42.
389. Fuller, K., J.M. Owens, and T.J. Chambers, *Induction of osteoclast formation by parathyroid hormone depends on an action on stromal cells*. J Endocrinol, 1998. **158**(3): p. 341-50.
390. Daubine, F., et al., *Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(4): p. 322-30.
391. Boissier, S., et al., *Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 3890-4.

392. Posner, L.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces monocyte recruitment that is associated with an increase in numbers of osteoblasts*. Bone, 1997. **21**(4): p. 321-7.
393. Craig, M.J. and R.D. Loberg, *CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 611-9.
394. Tannenbaum, C.S., et al., *Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 693-9.
395. Siegmund, S.V. and S. Dooley, *Alkohol und Leber Grundlagen, Diagnostik, Therapie*, in *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten*, M. Singer, Editor. 2005, Teyssen: Heidelberg. p. 230-274.
396. Salaspuro, M., *Epidemiological aspects of alcoholic liver disease, ethanol metabolism and pathogenesis of alcoholic liver injury*, in *Oxford textbook of clinical hepatology*, J. Bircher, et al., Editors. 1999, Oxford university press: Oxford New York. p. 1157-1178.
397. Gressner, A.M. and D. Schuppan, *Cellular and molecular pathobiology, pharmacological intervention, and biochemical assessment of liver fibrosis*, in *Oxford textbook of clinical hepatology*, J. Bircher, et al., Editors. 1999, Oxford university press: Oxford New York. p. 1157-1178.
398. Sorrell, M.F. and S. Mukherjee, *Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)*. Curr Treat Options Gastroenterol, 1999. **2**(6): p. 447-450.
399. Lunz, J.G., 3rd, et al., *Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21(WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs*. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1379-90.
400. Ezure, T., et al., *The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1627-39.
401. Xia, J.L., et al., *Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation*. Am J Pathol, 2006. **168**(5): p. 1500-12.
402. Weiler-Normann, C., J. Herkel, and A.W. Lohse, *Mouse models of liver fibrosis*. Z Gastroenterol, 2007. **45**(1): p. 43-50.
403. Muriel, P. and Y. Escobar, *Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride*. J Appl Toxicol, 2003. **23**(2): p. 103-8.
404. Sottile, J., et al., *Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1934-46.
405. Stetler-Stevenson, W.G., *Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix*. Am J Pathol, 1996. **148**(5): p. 1345-50.
406. Hammel, P., et al., *Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct*. N Engl J Med, 2001. **344**(6): p. 418-23.
407. Anthony, P.P., et al., *The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization*. J Clin Pathol, 1978. **31**(5): p. 395-414.
408. Parsons, C.J., M. Takashima, and R.A. Rippe, *Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22 Suppl 1**: p. S79-84.
409. Alba, M., et al., *Once-daily administration of CJC-1295, a long-acting growth hormone-releasing hormone (GHRH) analog, normalizes growth in the GHRH knockout mouse*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(6): p. E1290-4.
410. Hall, R.L. and N.E. Everds, *Factors affecting the interpretation of canine and nonhuman primate clinical pathology*. Toxicol Pathol, 2003. **31 Suppl**: p. 6-10.
411. Allison, A.C., *Turnovers of erythrocytes and plasma proteins in mammals*. Nature, 1960. **188**: p. 37-40.
412. Chaudhury, C., et al., *The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan*. J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 315-22.
413. Alcolado, R., M.J. Arthur, and J.P. Iredale, *Pathogenesis of liver fibrosis*. Clin Sci (Lond), 1997. **92**(2): p. 103-12.
414. Gressner, A.M., et al., *Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes)*. J Hepatol, 1993. **19**(1): p. 117-32.
415. Lee, K.S., et al., *Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2461-8.
416. Mann, B.K., R.H. Schmedlen, and J.L. West, *Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells*. Biomaterials, 2001. **22**(5): p. 439-44.
417. Ihn, H., *Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(6): p. 681-5.
418. Smith, C.N., *Transendothelial migration*, in *Adhesion:its role in inflammatory disease*, J.M. Livi, Editor. 1992, W.H. & Co.: New York. p. 82-115.

419. Shulman, Z., et al., *Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots*. *Nat Immunol*, 2011. **13**(1): p. 67-76.
420. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(3): p. 336-41.
421. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
422. Wynn, T.A., *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis*. *J Exp Med*, 2011. **208**(7): p. 1339-50.
423. Hironaka, K., et al., *Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **267**(1): p. 290-5.
424. Friedman, S.L., *Hepatic fibrosis*, in *Schiff's diseases of the liver*, E. Schiff, M.F. Sorell, and W.C. Maddrey, Editors. 1999a, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 371-385.
425. Sottile, J. and J. Chandler, *Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(2): p. 757-68.
426. Rebres, R.A., et al., *Extracellular matrix incorporation of normal and NEM-alkylated fibronectin: liver and spleen deposition*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(6 Pt 1): p. G902-12.
427. McDonald, G.A., et al., *Relaxin increases ubiquitin-dependent degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **285**(1): p. F59-67.
428. Deno, D.C., T.M. Saba, and E.P. Lewis, *Kinetics of endogenously labeled plasma fibronectin: incorporation into tissues*. *Am J Physiol*, 1983. **245**(4): p. R564-75.
429. Fontana, L., et al., *Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1*. *FASEB J*, 2005. **19**(13): p. 1798-808.
430. Annes, J.P., et al., *Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1*. *J Cell Biol*, 2004. **165**(5): p. 723-34.
431. Oyama, F., et al., *Patterns of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in human adult and fetal tissues*. *Biochemistry*, 1989. **28**(3): p. 1428-34.
432. Leask, A. and D.J. Abraham, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. *FASEB J*, 2004. **18**(7): p. 816-27.
433. Serini, G., et al., *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(3): p. 873-81.
434. Qi, Z., et al., *Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2345-9.
435. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
436. Rosol, T.J., et al., *Animal models of bone metastasis*. *Cancer*, 2003. **97**(3 Suppl): p. 748-57.
437. Monsky, W.L., et al., *Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(4): p. 1008-13.
438. Fidler, I.J., *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine*. *J Natl Cancer Inst*, 1970. **45**(4): p. 773-82.
439. Kim, J.W., et al., *Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells*. *Cancer Lett*, 2004. **213**(2): p. 203-12.
440. Wong, C.W., et al., *Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 333-8.
441. Lo Celso, C., et al., *Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche*. *Nature*, 2009. **457**(7225): p. 92-6.
442. Marks, S.C. and P.R. Odgren, *Structure and development of the skeleton*, in *Principles of bone biology*, J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, and G.A. Rodan, Editors. 2002, Academic: New York. p. 3-15.
443. Taichman, R.S. and S.G. Emerson, *Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor*. *J Exp Med*, 1994. **179**(5): p. 1677-82.
444. Taichman, R., et al., *Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors*. *Br J Haematol*, 2001. **112**(2): p. 438-48.
445. Welch, D.R., et al., *Breast cancer metastasis to bone: evolving models and research challenges*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2003. **3**(1): p. 30-8.
446. Yoneda, T., *Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone*. *Histol Histopathol*, 1997. **12**(4): p. 1145-9.
447. Gross, T.S. and T.L. Clemens, *Vascular Control of Bone Remodeling*, in *Advances in Organ Biology*. 1998, Elsevier. p. 137-160.

448. O'Connell, J.T., et al., *VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 16002-7.
449. Bidard, F.C., et al., *A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?* Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 5-10.
450. Kaplan, R.N., S. Rafii, and D. Lyden, *Preparing the "soil": the premetastatic niche*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11089-93.
451. Kaplan, R.N., B. Psaila, and D. Lyden, *Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 521-9.
452. Sleeman, J.P., *The metastatic niche and stromal progression*. Cancer Metastasis Rev, 2012.
453. Joseph, J., et al., *Disseminated prostate cancer cells can instruct hematopoietic stem and progenitor cells to regulate bone phenotype*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(3): p. 282-92.
454. Karparkin, S., et al., *Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo*. J Clin Invest, 1988. **81**(4): p. 1012-9.
455. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
456. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 631-44.
457. Byers, S.W., et al., *Role of E-cadherin in the response of tumor cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow: measurement of cell-cell adhesion strength*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 5)**: p. 2053-64.
458. Sakai, T., M. Larsen, and K.M. Yamada, *Fibronectin requirement in branching morphogenesis*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 876-81.
459. Le Floch, A., et al., *Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 559-70.
460. Johnson, G.R. and M.A. Moore, *Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis*. Nature, 1975. **258**(5537): p. 726-8.
461. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
462. Taichman, R.S., et al., *Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1832-7.
463. Kucia, M., et al., *Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis*. Stem Cells, 2005. **23**(7): p. 879-94.
464. Shiozawa, Y., et al., *Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer*. J Cell Biochem, 2008. **105**(2): p. 370-80.
465. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, *How do stem cells find their way home?* Blood, 2005. **106**(6): p. 1901-10.
466. Hirshberg, A., et al., *Metastatic tumors to postextraction sites*. J Oral Maxillofac Surg, 1993. **51**(12): p. 1334-7.
467. Marturano, J.E., et al., *An improved murine femur fracture device for bone healing studies*. J Biomech, 2008. **41**(6): p. 1222-8.
468. Zhao, H., et al., *Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo*. J Biomed Opt, 2005. **10**(4): p. 41210.
469. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.
470. Cho, T.J., L.C. Gerstenfeld, and T.A. Einhorn, *Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(3): p. 513-20.
471. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
472. Koh, K.K., I. Sakuma, and M.J. Quon, *Differential metabolic effects of distinct statins*. Atherosclerosis, 2011. **215**(1): p. 1-8.
473. Eielson, C., et al., *Estrogen modulates parathyroid hormone-induced fibronectin production in human and rat osteoblast-like cells*. Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1639-44.
474. Ishikawa, Y., et al., *Effects of calcitonin and parathyroid hormone on calcification of primary cultures of chicken growth plate chondrocytes*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(3): p. 356-66.
475. Sun, B.H., et al., *Parathyroid hormone increases circulating levels of fibronectin in vivo: modulating effect of ovariectomy*. Endocrinology, 1997. **138**(9): p. 3918-24.
476. Yin, J.J., et al., *TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 197-206.

477. Roodman, G.D., *Biology of osteoclast activation in cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(15): p. 3562-71.
478. Gallo, M., et al., *Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: implications for adjuvant therapy of breast cancer*. Ann Oncol, 2011.
479. Peters, A., et al., *Osteoporose: Diagnostik — Prävention — Therapie*, in *Rehabilitation in Orthopädie und Unfallchirurgie*, V. Stein and B. Greitemann, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg. p. 246-257.
480. Diel, I.J., E.F. Solomayer, and G. Bastert, *Bisphosphonates and the prevention of metastasis: first evidences from preclinical and clinical studies*. Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 3080-8.
481. Datta, N.S. and A.B. Abou-Samra, *PTH and PTHrP signaling in osteoblasts*. Cell Signal, 2009. **21**(8): p. 1245-54.
482. Swartz, M.A., et al., *Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2473-2480.
483. Visnjic, D., et al., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3258-64.
484. Gray, C. and S.J. Jones, *PTH(1-34) suppresses appositional bone formation by cultured rat cranial osteoblasts*. Bone, 1998. **23**(5): p. 453-7.
485. Amsel, S., et al., *The significance of intramedullary cancellous bone formation in the repair of bone marrow tissue*. Anat Rec, 1969. **164**(1): p. 101-11.
486. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
487. McCulloch, C.A. and J.N. Heersche, *Lifetime of the osteoblast in mouse periodontium*. Anat Rec, 1988. **222**(2): p. 128-35.
488. Podbesek, R., et al., *Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds*. Endocrinology, 1983. **112**(3): p. 1000-6.
489. Theriault, R.L. and G.N. Hortobagyi, *The evolving role of bisphosphonates*. Semin Oncol, 2001. **28**(3): p. 284-90.
490. van der Pluijm, G., et al., *Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 698-705.
491. Clezardin, P., et al., *In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates*. Curr Med Chem, 2003. **10**(2): p. 173-80.
492. Green, J.R., *Antitumor effects of bisphosphonates*. Cancer, 2003. **97**(3 Suppl): p. 840-7.
493. Sasaki, A., et al., *Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice*. Cancer Res, 1995. **55**(16): p. 3551-7.
494. Metcalf, S., H.S. Pandha, and R. Morgan, *Antiangiogenic effects of zoledronate on cancer neovasculation*. Future Oncol, 2011. **7**(11): p. 1325-33.
495. Fournier, P., et al., *Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6538-44.
496. Wood, J., et al., *Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(3): p. 1055-61.
497. Hiraga, T., et al., *Effects of oral UFT combined with or without zoledronic acid on bone metastasis in the 4T1/luc mouse breast cancer*. Int J Cancer, 2003. **106**(6): p. 973-9.
498. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
499. Folkman, J., *Angiogenesis*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 1-18.
500. Hamilton, E., T.M. Clay, and K.L. Blackwell, *New Perspectives on Zoledronic Acid in Breast Cancer: Potential Augmentation of Anticancer Immune Response*. Cancer Investigation, 2011. **29**(8): p. 533-541.
501. David Roodman, G., *Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis*. Cancer, 2003. **97**(3 Suppl): p. 733-8.
502. Partridge, N.C., S.R. Bloch, and A.T. Pearman, *Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 321-7.
503. Toulis, K.A., et al., *Targeting the osteoblast: approved and experimental anabolic agents for the treatment of osteoporosis*. Hormones (Athens), 2011. **10**(3): p. 174-95.
504. Youngs, S.J., et al., *Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 257-66.

505. Prest, S.J., et al., *Chemokines induce the cellular migration of MCF-7 human breast carcinoma cells: subpopulations of tumour cells display positive and negative chemotaxis and differential in vivo growth potentials*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(5): p. 389-96.
506. Robinson, S.C., et al., *A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8360-5.
507. Luboshits, G., et al., *Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4681-7.
508. Son, D.S., et al., *Keratinocyte chemoattractant (KC)/human growth-regulated oncogene (GRO) chemokines and pro-inflammatory chemokine networks in mouse and human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(8): p. 1302-12.
509. Ohmori, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo*. Am J Pathol, 1993. **142**(3): p. 861-70.
510. Richter, G., et al., *Interleukin 10 transfected into Chinese hamster ovary cells prevents tumor growth and macrophage infiltration*. Cancer Res, 1993. **53**(18): p. 4134-7.
511. Sjoberg, J., et al., *Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease*. Br J Haematol, 1996. **92**(2): p. 393-400.
512. Mantovani, A., et al., *The origin and function of tumor-associated macrophages*. Immunol Today, 1992. **13**(7): p. 265-70.
513. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
514. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammatory cells and cancer: think different!* J Exp Med, 2001. **193**(6): p. F23-6.
515. Hagemann, T., et al., *Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(7): p. 1993-2002.
516. Khan, O.M., et al., *Geranylgeranyltransferase type I (GGTase-I) deficiency hyperactivates macrophages and induces erosive arthritis in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 628-39.
517. Nussbaumer, O., et al., *DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by gammadelta T lymphocytes*. Blood, 2011. **118**(10): p. 2743-51.
518. Philips, M.R., *The perplexing case of the geranylgeranyl transferase-deficient mouse*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 510-3.
519. Lu, J., et al., *In vivo antitumor effect of a novel inhibitor of protein geranylgeranyltransferase-I*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(5): p. 1218-26.
520. Downward, J., *Cell cycle: routine role for Ras*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. R258-60.
521. Khwaja, A., J. O'Connolly, and B.M. Hendry, *Prenylation inhibitors in renal disease*. Lancet, 2000. **355**(9205): p. 741-4.
522. Siddhanti, S.R. and L.D. Quarles, *Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 310-20.
523. Greenwood, J., L. Steinman, and S.S. Zamvil, *Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 358-70.
524. Higgins, J.B. and P.J. Casey, *The role of prenylation in G-protein assembly and function*. Cell Signal, 1996. **8**(6): p. 433-7.
525. Jagdev, S.P., et al., *The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel*. Br J Cancer, 2001. **84**(8): p. 1126-34.
526. Tassone, P., et al., *Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro*. Br J Cancer, 2003. **88**(12): p. 1971-8.
527. Almubarak, H., et al., *Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers*. J Carcinog, 2011. **10**: p. 2.
528. Rachner, T.D., et al., *Zoledronic acid induces apoptosis and changes the TRAIL/OPG ratio in breast cancer cells*. Cancer Lett, 2010. **287**(1): p. 109-16.

VIII. Anhang