

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar

Die MDR 2 Knockout Maus als Modell der hepatischen Osteodystrophie

Andrea Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. K. Nüssler,

Eberhard-Karls Universität Tübingen

2. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 31.07.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2013 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Leber	1
1.2.1	Histologischer Aufbau der Leber	1
1.2.2	Physiologische Aufgaben der Leber	2
1.2.3	Pathophysiologie der Leber	3
1.3	Knochen	4
1.3.1	Knochenstruktur, -aufbau und -zellen	4
1.3.2	Remodeling und physiologische Aufgaben des Knochens	5
1.3.3	Imbalance des Knochenstoffwechsels	6
1.4	Studienlage	7
1.4.1	Knochenveränderungen bei chronischen Leberkrankheiten	7
1.4.2	Reversibilität hepatischer Osteodystrophie	8
1.5	Vitamin D Metabolismus	10
1.6	Die Rolle von TGF-β in Leber- und Knochenstoffwechsel	11
1.7	Alternative Tiermodell	13
1.8	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Studiendesign	15
2.2	Versuchstiere	16
2.2.1	Mausstämme	16
2.2.2	Präparatherstellung	17

2.2.2.1	Material	17
2.2.2.2	Methode	17
2.3	Histologie	18
2.3.1	Histotechnik	18
2.3.1.1	Fixierung der Lebergewebebeob	18
2.3.1.1.1	Material	18
2.3.1.1.2	Prinzip	18
2.3.1.1.3	Ausführung der Gewebefixierung	18
2.3.1.2	Entwässern und Einbetten der Lebergewebebeob	18
2.3.1.2.1	Material und Geräte	18
2.3.1.2.2	Prinzip der Entwässerung und Einbettung	19
2.3.1.2.3	Durchführung der Entwässerung und Einbettung	19
2.3.1.3	Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten	19
2.3.1.3.1	Material und Geräte	19
2.3.1.3.2	Prinzip der Herstellung von Schnittpräparaten	20
2.3.1.3.3	Durchführung	20
2.3.1.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung und Eindecken	20
2.3.1.4.1	Material	20
2.3.1.4.2	Prinzip der Hämatoxylin-Eosin Färbung	21
2.3.1.4.3	Durchführung der Färbung	21
2.3.1.5	Masson-Goldner-Trichrom Färbung und Eindecken	23
2.3.1.5.1	Material und Geräte	23
2.3.1.5.2	Prinzip der Masson-Goldner-Trichrom Färbung	24
2.3.1.5.3	Durchführung der Färbung	24
2.3.2	Lichtmikroskopische Auswertung der Leberschnittpräparate	27
2.3.2.1	Geräte und Software	27
2.3.2.2	Prinzip der lichtmikroskopischen Auswertung	27

2.3.2.3	Durchführung der lichtmikroskopischen Auswertung	27
2.4	Bestimmung und Auswertung der Blutserumwerte	28
2.4.1	Enzymaktivitätsbestimmung	28
2.4.1.1	Material, Geräte und Software	28
2.4.1.2	Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung	29
2.4.1.3	Ausführung der Enzymaktivitätsbestimmung	29
2.4.2	TGF- β -Konzentrationsbestimmung	31
2.4.2.1	Material, Geräte und Software	31
2.4.2.2	Prinzip	32
2.4.2.3	Ausführung der TGF- β -Konzentrationsbestimmung	32
2.5	Mikro-CT Messungen	35
2.5.1	Gerät und Software	35
2.5.2	Prinzip der μ CT Messung	35
2.5.3	Durchführung der μ CT Messung	35
2.5.4	Beschriebene Knochenparameter	36
2.6	Quantifizierung der Genexpression in Leber- und Knochengewebe	36
2.6.1	RNA-Isolation aus Leber- und Knochengewebe	36
2.6.1.1	Material, Geräte und Software	36
2.6.1.2	Prinzip der RNA-Isolation	37
2.6.1.3	Durchführung der RNA-Isolation	38
2.6.2	Komplementäre DNA (cDNA) Synthese	40
2.6.2.1	Material und Geräte	40
2.6.2.2	Prinzip der cDNA Synthese	40
2.6.2.3	Durchführung der cDNA Synthese	41
2.6.3	cDNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und elektrophoretische Trennung von DNA	41
2.6.3.1	Material, Geräte und Software	41

2.6.3.2	Prinzip der PCR und Gelelektrophorese	42
2.6.3.3	Durchführung der PCR und Gelelektrophorese	43
2.6.3.4	Angewandte Primer	44
2.6.4	Densitometrische Auswertung der Genexpression	46
2.6.4.1	Software	46
2.6.4.2	Prinzip und Ausführung der densitometrischen Auswertung	46
2.7	Statistische Auswertung	46
2.7.1	Software	46
2.7.2	Durchführung der statistischen Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Histologische Auswertung des Lebergewebes im zeitlichen Verlauf	47
3.2	Erhöhte Transaminasen- und Dehydrogenasenspiegel im Blutserum der MDR2^{-/-} Mäuse	51
3.2.1	Enzymaktivität LDH	51
3.2.2	Enzymaktivität ASAT	52
3.2.3	Enzymaktivität ALAT	53
3.3	Veränderte Knochenarchitektur von MDR2^{-/-} Mäusen	54
3.3.1	Kortikalisarchitektur	54
3.3.2	Spongiosaarchitektur	56
3.4	Chronisch erhöhte TGF-β Serumspiegel in MDR2^{-/-} Mäusen	60
3.5	Reduzierte Expression von Knochenmarkern in älteren MDR2^{-/-} Mäusen	61
3.5.1	OPN-Expression des Lebergewebes	62
3.5.2	Osteocalcin-Expression des Lebergewebes	63
3.5.3	OPG-Expression des Lebergewebes	64
3.5.4	OPN-Expression des Knochengewebes	65
3.5.5	Osteocalcin-Expression des Knochengewebes	66

3.6	Genexpression des Lebergewebes von Vitamin D-Stoffwechselregulierender Enzyme und Proteine	67
4	Diskussion	69
4.1	Limitierung und Ausblick	77
5	Zusammenfassung	80
6	Abbildungsverzeichnis	82
7	Tabellenverzeichnis	83
8	Literaturverzeichnis	84
9	Anhang	94
9.1	Färbeoptimierung	94
9.1.1	HE Färbung	94
9.1.2	MGT Färbung	95
9.2	Zusätzliche histologische Bilder	96
9.3	Zusatzinformationen der verwendeten Primer	98
9.3.1	β -Aktin	98
9.3.2	Osteocalcin	100
9.3.3	Osteopontin	105
9.3.4	Osteoprotegerin	107
9.3.5	MDR2	111
10	Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	DNA	Desoxyribonukleinsäure
µg	Mikrogramm	dNTP	Desoxyribonukleotid- triphosphat
µl	Mikroliter	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
µm	Mikrometer	EtBr	Ethidiumbromid
Abb.	Abbildung	EtOH	Ethanol
ALAT/ALT (früher GPT)	Alanin-Aminotransferase (früher Glutamat-Pyruvat- Transaminase)	FFPE	formalin-fixiert-paraffin- eingebettet
ASAT/AST (früher GOT)	Aspartat-Aminotransferase (früher Glutamat-Oxalacetat- Transaminase)	g	Gramm
AP	Alkalische Phosphatase	g	n × Erdanziehungskraft
BMD	Knochenmineralisationsdichte	GC	gruppenspezif. Komponente, Gen kodierend für VDBP
bp	Basenpaare	h	Stunde/ Stunden
BV	Knochenvolumen	HE	Hämatoxylin-Eosin
BV/TV	Knochenvolumenanteil	H₂O	Wasser
bzw	beziehungsweise	l	Liter
c	Konzentration	LDH	Laktatdehydrogenase
ca.	circa	M	Molar
cDNA	komplementäre DNA	MDR	Multidrug Resistance Gen
cm	Zentimeter	MgCl₂	Magnesiumchlorid
Conn.D	Connectivity Density	mg	Milligramm
CYP 2R1	Vitamin-D-25-Hydroxylase	MGT	Masson-Goldner-Trichrom
CYP 27A1	Sterol-26-Hydroxylase	min	Minute
ddH₂O	bidestilliertes Wasser	ml	Milliliter
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mm	Millimeter
DEXA	dual-energy-X-ray- absorptiometry	mM	Millimolar
DHCR7	7-Dehydrocholesterol-Reduktase	MRI	Klinikum rechts der Isar
dH₂O	destilliertes Wasser	mRNA	messenger RNA
DMEM	Dulbecco´s modifizierte Medien	ng	Nanogramm
		nm	Nanometer
		OPG	Osteoprotegerin
		OPN	Osteopontin

Abkürzungsverzeichnis

25(OH)D₃	25-Hydroxycholecalciferol
1,25(OH)₂D₃	1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol
PBC	primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Liga
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
SMI	Structure model index
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat/EDTA
Tb.N	Trabekelanzahl
Tb.Sp	Trabekelseparation
Tb.Th	Trabekeldicke
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TV	Gesamtknochenvolumen
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VDBP	Vitamin D-bindendes Protein
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Chronische Lebererkrankungen sind häufig und haben vielfältige Ursachen, die von chronischem Alkoholkonsum und Virushepatitiden über Autoimmunerkrankungen bis zu selteneren Auslösern wie Schistosomatidae reichen. Im Verlauf der chronischen Erkrankungen entwickelt sich oftmals eine Leberinsuffizienz und schließlich, als gemeinsame Endstrecke nahezu aller chronischer Leberkrankheiten, eine Leberzirrhose. Durch Leberinsuffizienz und -zirrhose bedingt entwickeln sich zahlreiche Komplikationen. Als extrahepatische Manifestation chronischer Leberkrankheiten wurden erstmals 1960 hepatische Osteodystrophien beschrieben [63:S. 82]. Dabei kommen zwei Formen der Osteodystrophie vor, Osteoporose und Osteomalazie, die zum vermehrten Auftreten von Frakturen und Knochenschmerzen führen [63:S. 82]. Die Problematik dieser Osteopathien ist heutzutage nicht die Diagnostik, sondern die fehlende Vorhersagbarkeit einer Manifestation, unzureichende Prophylaxe sowie unbefriedigende therapeutische Möglichkeiten auf Grund der bisher noch nicht ausreichend geklärten Regulationsmechanismen zwischen geschädigtem Leberstoffwechsel und Knochenstoffwechsel in ihrer Pathogenese. Somit stellt sich die Frage, welche Parameter sowohl durch parenchymatöse als auch durch cholestatische Leberkrankheiten systemisch verändert sind und wie diese den Knochenstoffwechsel beeinflussen können.

1.2 Leber

1.2.1 Histologischer Aufbau der Leber

Gesundes Lebergewebe lässt sich klassisch in kleine sechseckige Baueinheiten, die Zentralvenenläppchen, gliedern [66:S. 280]. Zu den in der Mitte liegenden Zentralvenen verlaufen, von den Kanten ausgehend, zu verzweigten Platten angeordnete Hepatozyten. Periportalfelder (Glisson-Trias) befinden sich an den Stellen, an denen sich drei oder mehr Sechsecke treffen und enthalten in der Regel je eine Arterie, eine Vene, einen Gallengang sowie ein Lymphgefäß in Bindegewebe eingebettet. Zwischen den Hepatozyten verlaufen die Sinusoide, an deren lumenalem Endothel Kupffer-Zellen (fixierte Makrophagen) liegen [66:S. 279, 142:S. 340], und die mit den Hepatozyten einen Zwischenraum, den Disse-Raum, in dem Ito-Zellen das spärliche Bindegewebe des Disse-Raumes produzieren, bilden [142:S. 341]. Das Gallensystem hat seinen Ursprung in den Läppchen, von wo die produzierte Galle nach

peripher in die Gallengänge der Periportalfelder abfließt [66:S. 280, 142:S. 337]. Die Begrenzung der Gallekanälchen zwischen den Hepatozyten bilden Tight Junctions und Desmosomen, so dass die im Hepatozyten produzierte Galle nicht austreten und Läsionen verursachen kann [142:S. 339].

Zentralvenenläppchen

schematischer Ausschnitt eines Leberläppchens

Lebereinheiten

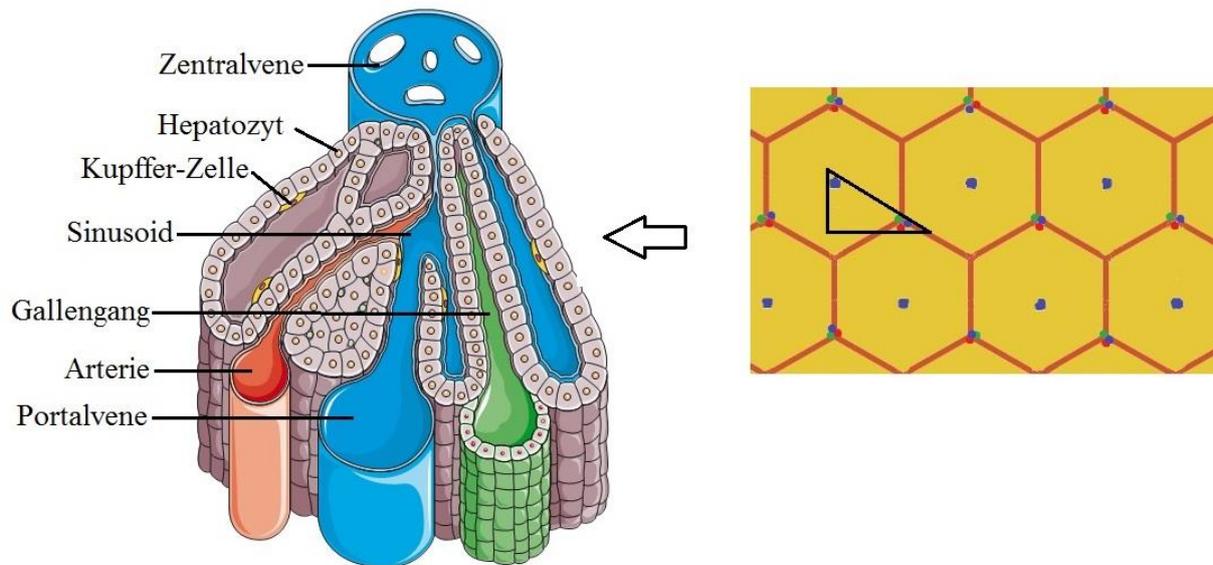


Abb. 1-1 Histologischer Leberaufbau: Zentralvenenläppchen

Grafik Quelle: <http://www.servier.de/medicalart/verdaunungssystem/?catSelect=7; 05.08.11>

1.2.2 Physiologische Aufgaben der Leber

Alle wesentlichen Funktionen der Leber werden durch Hepatozyten ausgeführt [142:S. 340]. Zu diesen gehört unter anderen die Biotransformation, bei der die Leberzellen endogene und exogene Stoffe entgiften beziehungsweise (bzw.) abbauen, damit diese in nun teilweise inaktiviertem Zustand über Galle oder Urin ausscheidbar sind [66:S. 280, 101:S. 507, 142:S. 339]. Eine weitere Hauptaufgabe der Leber besteht in der Proteinsynthese, wobei mindestens 80 % der Plasmaproteine in den Hepatozyten synthetisiert werden [66:S. 280, 101:S. 507]. Überdies wird die Lebergalle, die letztendlich der Fettverdauung und -resorption dient, zu 80 % durch Hepatozyten produziert. Physiologischerweise bilden die Phospholipide mit den Gallensäuren in der Galle Mizellen, durch die das Gallengangsepithel vor Läsionen durch die Gallensäure geschützt wird [102:S. 494ff, 121:S. 672, 142:S. 339]. Darüber hinaus wird Bilirubin in Hepatozyten mit Glukuronsäure konjugiert und nun in wasserlöslichem Zustand

in die Gallekanälchen sekretiert und ausgeschieden [66:S. 280, 102:S. 496, 142:S. 339]. Ferner können Hepatozyten durch Glykogensynthese, Glykogenolyse, Glukoneogenese und Glykolyse den Kohlenhydratstoffwechsel [66:S. 281, 101:S. 507, 142:S. 340] sowie durch die Bildung, die Weiterverarbeitung und den Abbau von Cholesterin, Fettsäuren, Phospholipide und Triglyceride den Lipidstoffwechsel beeinflussen [102:S. 496, 121:S. 671]. Zudem spielt die Leber eine Rolle bei der Vitaminsynthese von Vitamin D₃, das in der Leber zu 25-OH-Vitamin D₃ hydroxyliert wird [101:S. 507]. Überdies wird mit der Phagozytose von Fremdstoffen, Partikeln und Mikroorganismen durch die Kupffer-Zellen ein Beitrag zur Abwehr geleistet [101:S. 507, 142:S. 340]. Daneben ist die Leber Teil des enterohepatischen Kreislaufes. Über 90 % der Gallensäuren werden im Ileum rückresorbiert und wieder in die Hepatozyten aufgenommen, wodurch täglich nur ein kleiner Anteil Gallensäure neu synthetisiert werden muss [66:S. 283, 102:S. 497].

1.2.3 Pathophysiologie der Leber

Die permanente Leberschädigung im Rahmen chronischer Leberkrankheiten führt nahezu unabhängig von der Ursache der Erkrankung im Verlauf zu teilweise zeitgleich ablaufenden Reaktionsmustern im Lebergewebe. Auf Grund der Zellschädigung kommt es im Zuge von Apoptose und Nekrose der Hepatozyten, Gallengangepithelzellen und Gefäßendothelzellen in unterschiedlichster Form und Ausprägung (Mottenfraßnekrose, Brückennekrose) mit der Infiltration von Immunzellen zu Entzündungsreaktionen und Aktivierung von Reparationsmechanismen [37:S.803]. Dabei werden unter anderem zelluläre Entzündungsmediatoren freigesetzt bzw. Plasmamediatoren aktiviert, die die entzündlichen Reaktionen regulieren, die Gewebereparatur steuern sowie die Kollagenproduktion des Lebergewebes, zum Beispiel (z.B.) durch Aktivierung der Ito-Zellen stimulieren [142:S. 341]. In Folge dessen wird das zerstörte Leberparenchym im Sinne einer Reparatur (Defektheilung) durch Bindegewebe ersetzt und es kommt zur Vermehrung fibrotischen Gewebes in der Leber [37:S. 802]. Dieses fibrotische Gewebe produziert selbst vermehrt Transforming Growth Factor β (TGF- β) und begünstigt somit zusätzlich zur dysregulierten Ablagerung extrazellulärer Matrix mit progressiver Destruktion normalen Gewebes die Ausbildung einer Leberfibrose, die sich im Verlauf der Krankheit zu einer leberarchitekturzerstörenden Leberzirrhose umwandelt [126:S. 85, 149:S. 2480]. Dabei sind diese beiden Folgezustände chronischer Leberkrankheit meist irreversibel [37:S. 802].

Insgesamt betrachtet verursacht chronische Leberschädigung somit zahlreiche Veränderungen, die sich systemisch auswirken könnten. Durch die parenchymatöse und

zirkulatorische Leberinsuffizienz bedingt, kann das Lebergewebe seiner physiologischen Funktion nicht mehr oder nur unzureichend entsprechen, wodurch es einerseits zum Anstieg von Substanzen, wie z.B. Ammoniak oder Östrogenen kommt und sich andererseits ein Mangel an 25-OH-Vitamin D₃ oder Lebersyntheseprodukten wie Albumin einstellt [37:S. 803ff]. Im Zuge der bei chronischer Leberkrankheit auftretenden Entzündungsreaktion und Leberschädigung beim Reparaturvorgang sowie der Ausbildung fibrotischen Gewebes, wird des Weiteren ein Anstieg von Zytokinen oder Leberschädigungsmarker wie Alanin-Aminotransferase (ASAT), Aspartat-Aminotransferase (ALAT) oder Laktatdehydrogenase (LDH) beobachtet.

Zu den gängigen Methoden, die auftretenden Veränderungen bei chronischer Lebererkrankung objektiv zu erfassen, gehören neben Konzentrationsbestimmungen bestimmter Stoffe im Blutserum und Auswertung histologischer Färbungen von Gewebeschnitten auch die molekularbiologische Messung der Expression bestimmter Marker.

1.3 Knochen

1.3.1 Knochenstruktur, -aufbau und -zellen

Bei der Knochenstruktur lässt sich makroskopisch die Kompakta, die die solide Außenschicht des Knochens bildet, und die Spongiosa unterscheiden. Die Spongiosa ist ein dreidimensionales Geflecht von Knochenbälkchen, Trabekeln, die sich je nach Beanspruchung des Knochens vernetzen und ausrichten. Dabei bildet die Spongiosa eine Kombination maximaler Widerstandsfähigkeit bei zugleich minimalem Gewicht [143:S. 113]. Histologisch wird die Knochenstruktur von Spongiosa und Kompakta als Lamellenknochen beschrieben.

Das Knochengewebe besteht aus extrazellulärer Matrix und Knochenzellen. Die Knochenmatrix setzt sich aus einem anorganischen und einem organischen Anteil zusammen. Sie ist verkalkt, wodurch sie hohem Zug und Druck standhalten kann [143:S. 108]. 80 % der Matrix bestehen aus Wasser und anorganischen Substanzen, wobei es sich überwiegend um Hydroxylapatit handelt [76:S. 409, 143:S. 109]. Die restlichen 20 % der Matrix werden von organischen Substanzen gebildet, wovon 9/10 von Osteoblasten produzierte Kollagenfasern Typ 1 sind, die dem Knochen seine Festigkeit verleihen [76:S. 409, 89:S. 1060] und 1/10 sich aus in Osteoblasten synthetisierten Proteinen wie Osteopontin (OPN) und aus im Knochen absorbierten Proteinen und Wachstumsfaktoren wie TGF- β zusammensetzt [89:S. 1060].

Bei den Knochenzellen unterscheidet man aus Osteoprogenitorzellen differenzierte Osteoblasten, die sich selbst terminal in Osteozyten differenzieren können, und Osteoklasten. Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die, an der Matrixoberfläche liegend, Kollagen I, Strukturproteine und Wachstumsfaktoren synthetisieren und sekretieren, wobei sie den Großteil der Knochenmatrix bilden. Diese Zellen haben zahlreiche Rezeptoren für Zytokine, Hormone, Vitamin D und in ihrer Membran ist die für die Mineralisierung wichtige alkalische Phosphatase (AP) zu finden [89:S. 1058, 143:S. 110]. Osteoklasten, die sich im Zusammenspiel zwischen Osteoblasten, Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL), und Interleukin 1+6 aus osteoklastären Vorläuferzellen differenzieren, sind knochenresorbierende Zellen [89:S. 1058f, 143:S. 113]. Sie sekretieren Säuren und Enzyme in ein subzelluläres versiegeltes Kompartiment, wodurch bei dem entstehenden pH von etwa 4,5 Kalzium ausgelöst, TGF- β ausgelöst sowie aktiviert und Kollagen abgebaut wird [143:S. 112]. Osteoblasten und Osteoklasten stehen bei ihrer Differenzierung, Aktivierung und Funktionsausführung in einem engen Abhängigkeitsverhältnis zueinander, wodurch unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau gewährleistet ist (siehe 1.3.2).

1.3.2 Remodeling und physiologische Aufgaben des Knochens

Knochen ist dynamisches Gewebe, das einem lebenslangen Umbau unterliegt, um sich an die ständig veränderte Beanspruchung zu adaptieren und um seine zwei wesentlichen Funktionen erfüllen zu können: Stütz-/Schutzfunktion in Anpassung an biomechanische Belastung und Stoffwechselfunktion als Kalziumreservoir bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase [89:S. 1057, 143:S. 108]. An diesem komplexen Prozess des ständigen Umbaus, der als Remodeling bezeichnet wird, sind sowohl Osteoklasten, Osteozyten als auch Osteoblasten beteiligt, die als organisierte Gruppe (bone remodeling unit) in jeweiliger Abhängigkeit voneinander verknüpft sind (siehe Abb. 1-2). Im Zusammenspiel mit Osteoblasten setzen aktivierte Osteoklasten bei der Knochenresorption Stoffe wie TGF- β frei, die gemeinsam mit systemischen Stoffen zum coupling führen und teilweise über Feedback-Mechanismen die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität regulieren, so dass anschließend neues Osteoid durch Osteoblasten gebildet wird, dessen Mineralisierung zeitverzögert erfolgt [89:S. 1061, 143:S. 120]. Dabei kann nur durch die enge Verknüpfung der Regulierung von Osteoblasten und Osteoklasten in jeweiliger Abhängigkeit voneinander die empfindliche Balance zwischen Knochenresorption und Knochenaufbau in Adaptation an die Knochenbeanspruchung aufrechterhalten werden. Das remodeling des Knochens wird auf verschiedenen Wegen durch knochenexterne und interne Faktoren induziert, kontrolliert und moduliert. Zu diesen

Faktoren zählen neben Calcitriol, Parathormon (PTH) und Calcitonin der Östrogenspiegel, Insulin-like Growth Factor 1, TGF- β und Glukokortikoide, die Einfluss auf Osteoblasten und -klastenfunktion und somit die internen Faktoren wie Osteoprotegerin (OPG)- oder RANK-Ligand-Synthese haben [89:S. 1059].

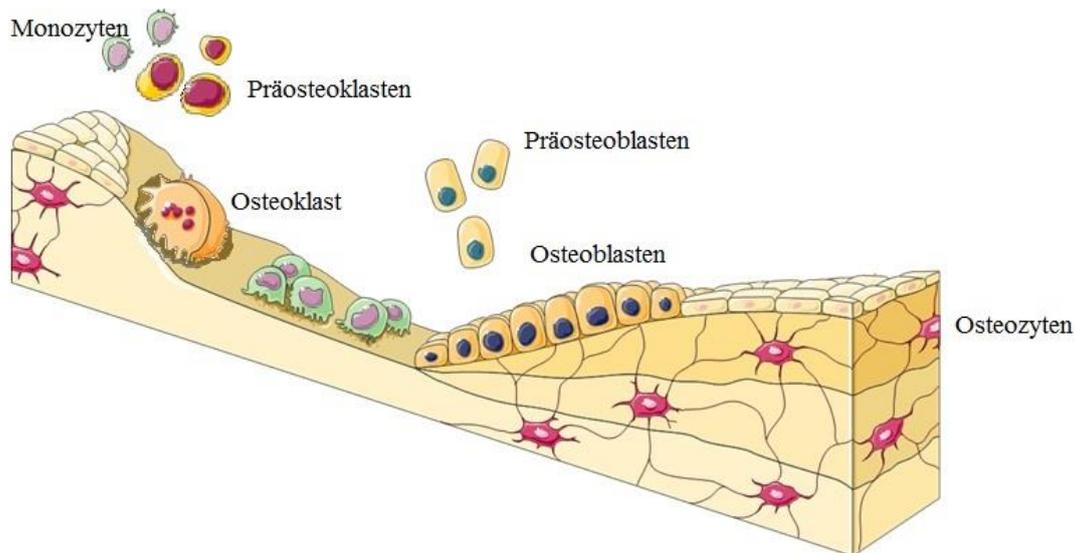


Abb. 1-2 Remodeling: Schematische Darstellung des Knochenumbaus

Grafik Quelle: <http://www.servier.de/medicalart/knochenstruktur/?catSelect=5>; 05.08.11

1.3.3 Imbalance des Knochenstoffwechsels

Kommt es z.B. im Rahmen einer knochenexternen Krankheit wie der Leberfibrose zu einer Veränderung der Faktoren, die Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben, kann die gesamte Kontrolle des Knochenstoffwechsels entkoppelt werden, wodurch es zu unharmonischen Interaktionen der Knochenzellen in jeweiliger Abhängigkeit zueinander käme [90:S. 1066]. Dies kann an abweichenden Zelleigenschaften, z.B. bezüglich der Anlockbarkeit, Erregbarkeit, Mobilisation oder auch Überlebenszeit liegen [90:S. 1066]. Des Weiteren kann die Funktion der Knochenzellen lädiert sein im Sinne eines Synthesedefizits, Produktionsüberschusses oder Bildung von mangelhaften Syntheseprodukten. Zusammenfassend kann eine solche Störung des Knochenstoffwechsels zu Osteopathien, wie z.B. Osteoporose oder Osteomalazie führen (siehe Abb. 1-3). Unter Osteoporose versteht man einen Knochenmasseverlust mit Veränderung der Mikroarchitektur und einem daraus resultierenden Anstieg der Knochenbrüchigkeit und des Frakturrisikos [90:S. 1066, 146:S. 1].

Unter Osteomalazie versteht man einen verminderten Mineralanteil der Knochengrundsubstanz [90:S. 1070].



Abb. 1-3 Vergleich Osteoporose versus Osteomalazie

Osteoporose: Knochenmasseverlust, Verhältnis organische Substanz zu Mineralanteil weitgehend gleichbleibend

Osteomalazie: Verhältnis organische Substanz zu Mineralanteil verändert sich, teilweise Knochenmasseverlust

Zu den bevorzugten Methoden, Osteopathien zu diagnostizieren und objektiv zu erfassen, gehören unter anderen μ CT-Messungen, dual-energy-X-ray-absorptiometry (DEXA) und histomorphometrische Untersuchungen, um die Mikroarchitektur, Knochenstrukturparameter und Mineralisierung beurteilen zu können, sowie molekularbiologische Untersuchungen von Knochenmarkern, um die Funktion der Knochenzellen bewerten zu können.

1.4 Studienlage

1.4.1 Knochenveränderungen bei chronischen Leberkrankheiten

In den letzten Jahren werden Osteopathien beschrieben, die sich im Zusammenhang mit verschiedenen chronischen Leberkrankheiten entwickeln. Dabei treten vor allem Osteopenie und Osteoporose auf, während Osteomalazie bei erwachsenen Patienten mit chronischen Leberkrankheiten nur selten zu finden ist [30:S. 1271]. Etwa 68 % aller Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie weisen eine reduzierte Knochenmineralisationsdichte (BMD) auf, wobei die Spongiosa stärker als die Kortikalis betroffen ist [62:S. 3518].

Bei Patienten mit fortgeschrittenen chronisch cholestatischen Leberkrankheiten wie primär biliäre Zirrhose (PBC) oder primär sklerosierende Cholangitis (PSC) finden sich signifikant reduzierte BMD, wovon 30-41 % der Patienten Osteopenie und 15-32 % Osteoporose aufweisen [6:S. 183, 24:S.315, 71:S. 898, 137:S. 2345]. Dabei zeigen histomorphometrische Untersuchungen der Knochenarchitektur verminderte Trabekelanzahl (Tb.N) und -dicken (Tb.Th) bei gesteigerter Knochenresorption und signifikant reduzierter Knochenneubildung [71:S. 899]. PSC-Patienten weisen signifikant höhere Raten an Knochenabbau pro Jahr auf,

als Alter und Geschlecht gematchte Kontrollgruppen [6:S. 183]. Dabei erhöht sich die Prävalenz der Osteoporose mit längerer Krankheitsdauer und bei histologischer Progression der Krankheit in der Leber (Stadium III und IV) [70:S. 574f].

Studien zur Infestation mit *Schistosomatidae mansoni* zeigen, dass Kinder und Jugendliche bei einer hepatosplenären Manifestation des Parasiten mit Auftreten einer Symmers-Fibrose eine reduzierte BMD haben [20:S. 1]. Dabei zeigt sich ein signifikanter Trend zur linearen Assoziation zwischen der Ausprägung der Symmers-Fibrose und dem Ausmaß der BMD-Reduktion [21:S. 1].

Auch Studien zu nicht-cholestatischen Lebererkrankungen, z.B. viraler Ursache, zeigen bei Patienten bereits im präzirrhotischen Stadium einer chronischen Hepatitis B oder C eine reduzierte BMD, wobei 51 % des Kollektivs Osteopenie und abhängig vom untersuchten Knochen 7-19 % Osteoporose aufweisen [127:S. 1845]. Des Weiteren zeigt sich, dass das Ausmaß der BMD-Reduktion abhängig von der Ausdehnung der Fibrose in der Leber ist [127:S. 1845]. Patienten mit viraler Leberzirrhose zeigen bis zu 94 % signifikant reduzierte BMD mit etwa 26-56 % Osteoporose und 42 % Osteopenie, wobei die Veränderungen sich vor allem in der Spongiosa zeigen [27:S. 1, 61:S. 696, 64:S. 4326, 87:S. 52]. Dabei hängt der Grad der Osteopenie von der Krankheitsschwere und die Osteoporosehäufigkeit von der Dauer der Erkrankung ab [61:S. 698, 87:S. 52].

Chronischer Alkoholismus führt bei jungen Frauen ohne Leberzirrhose zu keiner BMD-Reduktion, während männliche Alkoholiker ohne Leberzirrhose signifikant reduzierte BMD aufweisen [95:S. 177, 99:S. 878, 106:S. 377]. Bei Patienten mit alkoholinduzierter Leberzirrhose finden sich bei bis zu 97 % signifikant reduzierte BMD, wobei etwa 40 % Osteoporose aufweisen [27:S. 1, 42:S. 428].

1.4.2 Reversibilität hepatischer Osteodystrophie

Osteopenie und Osteoporose, sowie damit verbundene reduzierte Knochenneubildung bei chronischen Leberkrankheiten, sind reversibel nach adäquater Therapie, z.B. in Form von Lebertransplantation bei irreversibler Leberzirrhose (siehe Abb. 1-4) oder medikamentöser und operativer Behandlung von Billharziose [20:S. 1, 30:S. 1274, 44:S. 296, 86:S. 2581]. Untersuchungen der BMD vor und nach Lebertransplantation ergeben einen zweiphasigen Verlauf. Etwa bis zum 6. Monat postoperativ fällt der BMD auf Werte unter den präoperativen ab, was wahrscheinlich auf die posttransplantäre Therapie mit Kortikosteroiden und Calcineurininhibitoren zurückgeführt werden kann, um dann bis zum circa (ca.) 2. Jahr

postoperativ auf höhere Werte als präoperativ anzusteigen [30:S. 1274, 44:S. 296, 63:S. 83, 72:S.1198, 124:S. 302, 137:S. 2345]. Untersuchungen der BMD vor und nach Behandlung der Billharziose ergeben auch hier einen BMD-Anstieg nach Therapie, wobei das Ausmaß des Anstieges von der erreichten Verbesserung der Leberfunktion beurteilt nach Child-Pugh abhängt [20:S. 1, 21:S.1].

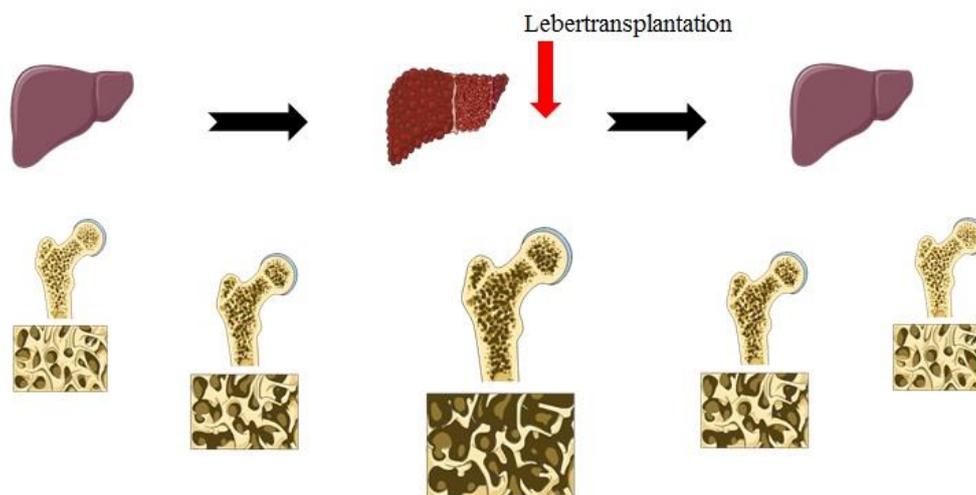


Abb. 1-4 Osteoporose ist nach Lebertransplantation reversibel

Grafik Quellen: <http://www.servier.de/medicalart/knochenstruktur/?catSelect=5;>
<http://www.servier.de/medicalart/verdauungssystem/?catSelect=7;> 05.08.11

Da es nur wenige Studien speziell zur Prävention oder Behandlung hepatischer Osteodystrophien gibt und z.B. für die PSC auch keine Daten zu diesem Thema zur Verfügung stehen, werden bei Patienten mit hepatischer Osteodystrophie ähnliche Verfahren wie bei postmenopausaler Osteoporose angewandt [6:S. 186, 141:S. 1397]. Diese Präventions- oder Therapiearten, die nicht kausal zu physiologischer Leberfunktion führen, sondern versuchen, mit Ersatzstoffen die Wirkung der Leberinsuffizienz auf den Knochen abzuschwächen oder aufzuheben, wie z.B. Bisphosphonate oder Hormonersatztherapie, können zwar die BMD steigern, aber keinen physiologischen Knochenstoffwechsel hervorrufen [63:S. 85, 111:S. 890, 151:S. 776]. Somit ergibt sich die Problematik, für die hepatische Osteodystrophie keine Prävention und außer der Lebertransplantation bei irreversibler Leberzirrhose, keine kausale Therapie zur Verfügung zu haben, solange die vermutlich multifaktoriellen Regulationsmechanismen zwischen Leberfunktionsstörung und Knochenstoffwechsel nicht aufgedeckt sind.

1.5 Vitamin D Metabolismus

Vitamin D ist ein Steroid, das in der Haut bei UV-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol gebildet wird [28:S. 243]. Im Blut wird es durch das Vitamin D-Bindeprotein (VDBP) zur Leber transportiert und dort unter anderem (u.a.) durch Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie R, Polypeptid 1 (CYP 2R1) zu 25-Hydroxycholecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) hydroxyliert [28:S. 244]. Anschließend erfolgt der Transport des $25(\text{OH})\text{D}_3$ durch VDBP zur Niere, in der die Hydroxylierung zu $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) stattfindet [13:S. 7, 28:S. 244, 130.S. 4195]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die hormonell aktive Form des Vitamin D, ist für nahezu alle biologischen Aktionen des Vitamins zuständig und diffundiert im Zielgewebe (Hauptziele sind Niere, Darm und Knochen) durch das Zellzytosol in den Zellkern zu dem dort an die DNA gebundenen Vitamin D Rezeptor, der als Transkriptionsfaktor Genexpression regulieren kann [13:S. 7, 28:S.244, 39.S. 564, 38:S. 625f].

Vitamin D dient der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase und der Regulierung des Knochenauf- und Knochenumbaus [28:S. 243, 38:S: 626]. Im Darm und im Zusammenspiel mit PTH in der Niere löst Vitamin D eine gesteigerte Reabsorption von Kalzium und Phosphat aus [38:S. 626, 132:S. 48]. Durch dieses erhöhte Angebot wird die Knochenmineralisierung angestoßen [38:S. 626]. In vitro Studien zeigen, dass Vitamin D das Remodeling des Knochens reguliert, indem es Osteoblasten zur Synthese von Proteinen wie Matrix-Metallo-Proteinasen oder von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und auch zur Sekretion von Adenosintriphosphat (ATP) stimuliert und in Gegenwart von Osteoblasten die Differenzierung von Osteoklasten fördert [10:S. 1618, 13:S. 8, 15:S. 1450, 38:S. 626, 43:S. E723f, 128:S. 213, 129:S. 832].

Kommt es zum Abfall des Vitamin D-Spiegels, wie es z.B. im Zusammenhang mit chronischen Leberkrankheiten in zahlreichen Studien beschrieben wurde [9:S. 2624, 12:85/S. 1, 57:S. 513, 62:S. 3516, 91:S. 842, 105:S. 922, 124:S. 302], hat dies mitunter Auswirkungen auf die Kalziumhomöostase und den Knochenstoffwechsel [28:S. 243, 75:S. 278]. Die gestörte Mineralisation der Knochen führt im Kindesalter zu Rachitis und bei Erwachsenen zu Osteomalazie und Osteoporose mit reduzierter BMD [13:S. 7, 29:S. 353, 75:S. 278].

Da bei Menschen mit chronischen Leberkrankheiten oftmals als extrahepatische Manifestation Knochenerkrankungen wie Osteoporose mit reduzierter BMD entstehen, wurde bereits mehrfach in Studien untersucht, ob Vitamin D ein möglicher Regulator der

hepatischen Osteodystrophie ist. Dabei wurden vielfach erniedrigte 25(OH)D₃-Serumlevel bei Patienten mit chronischen Leberkrankheiten und reduzierten BMD beschrieben [30:S. 1271, 33:S. 689, 61:S. 696, 77:S. 257, 78:S. 103, 96:S. 136, 124:S. 302]. Allerdings stand der erniedrigte 25(OH)D₃-Spiegel nicht immer in einer Beziehung zu dem Zeitpunkt oder der Schwere des Auftretens von Osteopenie, Osteoporose und dem Abfall der BMD [61:S. 696, 77:S. 257, 124:S. 302]. Darüber hinaus erwies sich die Behandlung von Osteoporosen verschiedenster Ursachen aber auch von hepatischer Osteodystrophie mit Vitamin D nur zum Teil als erfolgreich [13:S. 10, 31:S. 133, 33:S. 689, 59:S. 239, 78:S. 103, 96:S. 136, 107:S. 97, 124:S. 302, 133:S. 1604, 150:S. 1206]. Daher ist es umstritten, ob, und wenn ja, welche Rolle 25(OH)D₃ in der Entstehung von hepatischer Osteodystrophie spielt [33:S. 689].

1.6 Die Rolle von TGF- β in Leber- und Knochenstoffwechsel

Der Wachstumsfaktor TGF- β , der der TGF- β Superfamilie multifunktionaler Zytokine angehört, ist an der Regulation zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Zellprozesse beteiligt und hat somit Einfluss auf viele Zell- und Gewebearten [36:S. 719]. Die Wirkung von TGF- β wird über die Bindung an transmembranöse Serin/ Threonin-Kinasen-Rezeptoren vermittelt, wobei TGF- β sowohl autokrine als auch parakrine Funktionen erfüllt [92:S. 4254, 94:S. 435].

Unter physiologischen Bedingungen wird TGF- β von verschiedenen Lebergewebszellen, wie Hepatozyten, nicht-parenchymalen Ito-Zellen oder Gallengangepithelzellen gebildet [8:S. 218, 116:S. 1052]. Der Wachstumsfaktor hat regulatorischen Einfluss auf eine Vielzahl an in der Leber stattfindenden Zellprozessen. Beispielhaft ist die antiproliferative Wirkung auf die hepatozelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA) Synthese zu nennen [36:S. 719, 125:S. 5129]. Wird Lebergewebe chronisch geschädigt, kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion und Reparationsvorgänge zu einer Steigerung der Expression des profibrotisch wirkenden TGF- β (siehe Abb. 1-5), das eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Leberfibrose spielt [5:S. 236]. TGF- β gilt als zentrales Zytokin der Leberfibrose und Marker der Fibrose, dessen Expression im fibrotischen Stadium gesteigert ist [126:S. 91, 140:S. 1338]. Es wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, induziert die Expression ergänzender fibrogenetischer Mediatoren, ermöglicht die Differenzierung von Ito-Zellen in Myofibroblasten, fördert die Synthese von Kollagen und anderen Matrixkomponenten, während es den Kollagenabbau durch Herunterregulierung der Matrixmetalloproteasen-Expression reduziert [56:S. 3897, 100:S. 757f]. Patienten mit PBC und PSC weisen bereits in frühen Stadien erhöhte TGF- β Serumlevel auf und auch bei Leberfibrose und -zirrhosen verschiedenster Ursache wie

Hepatitis B oder Steatosis/Steatohepatitis korreliert das Level des systemisch erhöhten TGF- β -Spiegels positiv mit dem Grad der Leberschädigung [23:S. 199, 58:S. 677, 67:S. 2436, 114:S. 196, 144:S. 233, S. 240].

TGF- β , das reichlich in latenter Form in der Knochenmatrix vorkommt, hat Einfluss auf alle Knochenzellen und ruft in Abhängigkeit des Reifungsgrades der Zellen sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte (siehe Abb. 1-5) hervor [35:S. 21352, 93:S. 44976]. Dadurch ist TGF- β in der Lage, das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und -neubildung zu koordinieren [35:S. 21352, 49:S. 207, 93:S. 44985]. TGF- β begünstigt entscheidend die Osteoklastengengese [60:S. 2448, 92:S. 4254], während es bei der Knochenresorption aus der Matrix freigesetzt und aktiviert über negative Feedbackmechanismen eine hemmende Wirkung auf reife Osteoklasten ausübt und so die Tiefe und Größe der Resorption kontrollieren kann [35:S. 21352, 93:S. 44981, S. 44985, 112:S. 2]. Osteoblastäre Zellen werden von TGF- β chemotaktisch zur Resorptionsstelle gelockt [93:S. 44985]. Der Wachstumsfaktor stimuliert die Proliferation von Preosteoblasten, während er die terminale Differenzierung von Osteoblasten sowie die Proliferation reifer Osteoblasten inhibiert [3:S. 2264, 93:S. 44985]. Dabei wird die Bildung von Matrixkomponenten durch TGF- β gefördert [35:S. 21352], aber die Matrixmineralisierung gehemmt [94:S. 435]. Diese Vielzahl an teilweise gegensätzlichen Effekten demonstriert, dass der TGF- β -Spiegel im Knochen unter physiologischen Bedingungen in engen zeitlichen und quantitativen Grenzen reguliert sein muss, um ein harmonisches Zusammenspiel der Knochenzellen zu ermöglichen. Eine in vivo Studie an Mäusen zeigte, dass die pharmakologische Hemmung des TGF- β_1 -Rezeptors dosisabhängig zur Steigerung der Knochenmasse, der Knochendichte und Osteoblastenanzahl in der Spongiosa führte [112:S. 2]. Im Gegensatz dazu bewirkte ein endogen erhöhter TGF- β_2 -Spiegel bei einer anderen in vivo Mausstudie einen Osteoporose-ähnlichen Phänotyp mit reduzierter Knochendichte bei einem Mineralisierungsdefekt der neugebildeten Matrix [49:S. 198, S. 204ff]. Diese Ergebnisse werden durch eine in vitro Arbeit mit Zellkulturen primär humaner Osteoblasten bestätigt, bei der ein chronisch erhöhter TGF- β_1 -Spiegel durch negativen Einfluss auf die Osteoblastenfunktion vor allem zu reduzierter Bildung mineralisierter Matrix führte [46:S. 2].

Zusammenfassend stellt sich nun die Frage, ob ein systemisch erhöhter TGF- β -Serumspiegel, wie er bei Patienten mit chronischen Leberkrankheiten vorliegt, als möglicher Regulator Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat und somit zur Entstehung hepatischer Osteopathien beiträgt.

Hypothetischer Regulationsmechanismus hepatischer Osteodystrophie durch TGF- β

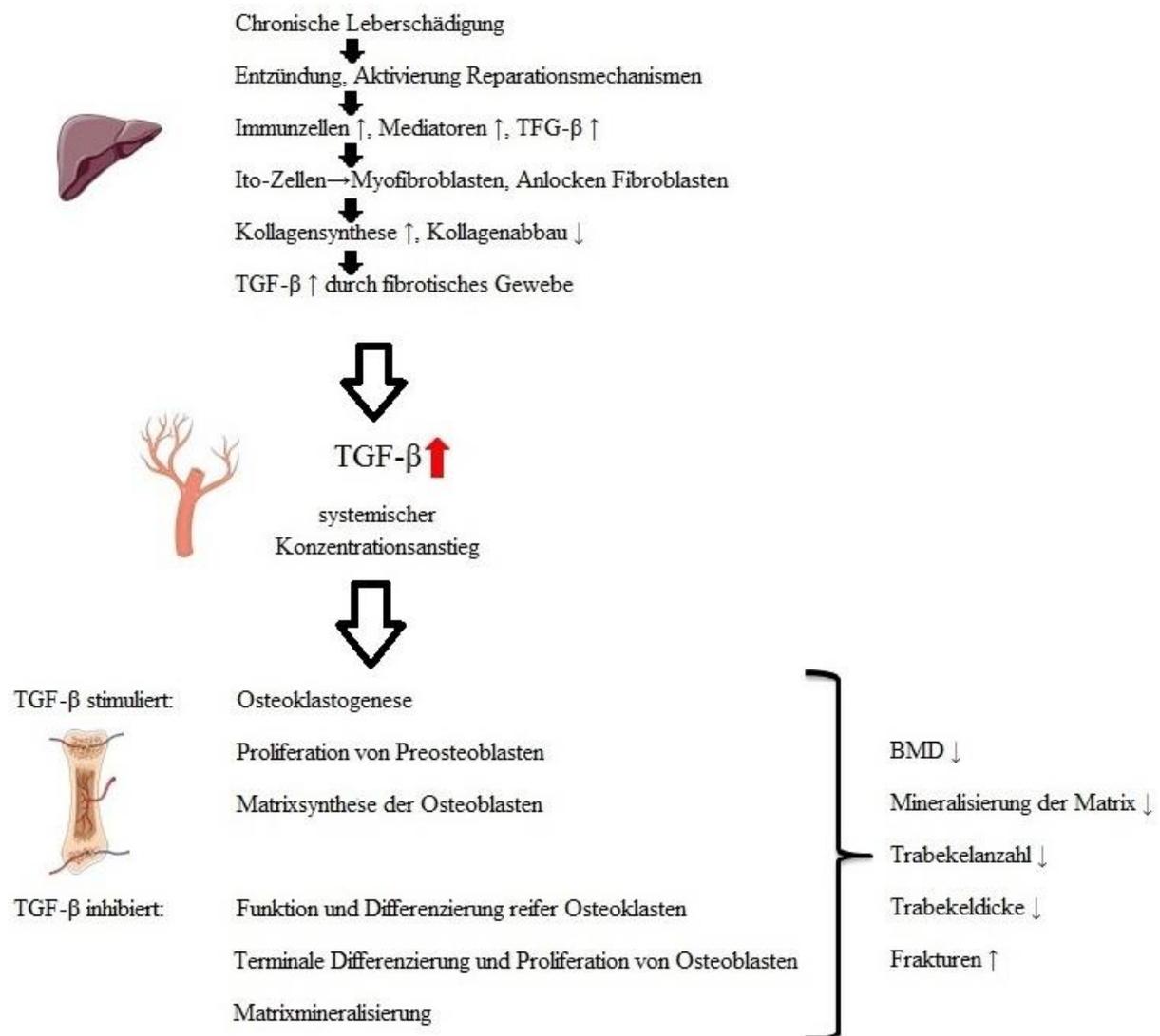


Abb. 1-5 Hypothetischer Regulationsmechanismus hepatischer Osteodystrophie

TGF- β als möglicher Regulator

Grafik Quellen: <http://www.servier.de/medicalart/skelett-und-knochen/?catSelect=5>; <http://www.servier.de/medicalart/arterien-physiologisch/?catSelect=0>; <http://www.servier.de/medicalart/verdauungssystem/?catSelect=7>; 05.08.11

1.7 Alternative Tiermodell

Insgesamt gibt es zum Thema hepatische Osteopathie keine präzise durchgeführten und in hinreichendem Umfang angelegten Langzeitstudien in vivo. In einer solchen sollte das Patientengut (Art, Dauer, Stadium der Lebererkrankung; Alter, Geschlecht, Ko-Morbiditäten

der Patienten), die angewandte Diagnostik (z.B. DEXA, laborchemische Parameter) und Therapie (z.B. Medikamentenart, -dosierung, -verabreichungsintervall) differenziert beschrieben werden und nach den gleichen Richtlinien erfolgen [104:S. 1550ff]. Dies würde Monate bis Jahre an Zeit beanspruchen und neben hohen Kosten einen enormen organisatorischen Aufwand zwischen zahlreichen Krankenhäusern und Instituten bedeuten.

Eine Alternative zur Erforschung der hepatischen Osteopathien sind Tiermodelle, wie das Multidrug Resistance Gene Typ 2 Knockout ($MDR2^{-/-}$) Mausmodell. Die homozygoten Tiere entwickeln auf Grund ihres fehlenden Phospholipidtransportes in die Galle Läsionen des Gallengangepithels, die u.a. zu sklerosierender Cholangitis führen [54:S. 261]. Seit entdeckt wurde, dass die in $MDR2^{-/-}$ Mäusen beobachteten histologischen und morphologischen Veränderungen der humanen PSC ähnlich sind, repräsentieren $MDR2^{-/-}$ Mäuse ein gut charakterisiertes Modell für PSC und inflammatorisch gesteuerte Fibrose [53:S. 1238]. Diese Entwicklung, beruhend auf einer Ausschaltung des MDR 2 Genes, lässt diese Mäuse eine chronische Leberkrankheit entwickeln, deren Progression reproduzierbar ist und im Verlauf zu Zirrhosen und hepatozellulären Karzinomen führen kann [108:S. 1237].

1.8 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Zusammenhang zwischen chronischer Leberkrankheit, dem Knochenstoffwechsel und damit einhergehender Knochengewebeveränderungen am Beispiel des $MDR2^{-/-}$ Mausmodelles genauer zu beschreiben. Des Weiteren soll evaluiert werden, ob der TGF- β Serumspiegel eine Rolle in der Pathogenese der hepatischen Osteodystrophie spielt. Dazu sollen in der vorliegenden Arbeit am $MDR2^{-/-}$ Mausmodell folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Finden sich messbare Veränderungen des Knochengewebes, die in einem zeitlichen Zusammenhang zur Leberschädigung der $MDR2^{-/-}$ Mäuse stehen?
2. Welcher Art sind die Veränderungen des Knochengewebes und der Knochenzellen?
3. Ist der systemische TGF- β -Serumspiegel ein möglicher Regulationsmechanismus?

Dazu werden Leber, Knochen und Blut von $MDR2^{-/-}$ Mäusen im Alter von 5 Wochen bis 44 Wochen histomorphometrisch, radiologisch, laborchemisch und molekularbiologisch untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie ist prospektiv. Es wurden postmortal gewonnene Proben von Gruppen von MDR2^{-/-} und Gruppen von Wildtyp Balb/c Mäuse unterschiedlichen Lebensalters jeweils untereinander sowie miteinander verglichen. Insgesamt wurden 38 Mäuse in dem Zeitraum von Mai 2009 bis Mai 2010 in die Studie aufgenommen (siehe Tabelle 2-1).

Lebenswochen	Mausart	Sex	Lebensdaten	Mausart	Sex	Lebensdaten
Woche 5	MDR2 ^{-/-}	♂	22.07.09-25.08.09	Wildtyp	♂	04.02.10-11.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	22.07.09-25.08.09	Wildtyp	♀	04.02.10-11.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♂	02.09.09-07.10.09	Wildtyp	♂	04.02.10-11.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	02.09.09-07.10.09	Wildtyp	♀	04.02.10-11.03.10
Woche 15	MDR2 ^{-/-}	♂	14.07.09-27.10.09	Wildtyp	♂	16.11.09-01.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	14.07.09-27.10.09	Wildtyp	♀	16.11.09-01.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♂	14.07.09-27.10.09	Wildtyp	♂	16.11.09-01.03.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	14.07.09-27.10.09	Wildtyp	♀	16.11.09-01.03.10
Woche 20	MDR2 ^{-/-}	♂	07.07.09-24.11.09	Wildtyp	♂	24.12.09-12.04.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	07.07.09-24.11.09	Wildtyp	♀	24.12.09-12.04.10
	MDR2 ^{-/-}	♂	07.07.09-24.11.09	Wildtyp	♂	24.12.09-12.04.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	07.07.09-24.11.09	Wildtyp	♀	24.12.09-12.04.10
Woche 30	MDR2 ^{-/-}	♂	09.02.09-07.09.09	Wildtyp	♂	20.10.09-18.05.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	09.02.09-07.09.09	Wildtyp	♀	20.10.09-18.05.10
				Wildtyp	♂	20.10.09-18.05.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	09.02.09-07.09.09	Wildtyp	♀	20.10.09-18.05.10
Woche 44	MDR2 ^{-/-}	♂	09.07.08-13.05.09	Wildtyp	♂	07.06.09-12.04.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	09.07.08-13.05.09	Wildtyp	♀	07.06.09-12.04.10
				Wildtyp	♂	07.06.09-12.04.10
	MDR2 ^{-/-}	♀	09.02.09-16.12.09	Wildtyp	♀	07.06.09-12.04.10

Tabelle 2-1 Lebensdaten der Versuchstiere

Alle Mäuse wurden in mit Streu ausgelegten Standardkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter nach Geschlechtern und Art getrennt bei Raumtemperatur (RT) und 12 Stunden (h) Tageslicht sowie 12 h Dunkelheit gehalten. In den Lebenswochen 5, 15, 20, 30 und 44 wurden je 3 bzw. 4 MDR2^{-/-} und je 4 Wildtyp Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Proben wurden aus Aortenblut, Lebergewebe und Knochengewebe gewonnen. Als Leberschädigungsmarker wurden die Enzymaktivitäten von LDH, ASAT und ALAT aus dem Blutserum bestimmt. Zusätzlich wurde die Konzentration von TGF- β im Blutserum ermittelt. Mit Teilen des Lebergewebes wurden histologische Färbungen angefertigt, um den Grad der Lebergewebsveränderungen im Zeitverlauf beurteilen zu können. Das Knochengewebe wurde anhand der Femora der Mäuse mit Hilfe von μ CT Messungen bewertet. Mittels aus Lebergewebe sowie Knochengewebe gewonnener Ribonukleinsäure (RNA) wurden Genexpressionsveränderungen analysiert.

Die aus einer Maus gewonnenen Proben wurden nur verwertet, wenn für die Enzymaktivitäts- und Zytokinkonzentrationsbestimmung ausreichendes Blutvolumen aus der Aorta gewonnen werden konnte, alle ausgelösten Knochen intakt und die Lagerungszeiten in Formalin bei der Fixierung des Lebergewebes eingehalten worden waren.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausstämme

Für die Studie wurden MDR2^{-/-} Mäuse als Tiermodell gewählt. Deren genetische Deletion des Multidrug-Resistance-Gens Typ 2 führt zu einem Defekt der Phospholipid Flippase MDR2, wodurch der physiologische Transport von biliärem Phospholipid in die Galle ausbleibt und sich keine gemischten Mizellen mit Gallensäure bilden können. Als Folge kommt es zur Gallengangsschädigung, was schließlich sowohl mikroskopische als auch makroskopische Leberschädigungen hervorruft. Die hier verwendeten MDR2^{-/-} Mäuse wurden auf dem genetischen Hintergrund von Balb/c Mäusen generiert. Wildtyp Balb/c Mäuse werden regelmäßig als Tiermodelle verschiedenster Studien verwendet, sind gut charakterisiert und entwickeln keine Lebererkrankung, die zur hepatischen Osteodystrophie führen könnte. Dadurch eignen sich Wildtyp Balb/c Mäuse explizit als gesunde Kontrolltiere neben den MDR2^{-/-} Mäusen mit genetischem Balb/c Hintergrund und wurden für die vorliegende Studie herangezogen. Die Aufzucht beider homozygoter Mausinzuchtstämme erfolgte im Tierhaus der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Die in der Studie verwendeten Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Steven Dooley, Abteilung für molekulare Alkoholforschung, Universitätsklinikum Mannheim, der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Haltung entsprach den Richtlinien der EU.

2.2.2 Präparatherstellung

2.2.2.1 Material

Niedermolekulares Heparin	Materialwirtschaft des MRI
PBS (1×)	PAA Laboratories GmbH (Cat-No.: H15-002)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, D-Hamburg

2.2.2.2 Methode

Bei Erreichen der für sie geplanten Lebenswoche wurde die jeweilige Maus einzeln in einen Standardkäfig umgesetzt und es wurde ihr 0,0625 Milliliter (ml) Heparin in 1:4 Verdünnung mit Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gespritzt, um die Gerinnung post mortem zu verzögern. Nach weiteren 15 Minuten (min) erfolgte die Tötung der Maus per zervikaler Dislokation.

Unmittelbar post mortem wurde der Bauchraum der Maus geöffnet und aus der abdominalen Aorta so viel Aortenblutvolumen wie möglich entnommen. Nach der Abnahme wurde das Aortenblut in einem Eppendorf-Gefäß für 20 min mit 14 000°g in einer Zentrifuge 5417R von Eppendorf zentrifugiert. Daraus resultierte ein gelblicher Überstand, Blutserum und ein Bodensatz aus zellulären Bestandteilen des Blutes. Das Blutserum wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß abpipettiert, in einem Stickstofftank schockgefroren und anschließend bei - 80 Grad Celsius (°C) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Im Folgenden wurde die Leber aus dem Bauchraum entnommen. Orientierend an der von Margaret J. Cook beschriebenen Leberanatomie von Labormäusen (siehe <http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure60.shtml>) wurde aus jedem Leberlappen (left, right, median, caudate lobe) je ein Gewebstück geschnitten und für die direkt folgende Fixierung zur Seite gelegt. Das restliche Lebergewebe wurde, in 0,008 Kubikzentimeter (cm³) große Einzelteile zerlegt, in einem Eppendorf-Gefäß schockgefroren und bis zu weiteren Verwendung als Leberprobe für die RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

Anschließend wurden die beiden Femurköpfe zuerst aus der Hüftgelenkpfanne luxiert und anschließend die unteren Extremitäten vom Corpus abgetrennt. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, den Femurkopf nicht abzurechen. Die Femora, Tibiae und Fibulae wurden von Weichteilen wie Muskeln befreit, auf 2 Eppendorf-Gefäße (1 Femur + 2 Tibiae und Fibulae; 1 Femur einzeln) aufgeteilt und in einem Stickstofftank schockgefroren. Folgend wurden die

Knochen bei -80 °C gelagert bis zur Verwendung als Knochenprobe für die RNA-Isolation bzw. für die Knochengewebsmessungen im μ CT.

2.3 Histologie

2.3.1 Histotechnik

2.3.1.1 Fixierung der Lebergewebeproben

2.3.1.1.1 Material

Rotilabo®-Einbettkassetten ROTH (Cat-No.: K116.1)

Formaldehyd (37 %) MERCK (Cat-No.: 818708)

2.3.1.1.2 Prinzip

Um den natürlichen Zell- und Strukturverband zu erhalten und die postmortale Autolyse bzw. Heterolyse zu verhindern, ist es nötig, die Lebergewebeproben direkt nach der Entnahme in ein Fixans einzulegen. Dieses vernetzt Eiweiße und verleiht dem Gewebe eine gummiartige Konsistenz, ohne es spröde werden zu lassen.

2.3.1.1.3 Ausführung der Gewebefixierung

Vor Durchführung der Methode sollte folgende Lösung hergestellt werden:

3,7 % Formalin:	100 ml	Formaldehyd (37 %)
	900 ml	destilliertes Wasser (dH ₂ O)

Die Proben wurden auf die Größe von ca. 0,3 cm*0,5 cm*0,5 cm zugeschnitten, in Einbettkassetten aus Kunststoff eingeordnet und in diesen komplett in das Fixierungsmittel gesetzt. Zur Fixierung wurde 3,7 % Formalin, neutral gepufferte wässrige Formaldehydlösung, verwendet. Es lag in 20-fachem Volumenüberschuss vor, sodass die Einbettkassetten im Fixierungsmittel schwammen. Die Proben blieben 8-24 h bei RT im Fixans, bis das Gewebe vollständig durchtränkt war. Anschließend wurden sie für dieselbe Zeitspanne in Leitungswasser ausgewaschen.

2.3.1.2 Entwässern und Einbetten der Lebergewebeproben

2.3.1.2.1 Material und Geräte

Xylol Apotheke des MRI

Ethanol (EtOH) 99,9 %, 90 %, 80 %, 70 % Apotheke des MRI

Paraplast @PLUS	ROTH (Cat-No.: X881.1)
Paraffin Embedding System TBS 88	MEDITE, D-Burgdorf
Gewebeinfiltrationsautomat Leica ASP200 S	LEICA Microsystems, D-Wetzlar

2.3.1.2.2 Prinzip der Entwässerung und Einbettung

Die Lebergewebeproben müssen von einer gleichmäßigen Konsistenz und Stabilität sein, damit aus ihnen dünne, regelmäßige Schnitte gewonnen werden können. Um dies zu gewährleisten, wird als Einbettmedium Paraffin verwendet, das erhitzt in flüssigem Zustand ins Gewebe eindringt und erkaltet zum Schneiden in festem Zustand vorliegt. Paraffin selbst ist nicht wasserlöslich. Deshalb erfolgt die Entwässerung der Leberproben mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe, wodurch die wässrige Fixierlösung und das Gewebewasser verdrängt werden. Anschließend werden die Leberproben in Xylol, das sich gleichermaßen mit Wasser und Paraffin mischt, inkubiert, womit der Alkohol und möglicherweise noch verbliebenes Wasser entfernt wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Infiltration von heißem Paraffin in alle zuvor wassergefüllten Räume des Gewebestücks. Das folgende Einblocken erleichtert die Herstellung von Schnittpräparaten aus den Lebergewebeproben.

2.3.1.2.3 Durchführung der Entwässerung und Einbettung

Genannte Arbeitsschritte erfolgten unter Benutzung des Gewebeinfiltrationsautomaten ASP200 S nach dem Routine Overnight Protokoll. Zum anschließenden Einblocken wurde das Paraffin Embedding System TBS 88 verwendet. Die Lebergewebestückchen wurden auf der Dispenser Unit aus den Einbettkassetten, mit der zu schneidenden Fläche nach unten, in die in der Thermal Unit vorgewärmten Gießschalen gebracht und mit heißem Paraffin überschichtet. Dabei bildete die Einbettkassette den Blockträger. Nach dem Erkalten der Gießschalen auf der Kühlplatte der Cool Unit konnten die Paraffinblöcke aus der Form gebrochen werden.

Die anschließende Lagerung erfolgte bei + 4 °C im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung.

2.3.1.3 Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten

2.3.1.3.1 Material und Geräte

Microtome Blades S 35 Feather	Materialwirtschaft des MRI
Objektträger	ROTH (Cat-No.: H868.1)

Seidenpapier	Kaut-Bullinger (Cat-No.: 992551)
Rotationsmikrotom HM 355 S	Micron, D-Walldorf
Hot Air Steriliziers, Heraeus	THERMO Fisher Scientific, US-Waltham
Paraffin-Streckbad	MEDITE, D-Burgdorf

2.3.1.3.2 Prinzip der Herstellung von Schnittpräparaten

Paraffinschnitte der Lebergewebeproben werden aus gekühlten Paraffinblöcken mittels Rotationsmikrotom hergestellt. Beim Eintauchen der entstandenen Lebergewebe-Schnitte in ein Streckbad wird der Paraffinschnitt durch die Oberflächenspannung plan gezogen. Durch die anschließende Trocknung der auf Objektträger gezogenen Lebergewebe-Schnitte wird zusätzlich zur Entziehung der Feuchtigkeit eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern erzielt.

2.3.1.3.3 Durchführung

Die Paraffinschnitte der Lebergewebeproben wurden mit einem Rotationsmikrotom nach Minot HM 355 S hergestellt. Die Schnittdicke wurde auf 5 Mikrometer (μm) eingestellt, die Deklination betrug 90° und die Inklination wurde so gewählt, dass sich ein Freiwinkel von ca. $3\text{-}5^\circ$ ergab. Die aus den in Schnellspannrahmen eingespannten Blockträgern entstehenden Schnitte wurden mit Hilfe eines angefeuchteten Seidenpapierstücks aufgenommen. Durch schnelles senkrechtetes Eintauchen in ein $+43^\circ\text{C}$ warmes Streckbad wurde der Schnitt vom Seidenpapier gelöst. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und für 24 h bei $+37^\circ\text{C}$ im Labortrockenschrank getrocknet. In getrocknetem Zustand konnten die Schnitte des formalin-fixiert-paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebes bis zur Weiterverarbeitung bei RT gelagert werden.

2.3.1.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung und Eindecken

2.3.1.4.1 Material

EtOH 99,9 %, 90 %, 80 %, 70 %	Apotheke des MRI
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	ROTH (Cat-No.: X883.1)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	ROTH (Cat-No.: T865)
Roticlear®	ROTH (Cat-No.: A538)

2.3.1.4.2 Prinzip der Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ist eine Routine-Färbung für morphologische Untersuchungen, die einen Überblick über verschiedene Gewebestrukturen gibt.

Vor der eigentlichen Färbung werden die Schnitte durch eine Roticlear®-Reihe entparaffiniert und mit einer in der Konzentration absteigenden EtOH-Reihe rehydriert. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der mit Aluminiumionen als Hämalaun aufbereitet einen bei niedrigem pH-Wert positiv geladenen Metall-Hämatein-Komplex bildet. Diese Hämalaunlösung nach Mayer geht im sauren Milieu mit basophilen Strukturen eine Bindung ein, wodurch die Strukturen rot-braun gefärbt werden. Indem durch das Spülen mit Leitungswasser der pH-Wert auf über 3 angehoben wird, kommt es zum Farbumschlag in die typische blau-violette Farbe (Bläuen). Dadurch wird die Färbung gleichzeitig fixiert, da sie bei höheren pH-Werten schlecht löslich ist. Für die Gegenfärbung wird Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig verwendet. Eosin ist ein negativ geladener synthetischer Farbstoff, der an azidophile Strukturen bindet und sie in verschiedenen Rottönen färbt. Nach der eigentlichen Färbung werden die Schnitte mit einer in der Konzentration aufsteigenden EtOH-Reihe entwässert und mit einer Roticlear®-Reihe geklärt. Anschließend werden die gefärbten, entwässerten und geklärten Schnitte eingedeckt, wodurch die Schnitte vor mechanischer Zerstörung geschützt werden und die optische Voraussetzung für Klarheit gegeben ist.

2.3.1.4.3 Durchführung der Färbung

Genannte Färbung erfolgte nach einem durch Färbeoptimierung (siehe Kapitel 9.1) erarbeiteten Protokoll (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Anschließend wurden die Schnitte mit Roti®-Histokitt II eingedeckt.

Die Eosin G-Lösung 0, 5 % wässrig ist bei RT gelagert, die Hämalaunlösung sauer nach Mayer bei + 15 - + 25 °C gelagert lange Zeit haltbar.

1.	Entparaffinieren	Roticlear® I	3 min
		Roticlear® II	2 min
		Roticlear® III	2 min
		Roticlear® IV	2 min
		Roticlear® V	2 min
2.	Rehydrierung	99,9 % EtOH I	3 min
		99,9 % EtOH II	3 min
		99,9 % EtOH III	2 min
		90 % EtOH	2 min
		80 % EtOH	2 min
		dH ₂ O	2 min
3.	Färbung	Hämalaunlösung sauer nach Mayer	5 min
		fließendes Leitungswasser	15 min
		Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	3 min
		dH ₂ O	kurz
4.	Dehydrierung	80 % EtOH	30 sec
		90 % EtOH I	4 min
		90 % EtOH II	4 min
		99,9 % EtOH I	3 min
		99,9 % EtOH II	5 min
5.	Klären	Roticlear® I	3 min
		Roticlear® II	4 min
		Roticlear® III	5 min
		Roticlear® IV	5 min
		Roticlear® V	3 min

Tabelle 2-2 Protokoll Hämatoxylin-Eosin Färbung

sec: Sekunde

Das Resultat der Färbung sind blau-violette Zellkerne, blassrotes Zytoplasma, rote Muskelfasern, rot-orange Erythrozyten und rotes kollagenes Bindegewebe (siehe Abb. 2-1).

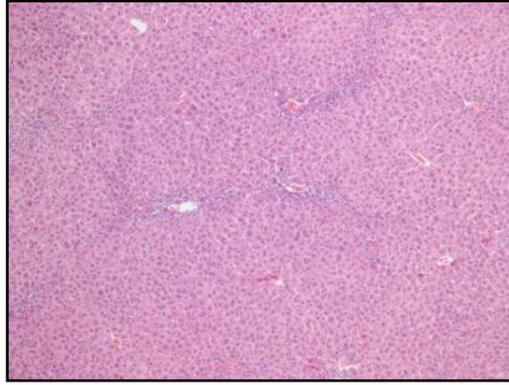


Abb. 2-1 Beispiel Hämatoxylin Eosin Färbung

Leber, weibliche MDR2^{-/-} Maus, Lebenswoche 5

2.3.1.5 Masson-Goldner-Trichrom Färbung und Eindecken

2.3.1.5.1 Material und Geräte

Rotipuran® 100 % Essigsäure p.a.	ROTH (Cat-No.: 3738.4)
EtOH 99,9 %, 90 %, 80 %, 70 %	Apotheke des MRI
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	ROTH (Cat-No.: X906.1)
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	ROTH (Cat-No.: X907.1)
Lichtgrün SF gelblich	MERCK (Cat-No.: 115941)
Orange G	MERCK (Cat-No.: 115925)
Poncau Xylidine	FLUKA Chemie GmbH (Cat-No.: 81465)
Säurefuchsin	FLUKA Chemie GmbH (Cat-No.: 84600)
Wolframatophosphorsäure-Hydrat krist.reinst	MERCK (Cat-No.: 100582)
Roticlear®	ROTH (Cat-No.: A538)
Magnetstäbchensortiment	ROTH (Cat-No.: C267.1)
Magnetrührer MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments, D-Schwabach
Analysenwaage	Kern und Sohn GmbH, D-Balingen

2.3.1.5.2 Prinzip der Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Die Masson Goldner Trichrom (MGT) Färbung ist eine Übersichtsfärbung, mit der sich Bindegewebe differenziert darstellen lässt.

Vor dem Färben werden die Schnitte durch eine Roticlear®-Reihe entparaffiniert und mit einer in der Konzentration absteigenden EtOH-Reihe rehydriert. Zur Kernfärbung im sauren Milieu wird Hämatoxylin nach Weigert verwendet, das sich an die negativen Phosphatgruppen des Kerns lagert. Diese Lösung enthält zusätzlich zum Hämatoxylin Eisen-3-Chlorid 25 % Salzsäure, wodurch die Kerne auch in den nachfolgenden sauren Lösungen nicht wieder entfärbt werden. Das der Kernfärbung folgende Wässern in Leitungswasser dient dem Einstellen des pH-Wertes > 3 zur Stabilisierung der Färbung. Anschließend wird mit der Trichromfärbung mit einer Kombinationslösung aus Säurefuchsin und Ponceau Xylidine begonnen. Dabei färbt der feindisperse Farbstoff Ponceau die Muskulatur schnell hellrot, während der grobdisperse, azidophile Farbstoff Säurefuchsin das Zytoplasma und Bindegewebe langsam rot färbt und somit verhindert, dass der Farbstoff Ponceau das Bindegewebe anfärbt. Das in der nächsten Kombinationslösung enthaltene feindisperse Orange G färbt Erythrozyten orange-rot. Unterdessen entfärbt die grobdisperse Beize Phosphorwolframsäure das Bindegewebe. Als letzter Farbstoff wird das grobdisperse, azidophile Lichtgrün eingesetzt, das das Bindegewebe grün anfärbt. Nach der Trichromfärbung erfolgt die Dehydrierung mit einer in der Konzentration aufsteigenden EtOH-Reihe und als Klärmedium wird eine Roticlear®-Reihe verwendet.

2.3.1.5.3 Durchführung der Färbung

Folgende Lösungen sollten vor Beginn der Färbung hergestellt werden:

1. 1 % Essigsäure

1 Liter (l)	Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)
10,1 ml	Rotipuran® 100 % Essigsäure

2. Hämatoxylin nach Weigert

100 ml	Hämatoxylinlösung A nach Weigert
100 ml	Hämatoxylinlösung B nach Weigert

3. Säurefuchsin-Ponceau-Xylidine

0,2 Gramm (g)	Ponceau Xylidine
0,1 g	Säurefuchsin
300 ml	ddH ₂ O
0,6 ml	1 % Essigsäure

4. Phosphorwolframsäure-Orange G

12 g	Wolframatophosphorsäure
3 g	Orange G
200 ml	ddH ₂ O

5. Lichtgrün

0,3 g	Lichtgrün SF gelblich
200 ml	ddH ₂ O
0,4 ml	1 % Essigsäure

Genannte Färbung erfolgte nach einem durch Färbeoptimierung (siehe Kapitel 9.1 unten) erarbeiteten Protokoll (siehe Tabelle 2-3). Anschließend wurden die gefärbten, entwässerten und geklärten Schnitte mit Roti®-Histokitt II auf die gleiche Weise wie die HE gefärbten Schnitte eingedeckt.

Die Mischung aus Hämatoxylin A bzw. B nach Weigert ist bei RT maximal 8 Tage haltbar.

Das Resultat der Färbung sind schwarz-braune Zellkerne, rotes Zytoplasma, hellrote Muskelfasern, orange-rote Erythrozyten und grünes kollagenes Bindegewebe (siehe Abb. 2-2).

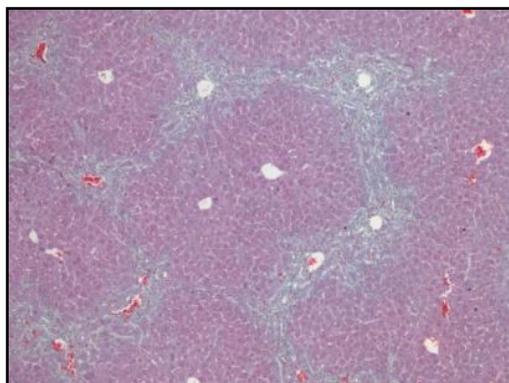


Abb. 2-2 Beispiel Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Leber, weibliche MDR2^{-/-} Maus, Lebenswoche 44

1.	Entparaffinieren	Roticlear® I	3 min
		Roticlear® II	2 min
		Roticlear® III	2 min
		Roticlear® IV	2 min
		Roticlear® V	2 min
2.	Rehydrierung	99,9 % EtOH I	3 min
		99,9 % EtOH II	3 min
		99,9 % EtOH III	2 min
		90 % EtOH	2 min
		80 % EtOH	2 min
3.	Färbung	Hämatoxylin nach Weigert	4 min
		fließendes Leitungswasser	10 min
		Säurefuchsin-Ponceau-Xylidine	2-4 min
		1% Essigsäure	kurz
		Phosphorwolframsäure-Orange G	5 min
		1 % Essigsäure	kurz
		Lichtgrün	15 min
		1 % Essigsäure	2 min
4.	Dehydrierung	80 % EtOH	30 sec
		90 % EtOH I	4 min
		90 % EtOH II	4 min
		99,9 % EtOH I	3 min
		99,9 % EtOH II	5 min
5.	Klären	Roticlear® I	3 min
		Roticlear® II	4 min
		Roticlear® III	5 min
		Roticlear® IV	5 min
		Roticlear® V	3 min

Tabelle 2-3 Protokoll Masson-Goldner-Trichrom Färbung

2.3.2 Lichtmikroskopische Auswertung der Leberschnittpräparate

2.3.2.1 Geräte und Software

Lichtmikroskop Axioskop 40	ZEISS, D-Jena
Lichtmikroskop Leitz DMRB	Leica, D-Wetzlar
AxioVision LE	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-München
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation

2.3.2.2 Prinzip der lichtmikroskopischen Auswertung

Die histologische Auswertung der Leberschnittpräparate erfolgte an den Lichtmikroskopen Axioskop 40, Zeiss und Lichtmikroskop Leitz DMRB. Zur fotografischen Dokumentation ausgewählter Befunde wurden mikroskopische Bilder erstellt. Dabei wurde die digitale Bildbearbeitung mit der Software AxioVision LE von Zeiss durchgeführt und das passende Bildformat .zvi verwendet

2.3.2.3 Durchführung der lichtmikroskopischen Auswertung

Die gefärbten Schnittpräparate wurden qualitativ und semiquantitativ anhand eines eigens hierfür entwickelten Scores ausgewertet (siehe Tabelle 2-4). Dieser Score wurde basierend auf die pathologischen Stadien I-IV der humanen PSC erarbeitet und zeigt den Progress der Lebergewebeveränderung und -schädigung an. Pro Maus wurden insgesamt acht Schnitte, je ein Schnitt eines Leberlappens (L= linker Leberlappen, R= rechter Leberlappen, M= medialer Leberlappen, C= caudatus Leberlappen) in HE Färbung sowie in MGT Färbung ausgewertet. Dazu wurden für jedes vorhandene Bewertungskriterium Punkte vergeben. Anschließend wurde das Endergebnis durch Addition der Grundpunktzahl des höchsten erreichten Stadiums mit den in diesem Stadium erreichten Punkten berechnet. Sowohl der Score als auch dessen Anwendung wurde von einem unabhängigen Pathologen (Prof. Dr. Jan Hengstler: Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund-IfADo, Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, WHO Collaborating Centre) überprüft. Vergabene Punkte wurden in Microsoft-Exceltabellen übertragen, mittels GraphPad Prism statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

	Hämatoxylin-Eosin				Masson-Goldner Tri.			
	L	R	M	C	L	R	M	C
Stadium I plus 0								
Periduktale Bindegewebe-Ablagerungen 1-3								
Ödeme 1								
Portales Entzündungsinfiltrat 1								
Stadium II plus 5								
Gallengangproliferation 1								
Periportales Entzündungsinfiltrat 1								
Fibrose portal-periportal 1-5								
Mottenfraßnekrose 1								
Stadium III plus 13								
Gallengangatrophie 1								
Brückennekrose 1								
Portoportale bindegewebige Septen 1-3								
Stadium IV plus 18								
Gallengangrarefizierung 1								
Biliäre Zirrhose 1								
Ergebnis								

Tabelle 2-4 Score zur histologischen Auswertung

2.4 Bestimmung und Auswertung der Blutserumwerte

2.4.1 Enzymaktivitätsbestimmung

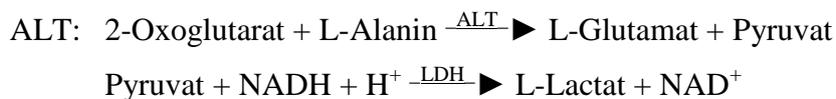
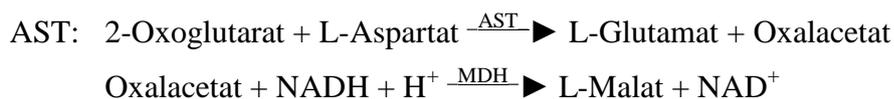
2.4.1.1 Material, Geräte und Software

Fluitest® LDH-L Test Kit	ANALYTICON Biotechnologies (Cat-No.: 2222)
Fluitest® GOT/ASAT	ANALYTICON Biotechnologies (Cat-No.: 1176)
Fluitest® GPT/ALAT	ANALYTICON Biotechnologies (Cat-No.: 1186)
LDH-Standard 0: NobiCalserum Multi	Nobis/HITADO

AST-Standard 0: NobisCalserum Multi	Nobis/HITADO
ALT-Standard 0: NobisCalserum Multi	Nobis/HITADO
Dulbecco's PBS (1×)	PAA Laboratories GmbH (Cat-No.: H15-002)
FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH, D-Offenburg
Control/ MARS Data Analysis Software	BMG LABTECH GmbH, D-Offenburg
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation

2.4.1.2 Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung

Bei Hepatozytenschädigung treten die Enzyme Lactatdehydrogenase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase vermehrt ins Blut aus. Da die absoluten Konzentrationen im Blutserum sehr gering sind, werden nur ihre Aktivitäten über die Geschwindigkeit ihres Substratumsatzes bestimmt. Somit ist die Enzymaktivität das Maß für die katalytische Wirkung der Enzyme. Zugabe von Reaktionslösung zum Blutserum und den darin enthaltenen Enzymen führen jeweils zu folgenden Reaktionen:



Die dadurch entstehende Extinktionszunahme bei 334 Nanometer (nm) durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH (LDH) bzw. Extinktionsabnahme bei 334 nm (GOT, GPT) durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ kann gemessen werden. Die Zuordnung der gemessenen Extinktionen zu einer bestimmten Enzymaktivität erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve.

2.4.1.3 Ausführung der Enzymaktivitätsbestimmung

Folgende Lösungen sollten vor Beginn der Enzymaktivitätsmessung hergestellt werden:

1. Reaktionsmischung LDH

2,8 ml	R1 Fluitest® LDH-L
0,7 ml	R2 Fluitest® LDH-L

2. Reaktionsmischung GOT/ ASAT

2,8 ml	R1 Fluitest® GOT/ ASAT
0,7 ml	R2 Fluitest® GOT/ ASAT

3. Reaktionsmischung GPT/ ALAT

2,8 ml	R1 Fluitest® GPT/ ALAT
0,7 ml	R2 Fluitest® GPT/ ALAT

4. Standardlösungen

Arbeitsschritt	1.	2.	LDH	AST	ALT
	in 2 ml Eppendorfgefäß	Hinzufügen	U/1	U/1	U/1
Standard 1	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 0	245	173,6	173,6
Standard 2	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 1	122,5	86,8	86,8
Standard 3	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 2	61,25	43,4	43,4
Standard 4	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 3	30,625	21,7	21,7
Standard 5	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 4	15,3125	10,85	10,85
Standard 6	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 5	7,65625	5,425	5,425
Standard 7	500 µl ddH ₂ O	500 µl Standard 6	3,82125	2,7125	2,7125
Standard 8	500 µl ddH ₂ O	-	0	0	0

µl: Mikroliter

Zu je 5 µl Blutserum bzw. 5 µl einer von 8 Standardlösungen mit bekannter Aktivität wurden 45 µl PBS und 50 µl einer Reaktionsmischung pipettiert. Die dadurch entstandene Extinktionszunahme bzw. Extinktionsabnahme wurde mit dem Microplate Reader FLUOstar Omega unter Anwendung der zugehörigen Software (MARS Data Analysis) über den Zeitraum von 10 min gemessen. Die Ergebnisse wurden in Tabellen der Software Microsoft Excel übertragen. Die anschließende Zuordnung der gemessenen Extinktionen zu einer bestimmten Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve (siehe Abb. 2-3). Dazu wurden im konstant ansteigenden Bereich je Standard die Mittelwerte der

Extinktionsveränderungen pro min $dE/min = \frac{E_{x\min} - E_{0\min}}{x\min}$ gebildet. Diese Mittelwerte wurden in einem Punktdiagramm auf der Ordinate gegen die bekannten Enzymaktivitäten je Standard auf der Abszisse aufgetragen. Anschließend wurde eine lineare Ausgleichsgerade des Punktdiagrammes berechnet sowie die sie beschreibende Funktion und ihr Bestimmtheitsmaß. Dabei entsprach die bei Standard 8 gemessene dE/min dem Blindwert. Die errechnete Funktion lag in folgender Form vor:

$$y = mx + c$$

Nach Auflösen der Formel nach x wurde für y jeweils dE/min des Zeitraumes 0 min bis x min jeder Serumprobe eingesetzt. Die so ermittelten x-Werte entsprachen der um den Blindwert berichtigten Enzymaktivität der Serumprobe und wurden in Microsoft-Exceltabellen übertragen, mittels GraphPad Prism statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

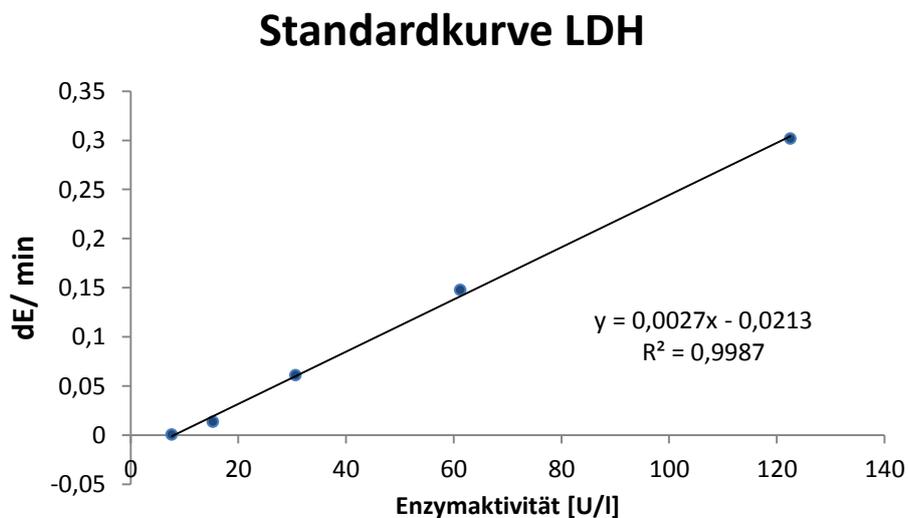


Abb. 2-3 Standardkurvenbeispiel LDH

photometrische Auswertung der LDH-Standardlösungen unter Einbeziehung der Standards 3-7

2.4.2 TGF- β -Konzentrationsbestimmung

2.4.2.1 Material, Geräte und Software

Recombinant human TGF- β_1

peproTech (Cat-No.: 100-21)

Dulbecco's PBS (1 \times)

PAA Laboratories GmbH (Cat-No.: H15-002)

Dulbeccos´s Modifizierte Medien (DMEM) PAA Laboratories GmbH (Cat-No.:E15-883)

Glycine	ALDRICH (Cat-No.: G7126-100G)
Tris-base	ALDRICH (Cat-No.: T1503-500G)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	SIGMA (Cat-No.: M2670-100G)
p-Nitrophenylphosphat (pNpp)	SIGMA (Cat-No.: N4645-5G)
HERAcell 150, Heraeus	THERMO Fisher Scientific, USA-Waltham
FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH, D-Offenburg
Control/MARS Data Analysis Software	BMG LABTECH GmbH, D-Offenburg
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation

2.4.2.2 Prinzip

Die quantitative Bestimmung des Zytokins TGF- β wurde nach der spezifischen Methode und mit den mausembryonalen Fibroblasten von Tesseur [134] durchgeführt. Dazu werden spezielle mausembryonale Fibroblasten als Reporterzellen genutzt. Diese Zellen sind durch das Einbringen von Plasmiden in mausembryonale Fibroblasten von TGF- $\beta_1^{-/-}$ Mäusen genetisch modifiziert, so dass sie in der Gegenwart von TGF- β über einen Smad-gekoppelten Weg alkalischer Phosphatase sekretieren. Zugabe von AP-Reaktionslösung führt durch die sekretierte AP zu folgender Reaktion:



Die dabei entstehende Extinktionszunahme kann gemessen werden und mit Hilfe einer Standardkurve bestimmten TGF- β Konzentrationen zugeordnet werden.

2.4.2.3 Ausführung der TGF- β -Konzentrationsbestimmung

Folgende Lösungen sollten vor Durchführung der Methode bzw. vor Beginn der Enzymaktivitätsmessung hergestellt werden:

1. 0,1 Molar (M) AP-Puffer, pH 10,5 (500 ml)

1,88 g Glycine

6,06 g Tris base

101,5 Milligramm (mg) MgCl₂500 ml dH₂OGlycine, Tris base and MgCl₂ in dH₂O lösen und pH auf 10,5 einstellen.**2. AP-Reaktionlösung (1 ml)**

1,3 mg pNpp

1 ml AP-Puffer

3. Standardlösung TGF- β

Arbeitsschritt	1.	2.	Konzentration
	in 2 ml Eppendorfgefäß	Hinzufügen	ng/ml
Standard 1	200 μ l DMEM	2 μ l TGF- β_1 Standard	40
Standard 2	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 1	20
Standard 3	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 2	10
Standard 4	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 3	5
Standard 5	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 4	2,5
Standard 6	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 5	1,25
Standard 7	100 μ l DMEM	100 μ l Standard 6	0,625
Standard 8	100 μ l DMEM	-	0

ng: Nanogramm

Die mausembryonalen Fibroblasten wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit je 100 μ l DMEM bedeckt. Anschließend wurden je 5 μ l Blutserum bzw. 5 μ l einer von 8 Standardlösungen mit bekannter TGF- β_1 Konzentration hinzugefügt und die 96-Well-Platten bei 37 °C für 48 h im HERAccl 150 inkubiert. In diesem Zeitraum führte die Anwesenheit von TGF- β zur Sekretion von AP aus den Reporterzellen. Danach wurden je 100 μ l der AP-Reaktionslösung zupipettiert. Die in der darauffolgenden Reaktion entstandene Extinktionszunahme bei 405 nm wurde im Microplate Reader FLUOstar Omega über den Zeitraum von 3 h gemessen. Die Ergebnisse wurden in Tabellen der Microsoft Excel übertragen.

Die Zuordnung der Extinktionszunahme pro Minute $dE/min = \frac{E_{x\text{min}} - E_{0\text{min}}}{x\text{min}}$ zu einer bestimmten TGF- β Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve (siehe Abb. 2-4). Dazu wurden in einem Punktdiagramm auf der Ordinate die Mittelwerte der dE/min je Standard gegen die bekannten TGF- β_1 Konzentrationen je Standard auf der Abszisse aufgetragen. Es wurde die lineare Ausgleichsgerade des Punktdiagrammes sowie die sie beschreibende Funktion und ihr Bestimmtheitsmaß berechnet, wobei die bei Standard 8 gemessene dE/min dem Blindwert entsprach. Die errechnete Funktion lag in folgender Form vor:

$$y = mx + c$$

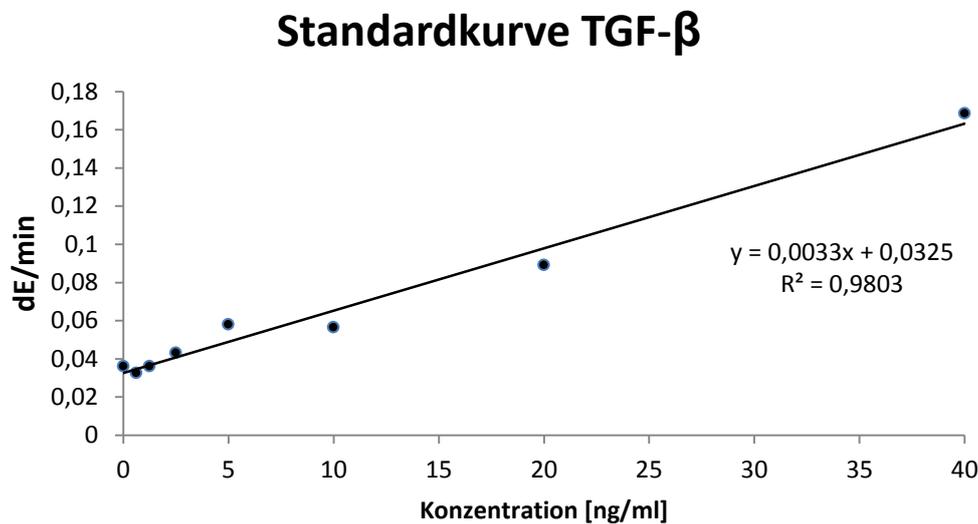


Abb. 2-4 Standardkurve TGF- β

photometrische Auswertung der TGF- β Standardlösungen

Nach Auflösen der Formel nach x wurde für y jeweils dE/min des Zeitraumes 0 min bis x min jeder Serumprobe eingesetzt. Die so ermittelten x -Werte entsprachen der um den Blindwert berichtigten TGF- β Konzentrationen der Serumprobe und wurden in Microsoft-Exceltabellen übertragen, mittels GraphPad Prism statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.5 Mikro-CT Messungen

2.5.1 Gerät und Software

Dulbecco's PBS (1×)	PAA Laboratories GmbH (Cat-No.: H15-002)
viva μ CT40	SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation

2.5.2 Prinzip der μ CT Messung

Zur Analyse der Knochen wurde die Untersuchung mittels μ CT gewählt. Diese Methode bietet im Gegensatz zur klassischen histomorphologischen Untersuchung der Mikrostrukturen die Möglichkeit einer direkten Darstellung und Quantifizierung der dreidimensionalen Knochenstruktur mit hoher Ortsauflösung. Weitere Vorteile sind destruktionsfreie Knochenanalyse, so dass die Proben noch für ergänzende Untersuchungen zur Verfügung stehen, digitale Daten und entfallende Präparationsarbeit. Die Messungen erfolgten am Julius Wolff Institut Berlin-Brandenburg des Center for Regenerative Therapies der Charité-Universitätsmedizin Berlin durch die Doktorandin Yvonne Lau im Rahmen ihrer Doktorarbeit.

2.5.3 Durchführung der μ CT Messung

Von den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Mausknöcheln wurde je ein Femur jeder Maus im hochauflösenden viva μ CT40 gemessen. Dazu wurden je vier Knochen für die Messung in Pipettenspitzen in Ausrichtung Femurkopf Richtung Spitze platziert. Diese Pipettenspitzen wurden je in ein mit PBS gefülltes Falcon-Röhrchen mit den Spitzen in Richtung Röhrchenöffnung eingeführt. Dabei durften keine Luftblasen entstehen, da diese sonst in den Scans zu sehen gewesen wären. Für den Scanvorgang wurden die befüllten Falcon-Röhrchen auf einem vorgefertigten Träger befestigt.

Zu Beginn wurde je ein Übersichtsscan (Scout-View) angefertigt. Auf diesem wurden die zu scannenden Bereiche jedes Knochens markiert. Im distalen Bereich wurden vom Knochenbeginn an 415 Slices und genau in der Knochenmitte 50 Slices angefertigt. Das VOI wurde gewählt, indem vom distalen Ende des Knochens die Metaphyse aufgesucht wurde, von dort aus noch 10 Slices verworfen und die nächsten 135 Slices gewertet wurden. Die Integrationszeit betrug 381 Millisekunden (gesamter Scan: 47,8 min) und die Auflösung $10\text{ }\mu\text{m}$. Das Increment war auf $10,5\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt.

Die Auswertung der Scans erfolgte mit Hilfe des vom Hersteller mitgelieferten passenden μ CT-Evaluationsprogrammes. Die dabei ermittelten Werte wurden in eine Tabelle der Microsoft Software Excel übertragen, mittels Graph Pad Prism statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.5.4 Beschriebene Knochenparameter

Abkürzung	Einheit	Parameter-Name	Beschreibung
Cortex und Spongiosa			
BMD	g/cm^3	Knochenmineralisationsdichte	Knochenmineralgehalt pro Volumeneinheit
BV	mm^3	Knochenvolumen	Volumen des Knochens der Region ^a
TV	mm^3	Gesamtvolumen	Volumen der gesamten region of interest ^a
BV/TV	%	Knochenvolumenanteil	Quotient aus Knochenvolumen und Gesamtvolumen ^{a,b}
Trabekuläre Mikroarchitektur			
Tb.N	1/mm	Trabekelanzahl	durchschnittliche Anzahl an Trabekel pro Längeneinheit ^{a,b}
Tb.Th	mm	Trabekeldicke	durchschnittliche Trabekeldicke ^{a,b}
Tb.Sp	mm	Trabekelseparation	Durchschnittlicher Abstand der Trabekel zueinander ^{a,b}
Conn.D	$1/\text{mm}^3$	Connectivity Density Vernetzungsdichte	Maß der Vernetzung des trabekulären Geflechts ^{a,c}
SMI		Struktur Modell Index	Indikator für Trabekelstruktur: 0 entspricht perfekter Plattenstruktur 3 entspricht perfekter Stäbchenstruktur ^d

Tabelle 2-5 Knochenparameter

mm: Millimeter; mm^3 : Kubikmillimeter

^a [19:S. 1475], ^b [80:S. 1168f], ^c [51:S. 3], ^d [79:S. 17]

2.6 Quantifizierung der Genexpression in Leber- und Knochengewebe

2.6.1 RNA-Isolation aus Leber- und Knochengewebe

2.6.1.1 Material, Geräte und Software

Borsäure	SIGMA (Cat-No.: B0252-1KG)
Bromphenol Blue	SIGMA (Cat-No.: 114391)
Chloroform	MERCK (Cat-No.: 102395)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	SIGMA (Cat-No.: D5758-25M2)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA (Cat-No.: E51343500G)
Ethidiumbromid (EtBr)	SIGMA (Cat-No.: E1385-5ML)
Flüssiger Stickstoff	Apotheke des MRI
Glycerol	SIGMA (Cat-No.: G8773-500ML)
Isopropanol	Apotheke des MRI
peqGOLD TriFast™	PEQLAB (Cat-No.: 30-2020)
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB (Cat-No.: 35-1020)
pUC19-Marker	ROTH (Cat.No.: X901.1)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	SIGMA (Cat-No.: T87602-3KG)
Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München
Spektralphotometer ND-1000 NanoDrop®	PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München
Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, D-Göttingen
NanoDrop® 1000 V3.7.1 Software	PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
Intas Steuer-Bildaufnahmesoftware	Intas Science Imaging Instruments GmbH, D-Göttingen

2.6.1.2 Prinzip der RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wird die Methode nach Chomezynski und Sacchi (single step) mittels peqGOLD TriFast™ verwendet (siehe Tabelle 2-6). Zur Vorbereitung werden beide Tibiae jeder Maus durch flüssigen Stickstoff schockgefroren, mit Mörser und Pistill zermahlen und mit peqGOLD TriFast™ in ein Eppendorf Gefäß gebracht. Die Lebergewebeprobe von 0,2*0,2*0,2 mm werden mit peqGOLD TriFast™ in Eppendorf Gefäßen zerstoßen. Durch das im peqGOLD TriFast™ enthaltene Guanidinisothiocyanat werden die Zellen in den Proben lysiert, sowie RNase und andere Enzyme inaktiviert, während sich in Phenol DNA und Proteine lösen. Die Phasentrennung wird mit Chloroform durchgeführt, wodurch eine

wässrige Oberphase mit RNA, eine Interphase mit Lipiden und DNA und eine rote organische Phase mit Proteinen und DNA entstehen. Die Präzipitation erfolgt durch Mischen der Oberphase mit Isopropanol, so dass die RNA in einem gelartigen Pellet vorliegt. Die folgende zweimalige RNA Waschung wird mittels 70 % EtOH ausgeführt, um überschüssiges Salz zu entfernen. Zuletzt wird das RNA-Pellet in DEPC H₂O resuspendiert.

Bei der anschließenden Quantifizierung der RNA wird zur Konzentrationsbestimmung die Abschwächung eines emittierten Lichtstrahls (Extinktion) bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 230 nm bzw. 280 nm. Die Reinheit der Probe lässt sich über die Quotienten 260/230 bzw. 260/280 bestimmen, für die der Richtwert von 1,8-2,0 erreicht werden muss.

Die Integrität der RNA wird mittels Gelelektrophorese unter Verwendung von EtBr und pUC19-Marker kontrolliert. EtBr interkaliert die RNA und fluoresziert unter ultraviolettem (UV)-Licht. Der pUC19-Marker dient als Längenstandard. Die Integrität der RNA wird nach Elektrophorese anhand der unter UV-Licht aufleuchtenden Banden 18S und 28S beurteilt.

2.6.1.3 Durchführung der RNA-Isolation

Folgende Lösungen sollten vor Durchführung der RNA Isolation hergestellt werden:

- | 1. DEPC H₂O | | Endkonzentration |
|--|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 ml | DEPC | |
| 1 l | ddH ₂ O | 0,1 % |
| Für 1 h bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren und auf RT abkühlen lassen. | | |
| 2. 10×Tris-Borat/EDTA (TBE) Puffer | | Endkonzentration |
| 540 g | TRIS-aminomethan (MW 121.14 g/ mol) | 0,89 M |
| 275 g | Borsäure (MW 61.83 g/ mol) | 0,89 M |
| 37,3 g | EDTA (MW 372.24 g/ mol) | 20 Millimolar (mM) |
| 5 l | ddH ₂ O | |
| pH auf 8,3 einstellen | | |
| 3. 1×TBE Puffer | | |
| 100 ml | 10× TBE Puffer | |
| 900 ml | ddH ₂ O | |

4. Ladepuffer (5×)		Endkonzentration
1 mg	Bromphenol Blue	
25 ml	10×TBE Puffer	5×
5 ml	Glycerol	10 %
20 ml	H ₂ O	

Bei 4 °C oder -20 °C (Langzeit) lagern.

Oben genannte RNA-Isolation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Homogenisierung	200 µl peqGOLD TriFast™ mit Probe (Leber/Knochen) vermischen
	550 µl peqGOLD TriFast™ hinzufügen, kurz mit Vortex-Gerät mischen
	5 min bei RT inkubieren
Phasentrennung	150 µl Chloroform hinzufügen und für 15 sec mit Vortex-Gerät mischen
	7 min bei RT inkubieren
	mit 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
RNA Präzipitation	obere klare Phase mit 375 µl Isopropanol in neues Eppendorf Gefäß
	Vorsichtig mischen und 7 min auf Eis inkubieren
	mit 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
RNA waschen	Überstand abpipettieren, mit 70 % EtOH waschen
	mit 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
	Überstand abpipettieren, mit 70 % EtOH waschen
	mit 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
RNA auflösen	Überstand abpipettieren, RNA in 50 µl DEPC H ₂ O auflösen
	Eppendorf Gefäße für 10 min mit offenem Deckel auf Eis inkubieren

Tabelle 2-6 Protokoll RNA Isolation

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000. Zur Bestimmung wurden zuerst 1,5 µl DEPC H₂O auf die Probehaltung des Spektralphotometers ND-1000 pipettiert, um einen Leerwert festzulegen und anschließend die Messung mit je 1,5 µl der RNA Proben durchgeführt.

Um die Integrität der RNA mittels Gelelektrophorese zu kontrollieren, wurden 1,5 g peqGOLD Universal Agarose und 100 ml 1×TBE Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf 50 °C wurden 6 µl EtBr zugefügt und das Gel in mit

Gelkammerrechen bestückten Gelschlitten ausgegossen. Nach einer Stunde wurde das Gel in eine Gelkammer mit 1×TBE Puffer gebracht. 300 ng RNA jeder RNA Probe wurden je in Tubes bis 10 µl mit DEPC H₂O aufgefüllt und mit je 7 µl Ladepuffer in der Reihenfolge DEPC H₂O, Ladepuffer, RNA Probe vermischt. Dabei diente der Ladepuffer zur Kontrolle der Laufgeschwindigkeit während der Elektrophorese. In die erste Geltasche jeder Reihe wurden 2 µl pUC19-Marker pipettiert. Die anderen Geltaschen wurden mit je 8 µl aus den vorbereiteten Strips beladen. Die Elektrophorese wurde bei 90 Volt (V) 40 min lang durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Integrität der RNA beurteilt.

2.6.2 Komplementäre DNA (cDNA) Synthese

2.6.2.1 Material und Geräte

DEPC SIGMA (Cat-No.: D5758-25ML)

First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas (Cat-No.:K1612)

Vial 1: M-MuLV Reverse Transkriptase

Vial 2: RiboLock™ RNase Inhibitor

Vial 3: 5× Reaction Buffer

Vial 4: dNTP Mix 10 mM each

Vial 5: Oligo (dT)₁₈ Primer

Vial 6: Random Hexamer Primer

Mastercycler® ep gradient

Eppendorf AG, D-Hamburg

2.6.2.2 Prinzip der cDNA Synthese

Die isolierte RNA, die nicht gleichermaßen stabil wie DNA ist, dient als Matrize, um mittels reverser Transkriptase einen zur Ausgangs-RNA komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Um die Transkription zu beginnen, benötigt diese RNA-abhängige DNA-Polymerase Primer, die an die RNA binden. Dafür kann ein Oligo-dt-Nukleotid, das komplementär zum Poly-A-Schwanz der messenger RNA (mRNA) ist, verwendet werden oder Random Hexamer Primer, welche, bestehend aus zufällig zusammengesetzten Basenpaaren (bp), komplementär an die mRNA binden. An die mRNA angelagert bilden die Primer die Startpunkte der reversen Transkriptase, welche durch Zugabe eines

Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) Mix einen komplementären DNA-Strang synthetisiert.

2.6.2.3 Durchführung der cDNA Synthese

Vor Durchführung der Methode muss Master Mix Komponente A und nach Beginn der Durchführung Master Mix Komponente B hergestellt werden:

Mastermix Komponente A		Mastermix Komponente B	
	pro Tube		pro Probe
Oligo (dt) ₁₈ Primer	1 µl	5× Reaction Buffer	4 µl
Random Hexamer Primer	1 µl	RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	1 µl
RNA Probe ($c = \frac{4}{9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	9 µl	10 mM dNTP Mix	2 µl
		M-MuLV Reverse Transkriptase	2 µl

Die mit DEPC H₂O zu einer Konzentration (c) von $\frac{4}{9}$ Mikrogramm pro µl verdünnten RNA Proben wurden mit Oligo(dt)₁₈Primer und Random Hexamer Primer zur Mastermix Komponente A vermischt und pro Probe wurde ein Tube mit 11 µl befüllt. Diese Tubes wurden für 5 min bei 65 °C in den MasterCycler® ep gradient gebracht, damit sich die Primer anlagern können. Währenddessen wurde die Mastermix Komponente B hergestellt, deren Volumen sich aus der Anzahl der RNA Proben berechnete. Anschließend wurden je 9 µl der Mastermix Komponente B in je ein Tube pipettiert, so dass das Gesamtvolumen eines jeden Tubes bei 20 µl lag. Im MasterCycler® ep gradient durchliefen die Tubes 60 min bei 37 °C und zur Beendigung der Synthese weitere 5 min bei 70 °C, um durch das Erhitzen das Enzym zu inaktivieren. Im Anschluss wurden die cDNA-Synthese Produkte mit DEPC H₂O auf 5 ng/µl verdünnt.

2.6.3 cDNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und elektrophoretische Trennung von DNA

2.6.3.1 Material, Geräte und Software

Borsäure	SIGMA (Cat-No.: B0252-1KG)
Bromphenol Blue	SIGMA (Cat-No.: 114391)
DEPC	SIGMA (Cat-No.: D5758-25ML)
EDTA	SIGMA (Cat-No.:E51343500G)

EtBr	SIGMA (Cat-No.: E1385-5ML)
Glycerol	SIGMA (Cat-No.: G8773-500ML)
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab (Cat-No.: 35-1020)
pUC19-Marker	ROTH (Cat-No.: X901.1)
Taq-Polymerase 1.000 U	Axon Labortechnik (Cat-No.: 22466)
Taq-Polymerase	
Reaktionspuffer 10× BD	
MgCL ₂	
dNTP-Mix 10 mM je Nukleotid	Axon Labortechnik (Cat-No.: 24478)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	SIGMA (Cat-No.: T87602-3KG)
Mastercycler® ep gradient	Eppendorf AG, D-Hamburg
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München
Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, D-Göttingen
Intas Steuer-Bildaufnahmesoftware	Intas Science Imaging Instruments GmbH, D-Göttingen

2.6.3.2 Prinzip der PCR und Gelelektrophorese

Die PCR ist eine Methode, um in vitro selektiv bestimmte Abschnitte der DNA amplifizieren zu können. Dazu durchlaufen Tubes befüllt mit cDNA und einem Reaktionsmix 40 Zyklen in einem Gerät wie dem Mastercycler® ep gradient. Jeder Zyklus besteht aus 3 Schritten:

1. Denaturierung

Bei 95 °C werden bestehende H-Brücken zwischen den DNA-Strängen oder Primern aufgebrochen, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen. Bei der Initialisierung wird dieser Schritt um 5 min verlängert, damit möglichst alle Stränge getrennt werden.

2. Annealing

Bei primerspezifischen Temperaturen von 58 °C-65 °C lagern sich Oligonukleotide, forward und reverse Primer, an die komplementäre Sequenz der Einzelstrang-DNA an. Zuvor muss die adäquate Temperatur für den jeweiligen Primer ermittelt werden, wie in unserer Studie experimentell geschehen.

3. Extension

Bei 72 °C synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus* isoliert) beginnend an der 3'-OH Gruppe des Primers in 5'-3'-Richtung einen zur cDNA-Vorlage komplementären DNA-Strang. Dabei werden forward und reverse Primer so gewählt, dass das forward Primer Produkt des vorherigen Zyklus als Vorlage für den reversen Primer im nächsten Zyklus dient und umgekehrt. Somit kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des Haupt-PCR-Produktes. Der letzte Zyklus wird zur Vervollständigung aller PCR-Produkte um eine 5-minütige Extensionsphase ergänzt.

Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, die amplifizierte DNA zu trennen, um anschließend die Quantität der Expression bestimmter Gene festzustellen. Dazu wird EtBr verwendet, welches die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Der pUC19-Marker dient als Längenstandard, um am Ende der Elektrophorese die unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden zu identifizieren.

2.6.3.3 Durchführung der PCR und Gelelektrophorese

Folgende Lösungen sollten vor Beginn der PCR hergestellt werden:

1. DEPC H ₂ O	siehe Kapitel 2.6.1.3 oben
2. 10×TBE Puffer	siehe Kapitel 2.6.1.3 oben
3. 1×TBE Puffer	siehe Kapitel 2.6.1.3 oben.
4. Ladepuffer (5×)	siehe Kapitel 2.6.1.3 oben
5. Mastermix PCR	pro Probe
Reaktions Puffer 10×BD	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
dNTP-Mix 10 mM je Nukleotid	0,5 µl
Taq DNA Polymerase 1.000 U	0,1 µl
DEPC H ₂ O	5,4 µl

Für die PCR wurden Tubes je mit 8 µl cDNA-Synthese Produkt bzw. eine Kontrolle mit 8 µl DEPC H₂O und 12 µl Mastermix PCR befüllt. Im Mastercycler® ep gradient durchliefen die Tubes eine 5 min Initialisierung bei 95 °C, 40 Zyklen mit primerspezifischer Dauer von Denaturierung bei 95 °C, Annealing bei primerspezifischer Annealingtemperatur und Extension bei 72 °C, die im letzten Zyklus um 5 min verlängert wurde (siehe Tabelle 2-7).

Um anschließend vergleichen zu können, in welcher Menge bestimmte Gene exprimiert wurden, wurde die amplifizierte DNA mittels Gelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1,5 g peqGOLD Universal Agarose und 100ml 1×TBE Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen des Gels auf 50 °C wurden 6 µl EtBr zugefügt und das Gel in mit Gelkammerrechen bestückten Gelschlitten ausgegossen. Nach einer Stunde wurde das Gel in eine Gelkammer mit 1×TBE Puffer gebracht. In die erste Geltasche jeder Reihe wurden 2 µl pUC19-Marker pipettiert. Die anderen Geltaschen wurden mit je 15 µl einer zentrifugierten Mischung aus den PCR-Produkten und je 10 µl Ladepuffer beladen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V 50 min lang durchgeführt. Im elektrischen Feld wurden die negativ geladenen Desoxyribonukleotidsäuren in Richtung des positiv geladenen Pluspols gezogen. Dabei sind kleinere DNA-Fragmente schneller als größere. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und mittels der an den Gel iX Imager angeschlossenen Intas Steuer-Bildaufnahmesoftware digital im Format .jpg festgehalten. Die entstandenen Banden konnten mit Hilfe des Längenstandards identifiziert werden.

2.6.3.4 Angewandte Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Primer-BLAST auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> designiert und ihre Spezifität durch genomweite Blasts verifiziert (siehe Kapitel 9.3 unten). Die Herstellung erfolgte bei MWG Operon.

Gen; gene bank accession number	Sequenzen 5' nach 3'	T_A in °C	Fragmentlänge
<u>β-Aktin;</u> NM_007393.3	for CGA CAA CGG CTC CGG CAT GT rev GCA CAG TGT GGG TGA CCC CG	65	461 bp
<u>mOsteocalcin;</u> NM_001037939.1	for ACC CTG GCT GCG CTC TGT CT rev CCA GGG TCC TGG ACA TGG GGA	60	241 bp
<u>mOPN;</u> NM_009263.2	for GCA GTC TTC TGC GGC AGG CA rev CGG CCG TTG GGG ACA TCG AC	59	487 bp
<u>mOPG;</u> NM_008764.3	for TGT GCT GCG CAC TCC TGG TG rev GGT GCG GTT GCA CTC CTG CT	64	278 bp
<u>mMDR2;</u> NM_008830.2	for GGA ATT GGT GAC AAG GTT GG rev ATA CCA GAA GGC CAG TGC AT	58	395 bp
<u>mCYP 2R1;</u> NM_024514.4	for GGG AGG CTT ACT CAA TTC CA rev GCA ATG ATG AGT TCA CCC ACT	58	567 bp
<u>mCYP 27A1;</u> NM_000784.3	for GTG GAC ACG ACA TCC AAC AC rev ATG ATC CGG GAG TTT GTG G	58	212 bp
<u>mDHCR7;</u> NM_001360.2	for ATG GGC GCT GCC TCA TCT GG rev GAT TCC AGG CAG CAG GCG GT	58	329 bp
<u>mGC;</u> NM_000583.2	for AGA GGA GGT GCT GCA AGA CT rev GCA GCA TAT TGT GAG CAG ACT C	62	707 bp
Gen			
Gen	Zyklusanzahl	jeweilige Zykluszeit in Sekunden	
		Denaturierung	Annealing
		Extension	
β-Aktin	40	30	30
mOsteocalcin	40	40	40
mOPN	40	30	30
mOPG	40	30	30
mMDR2	40	40	40
mCYP 2R1	40	60	60
mCYP 27A1	40	60	60
mDHCR7	40	60	60
mGC	40	60	60

Tabelle 2-7 Primereigenschaften

T_A: primerspezifische Annealingtemperatur; *CYP 27A1*: Vitamin D(3) 25-Hydroxylase; *DHCR7*: 7-Dehydrocholesterol-Reduktase; *GC*: gruppenspezifische Komponente, Gen kodierend für Vitamin D bindendes Protein

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Auswertung des Lebergewebes im zeitlichen Verlauf

Die Auswertung der gefärbten Schnittpräparate erfolgte dreifach an Lichtmikroskopen. Der Mittelwert aus den drei voneinander unabhängigen Bewertungen wurde für die Ergebnisbeurteilung verwendet. Zusätzlich wurden mit der digitalen Kamera mikroskopische Bilder in 5-facher, 10-facher, 20-facher und 40-facher Vergrößerung erstellt (Übersicht siehe Abb. 3-1).

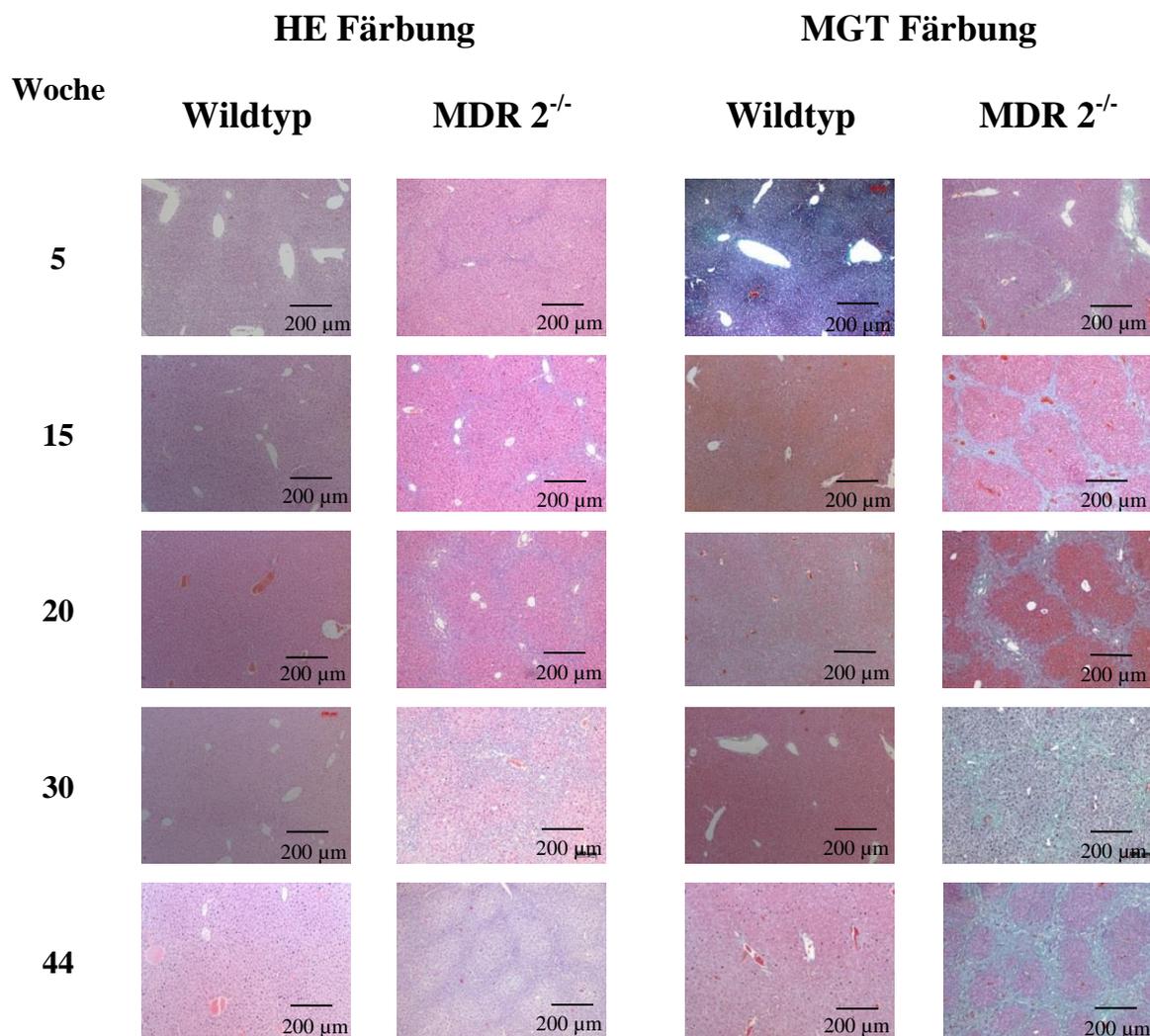


Abb. 3-1 Mikroskopische Bilder der Leberfärbungen, Übersicht: Vergrößerung 10 ×

Links: HE-Färbung des Lebergewebes im Zeitverlauf, 1. Spalte Wildtyp Mäuse, 2. Spalte MDR2^{-/-} Mäuse

Rechts: MGT Färbung des Lebergewebes im Zeitverlauf, 1. Spalte Wildtyp Mäuse, 2. Spalte MDR2^{-/-} Mäuse,

jeweils Lebenswoche 5 bis Lebenswoche 44

Die mikroskopische Auswertung lässt schon in Lebenswoche 5 große Unterschiede des Lebergewebes zwischen Wildtyp Balb/c-Mäusen und MDR2^{-/-} Mäusen erkennen. Bei den Wildtyp-Mäusen lässt sich gesundes Lebergewebe feststellen. Die Portalfelder sind normal groß mit vereinzelt Entzündungszellen oder Ödemen. Das Leberparenchym ist unauffällig. Die MDR2^{-/-} Mäuse zeigen dagegen erste Veränderungen des Lebergewebes: Es finden sich Bindegewebe-Ablagerungen um die Gallengänge (siehe Abb. 3-2 A + B). Mehrheitlich sind die Portalfelder entzündlich infiltriert und vergrößert, wobei sich das Entzündungsinfiltrat weitgehend auf die Portalfelder beschränkt. Teilweise breiten sich die Entzündungszellen bereits periportal aus (siehe Abb. 3-2 C). Vereinzelt finden sich beginnende Portalfeldfibrosen, Gallengangproliferation und Mottenfraßnekrosen.

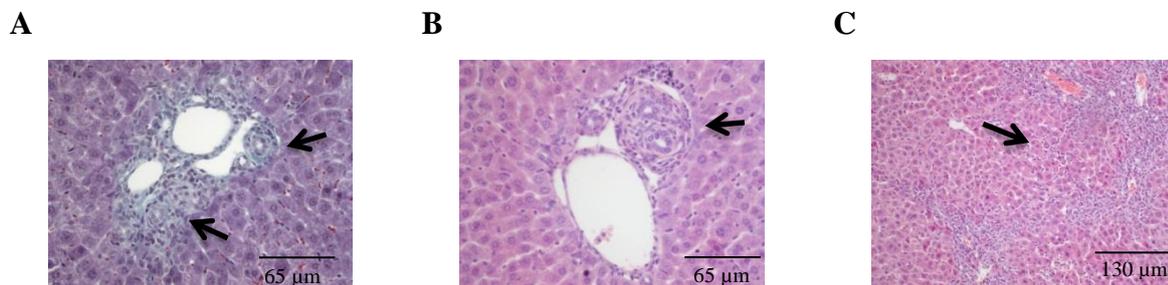


Abb. 3-2 Veränderung des Lebergewebes; Lebenswoche 5; MDR2^{-/-} Mäuse

A + B: Periduktale Bindegewebe-Ablagerungen in MGT und HE Färbung, männliche Tiere; Vergrößerung 40×

C: periportales Entzündungsinfiltrat in HE Färbung, weibliches Tier; Vergrößerung 20×

In Lebenswoche 15 zeigen sich noch deutlichere Unterschiede zwischen dem Lebergewebe der beiden Mauspopulationen. Während man gesundes Lebergewebe bei den Wildtyp-Mäusen findet, nimmt die Lebergewebeschädigung der MDR2^{-/-} Mäuse zu. Mehrheitlich sind Ductulusproliferationen (siehe Abb. 3-3 A) und Portalfeldfibrosen festzustellen. Die Entzündungsinfiltrate beschränken sich nicht mehr auf die Portalfelder (siehe Abb. 3-3 B), sondern breiten sich portoportal aus und greifen auf das angrenzende Leberparenchym über (siehe Abb. 3-3 C). Dabei sind vereinzelt beginnende bindegewebige Septen zu sehen.

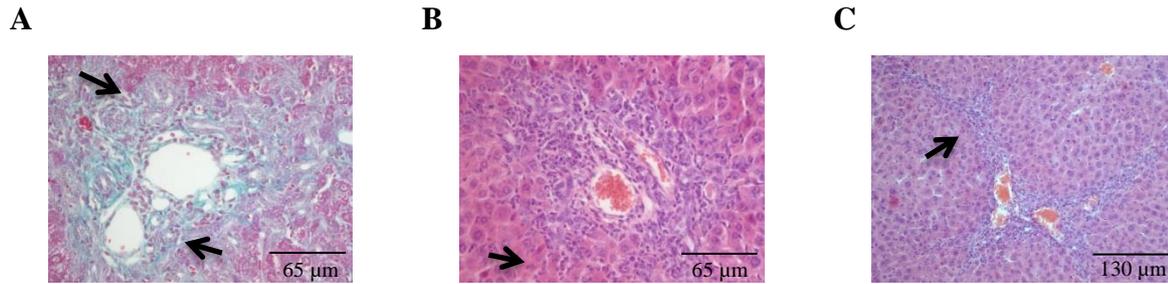


Abb. 3-3 Veränderung des Lebergewebes; Lebenswoche 15; MDR2^{-/-} Mäuse

A: Ductulusproliferation in MGT Färbung, weibliches Tier; Vergrößerung 40×

B: Grenzlamellendestruktion des Portalfeldes in HE Färbung, weibliches Tier; Vergrößerung 40×

C: periportales Entzündungsinfiltrat, greift auf angrenzendes Leberparenchym über, in HE Färbung, männliches Tier, Vergrößerung 20×

In den folgenden Wochen ändert sich das Bild kaum. Die Wildtyp-Mäuse weisen unauffälliges Lebergewebe auf. Bei den MDR2^{-/-} Mäusen zeigt das Lebergewebe bis zur 30. Lebenswoche nur noch einen mäßigen Anstieg der Schädigung. Teils finden sich portoportale bindegewebige Septen (siehe Abb. 3-4 C) und Brückennekrosen im Gewebe. Es kommt zur Gallengangatrophy, während sich die Portalfeldfibrosen und Entzündungsinfiltrate weiterhin ausbreiten (siehe Abb. 3-4 A).

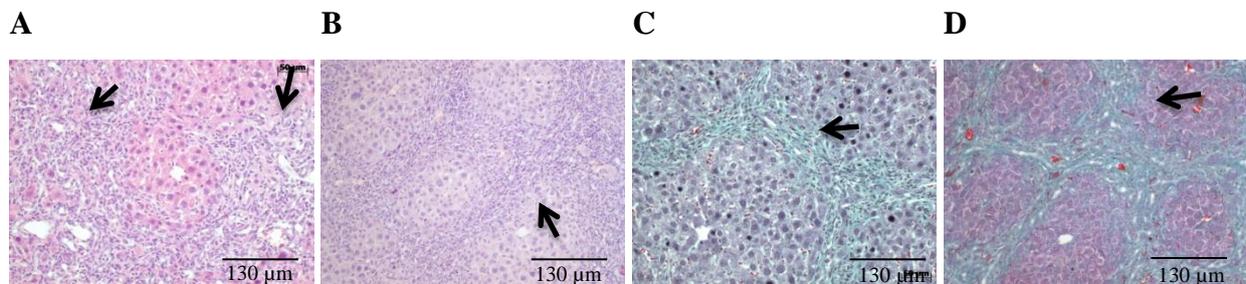


Abb. 3-4 Veränderung des Lebergewebes, Wochen 30 und 44; MDR2^{-/-} Mäuse

A: Entzündungsinfiltrat periportal und intralobulär in HE Färbung, Woche 30, weibliches Tier; Vergrößerung 20×

B: Entzündungsinfiltrat entlang bindegewebiger Septen und Übergreifen auf angrenzendes Leberparenchym, Nekrosebrücken, in HE Färbung, Woche 44, weibliches Tier; Vergrößerung 20×

C: portoportale bindegewebige Septen mit Entzündungsinfiltrat in MGT Färbung, Woche 30, weibliches Tier; Vergrößerung 20×

D: portoportale bindegewebige Septen, Entzündung rückläufig, Nekrosebrücken, in MGT Färbung, Woche 44; weibliches Tier; Vergrößerung 20×

Die Wildtyp-Mäuse zeigen in der Lebenswoche 44 vereinzelt portal Entzündungszellen oder Ödeme. Die $MDR2^{-/-}$ Mäuse entwickeln bis zur 44. Lebenswoche einen Umbau des Lebergewebes mit bindegewebigen Septen, Fibrosen und Brückennekrosen (siehe Abb. 3-4 B+D). Dabei sind die Entzündungsinfiltrate rückläufig und es zeigt sich Gallengangrarefizierung.

Durch Anwendung des Scores ergibt sich aus diesen Auswertungsergebnissen folgendes Diagramm:

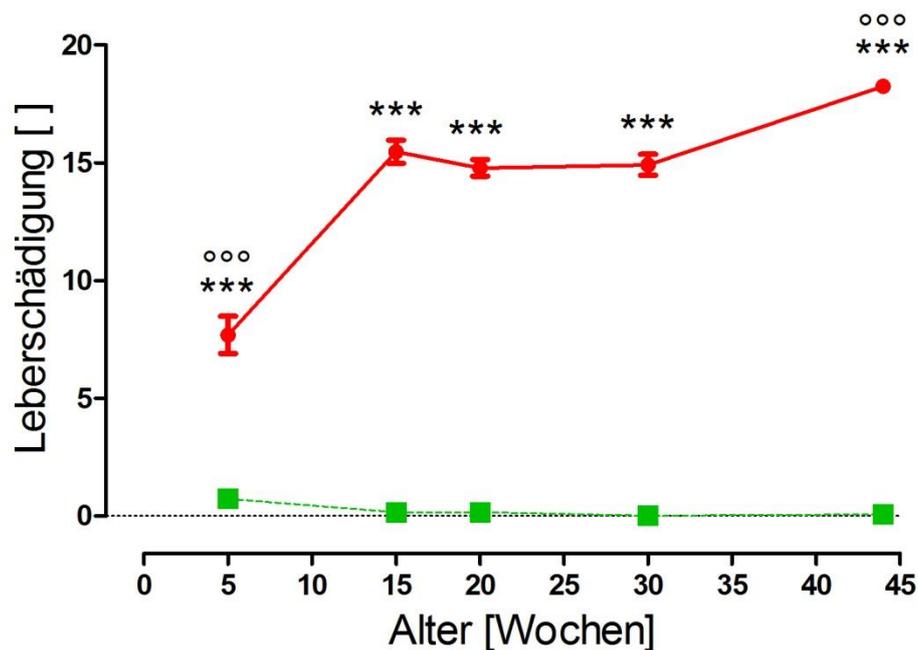


Abb. 3-5 Leberschädigungsgrad im Zeitverlauf

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: $MDR2^{-/-}$ Mäuse; Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

*** = $p < 0,001$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

ooo = $p < 0,001$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse Woche 5 im Vergleich zu $MDR2^{-/-}$ Mäusen Woche 20-44

und $MDR2^{-/-}$ Mäuse Woche 44 im Vergleich zu $MDR2^{-/-}$ Mäusen Woche 5-30

Die Lebergewebeschädigung der $MDR2^{-/-}$ Mäuse ist zu jedem beobachtetem Zeitpunkt signifikant höher als die der Wildtyp Mäuse (siehe Abb. 3-5). Die Lebergewebeschädigung der $MDR2^{-/-}$ Mäuse ist in den Wochen 15-44 signifikant gesteigert im Vergleich zur 5. Lebenswoche. Zusätzlich nimmt die Lebergewebeschädigung in der 44. Lebenswoche signifikant gegenüber den Lebenswochen 5-30 zu (siehe Abb. 3-5).

3.2 Erhöhte Transaminasen- und Dehydrogenasenspiegel im Blutserum der MDR2^{-/-} Mäuse

3.2.1 Enzymaktivität LDH

Die Blutanalysen bezüglich der Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase zeigen aufgetragen gegen das Lebensalter folgende Ergebnisse:

Im gesamten Zeitverlauf von Lebenswoche 5 bis Lebenswoche 44 lässt sich höhere LDH-Enzymaktivität im Blutserum der MDR2^{-/-} Mäuse als im Blutserum der Wildtyp-Mäuse nachweisen (siehe Abb. 3-6). Hierbei sind die Messergebnisse der MDR2^{-/-} Mäuse in den Wochen 20 und 44 im Vergleich zu denen der Wildtyp-Mäuse signifikant erhöht.

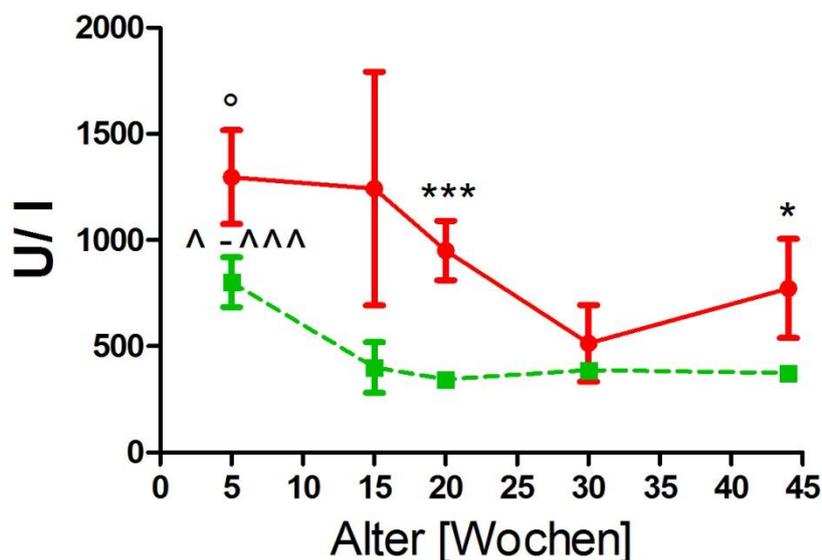


Abb. 3-6 Enzymaktivität LDH im Vergleich

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert ± SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

° = $p < 0,05$: MDR2^{-/-} Mäuse Woche 5 im Vergleich zu MDR2^{-/-} Mäusen Woche 44

^ = $p < 0,05$: Wildtyp Mäuse Woche 5 im Vergleich zu Wildtyp Mäusen Woche 15

^^ = $p < 0,001$: Wildtyp Mäuse Woche 5 im Vergleich zu Wildtyp Mäusen Woche 20-44

Die LDH-Enzymaktivität der Wildtyp-Mäuse reduziert sich im Zeitverlauf signifikant von initialen Mittelwerten von 800 U/l auf Mittelwerte bis 375 U/l (Woche 44). Die LDH-Enzymaktivität der MDR2^{-/-} Mäuse reduziert sich nach Maximalwerten in den Wochen 5 und 15 (1300 U/l) bis zur 30. Lebenswoche (510 U/l), um anschließend erneut bis zur 44. Lebenswoche (770 U/l) anzusteigen (siehe Abb. 3-6).

3.2.2 Enzymaktivität ASAT

Die Blutanalysen bezüglich der Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ergeben aufgetragen gegen das Lebensalter folgendes Resultat:

Im gesamten Zeitverlauf von Woche 5 bis Woche 44 lassen sich im Blutserum der $MDR2^{-/-}$ Mäuse höhere ASAT-Enzymaktivitäten als im Blutserum der Wildtyp-Mäuse nachweisen, wobei sich allerdings keine signifikanten Unterschiede ergeben (siehe Abb. 3-7).

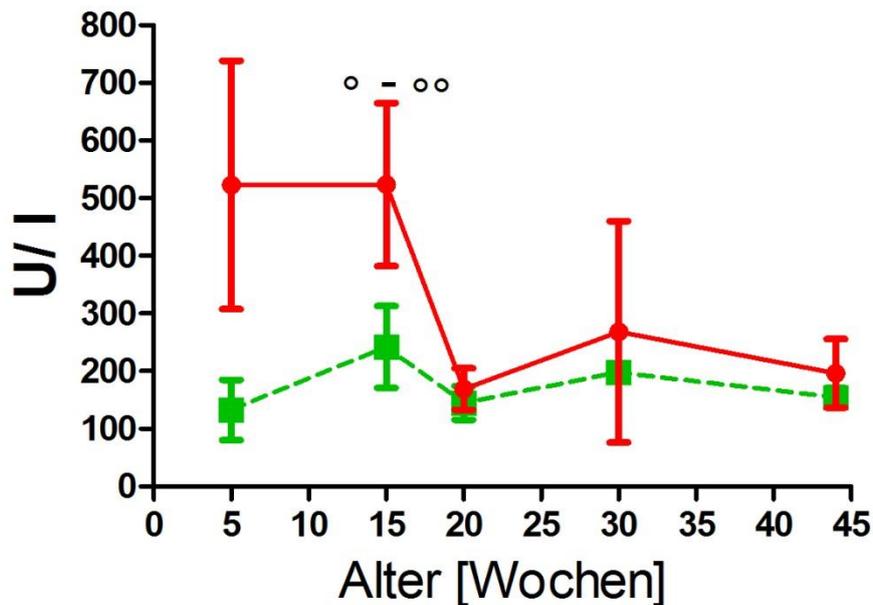


Abb. 3-7 Enzymaktivität ASAT im Vergleich

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: $MDR2^{-/-}$ Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

° = $p < 0,05$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse Woche 15 im Vergleich zu $MDR2^{-/-}$ Mäusen Woche 44

°° = $p < 0,01$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse Woche 15 im Vergleich zu $MDR2^{-/-}$ Mäusen Woche 20

Die ASAT-Enzymaktivitäts-Kurve der Wildtyp-Mäuse (siehe Abb. 3-7) zeigt einen zweigipfligen Verlauf ohne signifikante Unterschiede. Ausgehend von initial minimalen Mittelwerten von 133 U/l (Woche 5) steigt die ASAT-Enzymaktivität auf maximale Mittelwerte von 242 U/l in Woche 15 und fällt wieder auf Mittelwerte von 154 U/l (Woche 44) zurück. Die ASAT-Enzymaktivitäts-Kurve der $MDR2^{-/-}$ Mäuse (siehe Abb. 3-7) zeigt in den Wochen 5 und 15 ihr Maximum mit Mittelwerten von 523 U/l und fällt anschließend auf Mittelwerte von 196 U/l (Woche 44) ab, wobei die ASAT-Enzymaktivität in der Lebenswoche 15 signifikant höher als in den Lebenswochen 20 und 44 ist.

3.2.3 Enzymaktivität ALAT

Gegen das Lebensalter aufgetragen lassen die Blutanalysen bezüglich der Enzymaktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase folgende Ergebnisse erkennen:

Im gesamten Zeitverlauf von Woche 5 bis Woche 44 ist das ALAT-Enzymaktivitätsniveau der MDR2^{-/-} Mäuse höher als das der Wildtyp-Mäuse (siehe Abb. 3-8). Hierbei sind die Unterschiede, außer in Woche 30, signifikant.

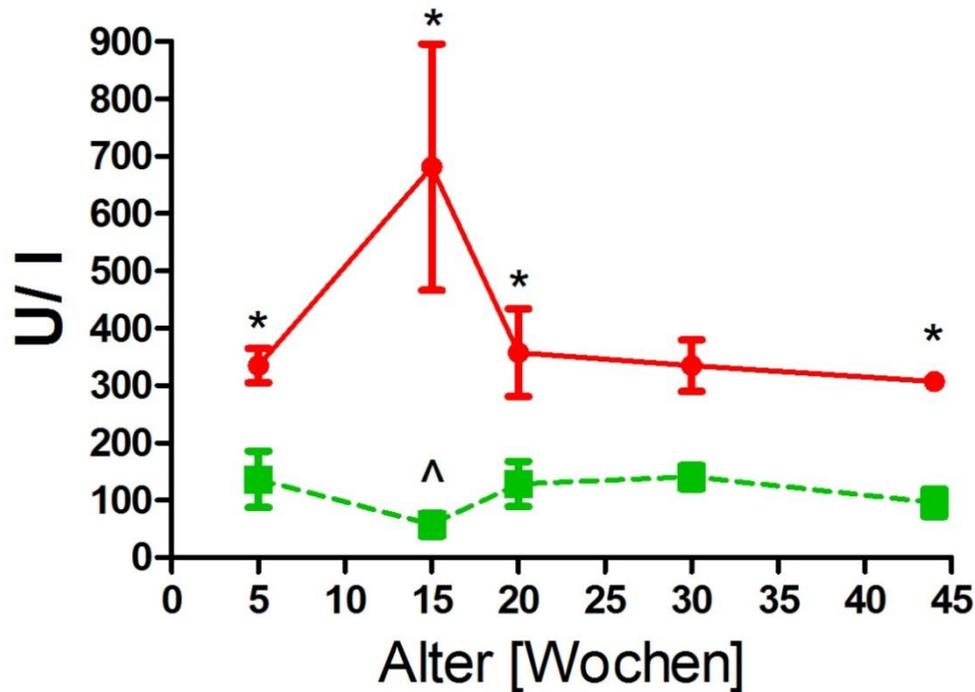


Abb. 3-8 Enzymaktivität ALAT im Vergleich

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert ± SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

[^] = $p < 0,05$: Wildtyp Mäuse Woche 15 im Vergleich zu Wildtyp Mäusen Woche 30

Die ALAT-Enzymaktivitäts-Kurve der Wildtyp-Mäuse (siehe Abb. 3-8) zeigt insgesamt keine starken Veränderungen mit Mittelwerten von 136 U/l (Woche 5) bis 95 U/l (Woche 44)). Die ALAT-Enzymaktivitäts-Kurve der MDR2^{-/-} Mäuse (siehe Abb. 3-8) steigt anfangs von Woche 5 (335 U/l) auf Maximalwerte in Woche 15 (681 U/l) an und reduziert sich anschließend stetig auf Mittelwerte bis 307 U/l in Lebenswoche 44.

3.3 Veränderte Knochenarchitektur von MDR2^{-/-} Mäusen

3.3.1 Kortikalisarchitektur

Mit Hilfe des μ CT wurden in der Kortikalis der distalen Metaphyse aller Femura mit einer Auflösung von 10 μ m folgende Parameter bestimmt: Das TV, das BV, der BV/TV und die kortikale Knochenmineralisationsdichte (cBMD).

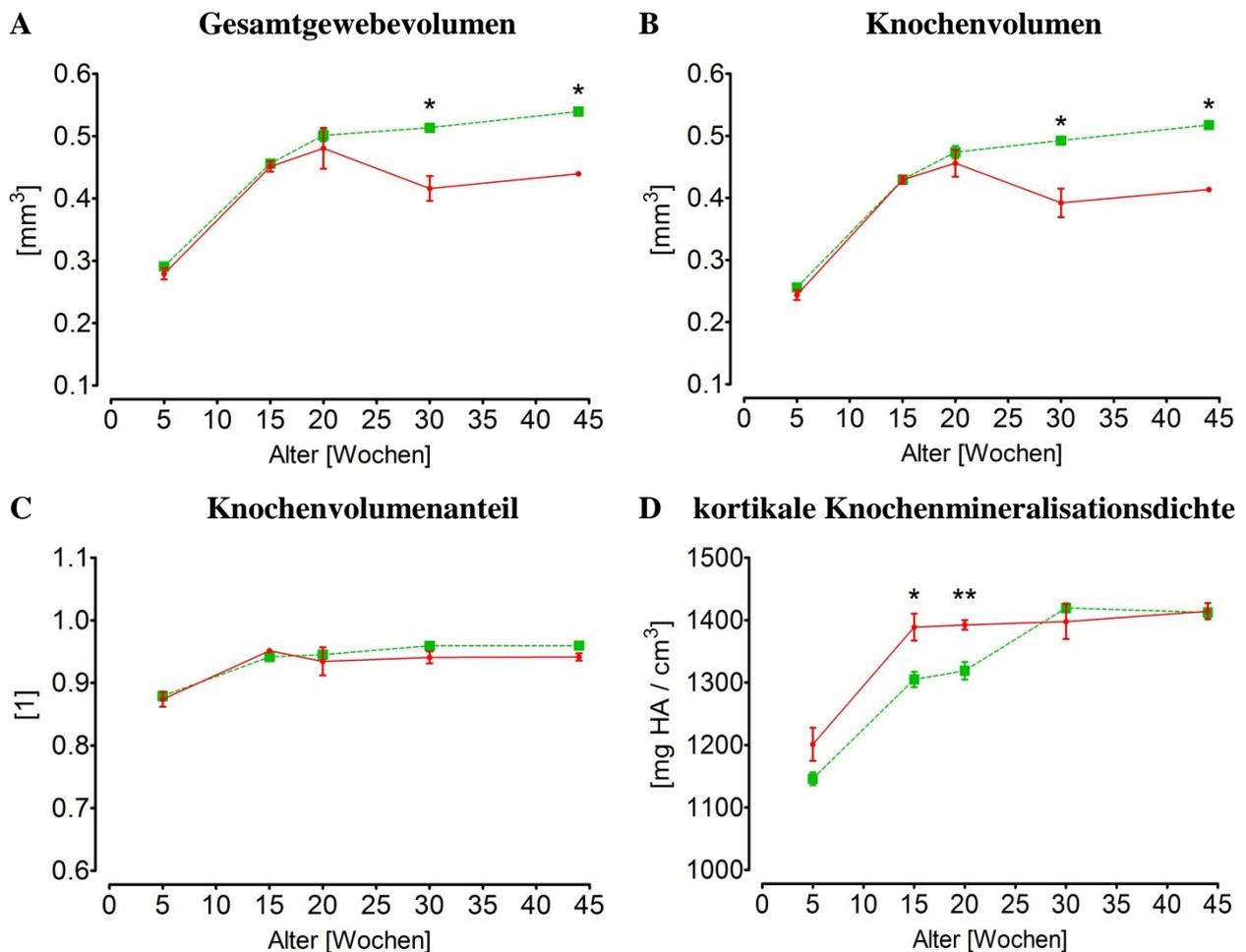


Abb. 3-9 Knochenstrukturparameter der Kortikalis

A: TV; B: BV; C: BV/TV; D: cBMD

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

Gegen das Lebensalter aufgetragen zeigt sich bei den Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 3-9 A), dass das TV der Kortikalis im gesamten Zeitverlauf ansteigt, wobei vor allem von der 5. Lebenswoche (0,29 mm³) bis zur 20. Lebenswoche (0,5 mm³) eine schnelle und anschließend

bis zur 44. Lebenswoche ($0,54 \text{ mm}^3$) eine mäßige Zunahme des TV zu sehen ist. Bei den $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäusen zeigt sich von der 5. Lebenswoche ($0,28 \text{ mm}^3$) bis zur 20. Lebenswoche ($0,48 \text{ mm}^3$) dieselbe schnelle TV-Zunahme. Allerdings reduziert sich das TV im weiteren Zeitverlauf (Woche 30: $0,42 \text{ mm}^3$; Woche 44: $0,44 \text{ mm}^3$), wobei sich signifikant geringere Werte als bei den Wildtyp-Mäusen ergeben.

Vergleichbar mit der TV-Entwicklung zeigt sich der BV-Verlauf (siehe Abb. 3-9 B). Gegen das Lebensalter der Wildtyp-Mäuse aufgetragen, ergibt sich von Woche 5 ($0,26 \text{ mm}^3$) bis Woche 20 ($0,47 \text{ mm}^3$) eine schnelle BV-Zunahme und ein mäßiger BV-Anstieg bis zu maximalen Mittelwerten in der 44. Lebenswoche ($0,52 \text{ mm}^3$). Eine bis zur Woche 20 vergleichbare BV-Zunahme zeigt sich bei den $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäusen mit einem Mittelwertanstieg des BV von $0,24 \text{ mm}^3$ (Woche 5) auf $0,46 \text{ mm}^3$ (Woche 20), wobei die $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäuse im weiteren Zeitverlauf abfallende BV-Werte aufweisen, die signifikant geringer als die der Wildtyp-Mäuse sind (Woche 30: $0,39 \text{ mm}^3$; Woche 44: $0,41 \text{ mm}^3$).

Wird der Knochenvolumenanteil der Kortikalis im Zeitverlauf betrachtet (siehe Abb. 3-9 C), ergibt sich bei Wildtyp-Mäusen und $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäusen eine leichte Zunahme des BV/TV von 87 % auf 95 % bis zur 15. Lebenswoche, der sich bis zur 44. Lebenswoche in beiden Mausgruppen ohne signifikante Unterschiede bei 94 % ($\text{MDR2}^{-/-}$) bzw. 96 % (Wildtyp) einpendelt.

Die cBMD der Wildtyp-Mäuse nimmt im Zeitverlauf (siehe Abb. 3-9 D) von Lebenswoche 5 (1146 mg HA/cm^3) bis Lebenswoche 30 (1419 mg HA/cm^3) zu. Im Gegensatz dazu nimmt die cBMD der $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäuse nur bis zur 15. Lebenswoche (1388 mg HA/cm^3) zu und pendelt sich anschließend bis zur 44. Lebenswoche bei Mittelwerten bis 1414 mg HA/cm^3 ein. Dabei weisen die $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäuse von der 5. bis zur 20. Lebenswoche eine in den Wochen 15 und 20 signifikant höhere cBMD als die Wildtyp-Mäuse auf.

Insgesamt lassen sich die μCT -Analysen der Kortikalis wie folgt zusammenfassen:

$\text{MDR2}^{-/-}$ Mäuse weisen ab Lebenswoche 30 sowohl ein signifikant geringeres TV als auch ein signifikant geringeres BV als die Wildtyp-Population auf, wobei sich keine signifikanten Unterschiede beim BV/TV zeigen. $\text{MDR2}^{-/-}$ Mäuse erreichen früher hohe cBMD, signifikant höher als die der Wildtyp-Mäuse, allerdings kommt es auch verfrüht, ab Lebenswoche 15/20, zu keiner weiteren Zunahme der cBMD.

3.3.2 Spongiosaarchitektur

Durch μ CT-Untersuchungen wurden in der Spongiosa der distalen Metaphyse aller Femura mit einer Auflösung von 10 μ m folgende Parameter bestimmt: das TV, das BV, der BV/TV, die BMD, die Tb.N, die Tb.Th, die Tb.Sp, die Conn.D und der SMI.

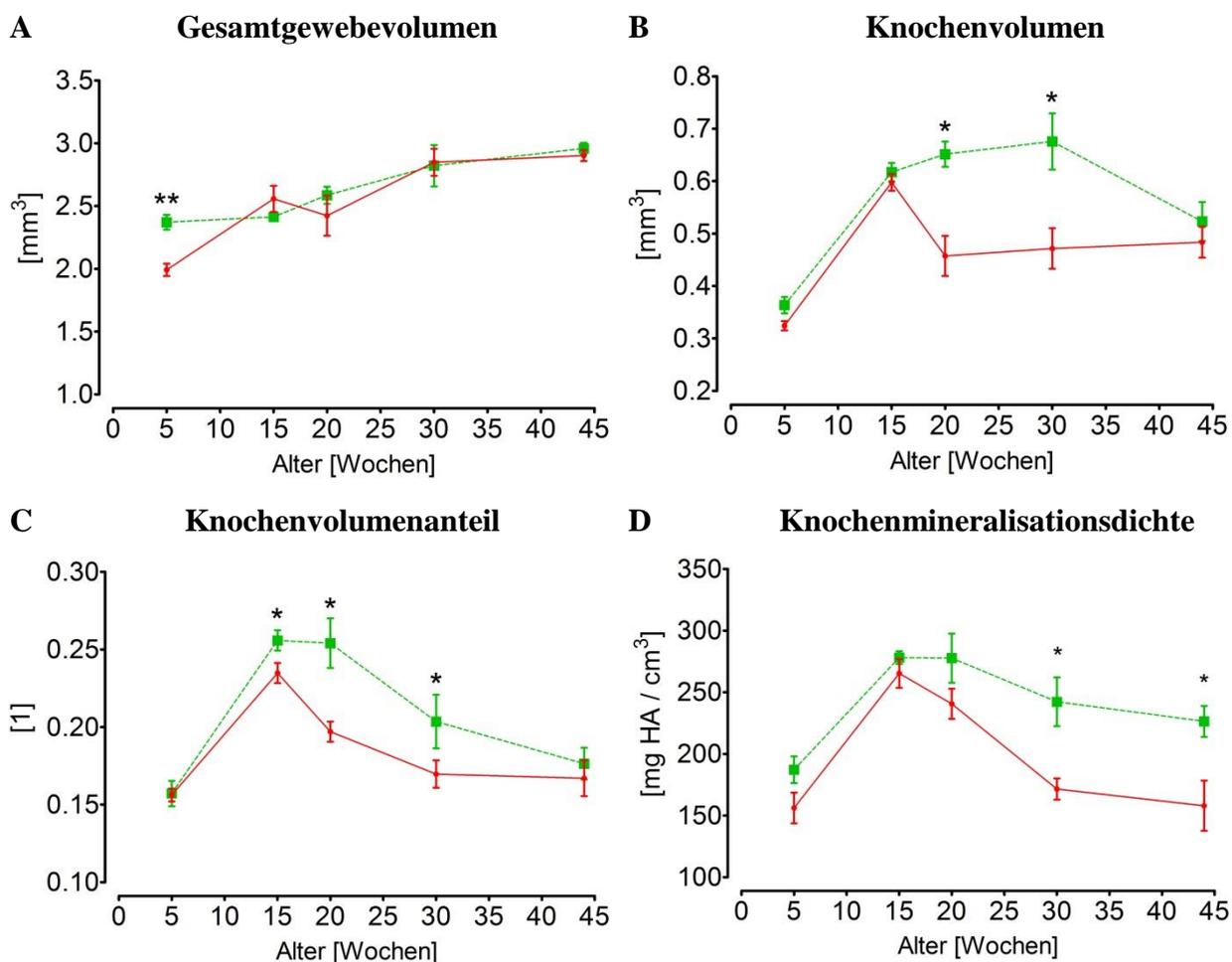


Abb. 3-10 Knochenstrukturparameter der Spongiosa (1)

A: TV; B: BV; C: BV/TV; D: BMD

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

Gegen das Lebensalter aufgetragen zeigt sich bei beiden Mauspopulationen eine leichte Zunahme des TV im beobachteten Zeitraum mit Mittelwerten von 2,37 mm³ - 2,96 mm³ (Wildtyp) bzw. 1,99 mm³ - 2,9 mm³ (MDR2^{-/-}), wobei die MDR2^{-/-} Mäuse in der 5. Lebenswoche ein signifikant geringeres TV als die Kontrolltiere aufweisen (siehe Abb. 3-10 A). Das BV nimmt bei beiden Mauspopulationen bis zur 15. Lebenswoche schnell von Mittelwerten

von $0,36 \text{ mm}^3$ auf $0,62 \text{ mm}^3$ (Wildtyp) bzw. $0,32 \text{ mm}^3$ auf $0,60 \text{ mm}^3$ (MDR2^{-/-}) zu (siehe Abb. 3-10 B). Im weiteren Zeitverlauf steigt das BV der Wildtyp-Mäuse bis zur 30. Lebenswoche ($0,68 \text{ mm}^3$) weiter, um anschließend abzufallen, während sich bei den MDR2^{-/-}-Mäusen eine verfrühte Abnahme des BV ab der 15. Lebenswoche mit signifikant geringeren BV-Werten in den Lebenswochen 20 und 30 ($0,46 \text{ mm}^3$; $0,47 \text{ mm}^3$) einstellt. Gegen das Lebensalter aufgetragen zeigt sich, dass der BV/TV der Wildtyp-Mäuse und MDR2^{-/-}-Mäuse (siehe Abb. 3-10 C) von demselben Ausgangswert (16 %) bis zur 15. Lebenswoche stark zunimmt und im weiteren Zeitverlauf langsam abnimmt, wobei der BV/TV der MDR2^{-/-}-Mäuse ein signifikant geringeres Maximum (23 %) in der 15. Lebenswoche erreicht und anschließend durch eine verfrüht ausgeprägte Abnahme des BV/TV der MDR2^{-/-}-Mäuse signifikant geringere BV/TV-Werte in den Lebenswochen 20 und 30 (20 %; 17 %) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen aufweist (25 %, 20 %). Bei beiden Mauspopulationen nimmt die BMD bis zur 15. Lebenswoche schnell auf Mittelwerte von 278 mg HA/cm^3 (Wildtyp) bzw. 265 mg HA/cm^3 (MDR2^{-/-}) zu (siehe Abb. 3-10 D). Im weiteren Zeitverlauf nimmt die BMD der Wildtyp-Mäuse ab der 20. Lebenswoche langsam auf Mittelwerte bis 242 mg HA/cm^3 und 226 mg HA/cm^3 (Woche 30 und 44) ab, während die BMD der MDR2^{-/-}-Mäuse bereits ab der 15. Lebenswoche verfrüht und stärker auf in den Lebenswochen 30 und 44 signifikant geringere BMD-Werte von 172 mg HA/cm^3 und 157 mg HA/cm^3 (Woche 30 und 44) abfällt.

Die Analyse der Trabekelarchitektur ergibt bei den Wildtyp-Mäusen und MDR2^{-/-}-Mäusen einen Anstieg der Tb.N bis zur 15. Lebenswoche, wobei das erreichte Maximum der MDR2^{-/-}-Mäuse ($4,56 \text{ mm}^{-1}$) signifikant geringer als das der Wildtyp-Mäuse ($5,01 \text{ mm}^{-1}$) ist (siehe Abb. 3-11 A). Anschließend zeigt sich bei beiden Mauspopulationen ein Rückgang der Tb.N bis zur 44. Lebenswoche, der bei den MDR2^{-/-}-Mäusen ausgeprägter ist, wodurch diese in den Lebenswochen 20 und 44 ($3,97 \text{ mm}^{-1}$; $2,42 \text{ mm}^{-1}$) eine signifikant geringere Tb.N aufweisen als die Kontrolltiere ($4,91 \text{ mm}^{-1}$; $3,58 \text{ mm}^{-1}$).

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauspopulationen bezüglich der Tb.Th, die bis zur 15. Lebenswoche leicht zunimmt und im weiteren Zeitverlauf nur mäßig abnimmt (siehe Abb. 3-11 B). Die Tb.Sp reduziert sich bei den Wildtyp-Mäusen und MDR2^{-/-}-Mäusen bis zur 15. Lebenswoche, wobei das erreichte Minimum der MDR2^{-/-}-Mäuse ($0,22 \text{ mm}$) signifikant höher als das der Wildtyp-Mäuse ($0,2 \text{ mm}$) ist (siehe Abb. 3-11 C). Die daraufhin bis zur 44. Lebenswoche folgende Zunahme der Tb.Sp ist bei den MDR2^{-/-}-Mäusen

ausgeprägter, wodurch diese von Lebenswoche 15-44 signifikant höhere Mittelwerte der Tb.Sp aufweisen.

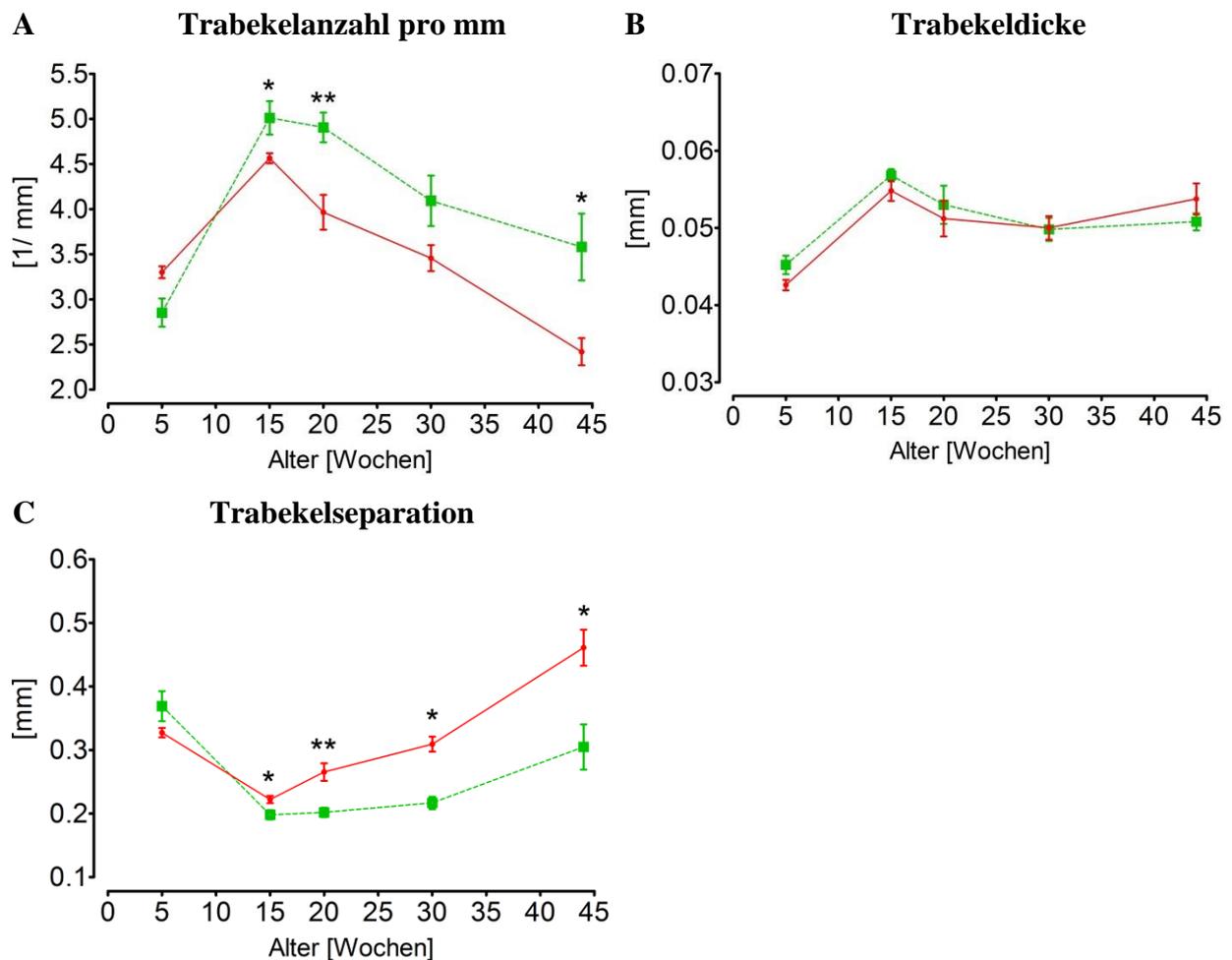


Abb. 3-11 quantitative Knochenstrukturparameter der Spongiosa (2)

A: Tb.N; B: Tb.Th; C: Tb.Sp

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

Es zeigt sich, dass die Conn.D der Wildtyp-Mäuse von der 5. bis zur 44. Lebenswoche stetig leicht abnimmt (426 1/mm^3 - 269 1/mm^3), während die Conn.D der MDR2^{-/-} Mäuse von der 5. bis zur 20. Lebenswoche stark abnimmt (463 1/mm^3 - 187 1/mm^3) und anschließend bis zur 44. Lebenswoche (236 1/mm^3) leicht zunimmt (siehe Abb. 3-12 A). Dadurch ergeben sich signifikant geringere Werte der Conn.D der MDR2^{-/-} Mäuse in den Lebenswochen 15-30. Die Analyse des SMI als Indikator der Trabekelstruktur zeigt bei beiden Mauspopulationen von der 5. bis zur 20. Lebenswoche einen Umbau der Trabekelarchitektur mit Tendenz in Richtung ideale Plattenstruktur (siehe Abb. 3-12 B), die in gesundem Knochen gefunden

wird. Im weiteren Zeitverlauf ergibt sich keine starke Veränderung der Tendenz bei den Wildtyp-Mäusen im Gegensatz zu den $MDR2^{-/-}$ Mäusen, deren Tendenz der Trabekelarchitektur sich in Richtung Stäbchenstruktur verlagert, wodurch sich signifikante Unterschiede des SMI zwischen den Mauspopulationen in den Lebenswochen 30 und 44 ergeben.

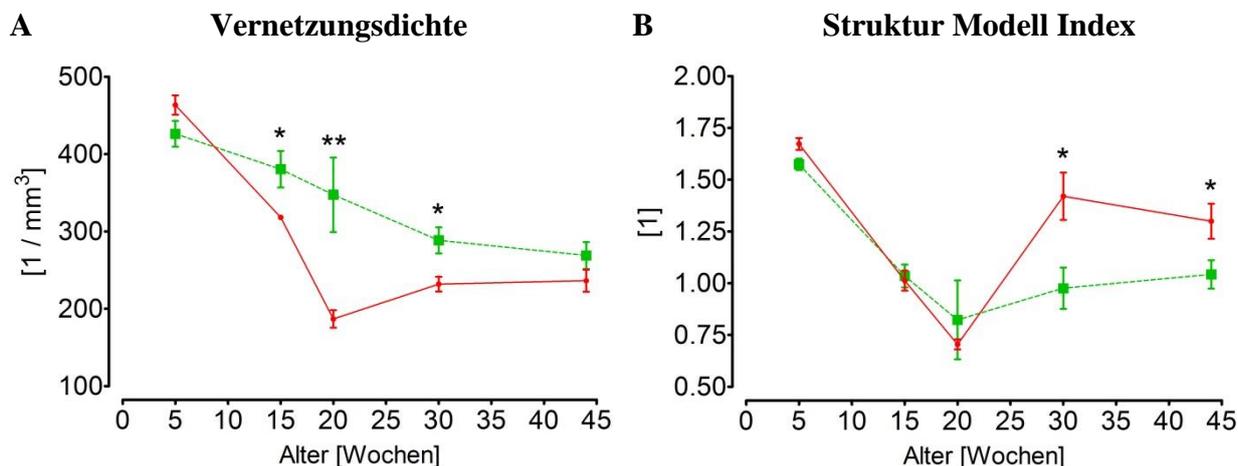


Abb. 3-12 Knochenstrukturparameter der Spongiosa (3)

A: Conn.D; B: SMI

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: $MDR2^{-/-}$ Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

Insgesamt lassen sich die μ CT-Analysen der Spongiosa wie folgt zusammenfassen:

$MDR2^{-/-}$ Mäuse weisen im beobachteten Zeitraum kaum Abweichungen zu den Wildtyp-Mäusen bezüglich des TV auf, während die Abnahme des BV und BV/TV ab der 15. Lebenswoche im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verfrüht ausgeprägter und mit teilweise signifikanten Unterschieden eintritt. Die BMD sinkt bei den $MDR2^{-/-}$ Mäusen verfrüht und in größerem Ausmaß mit signifikanten Unterschieden in den Wochen 30 und 44. $MDR2^{-/-}$ Mäuse zeigen keine Abweichungen der Tb.Th, jedoch eine erniedrigte Tb.N, signifikant in den Wochen 15, 20 und 44 sowie eine ab Woche 15 signifikant erhöhte Tb.Sp. Die Conn.D nimmt bei den $MDR2^{-/-}$ Mäusen früher in signifikant größerem Ausmaß in den Wochen 15, 20 und 30 ab, um in Woche 44 wieder das Niveau der Wildtyp-Mäuse zu erreichen. Der SMI der $MDR2^{-/-}$ Mäuse weist ab Lebenswoche 30 signifikante Unterschiede auf.

3.4 Chronisch erhöhte TGF- β Serumspiegel in MDR2^{-/-} Mäusen

Zur Bewertung des TGF- β Serumspiegels wurde das Serum jeder einzelnen Maus zweifach analysiert. Der aus diesen Werten gebildete Mittelwert wurde für die Ergebnisbeurteilung verwendet.

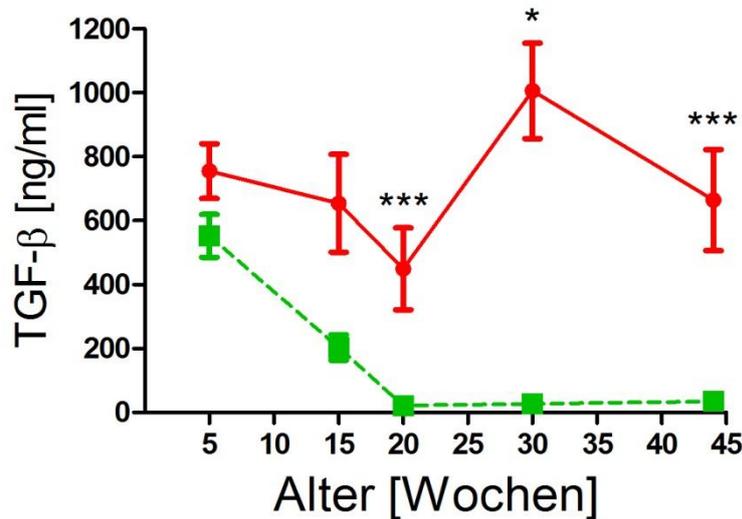


Abb. 3-13 TGF- β Serumlevel im Vergleich

Grün ■: Wildtyp-Mäuse; Rot ●: MDR2^{-/-} Mäuse, Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

Wird der TGF- β Serumspiegel gegen das Lebensalter der Mäuse aufgetragen, ist ein absteigender Verlauf der TGF- β Konzentration im Serum der Wildtyp-Mäuse zu erkennen. Initial hohe Werte in Lebenswoche 5, deren Mittelwert im Bereich von 552 ng/ml liegt, reduzieren sich signifikant bis Lebenswoche 20 auf Mittelwerte von 21 ng/ml. Ab diesem Zeitpunkt bis zur Woche 44 pendeln sich die TGF- β Konzentrationen um Werte zwischen 21-35 ng/ml ein (siehe Abb. 3-13). Im Vergleich dazu zeigt der TGF- β Serumspiegel in MDR2^{-/-} Mäusen einen abweichenden Verlauf. Von der 5. bis zur 20. Lebenswoche zeigt sich ein absteigender Verlauf bei insgesamt erhöhter Serumkonzentration gegenüber den Wildtyp-Mäusen mit Mittelwerten von 755 ng/ml (Woche 5) bis 449 ng/ml (Woche 20). In der 30. Lebenswoche steigt die TGF- β Serumkonzentration stark auf Mittelwerte von 1006 ng/ml an und reduziert sich bis zur 44. Lebenswoche auf Mittelwerte von 664 ng/ml, einer höheren TGF- β Konzentration als die Ausgangskonzentration im Serum der Wildtyp-Mäuse. Dabei erreichen die TGF- β Serumkonzentrationen in MDR2^{-/-} Mäusen von Lebenswoche 20 bis 44 maximal das 48-fache der Konzentrationen der Wildtyp-Mäuse und sind signifikant höher als im Kontrollmausserum (siehe Abb. 3-13).

3.5 Reduzierte Expression von Knochenmarkern in älteren MDR2^{-/-} Mäusen

Aus Knochen und Leber beider Maus-Populationen wurde RNA isoliert und cDNA durch die Anwendung von reverser Transkriptase gewonnen. Diese wurde analysiert und die Ergebnisse densitometrisch ausgewertet.

Mittels der Primer für das murine MDR2 Gen wurde die Zugehörigkeit der einzelnen Tiere zur MDR2^{-/-} Gruppe überprüft, um mögliche Falschzuordnungen aufzudecken. Dabei bestätigten sich die Angaben des Zulieferers bezüglich der genetischen MDR2 Deletion (siehe Abb. 3-14).

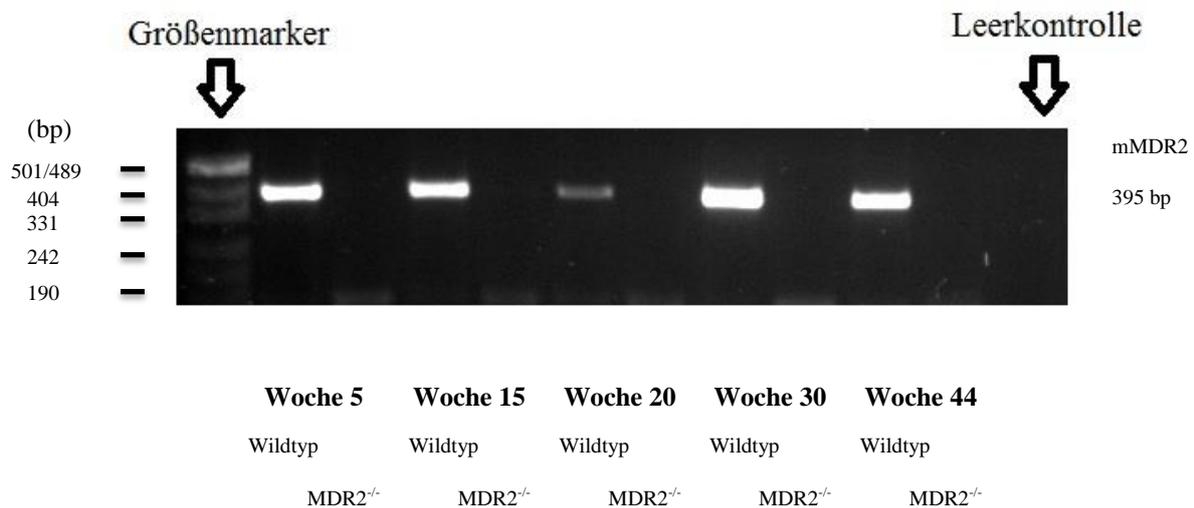


Abb. 3-14 mMDR2-Expression

3.5.1 OPN-Expression des Lebergewebes

In der densitometrischen Auswertung ergeben sich keine unterschiedlichen OPN-Expressionslevel des Lebergewebes bei $MDR2^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 3-15).

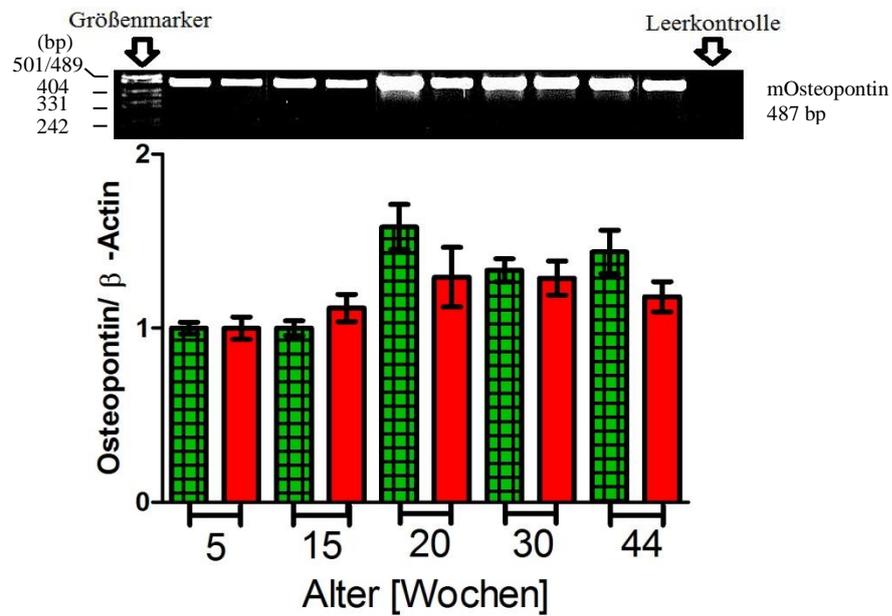


Abb. 3-15 Osteopontin-Expression Leber

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: $MDR2^{-/-}$ Mäuse; Mittelwert ± SEM (n=3-4)

3.5.2 Osteocalcin-Expression des Lebergewebes

Die densitometrische Auswertung gibt keinen Hinweis auf veränderte Osteocalcin-Expression der Leber bei $MDR2^{-/-}$ Mäusen in den Lebenswochen 5, 15 und 30 im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 3-16). In der Lebenswoche 20 ergibt sich gegenüber den Wildtyp-Mäusen (0,2) eine signifikant erhöhte Osteocalcin-Expression der Leber bei $MDR2^{-/-}$ Mäusen mit Mittelwerten von 1,5. Bei den ältesten beobachteten Tieren in Lebenswoche 44 lässt sich eine signifikante Abnahme der Osteocalcin-Expression der $MDR2^{-/-}$ Mäuse mit Mittelwerten von 0,3 im Vergleich zu denjenigen der Wildtyp-Mäuse von 0,6 nachweisen.

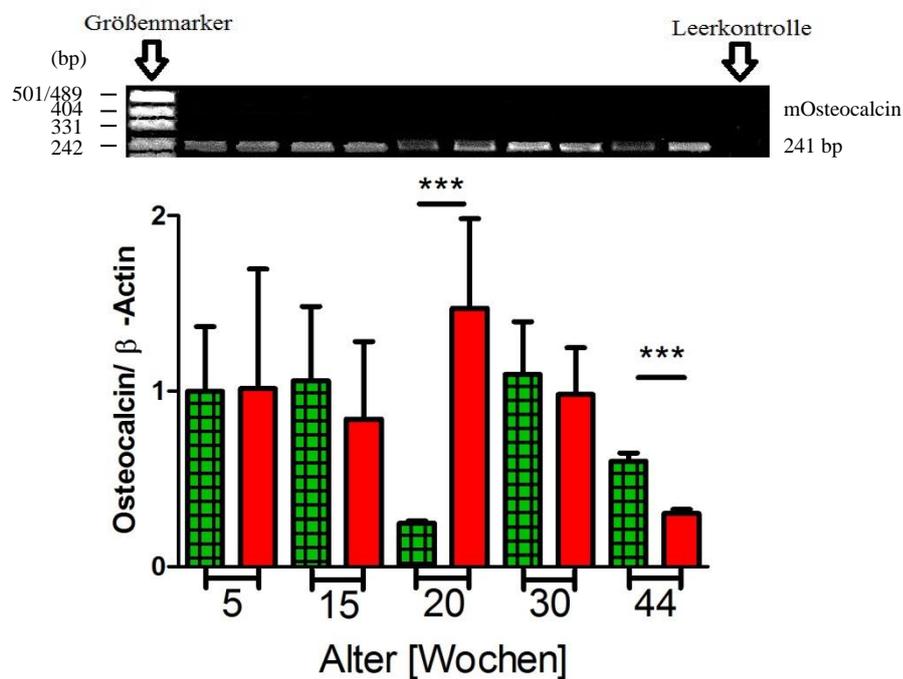


Abb. 3-16 Osteocalcin-Expression Leber

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: $MDR2^{-/-}$ Mäuse; Mittelwerte \pm SEM (n=3-4)

*** = $p < 0,001$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

3.5.3 OPG-Expression des Lebergewebes

Die densitometrische Auswertung ergibt eine tendenziell erhöhte OPG-Expression der Leber von Lebenswoche 5 bis 20 bei den $MDR2^{-/-}$ Mäusen, wobei die Expression in diesem Zeitraum bei beiden Mauspopulationen zunimmt. Dabei ist die Expression in den Wochen 15 (1,4) und 20 (1,9) signifikant gegenüber derjenigen der Wildtyp-Mäuse (Woche 15: 1,0; Woche 20: 1,3) erhöht. Ab Lebenswoche 20 ($MDR2^{-/-}$ Mäuse) bzw. Lebenswoche 30 (Wildtyp-Mäuse) kommt es zu einer Abnahme der OPG-Expression, die in Lebenswoche 44 bei den $MDR2^{-/-}$ Mäusen (0,6) signifikant gegenüber derjenigen der Wildtyp-Mäuse (1,0) reduziert ist (siehe Abb. 3-17).

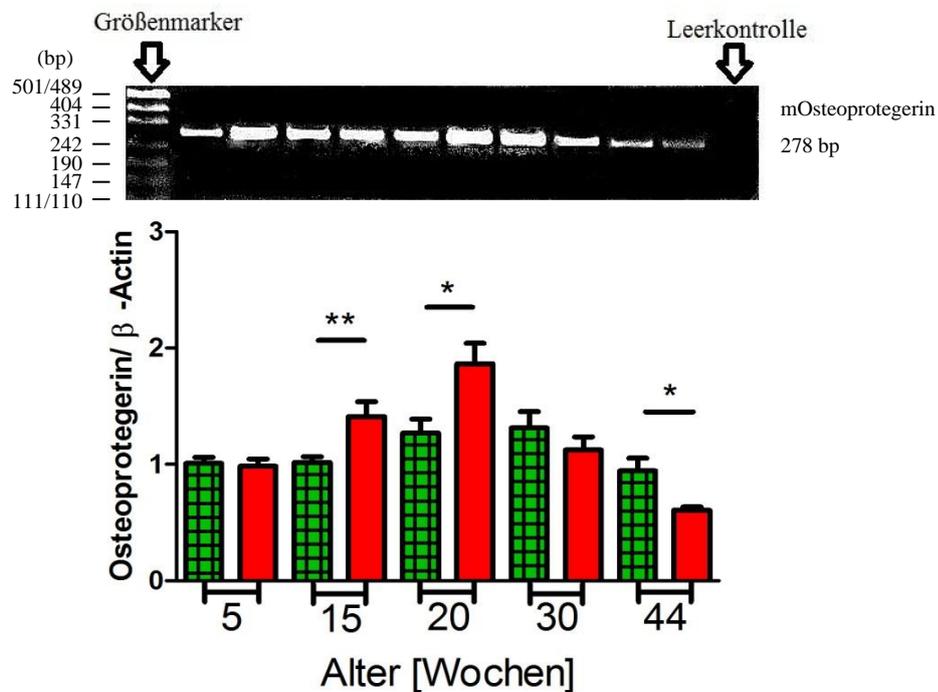


Abb. 3-17 Osteoprotegerin-Expression Leber

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: $MDR2^{-/-}$ Mäuse; Mittelwerte \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

3.5.4 OPN-Expression des Knochengewebes

Die Analyse der Knochen-cDNA ergibt keine signifikanten Unterschiede der OPN-Expression beider Mauspopulationen in den Lebenswochen 5 und 15 (siehe Abb. 3-18). Allerdings zeigt sich ab der 20. Lebenswoche eine signifikant reduzierte OPN-Expression der $MDR2^{-/-}$ Mäuse mit Mittelwerten von 1,0 (Woche 20 und 30) und 0,4 (Woche 44) im Vergleich zu den Mittelwerten der Wildtyp-Mäuse von 2,0 (Woche 20), 2,7 (Woche 30) und 1,8 (Woche 44).

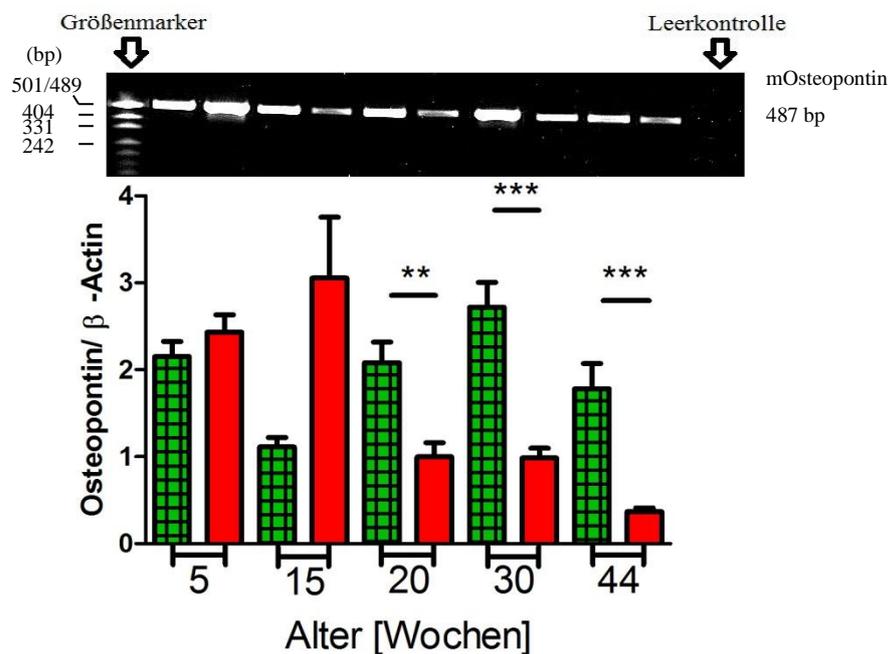


Abb. 3-18 Osteopontin-Expression Knochen

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: $MDR2^{-/-}$ Mäuse; Mittelwert \pm SEM (n=3-4)

** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$: $MDR2^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

3.5.5 Osteocalcin-Expression des Knochengewebes

Die Analyse der Knochen-cDNA bezüglich der Osteocalcin-Expression zeigt, dass diese bei den MDR2^{-/-} Mäusen, außer in der 15. Lebenswoche, im gesamten Zeitverlauf tendenziell, in den Wochen 5 (0,17) und 30 (0,07) signifikant, reduziert gegenüber derjenigen der Wildtyp-Mäuse (Woche 5: 0,88; Woche 30: 0,33) ist (siehe Abb. 3-19).

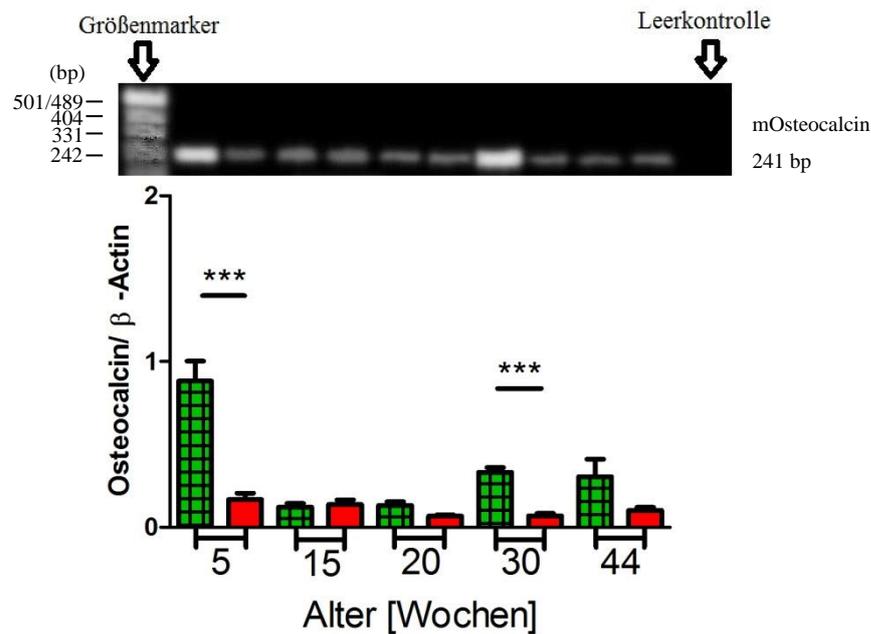


Abb. 3-19 Osteocalcin-Expression Knochen

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: MDR2^{-/-} Mäuse; Mittelwerte ± SEM (n=3-4)

*** = $p < 0,001$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen derselben Lebenswoche

3.6 Genexpression des Lebergewebes von Vitamin D-Stoffwechsel-regulierender Enzyme und Proteine

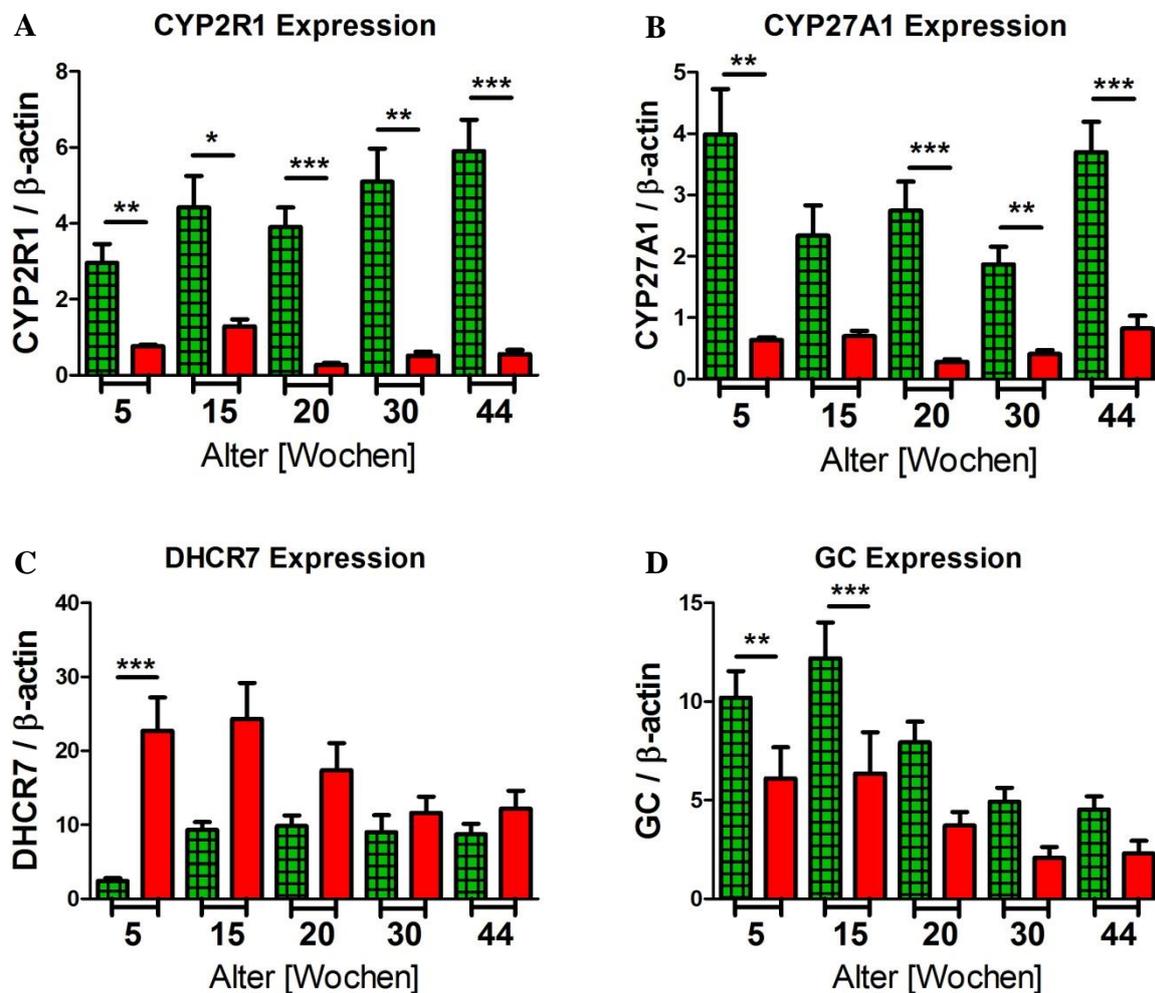


Abb. 3-20 Genexpression des Lebergewebes von Regulatoren des Vitamin D-Stoffwechsels

A: CYP 2R1 Expression; B: CYP 27A1 Expression; C: DHCR7 Expression; D: GC Expression

Grün #: Wildtyp-Mäuse; Rot □: MDR2^{-/-} Mäuse; Mittelwerte \pm SEM (n=3-4)

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$: MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen derselben Lebenswoche

Die Analyse der Leber cDNA zeigt im gesamten Zeitverlauf eine signifikant reduzierte CYP 2R1-Expression der MDR2^{-/-} Mäuse (siehe Abb. 3-20 A) mit Mittelwerten von 0,27 (Woche 20) und 0,55 (Woche 44) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mit 3,9 (Woche 20) und 5,9 (Woche 44). Es ergibt sich, außer in Lebenswoche 15, eine im gesamten Zeitverlauf signifikant reduzierte CYP 27A1-Expression der MDR2^{-/-} Mäuse mit Mittelwerten von 0,28

und 0,82 (Wochen 20 und 44) gegenüber den Wildtyp-Mäusen mit 2,7 und 3,7 (Wochen 20 und 44). Dabei ändert sich die Expression der MDR2^{-/-} Mäuse zu keinem Zeitpunkt signifikant (siehe Abb. 3-20 B). Die Expression des DHCR7 in MDR2^{-/-} Mäusen ist tendenziell im gesamten Zeitverlauf und signifikant in Woche 5 (26,9) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (2,4) erhöht, wobei sich keine signifikanten Expressionsänderungen der MDR2^{-/-} Mäuse von Woche 5 bis 44 zeigen (siehe Abb. 3-20 C). Die GC-Expression der MDR2^{-/-} Mäuse ist in den Wochen 5 (3,9) und 15 (2,3) signifikant und bis zur 44. Woche tendenziell gegenüber den Wildtyp-Mäusen reduziert (10,2 in Woche 5, 12,2 in Woche 15), wobei sich im gesamten Zeitverlauf keine signifikanten Expressionsveränderungen der MDR2^{-/-} Mäuse ergeben (siehe Abb. 3-20 D).

4 Diskussion

Chronische Lebererkrankungen und in deren Verlauf entstehende Leberzirrhosen treten ebenso wie die daraus resultierenden Komplikationen häufig auf und stellen ein Problem für die Gesundheit der Bevölkerung dar. Eine dieser Komplikationen ist die hepatische Osteodystrophie, durch die die Frakturhäufigkeit ansteigt, die Mortalitätsrate erhöht ist und die Lebensqualität auf Grund erhöhter Inzidenz von Knochenschmerzen beeinträchtigt wird [40:S. 84, 63:S. 82, 124:S.301]. In zahlreichen in vivo Studien wurden bei chronisch lebererkrankten Patienten bisher Knochenveränderungen und mögliche Regulatoren beobachtet und untersucht, wobei allerdings noch kein eindeutiger Regulationsmechanismus identifiziert werden konnte, der nach aktuell vorherrschender Meinung vermutlich multifaktorieller Genese ist [63:S. 82]. Schlussfolgerungen aus diesen Studien durch Vergleiche zu ziehen gestaltet sich oftmals schwierig, da das Patientengut Lebererkrankungen verschiedenster Ätiologie, Krankheitsdauer und Stadien aufweist, sich oftmals in Alter und Geschlecht unterscheidet, die Relevanz von Begleiterkrankungen nicht eindeutig einzuordnen ist und diese per se oft nicht fassbar sind. Knochenveränderungen werden in den Studien überwiegend mit DEXA untersucht. Der Vorteil dieser diagnostischen Methode ist die, im Vergleich zu anderen Methoden, schwächere Strahlenbelastung [83:S. 870]. Allerdings können mit dieser Untersuchung keine genaueren Aussagen über die dreidimensionale Knochenarchitektur getroffen oder differenzierte Betrachtungen von Spongiosa und Kortikalis angestellt werden.

Um nun die hepatische Osteodystrophie sowie mögliche Regulationsmechanismen systematisch analysieren zu können, wurde das dieser Arbeit zugrunde liegende Mausmodell herangezogen. Dazu wurde ein Tiermodell ausgesucht, das die Kriterien erfüllte, eine reproduzierbare Lebererkrankung zu entwickeln, deren Progression bereits gut beschrieben ist, die im Verlauf zu Fibrose und Zirrhose führen kann sowie außer der Lebererkrankung keine Ko-Morbiditäten aufweist. In Ermangelung eines Tiermodelles, das in der Forschung sowohl für cholestatische als auch nicht-cholestatische Leberkrankheiten eingesetzt werden kann, fiel die Wahl hierbei auf das MDR2^{-/-} Mausmodell, das ein gut charakterisiertes Modell für PSC und inflammatorisch gesteuerte Fibrose ist [53:S. 1238]. Die Tiere entwickeln Pericholangitis, periduktale Fibrose mit Gallengangsproliferation und letztendlich sklerosierende Cholangitis, auf Grund ihrer fehlenden Phospholipidsekretion [53:S. 1238, 131:S. 451, 135:S. 542]. Die dabei entstehenden histologischen Veränderungen gleichen der humanen PSC, was dieses Tiermodell zu einem nützlichen Knockout-Modell für diesen Typ

cholestatischer Lebererkrankungen macht [122:S. 62, 136:S. 99]. Damit stellt das MDR2^{-/-} kein Modell für chronische nicht-cholestatische Lebererkrankungen dar.

Um die Entwicklung hepatischer Osteodystrophie im Mausmodell genauer beschreiben zu können, wurden zunächst die Lebergewebeveränderungen der MDR2^{-/-} Mäuse mit Hilfe von histologischen Schnittpräparaten und Serumanalysen in einen zeitlichen und semiquantitativen Zusammenhang gebracht und mit den Leberergebnissen der Wildtyp-Kontrollmäuse verglichen. Es entwickelten sich keine histologisch sichtbaren Veränderungen des Lebergewebes bei den Kontrolltieren im beobachteten Zeitverlauf von der 5. - 44. Lebenswoche. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der MDR2^{-/-} Gruppe im gesamten Zeitverlauf eine Zunahme der schon bei den jüngsten Tieren histologisch sichtbaren Lebergewebeschädigung, wie es bereits bei MDR2^{-/-} Mäusen des genetischen Hintergrundes FVB/N (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) beschrieben wurde [54:S. 268, 53:S. 1245]. Der Progress der Leberschädigung schreitet bis zur 15. Lebenswoche signifikant in umfangreichem Ausmaß voran, um anschließend auf dem erreichten Schädigungslevel zu stagnieren. Diese Beobachtung stimmt mit lichtmikroskopisch erfassten Daten in der Literatur überein, die Lebergewebeveränderungen von MDR2^{-/-} Mäusen des genetischen Hintergrundes 129/OlaHsd (Harlan UK Limited, Bicester, UK) beschreiben, die ab der dritten Lebenswoche zunehmen und bis zur etwa 14.-15. Lebenswoche zu einem relativ stabilen Stadium voranschreiten [108:S. 1240]. Die Stagnation der Leberschädigung deutet auf einen Zustand hin, in dem der gesetzte Leberschaden so ausgeprägt ist, dass sich das Gewebe nicht regenerieren kann, aber die Reparationsmechanismen ein weiteres Voranschreiten der Schädigung verhindern. Das in diesem Stadium von ca. Lebenswoche 16-24 in der Literatur beschriebene Auftreten von Nekrosen bei MDR2^{-/-} Mäusen des genetischen Hintergrundes 129/OlaHsd (Harlan UK Limited, Bicester, UK) wird durch unsere Daten bestätigt [108:S. 1242]. Indes konnten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer anderen Studie [122:S. 63], in keinem unserer Schnittpräparate die von Mauad et al. bei 129/OlaHsd-MDR2^{-/-} Mäusen beschriebenen neoplastischen Läsionen gefunden werden [108:S. 1242]. Die von Fickert et. al. [53:S. 1245] bei MDR2^{-/-} Mäusen des genetischen Hintergrundes FVB/N (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) nachgewiesenen Lebergewebeveränderungen in diesem Zeitraum wie portoportale Septen oder Fibrosen vom biliären Typ stimmen mit unseren Analysen überein. Allerdings können unsere Ergebnisse die Aussage, dass die Lebermorphologie bereits ab der 8. Lebenswoche unverändert bleibt, weder bestätigen noch konterkarieren, da in der vorliegenden Studie keine Daten zwischen der 5. und 15. Lebenswoche erhoben wurden und es somit möglich wäre, dass bereits zu einem früheren

Zeitpunkt als der 15. Lebenswoche eine Stagnation der Leberschädigung eintritt. Trotz der, bei den ältesten analysierten Tieren beobachteten, nochmaligen signifikanten Zunahme der Leberschädigung, die mit einem rückläufigen Entzündungsinfiltrat einherging, konnten zu keinem Zeitpunkt alle Kriterien einer biliären Zirrhose gefunden werden. Dies bestätigt frühere Studien, die auch bei über einem Jahr alten MDR2^{-/-} Mäusen verschiedenen genetischem Hintergrundes keine biliäre Zirrhose feststellen konnten [108:S. 1240, 122:S. 64]. Es bleibt also offen, ob ältere Tiere als die in dieser und anderen Studien eingesetzten im späteren Verlauf eine biliäre Zirrhose, zu der es im Verlauf der humanen PSC gewöhnlich kommt, entwickeln würden [122:S. 64]. Insgesamt gesehen stellen die histologischen Präparate einen Zeitverlauf der Leberschädigung dar, bei dem der Großteil der Leber zum Zeitpunkt der 15. Lebenswoche geschädigt ist.

Da die Qualität einer lichtmikroskopischen Auswertung von der Erfahrung der bewertenden Person abhängt, wurden, um Fehler beim Erstellen des Zeitverlaufs des Leberschädigungsgrades zu vermeiden, ein unabhängiger, erfahrener Pathologe zur histologischen Evaluation herangezogen und zusätzlich Analysen des Serums bezüglich Leberschädigungsmarker durchgeführt. In den Lebenswochen 5 und 15 wurden die höchsten Serumspiegel der Leberschädigungsmarker LDH, AST und ALT bestimmt, die im gesamten beobachteten Zeitverlauf bei den MDR2^{-/-} Mäusen tendenziell erhöht gegenüber den Spiegeln der Wildtyp Balb/ c Mäuse waren. Dies bekräftigt die durch die histologischen Ergebnisse naheliegende Vermutung, dass der Hauptanteil des Lebergewebes bis zur 15. Lebenswoche geschädigt wird. Es ergaben sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Mauspopulationen, was sich durch die geringe Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe erklären lässt. Stellt man diese Daten den bereits erhobenen in der Literatur gegenüber, finden sich vergleichbare Serumspiegel bei jüngeren MDR2^{-/-} Mäusen und teilweise auch bei den älteren MDR2^{-/-} Tieren mit genetischem FVB/N Hintergrund, z.B. für ALT [54:S. 264, 53:S. 1247, 122:S. 50]. Allerdings muss hierbei abgewägt werden, wie aussagekräftig ein Vergleich zwischen unseren Daten und der Literatur ist, bei unterschiedlich gelagerten und mit anderen Methoden analysierten Serumproben sowie MDR2^{-/-} Tieren unterschiedlichen genetischem Hintergrundes. Summiert ergibt sich durch die Auswertung der histologischen und laborchemischen Ergebnisse, dass die Leberschädigung der MDR2^{-/-} Mäuse im gesamten beobachteten Zeitverlauf zunimmt, wobei ein Großteil der Gewebeschädigung bereits bis zur 15. Lebenswoche stattfindet.

Des Weiteren wurde in unserer Studie überprüft, ob sich die Leberschädigung auf das Expressionsverhalten des Lebergewebes auswirkt. Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied zwischen den MDR2^{-/-} Mäusen und den Wildtyp Balb/ c Mäusen bezüglich der OPN-Expression. Osteopontin spielt im Lebergewebe eine zentrale Rolle im Zellsignaling der Entzündungskontrolle, indem es unter anderem Migration und Zelladhäsion begünstigt und chemotaktisch auf Makrophagen wirkt [120:S. 4, S. 7]. Es wurde gezeigt, dass die OPN-Expression bei Leberschädigung verschiedenster Ursache und als Antwort auf Inflammation im Lebergewebe hochreguliert wird [120:S. 7, S. 10]. In einer Studie mit OPN-defizienten Mäusen (OPN^{-/-} Mäuse 11 Mal rückgekreuzt mit B6 Mäusen) konnte demonstriert werden, dass die Ausprägung von Leberentzündung signifikant geringer und das Überleben bei Leberschädigung häufiger ist, wenn OPN keinen Einfluss hat [41:S. 542f, 120:S. 6]. Dies führt zu der Frage, ob es eine Verbindung der nicht hochregulierten OPN-Expression unserer MDR2^{-/-} Mäuse mit den rückläufigen Entzündungsinfiltraten der älteren Tiere und der ausbleibenden Entwicklung einer biliären Zirrhose gibt. Eine Aussage darüber, ob die Expression von Osteocalcin im Lebergewebe, die lediglich eine kurzzeitige Hochregulierung in den MDR2^{-/-} Mäusen zeigte, in einem Zusammenhang mit der Leberschädigung steht, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht treffen. Die Expression von OPG im Lebergewebe war interessanterweise in den Lebenswochen 15 und 20 der MDR2^{-/-} Mäuse hochreguliert. Dies entspricht anderen Ergebnissen, die eine Überexpression von OPG durch aus hepatischen Sternzellen entstehenden Myofibroblasten bei Leberfibrose in Ratten demonstrieren konnten [17:S. 1]. Allerdings zeigten die ältesten unserer MDR2^{-/-} Tiere eine signifikante Abnahme der OPG-Expression, die mit keinem histologisch sichtbaren Rückgang der Fibrose, aber mit dem zeitgleichen Rückgang des Entzündungsinfiltrates einherging. Somit ist zu vermuten, dass die OPG-Expression nicht mit der Leberfibrose per se, sondern vielmehr mit dem Ausmaß der Leberentzündung assoziiert ist. Im geschädigten Lebergewebe der MDR2^{-/-} Mäuse war im gesamten Zeitverlauf die Genexpression der Vitamin D-Stoffwechsel regulierenden Enzyme und Proteine CYP2R1, CYP27A1 und GC vermindert und die DHCR7 Expression hochreguliert. Die durch CYP2R1 und CYP27A1 kodierten Enzyme katalysieren mitunter die Hydroxylierung von Vitamin D₃ zu 25(OH)D₃ [2:S. 4, 26:S. 38091, 65:S. 209]. Dadurch haben sie eine wichtige Funktion bei der Regulierung des 25(OH)D₃-Serumlevels und sind mit diesem assoziiert [22:S. 554, 26:S. 38084+38091, 139:S. 5]. Ebenso spielt das durch GC kodierte VDBP, das als Haupttransportprotein für 25(OH)D₃ gilt, eine Rolle bei der Regulierung des 25(OH)D₃-Serumlevels und ist mit diesem signifikant assoziiert [1:S. 771, 2:S. 4, 22:S. 554, 139:S. 7]. Auch die durch DHCR7 kodierte 7-

Dehydrocholesterol-Reduktase, die aus dem Vitamin D Vorläufer 7-Dehydrocholesterol Cholesterol synthetisiert, beeinflusst die 25(OH)D₃-Konzentration im Serum, wobei sie bei erhöhter Aktivität mit einem reduzierten 25(OH)D₃-Serumspiegel assoziiert ist [32:S. 1624, 139:S. 5f]. Somit könnte in diesem Mausmodell die verminderte Synthese, Hydroxylierung, Aktivierung und Transportierung von Vitamin D durch die reduzierte Expression von CYP2R1, CYP27A1 und GC bzw. die hochregulierte Expression von DHCR7, zu dem bereits in zahlreichen Studien bei Menschen mit chronischen Leberkrankheiten beobachteten, reduzierten 25(OH)D₃-Serumlevel [9:S. 2624, 12:S. 1, 57:S. 513, 62:S. 3516, 68:S. 990, 105:S. 922] und dessen Folgen führen.

Um zu untersuchen, ob die Versuchstiere im beobachteten Zeitverlauf Knochenveränderungen und somit eine hepatische Osteodystrophie entwickeln, wurden μ CT-Analysen der Femora durchgeführt, anhand derer eine qualitative und quantitative Einordnung in einen zeitlichen Ablauf möglich war. Das μ CT wurde dafür als Methode gewählt, da es das Potential hat, komplette Knochen kleiner Tiere auf einem nicht-invasiven Weg [98:S. 326] und mit einer Auflösung, die hoch genug ist, um die Architektur und den Grad der Mineralisierung auf trabekulärem Level adäquat zu bestimmen, untersucht [113:S. 776]. Auf die Darstellung und Auswertung der Tissue Mineral Density (TMD) wurde dabei leitliniengerecht auf Grund zu großer Voxel Size verzichtet [19:S. 1477]. Wie bereits mehrfach bei humanen hepatischen Osteodystrophien beschrieben, betrafen die Knochenveränderungen, die sich in den MDR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren ausbildeten, vor allem die Spongiosa [61:S. 696, 62:S. 3518]. Das liegt vermutlich an der geringeren turnover-Rate in kortikalem Knochen, wodurch sich kortikale Knochenveränderungen, wie z.B. auch in Tiermodellen, für Osteoporose nur langsam entwickeln [61:S. 696, 88:S. 195]. In unseren Ergebnissen weist die Kompakta der MDR2^{-/-} Mäuse bei unverändertem Knochenvolumenanteil ab der 20. Lebenswoche signifikant reduzierte Gesamtvolumina und Knochenvolumina zusammen mit einer im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht reduzierten cBMD auf. Den in der Literatur [147:S. 472f] beschriebenen altersabhängigen starken Anstieg der cBMD von Wildtyp Balb/c Mäusen bis zur 16. Woche und die anschließende Aufrechterhaltung können unsere Daten bestätigen. Die kortikale Knochenmineralisationsdichte gilt als ein guter Prädiktor für die mechanische Knochenfestigkeit, und ihre Reduktion korreliert negativ mit erhöhter Knochenporosität [18:S. 184, 117:S. 31]. Eine nicht reduzierte cBMD der MDR2^{-/-} Mäuse spricht zusammen mit dem unveränderten Knochenvolumenanteil der Kortikalis für eine bis zur 44. Lebenswoche weitgehend erhaltene kortikale Knochenfestigkeit, der bis zu 60 % der

gesamten Knochenfestigkeit zugeschrieben wird [145:S. 459]. Dieser Beitrag der Kompakta zur Knochenfestigkeit gewinnt umso mehr an Bedeutung in Situationen, in denen die Spongiosa pathophysiologische Veränderungen aufweist, und könnte in unserem Modell das Ausbleiben von Frakturen, die beispielsweise bei humanen Hüftfrakturen in der Kortikalis beginnen, im beobachteten Zeitverlauf erklären [4:S. 764, 52:S. 399, 82:S. 468]. Vergleicht man die von uns gemessenen Kortixergebnisse, in Ermangelung genauer Daten kortikaler Veränderungen in Tiermodellen zur hepatischen Osteodystrophie, mit Tiermodellen zu Osteopenie und Osteoporose, finden sich Übereinstimmungen mit den dort beschriebenen Kompaktaveränderungen wie der langsamen Geschwindigkeit des Kompaktaumbaus und einer lang konstant bleibenden Knochenfestigkeit [88:S. 195, S. 201].

Die Qualität eines Knochens hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. der Mikroarchitektur oder der Mineralisationsdichte, wobei bei trabekulärem Knochen oftmals eine pathophysiologisch veränderte Variable ausreicht, um mechanische Eigenschaften zu schwächen und die Knochenfestigkeit zu vermindern, wodurch es zu vermehrtem Auftreten von Frakturen kommen kann [25:S. 490, 123:S. 807f]. Die biomechanischen Eigenschaften der Knochen werden mitunter durch die Spongiosaarchitektur beeinflusst [47:S. 203]. Unsere Analysen der Spongiosa zeigten ab der 15. Lebenswoche größtenteils signifikant reduzierte Werte des trabekulären BV, BV/TV und BMD bei den MDR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, die selbst auch zeitgleich einen schwächer ausgeprägten Abfall des BV/TV und BMD entwickelten [147:S. 475]. Dieses Ergebnis entspricht den Daten, die bei chronisch-cholestatich lebererkrankten Menschen erhoben wurden (Abfall des trabekulären Knochenvolumens und dem BMD), und geht mit einer reduzierten Druckfestigkeit des Knochens einher [62:S. 3518, 71:S. 897, 109:S. 423]. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass die meisten BMD-Daten in Studien mit Menschen durch DEXA-Messungen erhoben wurden und somit keine differenzierte Betrachtung von trabekulären und kortikalen Veränderungen möglich ist. Wir konnten zeigen, dass die ab der 15. Lebenswoche beginnende Abnahme der Trabekelanzahl und Zunahme der Trabekelseparation bei den MDR2^{-/-} Mäusen signifikant verstärkt im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c Mäusen abläuft, während bei beiden Mauspopulationen die Trabekeldicke im beobachteten Zeitverlauf weitgehend unverändert war. Somit wird der Knochenmasseverlust nicht durch Verdünnung der vorhandenen Trabekel, sondern durch deren zahlenmäßige Reduktion verursacht [84:S. 163]. Des Weiteren entwickeln sich Unterschiede zwischen den MDR2^{-/-} Mäusen und den Wildtyp Balb/c Mäusen hinsichtlich der Trabekelvernetzung und der Platten-versus-Stäbchen-ähnlichen Charakteristik, die mit Hilfe der Vernetzungsdichte (Conn. D) und des Struktur

Modell Indexes (SMI) einschätzbar sind [19:S. 1476]. Studien über humane Knochen haben gezeigt, dass BMD-Messungen nicht ausreichen, um die Knochenstabilität einzuschätzen, und dass das Frakturrisiko mit den Strukturparametern Conn. D und SMI sehr gut ermittelbar ist [85:S. 1828, 110:S. 1009f]. Eine verminderte Conn. D und ein Übergang zu einer mehr stäbchen-ähnlichen Struktur, wie er bei humanen Knochen im Alter zu sehen ist, sprechen für eine Abnahme der Knochenstabilität [14:S. 1218, 69:S. 301, 79:S. 15]. Unsere Daten ergeben einen schnelleren Rückgang der Conn. D bei MDR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Balb/c Mäusen. Dies steht im Einklang mit der beobachteten gesteigerten Reduktion der Trabekelanzahl, die zu einer Abnahme der Gesamtkonnektivität führt, wie es bereits an humanem osteoporotischen Knochen beschrieben wurde [85:S. 1828]. Zusätzlich entwickelt sich die Trabekelarchitektur der älteren MDR2^{-/-} Mäuse tendenziell verstärkt in Richtung Stäbchenstruktur, wodurch vermutlich eine gesteigerte Knocheninstabilität herbeigeführt wird [14:S. 1218]. Summiert führt diese verstärkte Reduktion von BMD und Vernetzungsdichte bei mehr stäbchen-ähnlicher Struktur dazu, dass MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c Mäusen bereits in deutlich jüngerem Lebensalter das Ausmaß an Knochenveränderungen aufweisen, das, wenn überhaupt, nur in älteren Wildtyp Balb/c Tieren zu finden ist. Somit sind MDR2^{-/-} Mäuse früh einem erhöhten Risiko für Frakturen ausgesetzt, ähnlich dem von Menschen mit denselben trabekulären Veränderungen bei hepatischer Osteodystrophie [71:S. 898]. Zudem ist die Verringerung der Frakturresistenz, die bei Wildtyp Balb/c Mäusen ab der 28. (♂) bzw. 48. Lebenswoche (♀) abnimmt [147:S. 473ff], bei MDR2^{-/-} Mäusen auf Grund der schon fortgeschrittenen Knochenveränderungen früher zu erwarten.

Generell konnten wir zeigen, dass MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Balb/c Mäusen Knochenveränderungen entwickeln, die den humanen Knochenveränderungen ähneln, die bei hepatischer Osteodystrophie sowie Osteoporose auftreten und auch in Tiermodellen für Osteopenie und Osteoporose zu finden sind [88:S.195-201]. Des Weiteren legen unsere Daten einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Leberschädigung und den Knochenveränderungen der MDR2^{-/-} Mäuse nahe, da Abweichungen der Knochenergebnisse im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c Mäusen erstmals in der 15. Lebenswoche auftraten, zu einem Zeitpunkt, an dem der Großteil des Lebergewebes bereits geschädigt war.

Bei der Entwicklung und Regulation der hepatischen Osteodystrophie in diesem Mausmodell gehen wir von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Wie auch in anderen Studien dargestellt [9:S. 2624, 12:S. 1, 33:S. 689, 57:S. 513, 62:S. 3516, 105:S. 922], halten wir einen

Zusammenhang der Knochenveränderungen mit einem reduzierten 25(OH)D₃-Serumlevel, der bei reduzierter Expression von CYP2R1, CYP27A1 und GC bzw. hochregulierter Expression von DHCR7 erwartet werden kann, für möglich. Studien beschreiben bei 66 % - 96 % der Patienten mit chronischen Leberkrankheiten reduzierte 25(OH)D₃-Serumlevel [9:S. 2624, 12:S. 1, 33:S. 689, 57:S. 513, 62:S. 3516, 105:S. 922]. Es wurde dabei gezeigt, dass Vitamin D-Mangel unabhängig der Ätiologie zu reduzierter BMD und Knochenmasse führt [7:S. 675, 138:S. 628]. Darüber hinaus entwickeln Menschen, die im Verlauf chronischer Leberkrankheiten reduzierte 25(OH)D₃-Serumspiegel aufweisen, Knochenveränderungen wie reduzierte BMD, die vor allem die Spongiosa betreffen [61:S. 696, 62:S. 3518] und ähnlich den Knochenveränderungen in unserem Mausmodell sind. Somit vermuten wir, dass der 25(OH)D₃-Serumlevel in unserem Mausmodell regulatorischen Einfluss auf die Entstehung der hepatischen Osteodystrophie hat. Des Weiteren ziehen wir das Zytokin TGF- β als möglichen Regulator der hepatischen Osteodystrophie in Betracht. Es gilt als zentrales Zytokin der Leberfibrose und seine Expression ist im fibrotischen Stadium vieler chronischer Lebererkrankungen gesteigert [126:S. 91, 140:S. 1338, 144:S.238ff]. Bereits in den ersten acht Lebenswochen ist die Expression von TGF- β ₁ im Lebergewebe von MDR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu altersgematchten Wildtyp Kontrolltieren gesteigert [54:S. 269], wobei das mRNA-Level von TGF- β ₁ und TGF- β ₂ bis zu 11-fach erhöht ist [116:S. 1049]. Unsere Serumanalysen zeigen chronisch erhöhte Serumspiegel von aktivem TGF- β bei MDR2^{-/-} Mäusen im gesamten beobachteten Zeitraum, die maximal 48-fach in der 30. Lebenswoche gesteigert waren. Es ist anzunehmen, dass dieser hochgradige Anstieg des TGF- β -Levels als systemisch relevant einzustufen ist. Durch eine große Anzahl an Experimenten wird belegt, dass die Wirkung von TGF- β auf den Knochenstoffwechsel von Konzentration, Zeitpunkt und Zeitdauer der Aussetzung abhängig ist und stark variieren kann [50:S. 787, 93:S. 44985]. Dabei wurden mehrfach in vitro als auch in vivo dosisabhängige Knochenveränderungen beschrieben, die mit den in unserem Mausmodell beobachteten, wie die Abnahme der Knochendichte und der Trabekelanzahl, übereinstimmen [11:S. 18818, 49:S. 198f]. Des Weiteren zeigen in vivo Mausmodelle, dass die Hemmung des TGF- β Signalweges zu entgegengesetzten Effekten als denen in unseren Mäusen beobachteten führt, wie der Zunahme der Knochenmasse, des BMD und der Trabekelanzahl [45:S. 2419, 55:S. 4267, 112:S. 2]. Wird auf Zellebene betrachtet, durch welche Wirkungen von TGF- β auf die Knochenzellen die beschriebenen Knochenveränderungen hervorgerufen werden können, müssen die biphasischen Effekte von TGF- β auf den Knochenstoffwechsel beachtet werden. Initial begünstigt ein erhöhter TGF- β -Spiegel die Neubildung des Knochens durch

Stimulierung der Proliferation von Osteoprogenitorzellen und unreifen Osteoblasten in frühen und mittleren Differenzierungsstadien sowie der chemotaktischen Anlockung der osteoblastären Vorläufer zur Resorptionsstelle [73:S. 855, 94:S. 435, 115:S. 825]. Ist der TGF- β -Spiegel allerdings chronisch erhöht, kommt es zu einer Funktionsstörung der Osteoblasten, deren terminale Differenzierung zu reifen Zellen gehemmt wird, wodurch die Produktion von OPN und Osteocalcin, das physiologischer Weise als Marker für die Differenzierung reifer Osteoblasten, während der Mineralisierungsphase freigesetzt wird, nachlässt, und es zu einem Mineralisierungsdefekt der neuen Knochenmatrix kommt [3:S. 2254, 16:S. 350, 46:S. 2, 48:S. 300, 49:S. 204, S. 206, 73:S. 855, 94:S. 429, S. 435]. Zusätzlich begünstigt ein chronisch erhöhter TGF- β -Spiegel die Osteoklastogenese und hat stimulierende Effekte auf die Knochenresorption [60:S. 2451, 92:S. 4254, 103:S. 1628]. Die Untersuchung der mRNA-Expression des Knochengewebes der Versuchstiere in unserer Studie deuten bei tendenziell erniedrigter OPN-Expression und signifikant reduzierter Osteocalcin-Expression der älteren MDR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c Mäusen auf eine ausgebliebene terminale Differenzierung und eine Funktionsstörung der Osteoblasten hin. Somit stellt TGF- β fraglos einen möglichen Regulator der hepatischen Osteodystrophie in MDR2^{-/-} Mäusen dar.

Zusammenfassend veranschaulichen die Ergebnisse dieser Studie, dass MDR2^{-/-} Mäuse eine mit dem Alter zunehmende Leberschädigung aufweisen, die bereits bis zur 15. Lebenswoche auf den Großteil der Leber übergreift. Wir konnten zeigen, dass die in zeitlichem Zusammenhang mit der Leberschädigung ab der 15. Lebenswoche verstärkt einsetzende Abnahme des trabekulären BV und BMD vor allem auf eine verminderte Tb.N zurückzuführen ist und eine geringere Vernetzungsdichte zur Folge hat. Als mögliche Regulatoren dieser hepatischen Osteodystrophie erwägen wir einen kombinierten Effekt eines reduzierten 25(OH)D₃-Serumlevels und des Zytokins TGF- β , dessen chronisch erhöhte Serumkonzentration in unseren Analysen durch die Leberschädigung verursacht sein kann, und das im Blut zirkulierend die Funktionen der Knochenzellen in verschiedenen Reifungsstadien regulieren kann.

4.1 Limitierung und Ausblick

Das in dieser Studie genutzte Mausmodell für hepatische Osteodystrophie weist einige Limitierungen auf. Das Modell war auf den Zeitraum von 44 Wochen beschränkt. Unter Laborbedingungen beträgt das mittlere Lebensalter bei Wildtyp Balb/c Mäusen 25 Monate und etwas weniger bei MDR2^{-/-} Mäusen [74], wobei Wildtyp Balb/c Mäuse ab dem 18. Monat

als alt gelten [147:S. 482]. Somit kann durch dieses Modell die mögliche Entwicklung biliärer Zirrhosen oder neoplastischer Leberläsionen in einem höheren Lebensalter nicht ausgeschlossen werden [108:S. 1242] und keine Aussage über den weiteren Verlauf der hepatischen Osteodystrophie oder die Auswirkung einer sich bei den Versuchstieren im Alter entwickelnden Osteoporose auf diese getroffen werden. Eine andere Begrenzung unseres Modelles war die geringe Anzahl an Versuchstieren, so dass es keine Auswertung der Ergebnisse nach Geschlechtern getrennt gab. Zusätzlich stellen unsere Versuchstiere nur ein Modell für die chronisch cholestatischen Lebererkrankungen wie PSC da, wodurch anhand der Ergebnisse dieser Studie keine Schlussfolgerungen zu hepatischer Osteodystrophie bei chronischen Lebererkrankungen anderer Ätiologie wie Alkohol oder Viren getroffen werden können. Darüber hinaus sind Mausmodelle durch die begrenzte Übertragbarkeit der Studienergebnisse auf den Menschen limitiert. Generell weisen Mäuse im Vergleich zum Menschen andere Immunantworten, geringere Körpergröße und unterschiedliche Anatomie auf, wodurch sie andersartigen Belastungen ausgesetzt sind, was unter anderem die Knochenstruktur beeinflusst. Die Übertragbarkeit dieses Mausmodelles wird im Speziellen durch einen von dem des Menschen abweichenden Krankheitsverlauf bezüglich der Lebergewebschädigung der MDR2^{-/-} Mäuse beschränkt. Während MDR2^{-/-} Mäuse von Anfang an immunologische Aktivität im Lebergewebe aufweisen [53:S. 1245], aber durch die im Verlauf auftretende Stabilisierung der Krankheit erst spät oder nie eine biliäre Zirrhose entsteht, werden Leberschäden bei Menschen selten in der Kindheit und meist im Erwachsenenalter diagnostiziert, führen aber unbehandelt fast immer zur Zirrhose [34:S. 1476, 81:S. 283, 97:S. 1, 118:S. 745, 119:S. 1044, 148:S. 1].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MDR2^{-/-} Mäuse Knochenveränderungen im Sinne einer hepatischen Osteodystrophie entwickeln und dass neben einem reduzierten 25(OH)D₃-Serumlevel das Zytokin TGF- β als möglicher Regulator in Betracht kommt. Dabei wurden bisher noch nicht alle Möglichkeiten dieses Mausmodelles ausgeschöpft, mit dessen Hilfe weitere Unklarheiten überprüft werden können. So können durch ergänzende Analysen auf Zellebene, die, zu den Knochenveränderungen führenden Zellfunktionsstörungen im Detail untersucht werden. Dazu könnten unter anderem Aussagen über die Osteoklastenfunktion anhand der Tartrat-resistente saure Phosphatase (Trap) 5b Expression getroffen werden. Durch weiterführende Untersuchungen kann die Relevanz anderer zur Diskussion stehenden möglichen Regulationsmechanismen bei der Entwicklung hepatischer Osteodystrophien überprüft werden, wie Mangel Insulin Growth Factor 1 und Östrogen oder Anstieg von Substanzen wie Bilirubin [104:S. 1551]. Darüber hinaus können

mit diesem Mausmodell Therapieansätze zur Verbesserung der Knochenheilung getestet werden. Überdies kann TGF- β als Regulator der hepatischen Osteodystrophie, eine Aufgabe, die das Zytokin wie unsere Studienergebnisse zeigen möglicherweise erfüllt, durch weitere Studien verifiziert werden. Dafür sollte untersucht werden, ob die Blockierung des TGF- β Signalwegs frühzeitige Knochenveränderungen der MDR2^{-/-} Mäuse verhindert. Hierfür könnte man den Activin Receptor-like Kinase 5-Inhibitor nutzen oder ein Critical Size Defect Model mit beschichtetem Scaffold, so dass der TGF- β Signalweg auf lokalem Weg inhibiert wäre.

5 Zusammenfassung

Bei Menschen mit chronischen Lebererkrankungen treten vermehrt Knochenfrakturen auf, die durch reduzierte Knochenmineralisierung bedingt sind. Um Änderungen der Knochenmineralisationsdichte und Knochenarchitektur im Entwicklungsprozess hepatischer Osteodystrophien genauer beschreiben zu können und mögliche Regulationsmechanismen identifizieren zu können, wurden MDR2^{-/-} Mäuse als Krankheitsmodell gewählt, deren genetischer Defekt eine chronische Lebererkrankung, ähnlich der humanen primär sklerosierenden Cholangitis, hervorruft.

MDR2^{-/-} Mäuse und Wildtyp-Kontrollen (Balb/c) wurden in den Lebenswochen 5, 15, 20, 30 und 44 getötet. Das Fortschreiten der Leberschädigung wurde anhand histologischer Färbungen des Lebergewebes (Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner-Trichrom), den Serumspiegeln von Lactatdehydrogenase und Transaminasen sowie den durch reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) bestimmten Expressions-Level von Knochenmarkern (Osteopontin, Osteocalcin und Osteoprotegerin) und Vitamin D-Stoffwechsel regulierenden Enzymen und Proteinen (Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP 2R1), Sterol-26-Hydroxylase (CYP 27A1), Vitamin D-bindendes Protein (GC), 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7)) bewertet. Femora aller Mäuse wurden mittels μ CT bezüglich der Cortex- und Trabekelarchitektur analysiert und der Expressionsgrad von Knochenmarkern im Knochengewebe wurde per RT-PCR untersucht. Darüber hinaus wurde die Konzentration von aktivem TGF- β im Serum mittels Rezeptorzellanalysen bestimmt.

Die histologischen Färbungen zeigten, dass die Lebergewebesbeschädigung bei MDR2^{-/-} Mäusen mit dem Alter und dabei signifikant von Lebenswoche 5 bis 15 zunahm, während die Wildtyp-Kontrollen zu keinem der beobachteten Zeitpunkte Lebergewebeveränderungen aufwiesen. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch erhöhte Serumspiegel von Lactatdehydrogenase und Transaminasen in MDR2^{-/-} Mäusen, deren maximale Werte im Zeitraum von Lebenswoche 5 bis 15 gemessen wurden. Im Lebergewebe war die Expression von OPN der MDR2^{-/-} Mäuse nicht erhöht, während die Expressionslevel von Osteocalcin und Osteoprotegerin sich tendenziell wie das Ausmaß der Entzündungsinfiltrate im Gewebe verhielten und in Lebenswoche 20 ihre Maximalwerte erreichten. Die Expression der CYP 2R1, CYP 27A1 und des GC waren im Lebergewebe der MDR2^{-/-} Mäuse reduziert, während die Expression der DHCR7 hochreguliert war. μ CT-Untersuchungen der Femurmetaphysen zeigten ab der 15. Lebenswoche bei unveränderter Trabekeldicke eine verstärkte Reduktion

des Knochenvolumens, der Knochenmineralisationsdichte und der Trabekelanzahl bei MDR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen sowie einer daraus resultierenden Abnahme der Trabekelvernetzungsdichte. Die Expression der Knochenmarker OPN und Osteocalcin war im Knochen der MDR2^{-/-} Mäuse tendenziell herunterreguliert. Reporterzellanalysen zeigten einen mit dem Alter abfallenden TGF- β -Spiegel der Wildtyp-Kontrollen, während MDR2^{-/-} Mäuse chronisch erhöhte Werte aufwiesen.

Unsere Daten zeigen, dass in MDR2^{-/-} Mäusen mit zunehmender Leberschädigung das Knochenvolumen und die Knochendichte geringer werden. Dies beruht hauptsächlich auf einer verminderten Trabekelzahl, was bei gleichbleibender Trabekeldicke eine größere Separation und geringere Vernetzungsdichte zur Folge hat. Als mögliche Ursache postulieren wir neben einem reduzierten 25(OH)D₃-Spiegel chronisch erhöhte TGF- β -Spiegel im Serum, welche aus der Leberschädigung resultieren und im Serum zirkulierend die Osteoblastenfunktion beeinflussen können, wie z.B. die Expression von Osteopontin und Osteocalcin reduzieren.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Histologischer Leberaufbau: Zentralvenenläppchen	2
Abb. 1-2 Remodeling: Schematische Darstellung des Knochenumbaus	6
Abb. 1-3 Vergleich Osteoporose versus Osteomalazie	7
Abb. 1-4 Osteoporose ist nach Lebertransplantation reversibel	9
Abb. 1-5 Hypothetischer Regulationsmechanismus hepatischer Osteodystrophie	13
Abb. 2-1 Beispiel Hämatoxylin Eosin Färbung	23
Abb. 2-2 Beispiel Masson-Goldner-Trichrom Färbung	25
Abb. 2-3 Standardkurvenbeispiel LDH.....	31
Abb. 2-4 Standardkurve TGF- β	34
Abb. 3-1 Mikroskopische Bilder der Leberfärbungen, Übersicht: Vergrößerung 10 \times	47
Abb. 3-2 Veränderung des Lebergewebes; Lebenswoche 5; MDR2 ^{-/-} Mäuse.....	48
Abb. 3-3 Veränderung des Lebergewebes; Lebenswoche 15; MDR2 ^{-/-} Mäuse.....	49
Abb. 3-4 Veränderung des Lebergewebes, Wochen 30 und 44; MDR2 ^{-/-} Mäuse.....	49
Abb. 3-5 Leberschadigungsgrad im Zeitverlauf	50
Abb. 3-6 Enzymaktivität LDH im Vergleich	51
Abb. 3-7 Enzymaktivität ASAT im Vergleich.....	52
Abb. 3-8 Enzymaktivität ALAT im Vergleich.....	53
Abb. 3-9 Knochenstrukturparameter der Kortikalis.....	54
Abb. 3-10 Knochenstrukturparameter der Spongiosa (1)	56
Abb. 3-11 quantitative Knochenstrukturparameter der Spongiosa (2)	58
Abb. 3-12 Knochenstrukturparameter der Spongiosa (3)	59
Abb. 3-13 TGF- β Serumlevel im Vergleich.....	60
Abb. 3-14 mMDR2-Expression	61
Abb. 3-15 Osteopontin-Expression Leber.....	62
Abb. 3-16 Osteocalcin-Expression Leber	63
Abb. 3-17 Osteoprotegerin-Expression Leber	64
Abb. 3-18 Osteopontin-Expression Knochen.....	65
Abb. 3-19 Osteocalcin-Expression Knochen	66
Abb. 3-20 Genexpression des Lebergewebes von Regulatoren des Vitamin D-Stoffwechsels.....	67
Abb. 9-1 zusätzliche Bilder der HE Färbung; Leber; Vergrößerung 10 \times	96
Abb. 9-2 zusätzliche Bilder der MGT Färbung; Leber; Vergrößerung 10 \times	97

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Lebensdaten der Versuchstiere	15
Tabelle 2-2 Protokoll Hämatoxylin-Eosin Färbung	22
Tabelle 2-3 Protokoll Masson-Goldner-Trichrom Färbung	26
Tabelle 2-4 Score zur histologischen Auswertung	28
Tabelle 2-5 Knochenparameter	36
Tabelle 2-6 Protokoll RNA Isolation	39
Tabelle 2-7 Primereigenschaften	45
Tabelle 9-1 Färbeoptimierungsschema für Hämatoxylin-Eosin Färbung	94
Tabelle 9-2 Färbeoptimierungsschema für Masson-Goldner-Trichrom Färbung	95

8 Literaturverzeichnis

1. Ahn, J., Albanes, D., Berndt, S.I., Peters, U., Chatterjee, N., Freedman, N.D., Abnet, C.C., Huang, W.Y., Kibel, A.S., Crawford, E.D., Weinstein, S.J., Chanock, S.J., Schatzkin, A., and Hayes, R.B. "Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk." *Carcinogenesis*, 30 (2009): 769-776.
2. Ahn, J., Yu, K., Stolzenberg-Solomon, R., Simon, K.C., McCullough, M.L., Gallicchio, L., Jacobs, E.J., Ascherio, A., Helzlsouer, K., Jacobs, K.B., Li, Q., Weinstein, S.J., Purdue, M., Virtamo, J., Horst, R., Wheeler, W., Chanock, S., Hunter, D.J., Hayes, R.B., Kraft, P., and Albanes, D. "Genome-wide association study of circulating vitamin D levels." *Hum Mol Genet*, 19 (2010): 2739-2745.
3. Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G., and Derynck, R. "TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation." *Embo J*, 20 (2001): 2254-2272.
4. Andresen, R., Werner, H.J., and Schober, H.C. "Contribution of the cortical shell of vertebrae to mechanical behaviour of the lumbar vertebrae with implications for predicting fracture risk." *Br J Radiol*, 71 (1998): 759-765.
5. Andus, T. and Holstege, A. "Cytokines and the liver in health and disease. Effects on liver metabolism and fibrogenesis." *Acta Gastroenterol Belg*, 57 (1994): 236-244.
6. Angulo, P., Grandison, G.A., Fong, D.G., Keach, J.C., Lindor, K.D., Bjornsson, E., and Koch, A. "Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis." *Gastroenterology*, 140 (2011): 180-188.
7. Ardawi, M.S., Sibiany, A.M., Bakhsh, T.M., Qari, M.H., and Maimani, A.A. "High prevalence of vitamin D deficiency among healthy Saudi Arabian men: relationship to bone mineral density, parathyroid hormone, bone turnover markers, and lifestyle factors." *Osteoporos Int*, 23 (2012): 675-686.
8. Armendariz-Borunda, J., Seyer, J.M., Kang, A.H., and Raghov, R. "Regulation of TGF beta gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride." *Faseb J*, 4 (1990): 215-221.
9. Arteh, J., Narra, S., and Nair, S. "Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease." *Dig Dis Sci*, 55 (2010): 2624-2628.
10. Baldock, P.A., Thomas, G.P., Hodge, J.M., Baker, S.U., Dressel, U., O'Loughlin, P.D., Nicholson, G.C., Briffa, K.H., Eisman, J.A., and Gardiner, E.M. "Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast." *J Bone Miner Res*, 21 (2006): 1618-1626.
11. Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R.K., Schilling, S., Filvaroff, E.H., Marshall, G.W., Marshall, S.J., Ritchie, R.O., Derynck, R., and Alliston, T. "TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005): 18813-18818.
12. Barchetta, I., Angelico, F., Del Ben, M., Baroni, M.G., Pozzilli, P., Morini, S., and Cavallo, M.G. "Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes." *BMC Med*, 9 (2011): 85.
13. Bell, T.D., Demay, M.B., and Burnett-Bowie, S.A. "The biology and pathology of vitamin D control in bone." *J Cell Biochem*, 111 (2010): 7-13.
14. Bevill, G., Eswaran, S.K., Gupta, A., Papadopoulos, P., and Keaveny, T.M. "Influence of bone volume fraction and architecture on computed large-deformation failure mechanisms in human trabecular bone." *Bone*, 39 (2006): 1218-1225.
15. Biswas, P. and Zanello, L.P. "1alpha,25(OH)(2) vitamin D(3) induction of ATP secretion in osteoblasts." *J Bone Miner Res*, 24 (2009): 1450-1460.

16. Bonewald, L.F. and Dallas, S.L. "Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation." *J Cell Biochem*, 55 (1994): 350-357.
17. Bosselut, N., Guéchet, J., Zarski, J.-P., Barbu, V., Lasnier, E., Baudin, B., Housset, C., and Vaubourdolle, M. (2010) Serum osteoprotegerin, a new serum marker of liver fibrosis. (<http://www.kenes.com/easl2010/posters/Abstract932.htm>) Stand: 16.07.2011
18. Bousson, V., Bergot, C., Meunier, A., Barbot, F., Parlier-Cuau, C., Laval-Jeantet, A.M., and Laredo, J.D. "CT of the middiaphyseal femur: cortical bone mineral density and relation to porosity." *Radiology*, 217 (2000): 179-187.
19. Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., and Muller, R. "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." *J Bone Miner Res*, 25 (2010): 1468-1486.
20. Brandt, C.T., Souza, A.M.G., Braga, M.V.M., Melo, K.L.R., and Almeida, F. "Bone mineral density in children and adolescents with hepatosplenic mansonic schistosomiasis and esophageal varices who underwent splenectomy and ligation of the left gastric vein." *Acta Cirurgica Brasileira [serial online]*, 14 (1999).
21. Brandt, C.T., Souza, A.M.G., Braga, M.V.M., Melo, K.L.R., Marques, K.O.A., Sena, A.D., and Almeida, F. "Bone mineral content reduction in youth with surgical form of schistosomiasis mansoni: factors involved in the pathogenesis." *Acta Cirurgica Brasileira [serial online]*, 16 (2001).
22. Bu, F.X., Armas, L., Lappe, J., Zhou, Y., Gao, G., Wang, H.W., Recker, R., and Zhao, L.J. "Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects." *Hum Genet*, 128 (2010): 549-556.
23. Cameron, R.G., Blendis, L.M., and Neuman, M.G. "Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis." *Clin Biochem*, 34 (2001): 195-201.
24. Campbell, M.S., Lichtenstein, G.R., Rhim, A.D., Pazianas, M., and Faust, T. "Severity of liver disease does not predict osteopenia or low bone mineral density in primary sclerosing cholangitis." *Liver Int*, 25 (2005): 311-316.
25. Chappard, D., Josselin, N., Rouge-Maillart, C., Legrand, E., Basle, M.F., and Audran, M. "Bone microarchitecture in males with corticosteroid-induced osteoporosis." *Osteoporos Int*, 18 (2007): 487-494.
26. Cheng, J.B., Motola, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. "De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase." *J Biol Chem*, 278 (2003): 38084-38093.
27. Choudhary, N.S., Tomar, M., Chawla, Y.K., Bhadada, S.K., Khandelwal, N., Dhiman, R.K., Duseja, A., and Bhansali, A. "Hepatic Osteodystrophy Is Common in Patients with Noncholestatic Liver Disease." *Dig Dis Sci*, (2011).
28. Christakos, S., Ajibade, D.V., Dhawan, P., Fechner, A.J., and Mady, L.J. "Vitamin D: metabolism." *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39 (2010): 243-253, table of contents.
29. Cogan, E. "[Vitamin D supplementation: why and how?]." *Rev Med Brux*, 32 (2011): 353-361.
30. Collier, J. "Bone disorders in chronic liver disease." *Hepatology*, 46 (2007): 1271-1278.
31. Compston, J.E., Horton, L.W., and Thompson, R.P. "Treatment of osteomalacia associated with primary biliary cirrhosis with parenteral vitamin D2 or oral 25-hydroxyvitamin D3." *Gut*, 20 (1979): 133-136.
32. Cooper, J.D., Smyth, D.J., Walker, N.M., Stevens, H., Burren, O.S., Wallace, C., Greissl, C., Ramos-Lopez, E., Hypponen, E., Dunger, D.B., Spector, T.D., Ouweland, W.H., Wang, T.J., Badenhop, K., and Todd, J.A. "Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes." *Diabetes*, 60 (2011): 1624-1631.

33. Crawford, B.A., Labio, E.D., Strasser, S.I., and McCaughan, G.W. "Vitamin D replacement for cirrhosis-related bone disease." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3 (2006): 689-699.
34. Dahlan, Y., Smith, L., Simmonds, D., Jewell, L.D., Wanless, I., Heathcote, E.J., and Bain, V.G. "Pediatric-onset primary biliary cirrhosis." *Gastroenterology*, 125 (2003): 1476-1479.
35. Dallas, S.L., Rosser, J.L., Mundy, G.R., and Bonewald, L.F. "Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix." *J Biol Chem*, 277 (2002): 21352-21360.
36. Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Tahashi, Y., Furukawa, F., and Inoue, K. "Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury." *Gut*, 46 (2000): 719-724.
37. Denk, H., Dienes, H.P., Jochum, W., Schirmacher, P., and Trauner, M. 32.8 Folgezustände von Lebererkrankungen In "Pathologie", W. Böcker, Denk, H., Heitz, Ph.U., Moch, H. (Hrsg.), Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2008, 4. Auflage, S. 802-805.
38. Deutzmann, R. Teil B, 20 Hormone In "Biochemie", J. Rassow, et al. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 1. Auflage, S. 566-626.
39. Deutzmann, R. Teil B, 19 Mechanismen der Signaltransduktion In "Biochemie", J. Rassow, et al. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 1. Auflage, S. 544-565.
40. Diamond, T., Stiel, D., Lunzer, M., Wilkinson, M., Roche, J., and Posen, S. "Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease." *Gut*, 31 (1990): 82-87.
41. Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D., Segawa, T., Maeda, M., Hamuro, J., Nakayama, T., Taniguchi, M., Yagita, H., Van Kaer, L., Onoe, K., Denhardt, D., Rittling, S., and Uede, T. "Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases." *Immunity*, 21 (2004): 539-550.
42. Diez-Ruiz, A., Garcia-Saura, P.L., Garcia-Ruiz, P., Gonzalez-Calvin, J.L., Gallego-Rojo, F., and Fuchs, D. "Bone mineral density, bone turnover markers and cytokines in alcohol-induced cirrhosis." *Alcohol Alcohol*, 45 (2010): 427-430.
43. Duque, G., Macoritto, M., Dion, N., Ste-Marie, L.G., and Kremer, R. "1,25(OH)2D3 acts as a bone-forming agent in the hormone-independent senescence-accelerated mouse (SAM-P/6)." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288 (2005): E723-730.
44. Eastell, R., Dickson, E.R., Hodgson, S.F., Wiesner, R.H., Porayko, M.K., Wahner, H.W., Cedel, S.L., Riggs, B.L., and Krom, R.A. "Rates of vertebral bone loss before and after liver transplantation in women with primary biliary cirrhosis." *Hepatology*, 14 (1991): 296-300.
45. Edwards, J.R., Nyman, J.S., Lwin, S.T., Moore, M.M., Esparza, J., O'Quinn, E.C., Hart, A.J., Biswas, S., Patil, C.A., Lonning, S., Mahadevan-Jansen, A., and Mundy, G.R. "Inhibition of TGF-beta signaling by 1D11 antibody treatment increases bone mass and quality in vivo." *J Bone Miner Res*, 25 (2010): 2419-2426.
46. Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stockle, U., and Nussler, A.K. "TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation." *PLoS One*, 5 (2010): e14073.
47. Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., and Kalender, W. "[Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]." *Radiologe*, 39 (1999): 203-212.
48. Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M.M., Chen, Y., Wang, L., Zheng, H., Sutton, R.E., Boyce, B.F., and Lee, B. "Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis." *Nat Med*, 14 (2008): 299-305.

49. Erlebacher, A. and Derynck, R. "Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype." *J Cell Biol*, 132 (1996): 195-210.
50. Faucheux, C., Ulysse, F., Bareille, R., Reddi, A.H., and Amedee, J. "Opposing actions of BMP3 and TGF beta 1 in human bone marrow stromal cell growth and differentiation." *Biochem Biophys Res Commun*, 241 (1997): 787-793.
51. Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jasion, G., and Kleerekoper, M. "The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography." *J Bone Miner Res*, 4 (1989): 3-11.
52. Ferretti, J.L., Frost, H.M., Gasser, J.A., High, W.B., Jee, W.S., Jerome, C., Mosekilde, L., and Thompson, D.D. "Perspectives on osteoporosis research: its focus and some insights from a new paradigm." *Calcif Tissue Int*, 57 (1995): 399-404.
53. Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Weiglein, A.H., Lammert, F., Marschall, H.U., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M. "Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles." *Gastroenterology*, 123 (2002): 1238-1251.
54. Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., Marschall, H.U., Denk, H., and Trauner, M. "Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice." *Gastroenterology*, 127 (2004): 261-274.
55. Filvaroff, E., Erlebacher, A., Ye, J., Gitelman, S.E., Lotz, J., Heilman, M., and Derynck, R. "Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass." *Development*, 126 (1999): 4267-4279.
56. Fine, A. and Goldstein, R.H. "The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts." *J Biol Chem*, 262 (1987): 3897-3902.
57. Fisher, L. and Fisher, A. "Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease." *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5 (2007): 513-520.
58. Flisiak, R., Pytel-Krolczuk, B., and Prokopowicz, D. "Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis." *Cytokine*, 12 (2000): 677-681.
59. Floreani, A., Zappala, F., Fries, W., Naccarato, R., Plebani, M., D'Angelo, A., and Chiaramonte, M. "A 3-year pilot study with 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium, and calcitonin for severe osteodystrophy in primary biliary cirrhosis." *J Clin Gastroenterol*, 24 (1997): 239-244.
60. Fuller, K., Lean, J.M., Bayley, K.E., Wani, M.R., and Chambers, T.J. "A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival." *J Cell Sci*, 113 (Pt 13) (2000): 2445-2453.
61. Gallego-Rojo, F.J., Gonzalez-Calvin, J.L., Munoz-Torres, M., Mundi, J.L., Fernandez-Perez, R., and Rodrigo-Moreno, D. "Bone mineral density, serum insulin-like growth factor I, and bone turnover markers in viral cirrhosis." *Hepatology*, 28 (1998): 695-699.
62. George, J., Ganesh, H.K., Acharya, S., Bandgar, T.R., Shivane, V., Karvat, A., Bhatia, S.J., Shah, S., Menon, P.S., and Shah, N. "Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease." *World J Gastroenterol*, 15 (2009): 3516-3522.
63. Goel, V. and Kar, P. "Hepatic osteodystrophy." *Trop Gastroenterol*, 31 (2010): 82-86.
64. Gonzalez-Calvin, J.L., Gallego-Rojo, F., Fernandez-Perez, R., Casado-Caballero, F., Ruiz-Escolano, E., and Olivares, E.G. "Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis." *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (2004): 4325-4330.

65. Gottfried, E., Rehli, M., Hahn, J., Holler, E., Andreesen, R., and Kreutz, M. "Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite." *Biochem Biophys Res Commun*, 349 (2006): 209-213.
66. Gratzl, M. 15.3 Leber In "Histologie", M. Gratzl (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2002, 5. Auflage, S. 278-284.
67. Gressner, A.M., Gao, C.F., and Gressner, O.A. "Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey." *World J Gastroenterol*, 15 (2009): 2433-2440.
68. Gressner, O.A., Gao, C., Siluschek, M., Kim, P., and Gressner, A.M. "Inverse association between serum concentrations of actin-free vitamin D-binding protein and the histopathological extent of fibrogenic liver disease or hepatocellular carcinoma." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21 (2009): 990-995.
69. Grote, H.J., Amling, M., Vogel, M., Hahn, M., Posl, M., and Delling, G. "Intervertebral variation in trabecular microarchitecture throughout the normal spine in relation to age." *Bone*, 16 (1995): 301-308.
70. Guanabens, N., Pares, A., Ros, I., Caballeria, L., Pons, F., Vidal, S., Monegal, A., Peris, P., and Rodes, J. "Severity of cholestasis and advanced histological stage but not menopausal status are the major risk factors for osteoporosis in primary biliary cirrhosis." *J Hepatol*, 42 (2005): 573-577.
71. Guichelaar, M.M., Malinchoc, M., Sibonga, J., Clarke, B.L., and Hay, J.E. "Bone metabolism in advanced cholestatic liver disease: analysis by bone histomorphometry." *Hepatology*, 36 (2002): 895-903.
72. Guichelaar, M.M., Schmoll, J., Malinchoc, M., and Hay, J.E. "Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors." *Hepatology*, 46 (2007): 1198-1207.
73. Harris, S.E., Bonewald, L.F., Harris, M.A., Sabatini, M., Dallas, S., Feng, J.Q., Ghosh-Choudhury, N., Wozney, J., and Mundy, G.R. "Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts." *J Bone Miner Res*, 9 (1994): 855-863.
74. Harrison, D.E. (2009) Baseline life span data: twelve strains of commonly used laboratory mice. (http://research.jax.org/faculty/harrison/gerlvi_LifeStudy2.html) Stand: 13.07.2011
75. Hauser, K. Teil A, 16 Vitamine In "Biochemie", J. Rassow, et al. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 1. Auflage, S. 272-305.
76. Hauser, K. Teil B, 7 Extrazelluläre Matrix In "Biochemie", J. Rassow, Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 1. Auflage, S. 396-411.
77. Hay, J.E., Lindor, K.D., Wiesner, R.H., Dickson, E.R., Krom, R.A., and LaRusso, N.F. "The metabolic bone disease of primary sclerosing cholangitis." *Hepatology*, 14 (1991): 257-261.
78. Herlong, H.F., Recker, R.R., and Maddrey, W.C. "Bone disease in primary biliary cirrhosis: histologic features and response to 25-hydroxyvitamin D." *Gastroenterology*, 83 (1982): 103-108.
79. Hildebrand, T. and Ruegsegger, P. "Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index." *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, 1 (1997): 15-23.
80. Hildebrand, T., Laib, A., Muller, R., Dequeker, J., and Ruegsegger, P. "Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus." *J Bone Miner Res*, 14 (1999): 1167-1174.

81. Hohenester, S., Oude-Elferink, R.P., and Beuers, U. "Primary biliary cirrhosis." *Semin Immunopathol*, 31 (2009): 283-307.
82. Holzer, G., von Skrbensky, G., Holzer, L.A., and Pichl, W. "Hip fractures and the contribution of cortical versus trabecular bone to femoral neck strength." *J Bone Miner Res*, 24 (2009): 468-474.
83. Issever, A.S. and Link, T.M. "[New techniques for the diagnosis of osteoporosis]." *Radiologe*, 46 (2006): 870, 872-880.
84. Ito, M., Nakamura, T., Matsumoto, T., Tsurusaki, K., and Hayashi, K. "Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture." *Bone*, 23 (1998): 163-169.
85. Ito, M., Ikeda, K., Nishiguchi, M., Shindo, H., Uetani, M., Hosoi, T., and Orimo, H. "Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk." *J Bone Miner Res*, 20 (2005): 1828-1836.
86. Janes, C.H., Dickson, E.R., Okazaki, R., Bonde, S., McDonagh, A.F., and Riggs, B.L. "Role of hyperbilirubinemia in the impairment of osteoblast proliferation associated with cholestatic jaundice." *J Clin Invest*, 95 (1995): 2581-2586.
87. Javed, M., Saeed, A., Khan, I.M., Hameed, K., Rehman, S., Khattak, A.K., Ahmad, I., and Khan, S.A. "Frequency of osteoporosis in patients with cirrhosis due to hepatitis B and hepatitis C: a study of 100 cases." *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 21 (2009): 51-53.
88. Jee, W.S. and Yao, W. "Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis." *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 1 (2001): 193-207.
89. Jundt, G. 43 Knochen: 43.1 Normale Struktur und Funktion In "Pathologie", W. Böcker, Denk, H., Heitz, Ph.U., Moch, H. (Hrsg.), Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2008, 4. Auflage, S. 1057-1061.
90. Jundt, G. 43 Knochen: 43.3 Generalisierte Osteopathien In "Pathologie", W. Böcker, Denk, H., Heitz, Ph.U., Moch, H. (Hrsg.), Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2008, 4. Auflage, S. 1066-1071.
91. Jung, R.T., Davie, M., Siklos, P., Chalmers, T.M., Hunter, J.O., and Lawson, D.E. "Vitamin D metabolism in acute and chronic cholestasis." *Gut*, 20 (1979): 840-847.
92. Kaneda, T., Nojima, T., Nakagawa, M., Ogasawara, A., Kaneko, H., Sato, T., Mano, H., Kumegawa, M., and Hakeda, Y. "Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor." *J Immunol*, 165 (2000): 4254-4263.
93. Karsdal, M.A., Hjorth, P., Henriksen, K., Kirkegaard, T., Nielsen, K.L., Lou, H., Delaisse, J.M., and Foged, N.T. "Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression." *J Biol Chem*, 278 (2003): 44975-44987.
94. Kassem, M., Kveiborg, M., and Eriksen, E.F. "Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol." *Eur J Clin Invest*, 30 (2000): 429-437.
95. Kim, M.J., Shim, M.S., Kim, M.K., Lee, Y., Shin, Y.G., Chung, C.H., and Kwon, S.O. "Effect of chronic alcohol ingestion on bone mineral density in males without liver cirrhosis." *Korean J Intern Med*, 18 (2003): 174-180.
96. Klein, G.L., Soriano, H., Shulman, R.J., Levy, M., Jones, G., and Langman, C.B. "Hepatic osteodystrophy in chronic cholestasis: evidence for a multifactorial etiology." *Pediatr Transplant*, 6 (2002): 136-140.
97. Kumagi, T. and Heathcote, E.J. "Primary biliary cirrhosis." *Orphanet J Rare Dis*, 3 (2008): 1.

98. Laib, A., Barou, O., Vico, L., Lafage-Proust, M.H., Alexandre, C., and Rugseger, P. "3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with application to a rat model of immobilisation osteoporosis." *Med Biol Eng Comput*, 38 (2000): 326-332.
99. Laitinen, K., Karkkainen, M., Lalla, M., Lamberg-Allardt, C., Tunninen, R., Tahtela, R., and Valimaki, M. "Is alcohol an osteoporosis-inducing agent for young and middle-aged women?" *Metabolism*, 42 (1993): 875-881.
100. Lasky, J.A. and Brody, A.R. "Interstitial fibrosis and growth factors." *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 4 (2000): 751-762.
101. Leipziger, J. 13.4 Leber In "Physiologie", J.C. Behrends, Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., Wischmeyer, E. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009, S. 506-509.
102. Leipziger, J. 13.2 Verdauung In "Physiologie", J.C. Behrends, Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., Wischmeyer, E. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009, S. 469-501.
103. Lerner, U.H. "Transforming growth factor-beta stimulates bone resorption in neonatal mouse calvariae by a prostaglandin-unrelated but cell proliferation-dependent pathway." *J Bone Miner Res*, 11 (1996): 1628-1639.
104. Leuschner, U. "[Extrahepatic manifestations of liver diseases: skeleton]." *Praxis (Bern 1994)*, 95 (2006): 1550-1556.
105. Malham, M., Jorgensen, S.P., Ott, P., Agnholt, J., Vilstrup, H., Borre, M., and Dahlerup, J.F. "Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology." *World J Gastroenterol*, 17 (2011): 922-925.
106. Malik, P., Gasser, R.W., Kemmler, G., Moncayo, R., Finkenstedt, G., Kurz, M., and Fleischhacker, W.W. "Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study." *Alcohol Clin Exp Res*, 33 (2009): 375-381.
107. Matloff, D.S., Kaplan, M.M., Neer, R.M., Goldberg, M.J., Bitman, W., and Wolfe, H.J. "Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: effects of 25-hydroxyvitamin D3 treatment." *Gastroenterology*, 83 (1982): 97-102.
108. Mauad, T.H., van Nieuwkerk, C.M., Dingemans, K.P., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkruisen, R.P., Groen, A.K., Oude Elferink, R.P., and et al. "Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis." *Am J Pathol*, 145 (1994): 1237-1245.
109. McCalden, R.W., McGeough, J.A., and Court-Brown, C.M. "Age-related changes in the compressive strength of cancellous bone. The relative importance of changes in density and trabecular architecture." *J Bone Joint Surg Am*, 79 (1997): 421-427.
110. Melton, L.J., 3rd, Kan, S.H., Frye, M.A., Wahner, H.W., O'Fallon, W.M., and Riggs, B.L. "Epidemiology of vertebral fractures in women." *Am J Epidemiol*, 129 (1989): 1000-1011.
111. Menon, K.V., Angulo, P., Boe, G.M., and Lindor, K.D. "Safety and efficacy of estrogen therapy in preventing bone loss in primary biliary cirrhosis." *Am J Gastroenterol*, 98 (2003): 889-892.
112. Mohammad, K.S., Chen, C.G., Balooch, G., Stebbins, E., McKenna, C.R., Davis, H., Niewolna, M., Peng, X.H., Nguyen, D.H., Ionova-Martin, S.S., Bracey, J.W., Hogue, W.R., Wong, D.H., Ritchie, R.O., Suva, L.J., Derynck, R., Guise, T.A., and Alliston, T. "Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone." *PLoS One*, 4 (2009): e5275.

113. Mulder, L., Koolstra, J.H., and Van Eijden, T.M. "Accuracy of microCT in the quantitative determination of the degree and distribution of mineralization in developing bone." *Acta Radiol*, 45 (2004): 769-777.
114. Neuman, M., Angulo, P., Malkiewicz, I., Jorgensen, R., Shear, N., Dickson, E.R., Haber, J., Katz, G., and Lindor, K. "Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis." *J Gastroenterol Hepatol*, 17 (2002): 196-202.
115. Pfeilschifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H.W., Mundy, G.R., and Ziegler, R. "Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta." *J Bone Miner Res*, 5 (1990): 825-830.
116. Popov, Y., Patsenker, E., Fickert, P., Trauner, M., and Schuppan, D. "Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes." *J Hepatol*, 43 (2005): 1045-1054.
117. Pöschl, K. "Ermöglicht die Messung der trabekulären Mikroarchitektur thorakolumbalen Wirbelkörper eine Verbesserung der Vorhersage der mechanischen Kompetenz?" Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Fakultät, München, Dissertation, 2009
118. Poupon, R. "Primary biliary cirrhosis: a 2010 update." *J Hepatol*, 52 (2010): 745-758.
119. Prince, M., Chetwynd, A., Newman, W., Metcalf, J.V., and James, O.F. "Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years." *Gastroenterology*, 123 (2002): 1044-1051.
120. Ramaiah, S.K. and Rittling, S. "Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer." *Toxicol Sci*, 103 (2008): 4-13.
121. Rassow, J. Teil B, 24 Biochemie der Leber In "Biochemie", J. Rassow, Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 1. Auflage, S. 669-673.
122. Reiter, F. "Development of Sclerosing Cholangitis in Mdr2 (Abcb4) Knockout Mice- A Longitudinal Study in Aging Mice" Medizinische Universität Graz, Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Graz, Dissertation, 2010
123. Riggs, B.L., Hodgson, S.F., O'Fallon, W.M., Chao, E.Y., Wahner, H.W., Muhs, J.M., Cedel, S.L., and Melton, L.J., 3rd "Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis." *N Engl J Med*, 322 (1990): 802-809.
124. Rouillard, S. and Lane, N.E. "Hepatic osteodystrophy." *Hepatology*, 33 (2001): 301-307.
125. Russell, W.E., Coffey, R.J., Jr., Ouellette, A.J., and Moses, H.L. "Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988): 5126-5130.
126. Schaefer, C.J., Ruhrmund, D.W., Pan, L., Seiwert, S.D., and Kossen, K. "Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models." *Eur Respir Rev*, 20 (2011): 85-97.
127. Schiefke, I., Fach, A., Wiedmann, M., Aretin, A.V., Schenker, E., Borte, G., Wiese, M., and Moessner, J. "Reduced bone mineral density and altered bone turnover markers in patients with non-cirrhotic chronic hepatitis B or C infection." *World J Gastroenterol*, 11 (2005): 1843-1847.
128. Schlaeppli, J.M., Gutzwiller, S., Finkenzeller, G., and Fournier, B. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells." *Endocr Res*, 23 (1997): 213-229.
129. Shima, M., Tanaka, H., Norman, A.W., Yamaoka, K., Yoshikawa, H., Takaoka, K., Ishizuka, S., and Seino, Y. "23(S),25(R)-1,25-dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone stimulates murine bone formation in vivo." *Endocrinology*, 126 (1990): 832-836.
130. Siu-Caldera, M.L., Zou, L., Ehrlich, M.G., Schwartz, E.R., Ishizuka, S., and Reddy, G.S. "Human osteoblasts in culture metabolize both 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3

- and its precursor 25-hydroxyvitamin D3 into their respective lactones." *Endocrinology*, 136 (1995): 4195-4203.
131. Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A., and et al. "Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease." *Cell*, 75 (1993): 451-462.
 132. St-Arnaud, R. and Naja, R.P. "Vitamin D metabolism, cartilage and bone fracture repair." *Mol Cell Endocrinol*, 347 (2011): 48-54.
 133. Suzuki, K., Arakawa, Y., Chino, S., and Yagi, K. "[Hepatic osteodystrophy]." *Nihon Rinsho*, 56 (1998): 1604-1608.
 134. Tesseur, I., Zou, K., Berber, E., Zhang, H., and Wyss-Coray, T. "Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF-beta." *BMC Cell Biol*, 7 (2006): 15.
 135. Trauner, M., Fickert, P., Halilbasic, E., and Moustafa, T. "Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases." *Wien Med Wochenschr*, 158 (2008): 542-548.
 136. Trauner, M., Fickert, P., Baghdasaryan, A., Claudel, T., Halilbasic, E., Moustafa, T., Wagner, M., and Zollner, G. "New insights into autoimmune cholangitis through animal models." *Dig Dis*, 28 (2010): 99-104.
 137. Trautwein, C., Possienke, M., Schlitt, H.J., Boker, K.H., Horn, R., Raab, R., Manns, M.P., and Brabant, G. "Bone density and metabolism in patients with viral hepatitis and cholestatic liver diseases before and after liver transplantation." *Am J Gastroenterol*, 95 (2000): 2343-2351.
 138. Villareal, D.T., Civitelli, R., Chines, A., and Avioli, L.V. "Subclinical vitamin D deficiency in postmenopausal women with low vertebral bone mass." *J Clin Endocrinol Metab*, 72 (1991): 628-634.
 139. Wang, T.J., Zhang, F., Richards, J.B., Kestenbaum, B., van Meurs, J.B., Berry, D., Kiel, D.P., Streeten, E.A., Ohlsson, C., Koller, D.L., Peltonen, L., Cooper, J.D., O'Reilly, P.F., Houston, D.K., Glazer, N.L., Vandenput, L., Peacock, M., Shi, J., Rivadeneira, F., McCarthy, M.I., Anneli, P., de Boer, I.H., Mangino, M., Kato, B., Smyth, D.J., Booth, S.L., Jacques, P.F., Burke, G.L., Goodarzi, M., Cheung, C.L., Wolf, M., Rice, K., Goltzman, D., Hidiroglou, N., Ladouceur, M., Wareham, N.J., Hocking, L.J., Hart, D., Arden, N.K., Cooper, C., Malik, S., Fraser, W.D., Hartikainen, A.L., Zhai, G., Macdonald, H.M., Forouhi, N.G., Loos, R.J., Reid, D.M., Hakim, A., Dennison, E., Liu, Y., Power, C., Stevens, H.E., Jaana, L., Vasan, R.S., Soranzo, N., Bojunga, J., Psaty, B.M., Lorentzon, M., Foroud, T., Harris, T.B., Hofman, A., Jansson, J.O., Cauley, J.A., Uitterlinden, A.G., Gibson, Q., Jarvelin, M.R., Karasik, D., Siscovick, D.S., Econs, M.J., Kritchevsky, S.B., Florez, J.C., Todd, J.A., Dupuis, J., Hypponen, E., and Spector, T.D. "Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study." *Lancet*, 376 (2010): 180-188.
 140. Wanninger, J., Neumeier, M., Bauer, S., Weiss, T.S., Eisinger, K., Walter, R., Dorn, C., Hellerbrand, C., Schaffler, A., and Buechler, C. "Adiponectin induces the transforming growth factor decoy receptor BAMBI in human hepatocytes." *FEBS Lett*, 585 (2011): 1338-1344.
 141. Wariaghli, G., Allali, F., El Maghraoui, A., and Hajjaj-Hassouni, N. "Osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22 (2010): 1397-1401.
 142. Welsch, U. and Deller, T. 10.3 Leber und Gallenwege In "Lehrbuch Histologie", U. Welsch (Hrsg.), Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München, 2010, 3. Auflage, S. 332-344.

143. Welsch, U. and Deller, T. 3.2.12 Knochengewebe In "Lehrbuch Histologie", U. Welsch (Hrsg.), Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München, 2010, 3. Auflage, S. 108-121.
144. Weng, H.L., Liu, Y., Chen, J.L., Huang, T., Xu, L.J., Godoy, P., Hu, J.H., Zhou, C., Stickel, F., Marx, A., Bohle, R.M., Zimmer, V., Lammert, F., Mueller, S., Gigou, M., Samuel, D., Mertens, P.R., Singer, M.V., Seitz, H.K., and Dooley, S. "The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis." *Hepatology*, 50 (2009): 230-243.
145. Werner, C., Iversen, B.F., and Therkildsen, M.H. "Contribution of the trabecular component to mechanical strength and bone mineral content of the femoral neck. An experimental study on cadaver bones." *Scand J Clin Lab Invest*, 48 (1988): 457-460.
146. WHO "Prevention and management of osteoporosis." *World Health Organ Tech Rep Ser*, 921 (2003): 1-164, back cover.
147. Willingham, M.D., Brodt, M.D., Lee, K.L., Stephens, A.L., Ye, J., and Silva, M.J. "Age-related changes in bone structure and strength in female and male BALB/c mice." *Calcif Tissue Int*, 86 (2010): 470-483.
148. Worthington, J. and Chapman, R. "Primary sclerosing cholangitis." *Orphanet J Rare Dis*, 1 (2006): 41.
149. Yamamoto, T., Noble, N.A., Miller, D.E., and Border, W.A. "Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis." *Kidney Int*, 45 (1994): 916-927.
150. Yurci, A., Kalkan, A.O., Ozbakir, O., Karaman, A., Torun, E., Kula, M., Baskol, M., GURSOY, S., YUCESOY, M., and BAYRAM, F. "Efficacy of different therapeutic regimens on hepatic osteodystrophy in chronic viral liver disease." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23 (2011): 1206-1212.
151. Zein, C.O., Jorgensen, R.A., Clarke, B., Wenger, D.E., Keach, J.C., Angulo, P., and Lindor, K.D. "Alendronate improves bone mineral density in primary biliary cirrhosis: a randomized placebo-controlled trial." *Hepatology*, 42 (2005): 762-771.

9 Anhang

9.1 Färbeoptimierung

Mit 5 µm dicken Leberschnitten von MDR2^{-/-} Mäusen wurden Probefärbungen durchgeführt um bestmögliche histologische Ergebnisse zu erzielen. Dabei wurden die Schritte des Färbeprozesses Entparaffinieren, Rehydrierung, Dehydrierung sowie Klären nicht verändert.

9.1.1 HE Färbung

Bei der Optimierung der HE Färbung wurden die Zeiten der Färbelösungen und Art des Wässerns nach folgendem Schema variiert (siehe Tabelle 9-1):

Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Wässern mit Leitungswasser	Eosin G-Lösung 0,5% wässrig
10 min	fließendes Wasser	3 min
10 min	Wechselbad	3 min
10 min	fließendes Wasser	2 min
10 min	Wechselbad	2 min
8 min	fließendes Wasser	3 min
8 min	Wechselbad	3 min
8 min	fließendes Wasser	2 min
8 min	Wechselbad	2 min
7 min	fließendes Wasser	3 min
7 min	Wechselbad	3 min
7 min	fließendes Wasser	2 min
7 min	Wechselbad	2 min
5 min	fließendes Wasser	3 min
5 min	Wechselbad	3 min
5 min	fließendes Wasser	2 min
5 min	Wechselbad	2 min

Tabelle 9-1 Färbeoptimierungsschema für Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Auswertung der Färberegebnisse zeigte, dass das gewünschte Resultat bei der Kombination von 5 min Hämalaunlösung, Wässern unter fließendem Leitungswasser sowie 3 min Gegenfärbung mit Eosin G-Lösung erzielt wird.

9.1.2 MGT Färbung

Zur Optimierung der MGT Färbung wurden die Zeiten und Zusammensetzung der Färbelösungen variiert (siehe Tabelle 9-2):

Hämatoxylin nach Weigert	Säurefuchsin- Ponceau-Xylidine	Phosphorwolframsäure- Orange G	Lichtgrün
2 min	10 min	10 min	15 min
2 min	5 min	10 min	5 min
2 min	5 min	10 min	10 min
2 min	5 min	1 min	5 min
2 min	5 min	5 min	15 min
2 min	5 min	5 min	5 min
4 min	4 min	10 min	15 min
4 min	3 min	10 min	10 min
4 min	2 min	5 min	10 min
4 min	2 min	5 min	5 min

Tabelle 9-2 Färbeoptimierungsschema für Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Bei der Auswertung der Probefärbungen zeigte sich, dass zur Erzielung eines optimalen Resultats die Zusammensetzung der Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung von einem Verhältnis von 2:1 zu einem Verhältnis von 4:1 Wolframatophosphorsäure zu Orange G verändert werden musste. Das gewünschte Färbeergebnis ergab die Kombination 4 min Hämatoxylin, 2-4 min Säurefuchsin-Ponceau (Mikroskop-Kontrolle), 5 min Phosphorwolframsäure-Orange G und 15 min Lichtgrün.

9.2 Zusätzliche histologische Bilder

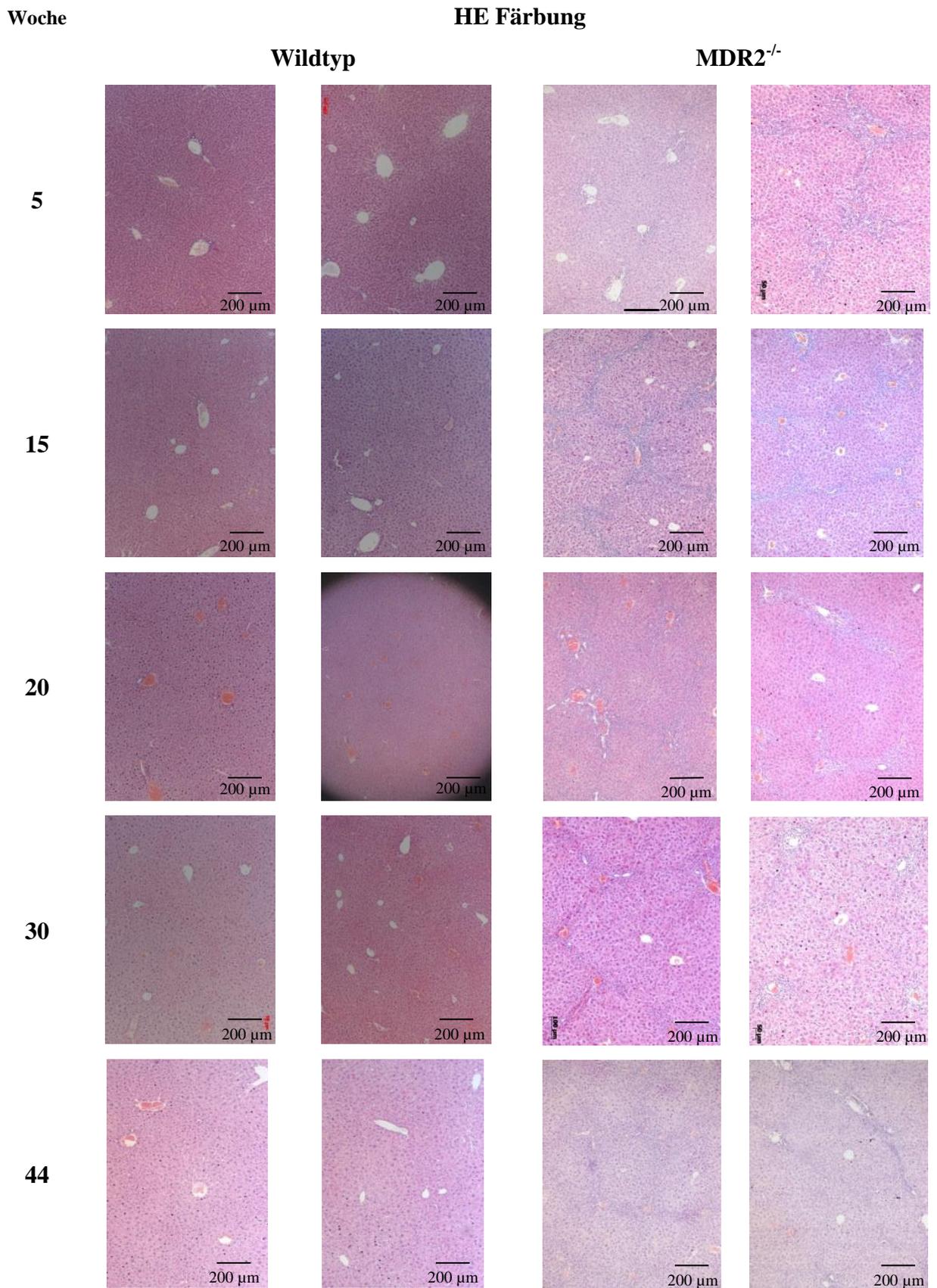


Abb. 9-1 zusätzliche Bilder der HE Färbung; Leber; Vergrößerung 10 ×

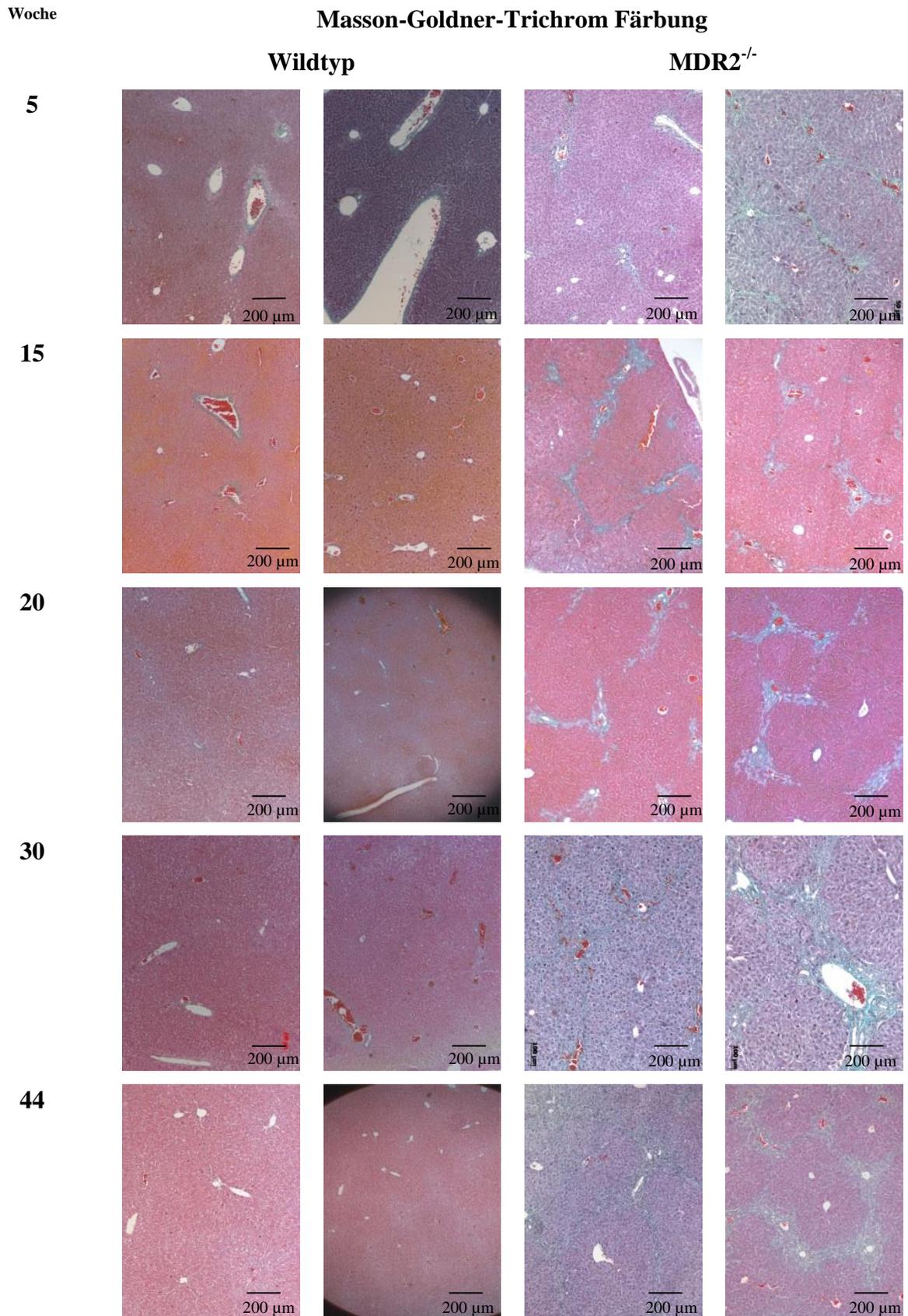


Abb. 9-2 zusätzliche Bilder der MGT Färbung; Leber; Vergrößerung 10 ×

9.3 Zusatzinformationen der verwendeten Primer

9.3.1 β -Aktin

>[NM_007393.3](#) Mus musculus actin, beta (Actb), mRNA

product length = 461

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 109 128

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 569 550

>[XM_003084589.1](#) PREDICTED: Mus musculus predicted gene 12715 (Gm12715), mRNA

product length = 461

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 97 T....T..... 116

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 557T....T..... 538

>[XM_003086368.1](#) PREDICTED: Mus musculus predicted gene 12715 (Gm12715), mRNA

product length = 461

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 120 T....T..... 139

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 580T....T..... 561

>[NM_009609.2](#) Mus musculus actin, gamma, cytoplasmic 1 (Actg1), mRNA

product length = 461

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 96 T....T..... 115

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 556T....T..... 537

>[NM_001145896.1](#) Mus musculus genetic suppressor element 1 (Gse1), transcript variant 2, mRNA

product length = 3060

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 97GGT..... 116

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 3156 A.....A.A..A.... 3137

>[NM_001167680.1](#) Mus musculus rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila) (Rhbf2), transcript variant 2, mRNA
product length = 188

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 1001 G.G..G...TG..... 1020

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 1188 ...G.....AC...T.. 1169

>[NM_172572.3](#) Mus musculus rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila) (Rhbf2), transcript variant 1, mRNA
product length = 188

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 1215 G.G..G...TG..... 1234

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 1402 ...G.....AC...T.. 1383

>[NM_028194.2](#) Mus musculus furry homolog-like (Drosophila) (Fryl), mRNA
product length = 2269

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 8428 G.C..GA.....T..... 8409

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 6160 .G.G.C...A..G..... 6179

>[NM_001004468.2](#) Mus musculus transforming, acidic coiled-coil containing protein 2 (Tacc2), transcript variant 3, mRNA

product length = 2070

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 5321 ..TA..G.....T...G. 5302

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 3252 TGC.....AA..A..... 3271

>NM_015830.1 Mus musculus small optic lobes homolog (Drosophila) (Solh), mRNA

product length = 2358

Forward primer 1 CGACAACGGCTCCGGCATGT 20

Template 2865 .TC..C.....AC....A 2846

Reverse primer 1 GCACAGTGTGGGTGACCCCG 20

Template 508 T.TGCC.....G..... 527

9.3.2 Osteocalcin

>NM_001037939.1 Mus musculus bone gamma carboxyglutamate protein (Bglap), transcript variant 2, mRNA

product length = 241

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 80 99

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 320 300

>NM_001165894.1 Mus musculus thymoma viral proto-oncogene 1 (Akt1), transcript variant 2, mRNA

product length = 384

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2125C..CAC..... 2144

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 2508GAC.....GC.... 2488

>NM_009652.3 Mus musculus thymoma viral proto-oncogene 1 (Akt1), transcript variant 1, mRNA

product length = 384

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2175C..CAC..... 2194

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 2558GAC.....GC.... 2538

>NM_001080769.1 Mus musculus UHRF1 (ICBP90) binding protein 1 (Uhrf1bp1), mRNA

product length = 7

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 7616A.CT..AG..... 7635

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 7622TGT..G...T... 7602

>[NM_139299.2](#) Mus musculus interleukin 31 receptor A (Il31ra), mRNA

product length = 19

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1077 .ACA.....A.....T... 1057

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1059 .ACAT.....C..T... 1079

>[NM_011881.3](#) Mus musculus G protein-coupled receptor kinase 1 (Grk1), mRNA

product length = 3751

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 4365 TGA..CT....T..... 4346

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 615 T.....GA.A....G 635

>[NM_001199136.1](#) Mus musculus microtubule-actin crosslinking factor 1 (Macf1), transcript variant 1, mRNA

product length = 1272

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3599 ...A..T..AT.G..... 3618

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 4870 G..T..CT...A.G..... 4850

>[NM_001145958.1](#) Mus musculus ciliary rootlet coiled-coil, rootletin (Crocc), transcript variant 2, mRNA

product length = 2643

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3082 .GT.....CA...C... 3101

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 5724 CT..A.TG.....C.... 5705

>[NM_172122.2](#) Mus musculus ciliary rootlet coiled-coil, rootletin (Crocc), transcript variant 1, mRNA

product length = 2643

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3335 .GT.....CA...C... 3354

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 5977 CT..A.TG.....C.... 5958

>NM_001033669.2 Mus musculus F-box and WD-40 domain protein 10 (Fbxw10), mRNA

product length = 1616

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 2786 A...T.G.....TCT.... 2766

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1171 .AG.....AC...A..... 1191

>NM_194348.3 Mus musculus ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae) (Atg2a), mRNA

product length = 1021

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1472 AG.T.....A.G.C..... 1452

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 452T.A....CA....C 472

>NM_177034.3 Mus musculus amyloid beta (A4) precursor protein binding, family A, member 1 (Apba1), mRNA

product length = 2391

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2991 GA...CTT...T..... 3010

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 5381 .AG...G.....CA..... 5361

product length = 840

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2991 GA...CTT...T..... 3010

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3830 .GG.....TT....C.. 3811

>NM_030256.2 Mus musculus B-cell CLL/lymphoma 9-like (Bcl9l), mRNA

product length = 1678

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 4455 ..CT...G.A..C.....C 4435

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 2778 ...T.CC..A.....C. 2798

>NM_134247.3 Mus musculus acyl-CoA thioesterase 4 (Acot4), mRNA

product length = 379

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 225 CGT.AC.....C 244

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 603 AA.....T.T.C.....G 583

>NM_001171615.1 Mus musculus myelin transcription factor 1 (Myt1), transcript variant 3, mRNA

product length = 688

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2937 CTT.....C.A...G.. 2956

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3624 T.....T.CTG..A... 3604

product length = 2179

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3624 T.....T.CTG..A... 3604

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1446 .A.A.CC.....G...T.. 1466

>NM_001171616.1 Mus musculus myelin transcription factor 1 (Myt1), transcript variant 2, mRNA

product length = 688

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3047 CTT.....C.A...G.. 3066

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3734 T.....T.CTG..A... 3714

product length = 2065

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3734 T.....T.CTG..A... 3714

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1670 .A.A.CC.....G...T.. 1690

>NM_008665.4 Mus musculus myelin transcription factor 1 (Myt1), transcript variant 1, mRNA

product length = 688

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3161 CTT.....C.A...G.. 3180

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3848 T.....T.CTG..A... 3828

product length = 2179

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3848 T.....T.CTG..A... 3828

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1670 .A.A.CC.....G...T.. 1690

>NM_001171680.1 Mus musculus myelin transcription factor 1 (Myt1), transcript variant 4, mRNA product length = 688

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 3127 CTT.....C.A...G.. 3146

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3814 T.....T.CTG..A... 3794

product length = 2179

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 3814 T.....T.CTG..A... 3794

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1636 .A.A.CC.....G...T.. 1656

>[NM_177214.4](#) Mus musculus small nuclear ribonucleoprotein 200 (U5) (Snrnp200), mRNA

product length = 2144

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2841 GAA.....G...A..C.. 2860

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 4984CG...CTC.....C 4964

>[NM_021877.2](#) Mus musculus hairless (Hr), mRNA

product length = 1537

Forward primer 1 ACCCTGGCTGCGCTCTGTCT 20

Template 2464 G..TG....TC.....A 2445

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 928 TG.....C.GA.C..... 948

>[NM_001164620.1](#) Mus musculus coiled-coil domain containing 157 (Ccdc157), transcript variant 1, mRNA

product length = 2787

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 4360 G..A..A.TG..G..... 4340

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1574 G..C..AG.....A..A.. 1594

>[NM_177616.3](#) Mus musculus coiled-coil domain containing 157 (Ccdc157), transcript variant 2, mRNA

product length = 2787

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 4496 G..A..A.TG..G..... 4476

Reverse primer 1 CCAGGGTCCTGGACATGGGGA 21

Template 1710 G..C..AG.....A..A.. 1730

9.3.3 Osteopontin

>[NM_009263.2](#) Mus musculus secreted phosphoprotein 1 (Spp1), mRNA

product length = 487

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 38 57

Reverse primer 1 CGGCCGTTGGGGACATCGAC 20

Template 524 505

>XM_973068.2 PREDICTED: Mus musculus complement C4-B-like, transcript variant 5 (LOC675521), mRNA
product length = 476

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 3860 A.CTG.....G...G. 3879

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 4335 .GG...A.....T.... 4316

>NM_001079932.3 Mus musculus tripartite motif-containing 72 (Trim72), mRNA

product length = 365

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 120 C.G.C.....T....A. 139

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 484 TTG.G....A..... 465

>NM_009780.2 Mus musculus complement component 4B (Childo blood group) (C4b), mRNA

product length = 476

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 3871 A.CTG.....G...G. 3890

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 4346 .GG...A.....T.... 4327

>NM_183034.1 Mus musculus pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 1 (Plekhm1), mRNA

product length = 4194

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 4983 ...C.....GT.GG.... 4964

Reverse primer 1 CGGCCGTTGGGGACATCGAC 20

Template 790 ...G.TC..A.....A 809

>[NM_199028.2](#) Mus musculus BEN domain containing 3 (Bend3), mRNA

product length = 448

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 1236 T..T.GAG.....A... 1217

Reverse primer 1 CGGCCGTTGGGGACATCGAC 20

Template 789 .CA...A.....C..A.. 808

>[NM_026853.1](#) Mus musculus ankyrin repeat and SOCS box-containing 11 (Asb11), mRNA

product length = 200

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 750 AA...AG.G.....T 769

Forward primer 1 GCAGTCTTCTGCGGCAGGCA 20

Template 949 TA...G.C..A.A..... 930

9.3.4 Osteoprotegerin

>[NM_008764.3](#) Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) (Tnfrsf11b), mRNA

product length = 287

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 251 270

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 537 518

>[NM_138651.6](#) Mus musculus CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2 (Cds2), mRNA

product length = 993

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 146 C.....T.....GG.... 165

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 1138 A.G.AT...T.....A 1119

>[NM_028801.2](#) Mus musculus mucin 5, subtype B, tracheobronchial (Muc5b), mRNA

product length = 4666

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 3789 .TGT..CT....C..... 3808

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 8454G.A.A...A.... 8435

>XR_105738.1 PREDICTED: Mus musculus hypothetical LOC100504021 (LOC100504021), partial miscRNA
product length = 69

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1299 G.G...T.T.....T... 1318

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1367 A.....G.GC.....A. 1348

>XR_106931.1 PREDICTED: Mus musculus hypothetical LOC100504021 (LOC100504021), partial miscRNA
product length = 69

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1299 G.G...T.T.....T... 1318

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1367 A.....G.GC.....A. 1348

>NM_023655.2 Mus musculus tripartite motif-containing 29 (Trim29), mRNA
product length = 1349

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 1971G..C..GG.....C 1952

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 623T..GCG.....A 642

>NM_018749.2 Mus musculus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D (Eif3d), mRNA
product length = 69

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 733 A.....G.GC.....A. 752

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 801 G.G...T.T.....T... 782

>NM_001003934.1 Mus musculus reticulon 3 (Rtn3), transcript variant 1, mRNA
product length = 3711

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 3733 .TG.T..C...C..... 3714

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 23 T.C...C.C.....T.. 42

>NM_053076.2 Mus musculus reticulon 3 (Rtn3), transcript variant 4, mRNA

product length = 1530

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 1544 .TG.T..C...C..... 1525

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 15 T.C...C.C.....T.. 34

>NM_001003933.1 Mus musculus reticulon 3 (Rtn3), transcript variant 2, mRNA

product length = 3654

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 3676 .TG.T..C...C..... 3657

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 23 T.C...C.C.....T.. 42

>NM_009871.2 Mus musculus cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35) (Cdk5r1), mRNA

product length = 532

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 674 ..G.....CT..T...A. 655

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 143 ..CCT.....G.T..... 162

>NM_001002897.3 Mus musculus ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae) (Atg9b), mRNA

product length = 2384

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 2501 GTCA...A.....G. 2482

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 118 A....T....TTG..... 137

>NM_028201.2 Mus musculus RIKEN cDNA 2210009G21 gene (2210009G21Rik), transcript variant 3, mRNA
product length = 1227

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 235 G.AA..T....G..... 254

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1461 .ACCA.....TG..... 1442

>NM_001038641.1 Mus musculus RIKEN cDNA 2210009G21 gene (2210009G21Rik), transcript variant 2, mRNA

product length = 1437

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 180 G.AA..T....G..... 199

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1616 .ACCA.....TG..... 1597

>NM_153535.2 Mus musculus family with sequence similarity 149, member A (Fam149a), mRNA

product length = 1538

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 1002 CCA.....AG.....A. 1021

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 2539 ..GAG.T.....G..... 2520

>NM_001167879.1 Mus musculus family with sequence similarity 59, member B (Fam59b), mRNA

product length = 604

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 846 C...T.C.C..C.....A 827

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 243 CC...T.A.C.....C 262

>XM_003084557.1 PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100502800 (LOC100502800), mRNA

product length = 363

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 26 G.A....GT.T.....T 45

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 388 A.A.TT.A...G..... 369

>[XM_003086302.1](#) PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100502800 (LOC100502800), mRNA

product length = 363

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 26 G.A...GT.T.....T 45

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 388 A.A.TT.A...G..... 369

>[NM_001168624.1](#) Mus musculus C2 calcium-dependent domain containing 4C (C2cd4c), transcript variant 2, mRNA

product length = 2691

Forward primer 1 TGTGCTGCGCACTCCTGGTG 20

Template 127 C...GG..AG.....C 146

Reverse primer 1 GGTGCGGTTGCACTCCTGCT 20

Template 2817 .CCA.....AA.....T. 2798

9.3.5 MDR2

>[NM_008830.2](#) Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 (Abcb4), mRNA

product length = 396

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 743 762

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1138 1119

>[NM_011075.2](#) Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B (Abcb1b), mRNA

product length = 396

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 699AA.... 718

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1094T..... 1075

>[XM_003084944.1](#) PREDICTED: Mus musculus cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like (LOC100504580), mRNA

product length = 1065

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 929 A.....A.CGG..... 948

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1993 TCC.....C..... 1974

>[XM_003085891.1](#) PREDICTED: Mus musculus cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like (LOC100504580), mRNA

product length = 1065

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 934 A.....A.CGG..... 953

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1998 TCC.....C..... 1979

>[NM_001164742.1](#) Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1F (Serpina1f), transcript variant 2, mRNA

product length = 124

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 817 AC...AT..... 836

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 940 .CT.....C..CT....A 921

>[NM_026687.2](#) Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1F (Serpina1f), transcript variant 1, mRNA

product length = 124

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1122 AC...AT..... 1141

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1245 .CT.....C..CT....A 1226

>[NM_001190404.1](#) Mus musculus amylase 2b (Amy2b), transcript variant 2, mRNA

product length = 570

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 655 A...C...G..G..... 674

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1224 T...TTT...T.....A 1205

>[NM_001190403.1](#) *Mus musculus* amylase 2b (Amy2b), transcript variant 1, mRNA

product length = 570

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 721 A...C...G..G..... 740

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1290 T...TTT...T.....A 1271

>[NM_001081374.1](#) *Mus musculus* protease, serine, 36 (Prss36), mRNA

product length = 1295

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 862 ...G...A.CT.....C 881

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 2156 CC.....TC.....G 2137

>[NM_030235.1](#) *Mus musculus* AVL9 homolog (*S. cerevisiae*) (Avl9), mRNA

product length = 693

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 2362A.C.TT.C..... 2381

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 3054 C..AG.....T...G.. 3035

>[NM_001113180.1](#) *Mus musculus* glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4) (Gria4), transcript variant 2, mRNA

product length = 4204

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 4975 T.T..CA....A..... 4956

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 772 ..GA..AG...T..... 791

>[NM_019691.4](#) Mus musculus glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4) (Gria4), transcript variant 1, mRNA

product length = 4204

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 4975 T.T..CA....A..... 4956

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 772 ..GA..AG...T..... 791

>[NM_133903.3](#) Mus musculus spondin 2, extracellular matrix protein (Spon2), mRNA

product length = 1652

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 58 A...C.A....G.....A 77

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1709 A.G.G....TG.....A 1690

>[NM_001081028.1](#) Mus musculus signal-induced proliferation-associated 1 like 3 (Sipa1l3), mRNA

product length = 1160

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 6002 CA.....C...C...C. 5983

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 4843 T...A.A.CA.....G 4862

>[NM_001113417.1](#) Mus musculus thyroid hormone receptor beta (Thrb), transcript variant 1, mRNA

product length = 267

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 891 ..C.....G.C.C..G.. 872

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 625 .A.TAT.....AA..... 644

>[NM_009380.3](#) Mus musculus thyroid hormone receptor beta (Thrb), transcript variant 2, mRNA

product length = 267

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 977 ..C.....G.C.C..G.. 958

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 711 .A.TAT.....AA..... 730

>NM_012037.2 Mus musculus vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica) (Vat1), mRNA

product length = 234

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1616 T.CT..T...C.....A. 1635

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 1849 ..G.CA..A.....A 1830

>NM_001177397.1 Mus musculus ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B (Anks1b), transcript variant 4, mRNA

product length = 382

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 2520 G.GA...C.T.....T.. 2501

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 2139 C..ATCC.....C 2158

>NM_172882.3 Mus musculus WD repeat and FYVE domain containing 3 (Wdfy3), mRNA

product length = 3489

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 6291 .ATC.G.A...G..... 6310

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 9779 .CCTG..A.....C.... 9760

>NM_001159519.1 Mus musculus phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAR amidotransferase) (Pfas), mRNA

product length = 678

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1761 CCC.....TTT..... 1742

Reverse primer 1 ATACCAGAAGGCCAGTGCAT 20

Template 1084 ..CAG...C.T.....C 1103

>NM_146155.3 Mus musculus AT hook, DNA binding motif, containing 1 (Ahdc1), mRNA

product length = 1904

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 2943 T.GG.C..A.....G... 2962

Forward primer 1 GGAATTGGTGACAAGGTTGG 20

Template 4846 A.CG.....AC....G.. 4827

10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. A. K. Nüssler möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Themas, die Möglichkeit die Arbeit in der von ihm geführten Abteilung durchführen zu können und für die zu jedem Zeitpunkt der Arbeit zuverlässige Betreuung bedanken.

Weiter gilt mein Dank Dr. rer. nat. S. Ehnert für professionelle Einführung in die Arbeitstechniken des Labors, die herzliche Betreuung und ständige Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. S Dooley für die Bereitstellung der Versuchstiere.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. J. Hengstler für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Ergebnisse.

Ich danke Yvonne Lau für die Erstellung der μ CT-Messungen.