

**Auswirkungen von Tenascin-C, -R und -C/R-Defizienz  
auf den skelettalen Phänotyp von Mäusen  
mit hohem Lebensalter**

vorgelegt von  
Miriam Herberholz  
aus Leipzig  
2005



Aus der Anatomischen Anstalt  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Putz

---

**Auswirkungen von Tenascin-C, -R und -C/R-Defizienz  
auf den skelettalen Phänotyp von Mäusen  
mit hohem Lebensalter**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von  
Miriam Herberholz  
aus Leipzig  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. F. Eckstein

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. V. Jansson

PD Dr. med. A. C. Muntau

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

10. November 2005

Für meine Familie

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht</b> .....	3
2.1 Die extrazelluläre Matrix (ECM).....	3
2.1.1 Aufbau und Zusammensetzung der ECM.....	3
2.2 Die Tenascin-Familie (Tenascin-C; -R;-X; -Y; -W).....	5
2.3 Molekülstruktur des Tenascin-C.....	7
2.4 Auftreten und Funktion des Tenascin-C in der ECM.....	8
2.5 Tenascin-R.....	11
2.6 Tenascin-C während der Skelettentstehung.....	12
2.6.1 Tenascin-C im Knorpelgewebe.....	12
2.6.2 Tenascin-C im Periost und im Knochen.....	13
2.6.3 Regulation der Tenascin-C-Expression im Knochen.....	16
2.7 Induktion der Tenascin-C-Synthese durch biomechanische Stimulation.....	17
2.8 Tiermodelle mit Tenascin-C- und Tenascin-R-Defizienz.....	18
2.9 Densitometrische und strukturelle Analyse der Knochen mit nicht-invasiven bildlichen Verfahren.....	19
2.9.1 Zwei-Energie-Röntgen Absorptiometrie (DXA).....	19
2.9.2 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT).....	21
<b>3. Studiendesign und Fragestellung</b> .....	24
<b>4. Material und Methoden</b> .....	25
4.1 Tiere.....	25
4.2 Ganzkörpermessung mit der DXA.....	25
4.3 Präparation und Entnahme der Knochen.....	26
4.4 Einzelknochenmessung mit der DXA.....	26
4.5 Einzelknochenmessung mit der pQCT.....	27
4.6 Statistische Analyse.....	28
<b>5. Ergebnisse</b> .....	29
5.1 Morphologische Veränderungen der Knockout-Tiere.....	29
5.2 Ganzkörpermessung mit der DXA.....	31
5.3 Einzelknochenmessung mit der DXA.....	33
5.4 Einzelknochenmessung mit der pQCT.....	35
5.4.1 Distale Femurmetaphyse.....	35
5.4.2 Femurdiaphyse.....	38
5.4.3 Wirbelkörper (L2-L4).....	41

<b>6. Diskussion</b> .....	45
6.1 Fragestellung und wichtigste Ergebnisse.....	45
6.2 Methodikdiskussion.....	46
6.2.1 Die Bedeutung der Maus als Knockout-Modell in der Forschung....	46
6.2.2 Auswahl der Tiere.....	46
6.2.3 DXA und pQCT als Methoden zur Untersuchung von Knochen.....	48
6.3 Ergebnisdiskussionen und Interpretationen.....	52
6.4 Schlussfolgerung.....	56
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	57
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	59
<b>9. Danksagung</b> .....	71
<b>10. Lebenslauf</b> .....	72

## 1. Einleitung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist der Ort relevanter Differenzierungsprozesse des Knorpel- und Knochengewebes (Mackie et al. 1987). Sie besteht unter anderem aus Glykoproteinen, die während Entwicklungsprozessen in verschiedenen Geweben als Mediatoren der Zelldifferenzierung sowie Zellproliferation fungieren (Hay 1992; Adams und Watt 1993).

Tenascin-C (TN-C) ist ein großes Glykoprotein der ECM und wurde als erstes Mitglied einer expandierenden Glykoproteinfamilie beschrieben (Mackie et al. 1998). Weitere Glykoproteine dieser Familie sind das Tenascin-R, Tenascin-X, Tenascin-Y und Tenascin-W.

Tenascin-R (TN-R) wurde erstmals unter der Bezeichnung „J1<sub>160/180</sub>“ als neurales Zelladhäsionsmolekül im zentralen Nervensystem beschrieben (Kruse et al. 1985; Crossin et al. 1986; Rathjen et al. 1991; Bartsch et al. 1993; Fuss et al. 1993). Tenascin-X (TN-X) wurde von Bristow und Mitarbeitern (1993) entdeckt und konnte später als ein essenzieller Bestandteil verschiedener Gewebe isoliert werden (Bristow et al. 1993; Lethias et al. 1996; Elferiou et al. 1997). Das Tenascin-Y (TN-Y) wurde von Hagios und Mitarbeitern (1996) charakterisiert, und es konnte ein Einfluss des Proteins auf das Zellwachstum nachgewiesen werden (Hagios et al. 1996; 1999). Weber und Mitarbeiter (1999) beschrieben ein weiteres Tenascinprotein mit der Bezeichnung Tenascin-W (TN-W), das sie aus Zebrafischgewebe isoliert hatten und dessen Synthese während der Skelettbildung erfolgte (Weber et al. 1998).

TN-C gilt als das am besten charakterisierteste Tenascinprotein (Mackie et al. 1998). Es wird vermutet, dass TN-C für die Verankerung der Zellen im umliegenden Gewebe verantwortlich ist. Es wurde sowohl im embryonalen als auch im adulten Gewebe nachgewiesen (Erickson et al. 1989). Weitere Bezeichnungen für TN-C sind: Cytotactin (Grumet et al. 1985), Hexabrachion (Erickson und Inglesias 1984), J1<sub>220/200</sub> Glykoprotein (Kruse et al. 1985), Myotendinous Antigen (Chiquet und Fambrough 1984) und GMEN (glioma mesenchymal extracellular matrix antigen, Bourdon et al. 1983).

Die erste Darstellung von TN-C erfolgte durch immunhistochemische Methoden. Chiquet und Fambrough (1984) wiesen TN-C im embryonalen Muskel- und Sehngewebe sowie in Teilen des embryonalen Hühnerskelettes nach. Mackie et al. (1987b) analysierten die Beteiligung von TN-C an der Knorpel- und Knochendifferenzierung in vivo und beobachteten einen fördernden Effekt auf die Knorpelentstehung in Hühnerembryonen in vitro.

Im embryonalen Gewebe wurde TN-C in Regionen mesenchymaler Kondensation, in der Brustdrüse und in der Zahnglocke nachgewiesen (Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Thesleff et al. 1987). Studien im adulten Gewebe belegten das Vorkommen des Proteins in der Haut (Jiang und Chuong 1992; Lightner et al. 1994), in Thymuszellen (Saga et al. 1992), im



Gewebe glatter Muskelzellen und in Nervenzellen (Grumet et al. 1985; Crossin et al. 1986), während der Wundheilung (Chuong et al. 1991) und während der Tumorentstehung (Chiquet-Ehrismann et al. 1986).

Bereits kurz nach der Identifizierung des TN-C-Moleküls wurde aufgrund der Lokalisation eine Beteiligung an den Entwicklungsprozessen der Knochen vermutet (Chiquet und Fambrough 1984a; Crossin et al. 1986; Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990; Mackie und Tucker 1992). Pacifici und Mitarbeiter (1993, 1995) postulierten, dass TN-C eine wichtige biomechanische Rolle beim Knorpelwachstum, und vor allem bei der Entwicklung des Skelettsystems spielt. Sie konnten TN-C in den sich entwickelnden Knorpelanlagen nachweisen und während der anschließenden Knorpelreifung zeigte sich ein Absinken der TN-C-Konzentration (Pacifici et al. 1993, 1995). Mackie und Mitarbeiter konnten das Protein um die Osteoblasten und deren Vorläuferzellen nachweisen und zeigten, dass diese Zellen sowohl in vivo als auch in vitro TN-C sezernierten (Mackie et al. 1987b; Mackie und Tucker 1992). In der Literatur wird dem Glykoprotein TN-C während des Wachstums und der Differenzierung der Osteoblasten eine wichtige Rolle zugesprochen. Dabei soll es eine Vermittlerfunktion zwischen Zellen und deren Umwelt wahrnehmen (Mackie und Ramsey 1996b).

Aufgrund dieser Tatsache stellten wir uns die Frage, inwieweit das Fehlen von TN-C Auswirkungen auf die Knochenentwicklung nach sich zieht. Hierzu verglichen wir 24 Monate alte TN-C-, TN-R- und TN-C/R-Doppel-Knockout (KO) Mäuse mit einer gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollgruppe. Unserer Untersuchung lag die Hypothese zugrunde, dass fehlendes TN-C, aufgrund seiner Beteiligung an Prozessen der Skelettentstehung und –aufrechterhaltung, zu einer Veränderung der Knochenstruktur führt, welche es erlaubt, seine Funktion im Knochen zu charakterisieren. Ziel der Untersuchung war daher eine nicht-invasive Analyse der Knochenmasse, Knochendichte und Knochenstruktur bei TN-C, -R, -C/R-KO-Tieren.

## 2. Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht

### 2.1 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

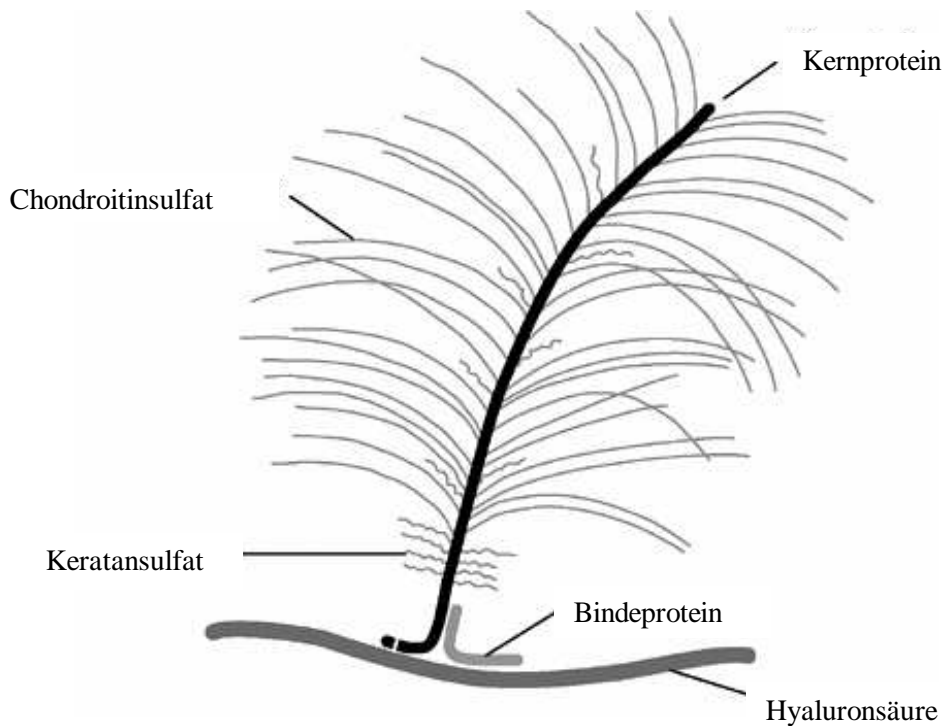
#### 2.1.1 Aufbau und Zusammensetzung der ECM

Die ECM gehört neben den Zellen zu den Hauptbestandteilen der Gewebe (Epithel-, Binde-, Muskel- oder Nervengewebe). Sie enthält im Wesentlichen zwei Komponenten: Fasern und amorphe Grundsubstanz. Die Fasern können in drei Gruppen unterteilt werden: Kollagenfasern, retikuläre und elastische Fasern. Der Anteil der Faserstrukturen in der ECM ist bestimmend für die mechanischen Eigenschaften des Gewebes. So findet man zum Beispiel im straffen Bindegewebe (Faszien, Sehnen und Bänder), welches mechanische Funktionen wahrnimmt, einen sehr hohen Anteil an Faserstrukturen. Das lockere Bindegewebe dagegen ist faserarm und besitzt einen hohen Anteil an Zellen. Diese Zellen unterscheidet man in spezifische Bindegewebszellen (Mesenchymzellen, Fibroblasten, Retikulumzellen) und eingewanderte (freie) Zellen (Makrophagen, Mastzellen, Plasmazellen).

Im Stützgewebe (Knochen und Knorpel) wird durch zusätzliches Einlagern von organischen Bestandteilen (z.B. Kalziumsalzen) eine hohe Festigkeit der ECM erreicht. Die amorphe Grundsubstanz, in welche die Zellen und Fasern eingebettet sind, besteht aus einer Zusammensetzung von interstitieller Flüssigkeit und verschiedenen Makromolekülen. Zu diesen zählt man die Proteoglykane, die Glykosaminoglykane (GAGs) sowie die Glykoproteine (Drenckhahn und Kugler 1994; Junqueira und Caneiro 1996).

Die Proteoglykane (s. Abb. 1) bilden eine Klasse von Molekülen, bestehend aus einem fadenförmigen Kernprotein („Coreprotein“) und Seitenketten, welche weiterhin aus sulfatierten Glykosaminoglykanen zusammengesetzt sind. Proteoglykane bilden als beinahe ubiquitär vorkommende Moleküle den Hauptteil der amorphen Grundsubstanz. Ihre Aufgaben, insbesondere diejenigen der Glykosaminoglykane, bestehen in der Einleitung der Kalzifizierung, der Wundheilung sowie der Regulation des Wassergehaltes der Bindegewebe. Weiterhin beeinflussen die zellgebundenen Proteoglykane die Adhäsion und Migration von Zellen der ECM und scheinen auch die Migration in der Embryonalphase zu kontrollieren. Perizelluläre Proteoglykane sind in der Lage Wachstumsfaktoren zu binden und gleichzeitig zu aktivieren (Drenckhahn und Kugler 1994; Junqueira und Caneiro 1996).

Glykosaminoglykane sind Polysaccharidketten und bestehen aus repetitiven (sich wiederholenden) Disaccharideinheiten, welche unter anderem die Seitenketten der Proteoglykane bilden. Aufgrund ihrer spezifischen Zusammensetzung, einer anionischen Gruppe und einem Aminozucker, sind die Glykosaminoglykane stark sauer (polyanionisch) und bevorzugen basische (kationische) Liganden.



**Abb. 1:** Schema der Struktur des Proteoglykans Aggrecan aus dem Knorpel, bestehend aus einem Kernprotein, an das verschiedene Glykosaminoglykanseitenketten gebunden sind (Beninghoff, Anatomie, Bd. 1)

Prinzipiell sind sulfatierte und nicht sulfatierte Glykosaminoglykane zu unterscheiden. Sulfatierte Glykosaminoglykane verleihen dem Gewebe eine feste Konsistenz, wobei hier als wichtigster Vertreter das Chondroitinsulfat zu nennen ist. Der Hauptvertreter der nicht sulfatierten GAGs ist die Hyaluronsäure. Diese bildet durch ihre stark wasserbindende Eigenschaft eine visköse bis gelartige Matrix und ist besonders im Knorpel sowie in der Gelenkflüssigkeit (Synovia) zu finden (Junqueira und Carneiro 1996). Im Gegensatz zu den Proteoglykanen weisen die Glykoproteine kurze nicht sulfatierte Kohlenhydratseitenketten auf. Diese Seitenketten bestehen aus Monosacchariden (Einfachzuckern) und sind an ein zentrales Protein („Coreprotein“) gebunden. Aufgrund dieser Zusammensetzung überwiegt der Proteinanteil in den Glykoproteinen. Die Hauptaufgabe der Glykoproteine besteht in der Verankerung der Zellen in ihrer umgebenden Matrix, wovon sich auch die Bezeichnung „Adhäsionsprotein“ ableitet. Ein Großteil dieser Proteine enthält das Sequenzmotiv Arginin-Glycin-Asparagin (RGD), mit dessen Hilfe die Bindung der Proteine an zelluläre Adhäsionsrezeptoren vom Typ der Integrine vermittelt werden kann. Diese Rezeptoren stehen in der Zelle mit dem kontraktiven Aktin-Myosin-Filamentsystem in Verbindung und sind somit in der Lage, Signale in die Zelle weiterzuleiten. Die zeitweilige Adhäsion der

Bindegewebszellen an die ECM stellt eine wichtige Voraussetzung für die Fortbewegung (Migration) der Zellen in der ECM dar. Über diese Integrine beeinflussen die Adhäsionsproteine weitere Prozesse, wie die Proliferation und Differenzierung freier Zellen, Embryonalzellen und auch Tumorzellen. Wichtige Vertreter der Adhäsionsproteine sind u.a. Fibronectin, Laminin sowie Tenascin.

## 2.2 Die Tenascinfamilie (TN-C; TN-R; TN-X; TN-Y; TN-W)

Die verschiedenen Mitglieder der Tenascinfamilie zählen zu den oligomerischen Glykoproteinen der ECM (Erickson et al. 1984; 1989). Der Begriff „Tenascin“ leitet sich aus dem Lateinischen ab und beinhaltet die Worte „tenere“ (ziehen) und „nasci“ (geboren werden). Die Bezeichnung „tenere“ weist auf die Expression in zugfesten Geweben hin, wie Sehnen- und Muskelgewebe. „Nasci“ bezieht sich auf die Synthese des Glykoproteins während der Organogenese (Chiquet-Ehrismann et al. 1986).

Die Bezeichnung Tenascin-C wurde erstmals durch Chiquet-Ehrismann et al. (1986) für das bereits bekannte Molekül „Myotendinous Antigen“ eingeführt. Zuvor hatten Chiquet und Fambrough (1984a, b) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers Komplexbildungen in Muskelsehnenverbindungen zwischen dem Antikörper und einem unbekanntem Antigen beobachtet und bezeichneten das Antigen als „Myotendinous Antigen“ (Antigen in Muskelsehnenverbindungen). Später beschrieben die Autoren mit Hilfe desselben Antikörpers ein mesenchymales Matrixprotein, das hauptsächlich während der Morphogenese von Zähnen, im Brüstdrüsengewebe und während der Tumorgenese gebildet wurde (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Besonders auffällig war das Auftreten des Proteins in den Kontaktzonen von Epithel und Mesenchym, die als Schnittstellen wichtiger embryologischer Prozesse galten (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Aufderheide et al. (1988) untersuchten die Präsenz dieses Proteins im Epithel und kamen zu dem Ergebnis, dass wachsendes Epithelgewebe Faktoren bildete, welche die TN-C-Synthese stimulierten.

Erickson und Taylor (1987), Chiquet-Ehrismann et al. (1988) und Hoffmann et al. (1988) postulierten nahezu gleichzeitig, dass Tenascin mit dem von Bourdon et al. (1983, 1985) beschriebenen menschlichen Protein „Glioma-mesenchymal extracellular matrix molecule“ (GMEM) identisch sei. Eine Identität wurde auch mit dem von Erickson und Inglesias (1984) beobachteten menschlichen „Hexabrachion“ und dem aus embryonalem Nervengewebe des Huhnes isolierten Cytotactin festgestellt (Grumet et al. 1985). Bei dem von Kruse et al. (1985) näher beschriebenen „J1<sub>220/200</sub>“-Glykoprotein, welches eine hemmende Funktion während Adhäsionsvorgängen zwischen Neuronen und Gliazellen

ausüben soll, konnte ebenfalls eine Homologie zum bekannten Tenascinmolekül nachgewiesen werden (Thor et al. 1987).

Nachdem weitere Mitglieder der Tenascinfamilie entdeckt wurden, bezeichnete man das erstbeschriebene Tenascinprotein dieser Familie als Tenascin-C, wobei das „C“ für die anfängliche Bezeichnung Cytotactin stand (Erickson 1993b). Tenascin-R (TN-R), auch bekannt als Restrictin, J1<sub>160/180</sub> oder Janusin (Rathjen et al. 1991; Nörenberg et al. 1992; Fuss et al. 1993), wurde durch Oligodendrozyten im Zentralen Nervensystem (ZNS) gebildet. Im späten Gestationszyklus konnte eine Expression während der frühen postnatalen ZNS-Entwicklung, den Myelinisierungsprozessen und im adulten Nervengewebe nachgewiesen werden (Pesheva et al. 1989, 2000; Rathjen et al. 1991; Bartsch et al. 1993; Angelov et al. 1998). TN-R wird vorzugsweise postnatal und im adulten Nervensystem synthetisiert (Crossin et al. 1986; Mackie et al. 1988b; Martini et al. 1990; Bartsch et al. 1992a; Carnemolla et al. 1999). Dies steht im Gegensatz zur Bildung des TN-C-Moleküls, welche hauptsächlich zu Zeiten der Embryogenese und nur sehr eingeschränkt im adulten Gewebe erfolgt (Riou et al. 1992; Faissner und Steindler 1995; Götz et al. 1996, 1997).

Tenascin-X weist eine Molekularmasse von 400 kDa auf (Bristow et al. 1993). Es wird durch ein Gen (XB-Gen) kodiert, welches auf dem menschlichen Chromosom 6 im „major histocompatibility complex“-Lokus (MHC) lokalisiert ist (Bristow et al. 1993). In verschiedenen Organen und Geweben kommt es zu Überschneidungen der Synthese von TN-X und TN-C. Dies wurde unter anderem in Sehnenfasern, der Haut, dem Herzen, den Nieren, der glatter Gefäßmuskulatur, im Verdauungstrakt sowie im Bindegewebe beschrieben (Bristow et al. 1993). Im Nervengewebe erfolgt die Synthese der beiden Proteine durch Astrozyten und Schwannsche Zellen (Matsumoto et al. 1994; Burch et al. 1995; Geffrotin et al. 1995; Hasegawa et al. 1997). TN-X wurde als essenzieller Gewebsbestandteil unter der Bezeichnung „Flexilin“ isoliert (Lethias et al. 1996; Elfteriou et al. 1997). Burch et al. (1997) wiesen den Zusammenhang zwischen einer fehlerhaften Synthese des TN-X-Proteins und dem daraus resultierenden Ehlers-Danlos-Syndrom nach. Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine Bindegewebsschwäche, die sich in einer Überstreckbarkeit der Gelenke, in Gefäßbrüchigkeit und Fehlfunktionen der Haut durch verzögerte Wundheilung äußert (Burch et al. 1997). Weitere pathologische Veränderungen durch Rekombinationen im entsprechenden Genabschnitt des Chromosom 6 oder als Folge von Mutationen des X-Proteins können sich in Form eines immunologischen Defizits, einer adrenalen Hyperplasie und einer juvenilen rheumatoiden Arthritis äußern (Jaatinen et al. 1999; Rupert et al. 1999; Yang et al. 1999).

Im Gegensatz zu den restlichen Familienmitgliedern enthält Tenascin-Y (TN-Y) ein zusätzliches Areal, welches durch einen Serin-Prolin-X Abschnitt (X steht für weitere Aminosäuren) charakterisiert ist (Hagios et al. 1996). Im embryonalen und adulten Hühnergewebe konnte gezeigt werden, dass TN-X im Skelett- und Herzmuskelgewebe das Zellwachstum beeinflusst (Hagios et al. 1999). Eine Koexpression mit TN-C konnte in Zellen der Lunge, der Haut und des Nierengewebes beobachtet werden (Hagios et al. 1996, 1999). Im Nervengewebe wurde das Protein mit einem polyklonalen Antikörper in Bindegewebsscheiden peripherer Nerven, in der Pia mater und in Blutgefäßen gefunden (Hagios et al. 1996, Tucker et al. 1999). Die Synthese im neuronalen Gewebe erfolgt durch Ependymzellen (Tucker et al. 1999).

Das derzeit "jüngste" Protein der Familie ist das Tenascin-W (TN-W). Es wurde von Weber et al. (1998) aus dem Gewebe des Zebrafisches isoliert. Es handelt sich hierbei um ein Protein, dessen Expression während der Neuralrohrentwicklung und während der Entstehung des knorpeligen Skeletts erfolgt. TN-W ist neben dem TN-C das einzige Protein dieser Glykoproteinfamilie, welches im wachsenden Skelett exprimiert wird (Weber et al. 1998).

### 2.3 Molekülstruktur von Tenascin-C

Der Name Hexabrachion, welcher unter anderem für TN-C verwendet wurde, basiert auf elektronenmikroskopischen Beobachtungen und beschreibt die sechsarmige Struktur des Proteins (Erickson und Inglesias 1984) (s. Abb. 2). Ein zentraler elipsoider Kern dient als Ausgangspunkt von sechs Armen. Diese homologen Segmente setzen an den gegenüberliegenden spitzen Enden des elipsoiden Kerns mit je drei Segmenten an. Die beiden gegenüberliegenden Verzweigungspunkte der drei Arme werden aufgrund ihrer T-ähnlichen Struktur als Trimer bezeichnet (Erickson und Inglesias 1984; Taylor et al. 1989). Sie vereinigen sich zu einer so genannten gewundenen „coiled-coil“ Helix, deren Struktur zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert wird (Jones et al. 1989; Spring et al. 1989; Nies et al. 1991). Jenseits dieser Tripelhelix trennen sich die Arme auf, verlaufen weiter in einem dünneren proximalen sowie einem dickeren distalen Abschnitt und enden jeweils in einer kleinen globulären Domäne (Erickson und Inglesias 1984; Chiquet-Ehrismann et al. 1988).

Der proximale Teil jedes Armes beginnt mit einer Amino-(N-) Terminus-Domäne, die 84 Aminosäuren aufweist. Dieser Domäne folgen sich wiederholende Sequenzen (Siri et al. 1991), wobei jede dieser Sequenzen aus 31 Aminosäuren besteht. Diese sind in ihrem Aufbau dem epithelialen Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“, EGF) ähnlich. Aus dem Grund erhielt dieser Proteinabschnitt die Bezeichnung EGF-ähnliche Domäne (EGF-like;

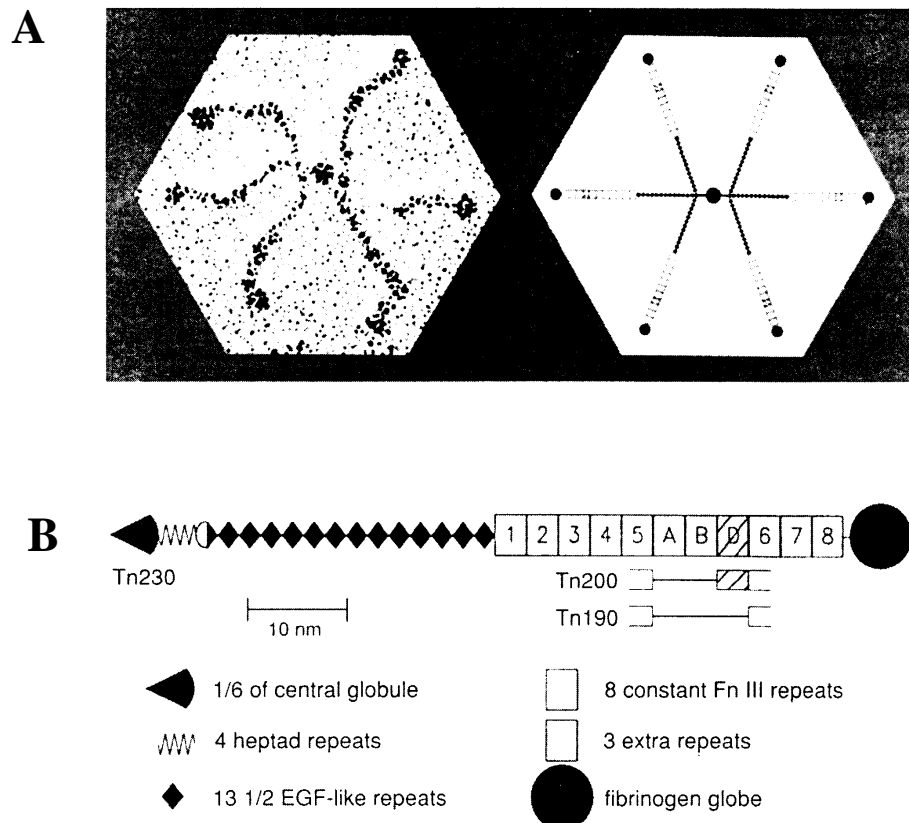
EGFL) (Bourdon et al. 1983; Jones et al. 1989; Spring 1989; Nies et al. 1991; Siri et al. 1991).

Der Aufbau des TN-C Moleküls weist bei verschiedenen Spezies in der Regel eine Analogie von circa 90% auf, lediglich die Anzahl der repetitiven Domänen variiert stärker (Jones et al. 1988; Gulcher et al. 1989; Saga et al. 1991). So besitzt das TN-C-Molekül des Huhns 13 ½ EGFL-Domänen (Bourdon et al. 1983; Jones et al. 1988,1989; Spring 1989; Nies et al. 1991; Siri et al. 1991) und das des Menschen und der Maus 14½ Domänen (Weller et al. 1991). Diesem EGFL-Abschnitt folgt ein dickerer Teil, der sich ebenfalls aus repetitiven Einheiten zusammensetzt. Eine der Sequenzen besteht aus 90 Aminosäuren (Nies et al. 1991) und ist den Domänen des Moleküls Fibronektin sehr ähnlich (Pierschbacher et al. 1982, Jones 1989; Nies et al. 1991). Folglich bezeichnete man diese Sequenzen als Fibronektin-Typ-III-homologe Domänen (FN-III). Acht dieser FN-III-Segmente (FN1-FN8) bilden sowohl beim Menschen als auch beim Huhn einen konstanten Bestandteil der TN-C-Struktur (Spring et al. 1989; Erickson et al. 1993b). Zwischen dem 5. und 6. FN-Segment können zusätzliche, durch alternatives Spleißen gebildete, Domänen eingefügt werden und dadurch eine Vergrößerung des Moleküls bewirken (Spring et al. 1989; Nies et al. 1991; Sriramaro et al. 1993a). Die Möglichkeit dieser strukturellen Variabilität erklärt die verschiedenen Isoformen des TN-C-Proteins (Jones et al. 1988; Spring et al. 1989), dessen Größe zwischen 190 kDa – 320 kDa betragen kann (Erickson und Inglesias 1984; Nies et al. 1991). Das Gesamtgewicht eines TN-C-Moleküls beläuft sich nach Angaben von Taylor et al. (1989) auf  $1.9 \times 10^6$  Dalton. Die Fibronektin-Domäne enthält zusätzlich eine spezifische Arginin-Glycin-Asparagin (RGD)-Sequenz, die während Zelladhäsionsprozessen eine wichtige Rolle spielt (Pierschbacher et al. 1984; Friedländer et al. 1988). Die FN-Domäne wurde sowohl beim Menschen als auch beim Huhn identifiziert und scheint bei der Maus durch eine RVD-Sequenz ersetzt worden zu sein (Saga et al. 1991; Weller et al. 1991; Joshi et al. 1993; Prieto et al. 1993, Sriramarao et al. 1993b). Die abschließende C-Terminusdomäne des Moleküls ähnelt in ihrer Sequenz dem Karboxyterminus des Fibrinogenmoleküls (fbg) (der Beta ( $\beta$ )- und Gamma( $\gamma$ )-Kette) und wurde als TN-Cfbg bezeichnet (Joshi et al. 1993).

#### **2.4 Auftreten und Funktion von Tenascin-C in der ECM**

Aufgrund seiner Multidomänenstruktur ist TN-C in der Lage Interaktionen mit Zellen der ECM und anderen Matrixkomponenten einzugehen (Mackie und Ramsey 1996a). Abhängig vom Zelltyp kann TN-C Prozesse der Zellproliferation stimulieren oder hemmen (End et al. 1992). Viele Studien haben TN-C als ein anti-adhäsives Protein beschrieben (Grumet et al.

1985; Kruse et al. 1985; Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Mackie et al. 1987b; Lotz et al. 1989). Andere Studien betrachteten TN-C eher als Adhäsionsprotein (Chiquet-Ehrismann et al. 1988; Spring et al. 1989; Friedländer et al. 1988; Bourdon und Ruoslahti, 1989; Lightner et al. 1990; Aukhil et al. 1990; Prieto et al. 1992).



**Abb. 2:** Bildliche und schematische Darstellung des TN-C-Moleküls

**A:** Elektronenmikroskop **B:** Strukturelle Domänen und einzelne Untereinheiten

(Chiquet-Ehrismann, 1995)

Zu seinen Liganden zählen auch Mitglieder der Integrinfamilie (Prieto et al. 1992), einige Zelladhäsionsmoleküle, der Transmembranrezeptor Phosphacan (Aukhil et al. 1993; Barnea et al. 1994; Milev et al. 1997) und Annexin II (Chung und Erickson 1994; Chung et al. 1996). Weitere Liganden sind das Molekül Fibronectin (Chiquet-Ehrismann et al. 1991; Chung et al. 1995; Hauzenberger et al. 1999) sowie einige Chondroitinsulfatproteoglykane (Vaughan et al. 1987; Aspberg et al. 1997). Die Interaktionen der Moleküle untereinander sind abhängig von der flexiblen Isoform des TN-C-Moleküls. Aufgrund der verschiedenen



Isoformen des Moleküls ist es in der Lage Verbindungen mit bevorzugten Liganden einzugehen. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine 190 kDa Isoform des TN-C-Moleküls eine stärkere Affinität zu dem Molekül Fibronectin aufweist als ein TN-C-Molekül mit einer größeren Masse (Chiquet-Ehrismann 1991).

Als zelluläre TN-C-Rezeptoren dienen unter anderem Oberflächenintegrine (Joshi et al. 1993; Sriramarao et al. 1993b). Die Adhäsion zwischen TN-C und den Integrinen wird zum Teil durch die RGD – Sequenz des TN-C-Moleküls vermittelt.

Zu den adhäsiven Segmenten des TN-C, die im proximalen Molekülabschnitt lokalisiert sind, gehören die Fibronectinsegmente (FN1 und FN2) und die terminale Fibrinogendomäne (fbg), die mit einer Kalziumbindungsstelle versehen ist (Friedländer et al. 1988; Nörenberg et al. 1992; Prieto et al. 1992; Aukhil et al. 1993; Joshi et al. 1993). Mit der am Ende des Moleküls gelegenen Fibrinogendomäne kann TN-C an Zellen binden, die mit Oberflächenproteoglykanen und Integrinen ausgestattet sind, und durch diese Verbindung werden diese Zellen an einer Veränderung ihrer Zellform gehindert (Aukhil et al. 1993; Joshi et al. 1993; Sriramarao et al. 1993b). Hingegen scheint dieser hemmende Einfluss bei einer Adhäsion an das proximale FN-Segment des TN-C-Moleküls nicht vorzuliegen (Prieto et al. 1992). Der ebenfalls am Ende gelegene FN 7-8 Abschnitt des TN-C Proteins (TN-Cfn7-8) kann sowohl einen adhäsiven und einen anti-adhäsiven Effekt auf Zellen ausüben, jedoch scheinen die anti-adhäsiven Eigenschaften zu überwiegen (Prieto et al. 1992).

Das Expressionsmuster von TN-C ist abhängig von dem jeweiligen Entwicklungsstadium des Gewebes. Die Synthese des Proteins erfolgt im embryonalen Gewebe an Stellen mesenchymaler-epithelialer Interaktionen und in Gebieten mesenchymaler Kondensation (Chiquet-Ehrismann et al. 1995). TN-C wird während der Embryogenese der Brustdrüse, im Zahngewebe (Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Thesleff et al. 1987), in der Tubulogenese der Nieren (Aufderheide et al. 1987), im Urogenitalsinus (Takeda et al. 1988) und im kleinen Intestinum (Aufderheide und Ekblom 1988) nachgewiesen. TN-C wurde auch in nicht-epithelialen Geweben wie in Sehnen und Bändern, im Knorpel und im Periost des wachsenden Knochens (Chiquet und Fambrough 1984a; Crossin et al. 1986; Vaughan et al. 1987; Mackie et al. 1987b; Tan et al. 1987), in der glatten Muskulatur und in Muskelsehnenverbindungen (Grumet et al. 1985) gefunden. Im Granulationsgewebe der Haut konnte eine starke Akkumulation des Proteins während der Wundheilungsprozesse beobachtet werden (Mackie et al. 1988a; Lightner et al. 1989).

Im Nervensystem wurde das Auftreten und die Beteiligung von TN-C an verschiedenen Orten und während unterschiedlicher Entwicklungsstadien gezeigt (Steindler

1989; Miragall et al. 1990; Bartsch et al. 1994; Faissner 1996, 1997; Götz et al. 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Proteindomänen und deren verschiedenen Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen, beeinflusst TN-C auch die Bildungs-, Ausdehnungs- und Wachstumsprozesse von Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass TN-C ein Sistieren der Wachstumsprozesse von Nervenzellen hervorruft (Spring et al. 1989; Murphy-Ullrich et al. 1991; Prieto 1992; Chung et al. 1996; Chung und Erickson 1997; Fischer et al. 1997; Jones und Jones 2000).

Im Rahmen der Regulation der TN-C-Synthese wurden im ZNS weitere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren identifiziert (Edelmann und Jones 1992; Copertino et al. 1995; Gherzi et al. 1995; Mitrovic et al. 1996).

Weiterhin konnte während der Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS) im Vergleich zum ZNS eine verminderte Konzentration des Tenascin-C-Proteins nachgewiesen werden (Wehrle-Haller et al. 1991; Martini 1994).

Unter pathologischen Bedingungen wurde das Glykoprotein in mesenchymalen Tumoren und in Karzinomen gefunden (Bourdon et al. 1983; Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Mackie et al. 1987a; Lightner et al. 1989). Hier synthetisierten Stromafibroblasten das TN-C-Protein. Dieser Prozess wurde durch Zytokine, insbesondere durch TGF- $\beta$  induziert (Pearson et al. 1988; Erickson 1989; Chiquet-Ehrismann 1990). In pathologisch verändertem Knochenmark konnte vor allem in Geweben mit verstärkter Fibroseaktivität und mit erhöhtem Gehalt an retikulären Fasern eine hohe TN-C-Konzentration nachgewiesen werden. Auch im osteoarthritischen Knorpelgewebe wurde ein erhöhter TN-C-Gehalt nachgewiesen (Chevalier et al. 1994). Im Gegensatz dazu zeigte sich im aplastischen und hypoplastischen Knochenmark kein TN-C (Soini et al. 1993).

## 2.5 Tenascin-R

Tenascin-R (TN-R) wurde erstmals unter dem Namen „J1<sub>160/180</sub>“ von Kruse et al. (1985) erwähnt. Synthetisiert wird das Protein im ZNS von Gliazellen, Fibroblasten und Neuronen (Kruse et al. 1985). Die Expression erfolgt hauptsächlich im adulten Nervengewebe durch Inter- und Motoneurone und konnte speziell in der Retina, im Cortex, im Cerebellum, im Hirnstamm und im Rückenmark beobachtet werden (Bartsch et al. 1993; Fuss et al. 1993; Angelov et al. 1998; Hagihara et al. 1999). Die Anordnung des Proteins erfolgt in Form von Di- bzw. Trimeren (Pesheva et al. 1989, 2000; Nörenberg et al. 1992). TN-R wird nicht im peripheren Nervensystem und auch nicht in anderen Organen des Körpers gebildet (Pesheva et al. 1989, 2000). Die Bildung des TN-R-Proteins im ZNS wird unter anderem durch

Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie durch den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) reguliert (Angelov et al. 1998). Während Regenerationsvorgängen und pathologischer Prozesse wird die Synthese des Proteins im ZNS reduziert und der Grund dafür scheinen die anti-adhäsiven Eigenschaften des TN-R-Proteins zu sein. Diese Eigenschaften können durch die verminderte Synthese vermindert wirken und somit findet eine Regulation statt (Angelov et al. 1998).

## **2.6 Tenascin-C während der Skelettentstehung**

Die ECM des Knochens ist nicht nur für Regulationsvorgänge der Zellen von Bedeutung, sondern gewährleistet auch eine der Haupteigenschaften von diesem Gewebe: seine mechanische Festigkeit und Stützfunktion (Gehron Robey P. 1989).

### ***2.6.1 Tenascin-C im Knorpelgewebe***

In der Arbeit von Chiquet und Fambrough (1984a) wurde erstmals die Hypothese formuliert, dass TN-C an der Knorpel- und damit auch an der Gelenkentwicklung beteiligt ist. Die Autoren versetzten die ECM von Hühnerembryonen mit einem monoklonalen Antikörper und nannten die Struktur, gegen welche der Antikörper reagierte, „Myotendinous Antigen“. Sie stellten fest, dass dieses Antigen auch im Perichondrium und entlang der Diaphyse von embryonalem Knorpelgewebe in Erscheinung trat. In einem späteren Entwicklungsstadium zeigte sich das Molekül im Muskel- und Sehngewebe sowie im epiphysären Bereich des Knochens. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass das Protein als Matrixkomponente des Perichondriums eine biomechanische Rolle während des Knorpelwachstums sowie der Skelettogenese spielt (Pacifci et al. 1993; Pacifci 1995).

Auch Mackie et al. (1987b) wiesen mit Antikörpern das Auftreten von TN-C im embryonalen Knorpel- und Knochengewebe während verschiedener Entwicklungsstadien nach. TN-C wurde in dem verdichteten embryonalen Mesenchym des Knorpels gefunden. Das umgebende, nicht-knorpelige, mesenchymale Gewebe hingegen war TN-C frei. Mit fortschreitender Differenzierung des Knorpelgewebes ließ der Gehalt an TN-C zusehends nach, blieb jedoch im Perichondrium unverändert (Mackie et al. 1987b). Das embryonale Perichondrium gilt als Ausgangspunkt für Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt zu Chondroblasten differenzieren. Im Vergleich zum fetalen Perichondrium, welches als Wachstumsgrundlage für viele Prozesse gilt, enthält adultes Perichondrium weniger TN-C, da dieses lediglich zu Regenerationszwecken im reifen Knorpel dient.

Untersuchungen an Flügelknospenzellen von Hühnerembryonen zeigten eine Stimulation des Wachstums und der Differenzierung der Knorpelzellen durch exogenes TN-C, und die TN-C-Antikörper bewirkten eine Hemmung dieser Prozesse (Chiquet und Fambrough 1984a, b; Mackie et al. 1987b; Chuong et al. 1993). Auch Hoffmann et al. (1988) und Väkevä et al. (1990) fanden das Protein in unreifen Knorpelzellen und im Perichondrium sowie im Peri- und Endost des intramembranösen Knochengewebes. Weitere Studien konnten zeigen, dass TN-C sowohl während der Entstehung des Knorpels als auch bei postnatalen Entwicklungsvorgängen einen Einfluss auf das Verhalten der Knorpelzellen ausübt (Pacifci et al. 1993; Pacifci 1995). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die TN-C-Synthese ausschließlich in Zellen abläuft, welche die Gelenkoberfläche bilden und keiner weiteren Knorpeldifferenzierung unterzogen werden (Pacifci et al. 1993). Auch die Ergebnisse von Mackie und Ramsey (1996a) wiesen darauf hin, dass TN-C bei der frühen Induktion der Knorpelbildung in vivo eine wichtige Rolle spielt, jedoch nicht bei der Aufrechterhaltung und Ausdifferenzierung der Knorpelzellen (Mackie und Ramsey 1996a).

### ***2.6.2 Tenascin-C im Periost und im Knochen***

Das Periost spielt eine Schlüsselrolle bei Umbau- und Reparationsprozessen des Knochens und stellt eine Quelle für Knochen- und Knorpelvorläuferzellen dar (Enneking 1948; Basset 1962; Hall 1970, Caplan 1988). Die Beteiligung an embryonalen Prozessen sowie ein darauf folgendes Verschwinden von TN-C aus der reifen Matrix ist in verschiedenen Geweben beschrieben worden. Das Periost ist jedoch eines der wenigen Strukturen, die auch im reifen Zustand TN-C enthalten (Koyama et al. 1996). Während der frühen Periostentwicklung konnte in der inneren Periostschicht in der wachsenden Diaphyse eine erhöhte TN-C-Konzentration nachgewiesen werden (Koyama et al. 1996). Im epiphysären Periost wurde dagegen eine geringe Menge an TN-C nachgewiesen, der metaphysäre Bereich schien frei von TN-C zu sein. Zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt konnte kurzzeitig ein Anstieg des Proteingehalts in allen drei Bereichen des Periosts beobachtet werden, der aber während der intramembranösen Ossifikation im diaphysären und metaphysären Bereich wieder absank (Koyama et al. 1996). Weiterhin wurde TN-C um die Periostzellen herum und um die vom Periost her einwandernden Vorläuferzellen nachgewiesen (Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990; Lukinmaa et al. 1991).

Die Entwicklung der langen Röhrenknochen durchläuft eine Vielzahl von Stadien, die Veränderungen der Zellphänotypen und des morphologischen Erscheinungsbildes sowie der Zusammensetzung der ECM beinhalten (Fell 1925; Hall 1970). Zu Beginn verdichten sich

Mesenchymzellen und differenzieren anschließend in Knorpelzellen, welche nun knorpelige Skelettelemente bilden. Daraufhin erfolgt eine Separierung dieser Elemente vom umliegenden Gewebe durch Perichondrium, welches sich später in Periost umwandelt (Fell 1925; Hall 1970; Hinchliffe und Johnson 1983; Pechak 1986). In der Diaphyse beginnen die Knorpelzellen zu hypertrophieren und werden im Laufe der Entwicklung durch Knochenvorläuferzellen ersetzt. Diese ursprünglich vom Periost her eingewanderten Zellen bilden später das Knochenmark und den trabekulären Knochen. Die Knorpelzellen der Epiphyse werden nach und nach zu Gelenkknorpel umgewandelt (Bassett 1962; Hall 1970; Caplan 1988).

Aufgrund seiner Lokalisation wurde schon zu Beginn der Identifizierung von TN-C eine Beteiligung an den Entwicklungsprozessen der Knochen vermutet (Chiquet und Fambrough 1984a; Crossin et al. 1986; Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990; Mackie und Tucker 1992; Pacifici et al. 1993). Während der Skelettogenese wurde TN-C im kondensierten Mesenchym der embryonalen Knochen, in den primären Ossifikationszentren des endochondralen Knochens und im Periost des reifen mineralisierten Gewebes nachgewiesen (Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990). Weitere Untersucher fanden das Protein um die Osteoblasten und deren Vorläuferzellen und zeigten, dass diese Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* TN-C sezernierten (Mackie et al. 1987b; Mackie und Tucker 1992).

Weiterhin wurde die Expression von TN-C an der Grenze zwischen den hypertrophierten Knorpelzellen und den Knochenvorläuferzellen nachgewiesen. Es fanden sich TN-C-Anreicherungen zwischen der Wachstumsfuge und der Epiphyse sowie an der Trabekeloberfläche der sekundären Ossifikationszentren und in den Osteozytenlakunen (Mackie und Ramsey 1996a). Da die primäre Spongiosa der Knochenmetaphyse TN-C-negativ war, in den sekundären Ossifikationszentren jedoch TN-C nachgewiesen werden konnte, konnte gezeigt werden, dass Osteozyten erst nach einer gewissen Verweildauer in der Knochenmatrix die Fähigkeit zur TN-C-Synthese erlangen (Mackie und Ramsey 1996a).

Um den Einfluss von TN-C auf die Osteoblasten genauer zu untersuchen, wurde das Verhalten von Knochenzellen in Gegenwart von TN-C mit dem Verhalten der Zellen in Gegenwart von Fibronektin und Tenascin-C-Antikörpern verglichen. Die Zellen ohne TN-C waren in der Lage ihre Zellform stark zu verändern und dadurch feste Verbindungen mit anderen Liganden, wie Fibronektin einzugehen. Es zeigte sich weiterhin eine signifikante Reduktion der Kollagensynthese und eine erniedrigte Konzentration der alkalischen Phosphatase (Mackie und Ramsey 1996b). Beide Parameter galten in diesem Zusammenhang als Marker für den Differenzierungsgrad der Osteoblasten während ihrer Entwicklung.

Dagegen wiesen die Zellen in Gegenwart von TN-C kaum Veränderungen ihrer Zellform auf und bildeten schwache Zellverbindungen aus (Mackie und Tucker 1992; Mackie und Ramsey 1996b).

Abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium der Osteoblasten übte TN-C einen unterschiedlichen Einfluss auf Knochenzellen aus (Mackie und Ramsey 1996b). Die Proliferation reifer Knochenzellen wurde durch TN-C tendenziell supprimiert. Hingegen wurde kein hemmender Einfluss auf unreife Osteoblasten nachgewiesen, unabhängig von ihrer jeweiligen Zellform.

Untersuchungen über die Verteilung der TN-C-Isoformen während der endochondralen Ossifikation zeigten, dass Fibroblasten und Mesenchymzellen TN-C-Isoformen mit einer Größe von 190 kDa, 200 kDa und 230 kDa exprimierten (Vaughan et al. 1987; Prieto et al. 1990; Mackie und Tucker 1992; Derr et al. 1997; Mackie und Murphy 1998). Die größte Isoform mit 230 kDa wurde im Periost und in den primären Ossifikationszentren der Diaphyse gefunden. Chondrozyten exprimierten die 190 kDa und 200 kDa Isoformen. Die peripheren Knorpel- und Knochenvorläuferzellen, welche hauptsächlich im Periost vorkommen, waren in der Lage alle drei Varianten (190 kDa, 200 kDa und 230 kDa) zu bilden (Mackie und Murphy 1998). Die unterschiedliche Verteilung der TN-C-Moleküle ließ die Autoren vermuten, dass die verschiedenen Isoformen jeweils andere Effekte auf die Knochenbildung ausüben. Hierfür fehlen jedoch bislang eindeutige Belege (Mackie und Murphy 1998).

Eine Hemmung der TN-C-Expression im Knochen konnte durch Glukokortikoide induziert werden. Glukokortikoide beeinflussen unter anderem die Zusammensetzung der ECM und die Blutbildung im Knochenmark (Ekblom et al. 1993). Hier findet sich TN-C in den Intersinusoidalräumen entlang der Knochenmarkszellen und in den Arterienwänden der Gefäße. Der Einfluss des Proteins im Knochenmark besteht unter anderem darin, die Adhäsion von Monozyten und Knochenmarkszellen an Fibronectin zu unterstützen (Chiquet-Ehrismann et al. 1988, 1991; Erickson und Bourdon 1989). In glukokortikoiddefizienten Knochenmarkskulturen konnte ein vermehrter Gehalt an TN-C nachgewiesen werden, und es zeigte sich entsprechend den anti-adhäsiven Eigenschaften des Glykoproteins eine verringerte Adhäsion der hämatopoetischen Zellen zu den Komponenten der ECM und zum Stroma sowie eine verminderte Hämatopoese (Ekblom et al. 1993).

In der Matrix des reifen Knochengewebes und um die Kollagen Typ III Fasern im Knochen konnte fast kein TN-C nachgewiesen werden (Mackie et al. 1987b; Carter et al. 1991). Während Knochenneubildungs- und -remodellingsprozessen zeigte sich jedoch ein

erneuter Anstieg der TN-C-Konzentration (Mackie et al. 1987b; Mackie und Ramsey 1996a). In diesem Zusammenhang wurde die Vermutung geäußert, dass TN-C als Vermittler zwischen den Knochenzellen und deren Umgebung fungiert, so dass Osteoblasten in ihrer Differenzierung und Funktion adäquat auf Veränderungen und äußere Einflüsse wie Wachstumsfaktoren, Hormone und mechanische Spannungen reagieren können (Mackie und Ramsey 1996b).

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Befunde darauf hin, dass TN-C während des Wachstums, der Differenzierung und Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktionen eine wichtige Rolle spielt. Es stellt einen Vermittler zwischen den Zellen und deren Umwelt dar und scheint somit für eine optimale Anpassung der Zellen verantwortlich zu sein (Mackie und Ramsey 1996b). Aufgrund dieser Tatsachen kann man sich vorstellen, dass das Fehlen von TN-C eine nachweisbare Veränderung in der Entwicklung der Osteoblasten nach sich zieht.

### ***2.6.3 Regulation der TN-C-Expression im Knochen***

Die Stimulation der TN-C-Bildung im Skelett erfolgte unter anderem durch den Wachstumsfaktor „transforming growth factor beta“ (TGF- $\beta$ ) (Pearson et al. 1988; Chiquet-Ehrismann et al. 1989; Sakai et al. 1994). TGF- $\beta$  ist im Knochen der am ubiquitärsten vorhandene Wachstumsfaktor und gilt als ein Hauptstimulator der Zellproliferation und Produktion von ECM (Roberts et al. 1988; Hock et al. 1990; Bonewald et al. 1994). In verschiedenen Arbeiten konnte im Knochen durch exogen zugeführtes TGF- $\beta$  eine Neubildung von Knochensubstanz induziert werden (Pheilschifter et al. 1987; Noda et al. 1989; Marcelli et al. 1990).

Weitere Wachstumsfaktoren und Zytokine, die neben TGF- $\beta$  an der Regulation der TN-C-Synthese beteiligt waren, sind der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) (Tucker 1993), Activin (Umbhauer et al. 1992), Plättchen-aktivierender Wachstumsfaktor (PDGF), das Hormon Angiotensin-II (Mackie et al. 1992), Interleukin-I, IV (IL-I, IV) (McCachren et al. 1992), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Wakabayashi et al. 1997) und verschiedene Serumfraktionen (Vrucinic-Filipi und Chiquet-Ehrismann 1993). Abhängig von den jeweiligen Faktoren resultierte eine Synthese verschiedener TN-C-Molekülgrößen. Tucker (1993) zeigte am Beispiel von embryonalen Mausfibroblasten, dass TN-C-Proteine, deren Expression aufgrund des bFGF angeregt wurde, eine Molekülgröße von 250 kDa aufwiesen, während TGF- $\beta$ 1 die Bildung von 200 kDa TN-C-Proteinen stimulierte (Tucker 1993).

### **2.7 Induktion der TN-C-Synthese durch biomechanische Stimulation**

Zellen des muskuloskelettalen Systems sowie andere Gewebearten sind ununterbrochen dem Einfluss von mechanischen Kräften ausgesetzt und werden während der Entwicklung in ihrem biologischen Verhalten durch diese Beanspruchung modifiziert (Gooch und Tennant 1997). Die ECM gilt in diesem Zusammenhang als mechanischer Stabilisator und ist für die Aufrechterhaltung der Zellform und des strukturellen Netzwerkes, für das Einfügen der Zellen in die Umgebung sowie für die Weiterleitung von Informationen verantwortlich (Suzuki et al. 1997; Yano et al. 1997). Weiterhin gilt die ECM als Substrat für Zelladhäsions-, Migrations- und Differenzierungsprozesse (Hay 1992; Adams und Watt 1993). Sie steht mit Zelloberflächenrezeptoren in Verbindung und spielt bei der Übermittlung von mechanischen Signalen eine wichtige Rolle. Integrine stellen als Bestandteile der ECM und als Membranproteine eine direkte Schnittstelle zwischen ECM und Zellskelett dar und spielen daher unter Umständen eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion (Ingber 1991; Hynes 1992). Im Knochen und auch in anderen Geweben konnte als Antwort auf mechanische Belastung eine Zunahme der ECM und während verminderter Belastung eine Reduktion verzeichnet werden (Wolff 1892; Chiquet et al. 1996; Mehr et al. 2000). Diese Prozesse legen nahe, dass die Zellen der ECM als Mechanosensoren fungieren (Brand et al. 1997).

Studien belegen, dass die Expression des TN-C-Gens von mechanischen Faktoren beeinflusst wird und damit mechanosensitiv ist (Chiquet-Ehrismann et al. 1994). Webb et al. (1997) zeigten, dass TN-C im mechanisch beanspruchten Skelett eine gesteigerte Synthese durch die Osteoblasten erfährt und diese Stimulation unabhängig von den Einflüssen der Wachstumsfaktoren ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Entlastung eines mechanisch beanspruchten Gewebes eine Reduktion der TN-C-Synthese hervorruft (Järvinen et al. 1999). Wie aus früheren Studien bekannt, induzierte TN-C in vielen Geweben eine Blockade der Zellinteraktionen (Chiquet-Ehrismann et al. 1988, 1995; Murphy-Ullrich et al. 1991) und da die Kopplung der Zellen an die umliegende Matrix durch Integrine und Zelloberflächenrezeptoren (Lotz et al. 1989, Ingber 1991, Banes et al. 1995) erfolgt und diese mit TN-C in Verbindung stehen, könnte TN-C in diesem Zusammenhang für eine reduzierte Matrixadhäsion sorgen. Mehr et al. (2000) untersuchten den Einfluss von TN-C auf die Morphologie von Sehnenzellen unter mechanischer Beanspruchung. Es zeigte sich, dass TN-C für eine verringerte Anheftung der Sehnenzellen an das umgebende Gewebe sorgte und dass die Zellen in Gegenwart von TN-C ihre ursprüngliche Form nicht veränderten (Mehr et al. 2000).



Zusammenfassend scheint TN-C die mechanische Beanspruchung der Zellen in mechanisch belastetem Gewebe herabzusetzen und die optimale Anpassung der Zellen im Gewebe zu unterstützen (Brand et al. 1997; Webb et al. 1997; Mehr et al. 2000).

## **2.8 Tiermodelle mit TN-C- und TN-R-Defizienz**

Um die Funktionen eines Proteins genauer zu erfassen, bieten sich Studien an Tieren an, in welchen die Funktion des entsprechenden Gens ausgeschaltet wurde (Knockout, KO). Diese Tiere können phänotypisch im Hinblick auf die Funktion des entsprechenden Proteins untersucht werden.

Ein so genannter Knockout des TN-C-Gens wurde erstmals von Saga und Mitarbeitern (1992) beschrieben. Überraschenderweise zeigten sich keine phänotypischen Auffälligkeiten der Tiere. Weiterhin untersuchten Mitrovic und Schachner (1995), Forsberg und Mitarbeiter (1996) und Settlers und Mitarbeiter (1997) TN-C-negative Tiere, und diese schienen ebenfalls phänotypisch völlig unauffällig zu sein (Mackie und Tucker 1999). Vermutungen, dass bei TN-C-Knockout-Tieren unter Umständen doch das TN-C-Protein synthetisiert wird, konnten Settles und Mitarbeiter widerlegen (Settles et al. 1997).

Gewebearten, welche unter physiologischen Bedingungen hohe TN-C-Konzentrationen aufwiesen, waren bei diesen Tieren histologisch unauffällig (Saga et al. 1992). Dazu zählten die Brustdrüse (Chiquet-Ehrismann et al. 1986), die wachsende Zahnglocke (Thesleff et al. 1987), die Tubulogenese der Nieren (Aufderheide et al. 1987) und das Gewebe des Urogenitalsinus (Takeda et al. 1988). Im Kleinhirn, wo TN-C ein Substrat für die Migration der Körnerzellen darstellt (Husmann et al. 1992), erschien das Gewebe ebenfalls unauffällig. Gleiches gilt für Muskelsehnenverbindungen und glattes Muskelgewebe (Grumet et al. 1985), Haarfollikel (Chiquet-Ehrismann et al. 1986), das kleine Intestinum (Aufderheide und Ekblom 1988), das Gehirn und andere neurale Gewebe (Kruse et al. 1985; Crossin et al. 1989; Prieto et al. 1990; Bartsch et al. 1992a,b), Gewebe der Flügelknospe (Wehrle-Haller et al. 1991) und die Haut (Jiang und Chuong 1992). Auch biologische Prozesse, welche normalerweise unter Beteiligung von TN-C ablaufen, wurden auf ihre Fehlfunktionen hin untersucht. Es zeigte sich weder während der Wundheilung (Mackie et al. 1988) noch während Geburtsvorgängen Abnormalitäten (Castellucci et al. 1991; Saga et al. 1992).

Im folgenden Zeitraum wurde jedoch festgestellt, dass die TN-C-KO Tiere einige subtile Defizite aufwiesen. Es wurden verschiedenste neurologische Defekte nachgewiesen, die sich in einem auffälligen Verhalten äußerten, z. B. Hyperaktivität während neurologischer

Tests, verminderte sensomotorische Koordination und untypisches Benehmen während Balanceversuchen (Fukamauchi et al. 1996, 1998; Kiernann et al. 1999). Im Nervengewebe zeigten sich während der Myelinisierungsprozesse einige Auffälligkeiten. Die Nervenendigungen der neuromuskulären Verbindungen und die Reinnervationskapazität nach Verletzungen schienen hingegen unauffällig (Moscoso et al. 1998). Cifuentes-Diaz und Mitarbeiter (1998) beobachteten nach einer Botulinum-Toxin-Injektion einen signifikant reduzierten Ausbreitungsprozess des Giftes im Bereich der Nervenendigungen sowie eine abnormale Reinnervation im Skelettmuskel (Cifuentes-Diaz et al. 2002). Ohta et al. (1998) konnten eine verzögerte Wundheilung der verletzten Kornea nachweisen, weiterhin zeigte sich ein verzögerter Heilungsprozess einer durch Schlangengift induzierten Glomerulonephritis (Nakao et al. 1998).

Untersuchungen der ECM des Nervengewebes von TN-R-defizienten Tieren wiesen ebenfalls Veränderungen auf. Die Anatomie der Hauptstrukturen und die Bildung sowie der Aufbau des Myelins erschienen zwar normal (Weber et al. 1999), aber das Protein Phosphacan, welches in gesundem Nervengewebe ein wichtiger Ligand des TN-R ist, konnte im Nervengewebe nicht nachgewiesen werden (Weber et al. 1999, Haunso et al. 2000). Es fanden sich ebenfalls Fehler während der Informationsverarbeitung entlang einiger Nervenfasern (Weber et al. 1999).

## **2.9 Densitometrische und strukturelle Analyse der Knochen mit nicht-invasiven bildlichen Verfahren**

### **2.9.1 Zwei Energie Röntgen Absorptiometrie (DXA)**

Das heute gebräuchlichste Verfahren der Knochendichte- bzw. Knochenmassebestimmung ist die DXA (s. Abb. 3). Durch die Verwendung von Strahlung mit zwei unterschiedlichen Energien ist es möglich den Knochenmineralgehalt zu bestimmen. Die physikalische Dichte stellt die entscheidende Größe für die Schwächung der Röntgenstrahlung in der Materie dar, Elemente höherer Ordnungszahl (z.B. Kalzium) absorbieren mehr Strahlung als solche mit niedrigerer Ordnungszahl. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich die quantitative Knochenmasse (Knochenmineralgehalt = BMC = bone mineral content) innerhalb eines Strahlenganges einer Röntgenröhre zu bestimmen. Die hiermit ermittelte Knochenmasse kann in der DXA auf die Flächengröße der Knochen im Strahlengang normiert werden (flächenhafte Knochendichte = bone mineral density = BMD in mg/cm<sup>2</sup>), jedoch ist eine Bestimmung der volumetrischen Knochendichte (mg/cm<sup>3</sup>) nicht möglich. Dies führt dazu,

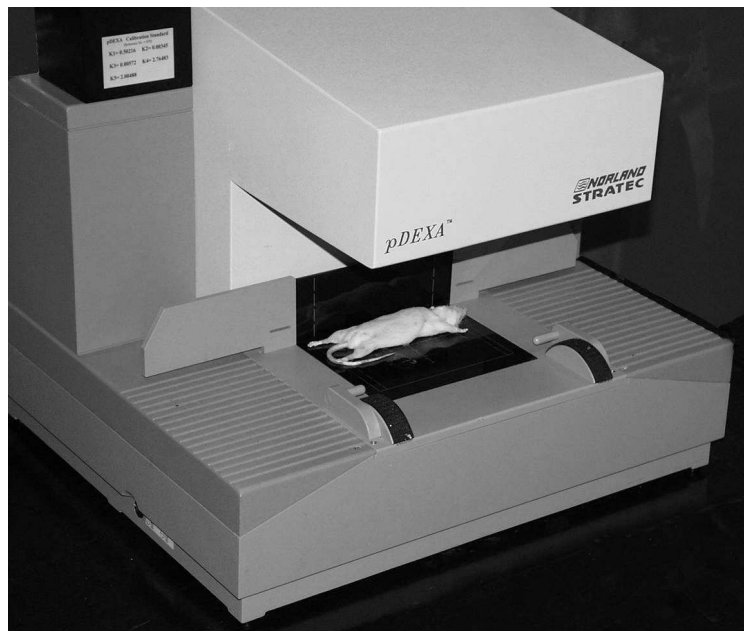
dass größere Knochen eine höhere BMD aufweisen als kleinere, ohne dass Unterschiede der volumetrischen Dichte vorliegen müssen (Carter et al. 1992; Lochmüller et al. 1999, 2000).

Da das Verhältnis des umgebenden Weichteilgewebes die quantitative Bestimmung der Knochenmasse beeinflusst, muss diese in der DXA in einer Region neben dem Knochen analysiert und für das Gewebe vor und hinter dem zu messenden Knochen rechnerisch eingesetzt werden. Diese Vereinfachung kann sich negativ auf die Genauigkeit der Messung auswirken, da der Körper unter Umständen eine inhomogene Verteilung von Fett- und Muskelgewebe aufweist (Svendsen et al. 1995; Lochmüller et al. 2000, 2001). Weiterhin können sich die Positionierung der Knochen relativ zum Strahlengang oder auch Verkalkungen im Körper auf die Messgenauigkeit auswirken (Adams 1997). Die Detektoren sind für die Absorption der Strahlung nach Durchlaufen des Messobjektes verantwortlich. Durch die gegenüberliegende Anordnung von Röhre und Detektoren ist es möglich das Messobjekt mäanderförmig abzufahren. Die Fein-Fokus-Röntgenröhre des Gerätes arbeitet mit einem Brennfleckdurchmesser von 50µm (Beschleunigungsspannung: 60 kV) und einem Anodenstrom von 250 µA. Aus dem Energiespektrum werden durch Photonenabsorption mit Hilfe von K-Kanten Filterung (250 µm Sn) zwei schmale Energiegipfel bei 28 KeV (Kiloelektronenvolt) und 48 keV selektiert.

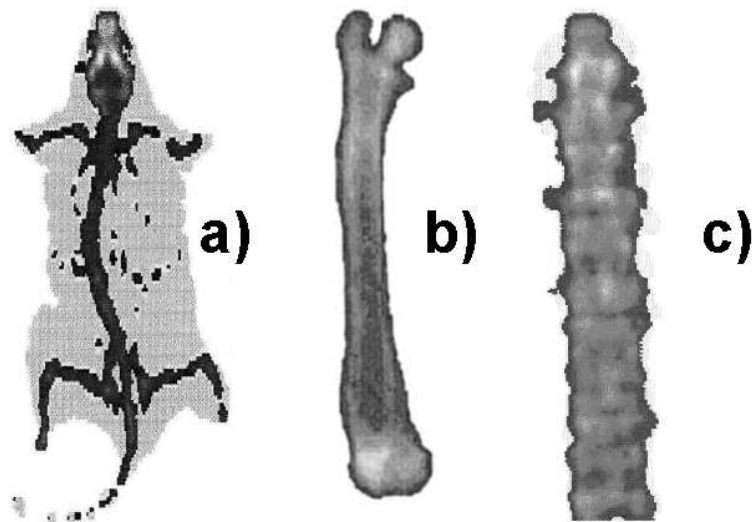
Die erzeugten Bilder (s. Abb. 4) erlauben es die Skelettelemente darzustellen und in die für die Auswertung interessierenden Bereiche (Region of interest, ROI) abzugrenzen. Eine adäquate Anpassung der Hard – und Software durch die Herstellerfirma ermöglicht die Untersuchungen an Kleintieren. Die Messfeldgröße wurde auf 120 mm x 150 mm reduziert, damit bietet das Gerät optimale Bedingungen für Messungen an Mäusen (Beschleunigungsspannung  $50 \pm 2$  kV, Anodenstrom  $< 0.3$  mA, Brennfleckdurchmesser  $< 0.05$  mm; mittlere Röntgenenergie  $38 \pm 2$  KeV; Breite des Energiegipfels  $19 \pm 1$  KeV).

### ***2.9.2 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)***

Mit Hilfe der Computertomographie werden Querschnittsbilder durch Messungen der Absorption aus mehreren Projektionen gewonnen (quantitative computer tomography, QCT). Für die Anwendung im peripheren Skelett wurden spezielle periphere QCT - Geräte (pQCT) entwickelt (s. Abb. 5). Die pQCT dient wie die konventionelle QCT der Bestimmung der volumetrischen Knochendichte und der strukturellen Geometrie-basierten Eigenschaften im Schaftbereich der Knochen.



**Abb. 3: DXA-Gerät (pDEXA Sabre, Norland/Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Deutschland)**



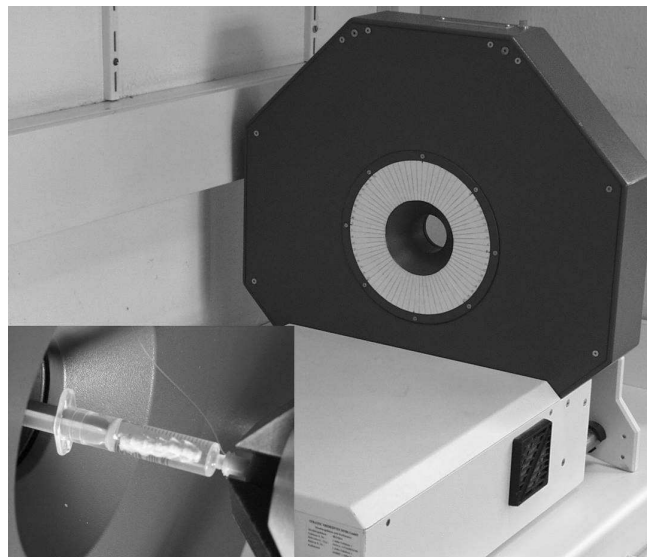
**Abb. 4: Scout-View einer DXA-Messung  
a) Ganzkörper b) Femur c) Wirbel L1-L5**

Die ermittelte volumetrische Knochendichte (bone mineral density, BMD), welche auch als „apparente“ Dichte bezeichnet wird, stellt das Verhältnis aus Knochenmasse (bone mineral content, BMC) pro Volumeneinheit dar und wird in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  angegeben. Mit dem pQCT ist im Unterschied zur DXA auch eine Separierung zwischen trabekulären und kortikalen Knochen möglich und beide Kompartimente können getrennt untersucht werden.

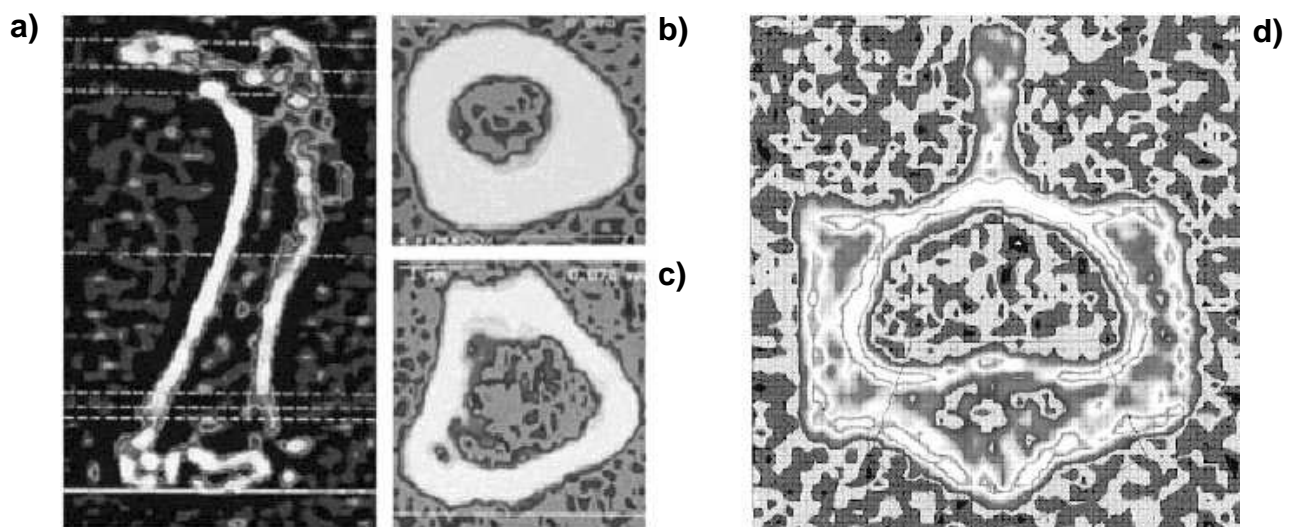
Als Translations-Rotations-Scanner ist das pQCT - Gerät in der Lage durch radiale, axiale und transversale Bewegungen Querschnittsbilder entlang der Longitudinalachse des Messobjektes zu liefern. Die von der Röntgenquelle ausgehenden Strahlen werden nach Durchlaufen des Objektes vom Detektor aufgenommen. Erzeugt werden Querschnittsbilder durch die gefilterte Rückprojektion mit anschließender Analyse der Abschwächungsprofile, die beim Durchstrahlen des Messobjektes erzielt wurden. Der zu analysierende Messbereich wird dabei in quadratische Volumeneinheiten (Voxels) unterteilt. Für jedes der Voxels erfolgt eine Berechnung des linearen Abschwächungskoeffizienten. Anhand dieses Koeffizienten wird anschließend in Relation zu einem Phantom der volumetrische Mineralgehalt und die Mineraldichte bestimmt. Das Phantom aus Hydroxylapatit weist eine integrierte Skala auf. Anhand von Referenzwerten können die verschiedenen Voxelinhalte und der volumetrische Mineralgehalt (volumetric bone mineral content, vBMC) sowie die volumetrische Mineraldichte (volumetric bone mineral density, vBMD) berechnet werden.

Die Knochendichte (vBMD) beinhaltet den Knochenmineralgehalt pro Knochenvolumen ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) und ist im Unterschied zu der durch die DXA bestimmten flächenhaften Knochendichte ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) nicht von der Knochengröße abhängig. Zusätzlich besteht die Möglichkeit zur Berechnung von geometrischen Parametern des Knochenschaftes, wie kortikale Querschnittsfläche und Trägheitsmoment. Da an der Metaphyse die eigentliche kortikale Knochenplatte zu dünn ist, können geometrische Messungen dort nicht erfolgen. Die dort gemessene äußere Region wird als subkortikales Segment angesehen.

Das in dieser Studie verwendete Gerät erstellt zunächst für jedes Messobjekt ein Übersichtsbild (Scout-View, s. Abb. 6). Mit Hilfe dieses zweidimensionalen Übersichtsbildes können anhand charakterisierter anatomischer Markierungspunkte die gewünschten Messstellen ermittelt werden. Die Bestimmung der Grenze zwischen Knochen und umgebendem Gewebe wird mit Hilfe von Schwellenwerten durchgeführt. Die Separierung der trabekulären von der subkortikalen Region erfolgt mit Hilfe eines Abschälmodus (Peelmode). Bei dieser konzentrischen Abschälung des Knochens orientiert sich das Gerät an einer vom Benutzer festgelegten Schwelle (Schmidt et al. 2003).



**Abb. 5: pQCT-M Research (Stratec)**



**Abb. 6: pQCT-Messlokalisationen mit Scoutview und Schnittbildern:**

- a) Femur-Scoutview
- b) Femurschnittbild bei 50% (Schaftmitte)
- c) Femurschnittbild bei 15% (distale Metaphyse)
- d) Wirbelkörperschnittbild bei 50% (Wirbelkörpermitte)

### 3. Studiendesign und Fragestellung

Tenascin-C-Glykoproteine werden als Adhäsionsmoleküle in der ECM exprimiert. Die Glykoproteine sollen an Interaktionen der Zellen mit der Matrix beteiligt sein (Mackie und Ramsey 1996b) und in den Binde- und Stützgeweben eine Rolle bei der Vermittlung mechanischer Stimuli an die Zellen spielen (Webb et al. 1997). TN-C hat im Knochengewebe während des Wachstums und der Differenzierung der Knochenzellen eine bedeutende Funktion (Chiquet und Fambrough 1984a; Crossin et al. 1986; Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990; Mackie und Tucker 1992; Pacifici et al. 1993; Pacifici 1995). TN-C wird während der Skelettogenese im embryonalen Knochen von den Osteoblasten und deren Vorläuferzellen gebildet und wurde auch im Periost des reifen mineralisierten Gewebes nachgewiesen. TN-C gilt als Vermittler zwischen den Knochenzellen und deren Umwelt, welches Osteoblasten während ihrer Entwicklung in die Lage versetzen soll, adäquat auf äußere Einflüsse, insbesondere mechanische, zu reagieren und sich entsprechend anzupassen (Mackie et al. 1987b; Väkäva et al. 1990; Mackie und Tucker 1992; Mackie und Ramsey 1996b).

Bisher wurde an TN-C-KO-Mäusen keine systematische Untersuchung des skelettalen Phänotyps durchgeführt. Da sich ein pathologischer Phänotyp unter Umständen erst in einem höheren Lebensalter äußert, wurden in der vorliegenden Studie die Tiere in einem Alter von 24 Monaten untersucht. Es standen TN-C-KO, TN-R-KO und TN-R/TN-C-Doppel-KO zur Verfügung, wobei nur für die Tiere mit TN-C-Defizienz und Doppel-KO-Tiere Veränderungen der Knochen erwartet wurden. Die Charakterisierung des skelettalen Phänotyps wurde mit den oben beschriebenen Methoden der DXA und pQCT vorgenommen.

Wir untersuchten die folgenden konkreten Fragen:

1. Können Veränderungen der Knochengröße und Knochenzusammensetzung (Knochenmineralgehalt, BMC) bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren beobachtet werden?
2. Gibt es nachweisbare Alterationen der trabekulären und kortikalen Knochendichte bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren?
3. Gibt es signifikante strukturelle Unterschiede in der distalen Femurmetaphyse sowie im Femurschaft von TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren?

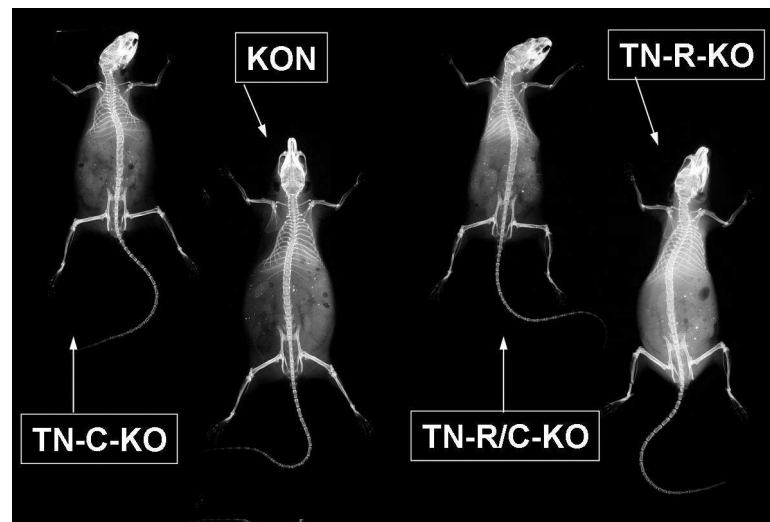
## 4. Material und Methoden

### 4.1 Tiere

Untersucht wurden 28 weibliche Mäuse im Alter von 24 Monaten. Darunter befanden sich 7 Kontrolltiere, 6 Tiere mit TN-C-Defizienz, 7 Tiere mit fehlendem TN-R-Protein und 8 Doppelknockout-Tiere (TN-C- und TN-R-Defizienz).

Alle Mäuse lagen im getöteten Zustand vor und wurden bis zur Untersuchung bei -20°C aufbewahrt. Die Experimente und die Tötung der Tiere wurden im Einklang mit den Deutschen Tierschutzgesetzen durchgeführt.

Um Missbildungen der Tiere auszuschließen wurde von allen Tieren eine Kontaktradiographie angefertigt (Abb. 7), welche keine Veränderungen der Tiere zeigte.



**Abb. 7: Ganzkörperkontaktradiographie einer Kontrollmaus (KON), TN-C-, TN-C/R-, TN-R-defizienten Maus**

### 4.2 Ganzkörpermessung mit der DXA

Die DXA-Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden mit einem Gerät der Firma Norland Stratec (pDEXA Sabre, Norland/Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Deutschland) durchgeführt (s. Abb. 3). Vor Beginn der Messung wurde das Gewicht eines jeden Tierkörpers mit einer Laborwaage (Mettler Pm 100, Mettler, Giessen) bestimmt. Die Mäuse wurden dann in Rückenlage mit abduzierten Extremitäten in dem DXA-Gerät positioniert. Zunächst wurde ein Übersichtsbild (Scout-View) erstellt (s. Abb. 4). Anhand dieser zweidimensionalen Repräsentation des Messobjektes besteht für den Untersucher die Möglichkeit gewünschte Interessengebiete (region of interest, ROI) festzulegen und somit eine Reduzierung der Messzeit zu bewirken. Der eigentliche Messvorgang erfolgte bei einer



Auflösung von 0,5 mm x 1,0 mm, der Schwellenwert wurde einheitlich bei 0,190 g/cm<sup>2</sup> festgelegt. Die Messgeschwindigkeit lag bei 20 mm/s, der gesamte Messvorgang beanspruchte einen Zeitraum von circa 20 min. Für den eigentlichen Messvorgang benötigten wir, je nach Größe des Tieres, etwa 10 – 13 min, weitere 5 min mussten für die korrekte Positionierung des Tieres einkalkuliert werden. Die Erstellung und Auswertung des Scout-Views dauerte circa 3 – 4 min.

Auf Basis der Messungen wurde der Knochenmineralgehalt (BMC) des Gesamtskelettes bestimmt (BMC = bone mineral content), der Fettgehalt (fat) und die Weichteilmasse (lean mass). Gleichzeitig erfolgte eine automatische Berechnung des Gesamtgewichtes aus der Summe des BMC-Wertes, des Fettgehaltes und der bestehenden Weichteilmasse, welche mit den Messungen auf der Laborwaage verglichen wurde.

### **4.3 Präparation und Entnahme der Knochen**

Nach der DXA-Messung wurde das Fell entfernt und Kopf und Schwanz vom Körper getrennt. Anschließend erfolgte die Präparation der Wirbelsäule, wobei alle sechs Lendenwirbel (LWK 1-6) präpariert wurden. Die Entnahme der Oberschenkelknochen erfolgte entlang der anatomischen Leitstrukturen. Die Muskulatur wurde distal der Patella und im proximalen Hüftgelenk durchtrennt und das Femur im Knie- und Hüftgelenk disloziert. Durch vorsichtiges Schaben entlang des Knochens wurde das restliche Weichteilgewebe entfernt. Die Präparation der Tibia erfolgte nach ähnlichem Muster. Um ein Austrocknen der Knochen nach der Präparation zu verhindern, wurden die Knochen nach Entnahme in eine befeuchtete Gaze eingewickelt. Dazu wurde eine 0,9%-Natriumchlorid-Lösung verwendet, um ein isotones Milieu in der Knochenumgebung zu schaffen. Die anschließende Aufbewahrung bei -20°C erfolgte in sorgfältig beschrifteten Behältern.

### **4.4 Einzelknochenmessungen mit der DXA**

Für die Messung einzelner Knochen wurden die Geräteeinstellungen auf die Größe des zu untersuchenden Objektes angepasst. Das Messfeld wurde auf 25 mm x 15 mm reduziert, die Auflösung betrug 100 µm x 100 µm. Mit einer Messgeschwindigkeit von 5 mm/s dauerte der gesamte Messvorgang, einschließlich Scout-View, circa 40 min. Die Messungen wurden an Femur, Tibia und den sechs Lendenwirbeln vorgenommen.

Die einzelnen Knochen (Femur, Tibia, Humerus, Lendenwirbel 1-5) wurden während der Untersuchung in einer dafür vorgesehenen Petrischale gelagert. Um ein Austrocknen während der Untersuchung zu verhindern, war diese bis auf eine Höhe von 5 mm mit

wässriger Lösung gefüllt. Gleichzeitig erleichterte dies die einheitliche Positionierung parallel zum Boden, wobei die distalen Knochenenden in Richtung Röntgenröhre zeigten. Direkt nach der Messung wurde die Länge der Knochen sowie der antero-posteriore Durchmesser auf Höhe der Schaftmitte mit Hilfe einer Schieblehre (Kaliper) bestimmt.

#### **4.5 Einzelknochenmessung mit der pQCT**

Für die pQCT-Messung wurden die Einzelknochen zwischen der Strahlungsquelle und dem Detektor mit Hilfe einer speziell für diese Anforderungen konstruierten Halterung positioniert (s. Abb. 5). Vor jedem Messdurchgang wurden die Knochen (Femur, Lendenwirbel 2-4) für 20 min in einem speziellen Gerät entlüftet. Innerhalb dieser Zeit wurde ein Vakuum in der Maschine geschaffen, so dass dem Knochen Luftblasen entzogen wurden. Andernfalls würde die Luft zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da sie einen Abschwächungswert von Null im Knochen erzeugt. Anschließend erfolgte die Positionierung der Knochen in einer 5 ml Spritze. Die Spritze war vollständig mit Wasser gefüllt, um ein Wiedereindringen der Luft und die Austrocknung der Knochen zu verhindern.

Nach Erstellung des Scout-Views (s. Abb. 6) wurden Querschnittsbilder mit einer Schichtdicke von 500  $\mu\text{m}$  und einer Auflösung in der Bildebene von 100  $\mu\text{m}$  an der Diaphyse (Schaftmitte) sowie an der distalen Femurmetaphyse erhoben. Mit Hilfe der Referenzlinie wurden die gewünschten Schnittpositionen gewählt, die an der distalen Femurmetaphyse bei 15 %, 17,5 % und 20 % Knochenlänge lagen. Nachfolgend wurde der Mittelwert aus diesen Schnittbildern ermittelt. Die Dauer eines Messvorganges betrug circa 20 min.

Die Parameter der Femurmetaphyse wurden mit verschiedenen Peelmodi (P\_) ermittelt. Dabei wurde die Grenze zwischen subkortikalen und trabekulären Knochenmineralgehalt einmal bei 400 mg/mm (P\_400) und einmal bei 600 mg/mm (P\_600) gesetzt. Bei den Wirbelkörpern wurde ein zusätzlicher Peelmode 1 (P\_1) verwendet, bei welchem die inneren 40% zum trabekulären und die äußeren 60% zum kortikalen Knochenkompartiment gezählt wurden.

Aus den Querschnittsbildern wurde der metaphysäre Mineralgehalt, die Fläche und die Dichte des trabekulären (<400/600 mg/cm<sup>3</sup>) und des subkortikalen Kompartiments (>400/600 mg/cm<sup>3</sup>) berechnet. An der Schaftmitte wurde der kortikale Mineralgehalt, die kortikale Fläche, die kortikale Dichte, die kortikale Dicke und das polare Flächenträgheitsmoment (IP) berechnet, welche als Maße für die mechanische Festigkeit des Knochens bei Torsion angesehen werden können.

#### 4.6 Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten wurden mit dem Programm StatView 4.5 statistisch ausgewertet. Diese Berechnungen umfassten den Vergleich der Knockout-Gruppen mit der Kontrollgruppe und der Knockout-Gruppen untereinander (ANOVA post hoc und Bonferroni/Dunn Korrektur).

Die Sequenzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt:

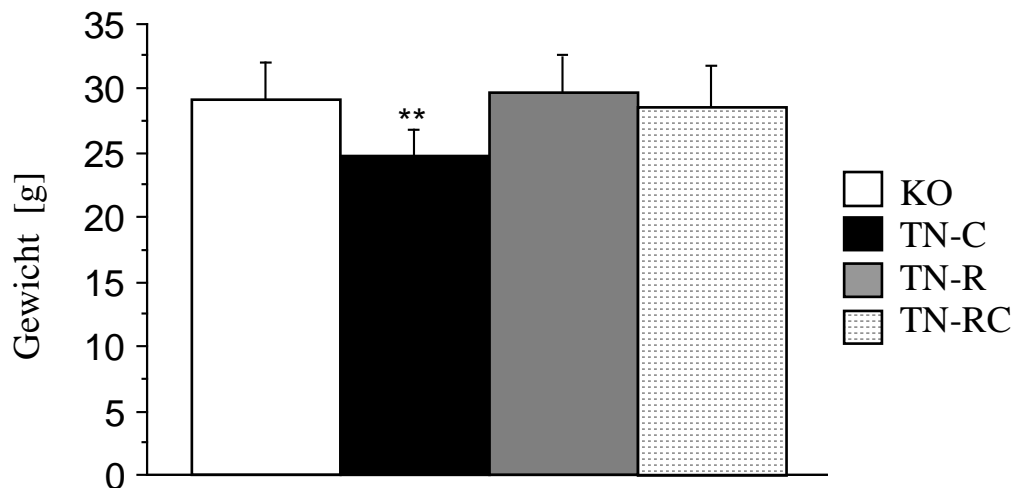
- a)  $p < 0,05$  im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant
- b)  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant
- c)  $p < 0,0033$  im Einzeltest =  $p < 0,01$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen verschiedenen Gruppen = hoch signifikant. Eine Korrektur für die multiple Testung mehrerer Messparameter wurde nicht vorgenommen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Morphologische Veränderungen der Knockout-Tiere

Das durchschnittliche Gewicht der weiblichen Kontrolltiere betrug  $29,1 \pm 2,9$  g und die Spannweite (range) lag bei 24,2 g bis 31,8 g. In der TN-R-defizienten Gruppe konnten keine signifikanten Abweichungen gegenüber den Kontrolltieren ermittelt werden (TN-R-KO:  $29,7 \pm 2,7$  g; +1,9%; nicht signifikant = n.s.) (s. Tab. 1a/b). Auch die Werte der Doppel-KO-Tiere wiesen keine Abweichungen auf ( $28,5 \pm 3,1$  g; -2,0%; n.s.). Die TN-C-defizienten Tiere wiesen ein signifikant reduziertes Körpergewicht auf ( $24,7 \pm 2,0$  g; -15,0%;  $p < 0,0166$  im Einzeltest) (s. Tab. 1a/b; Abb. 8).

**Abb. 8: Ganzkörpergewicht der Tiere**



\*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

Die Tibiae der Kontrolltiere wiesen eine Knochenlänge von  $19,2 \pm 0,3$  mm auf, die Parameter in der TN-R-KO- und in der Doppel-KO-Gruppe wichen nur unwesentlich von denen der Kontrolltiere ab. Grenzwertig signifikant kürzere Tibiae konnten in der TN-C-defizienten Gruppe ermittelt werden (TN-C-KO:  $18,5 \pm 0,2$  mm; -3,7%;  $p < 0,05$  im Einzeltest). An Femur und Humerus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tab. 1a/b).

Der Knochendurchmesser der Femora der Kontrollgruppe betrug  $1,22 \pm 0,10$  mm. Die TN-C-defizienten Tiere zeigten keine signifikanten Abweichungen hiervon ( $1,12 \pm 0,10$  mm; -8,2%; n.s.). In der TN-R-defizienten Gruppe lag der entsprechende Wert bei  $1,33 \pm 0,13$  mm (+9,2%; n.s.). Die Doppel-KO-Tiere wiesen einen Femurdurchmesser von  $1,38 \pm 0,1$  mm auf,

was einer grenzwertig signifikanten Differenz von +13,7% ( $p < 0,05$  im Einzeltest) entsprach (s. Tab. 1a/b).

Die Knochendurchmesser der Humeri wiesen in der TN-C- und TN-C/R-defizienten Gruppe keine signifikanten Abweichungen von der Kontrollgruppe auf, jedoch konnte in der TN-R-KO Gruppe ein signifikant erhöhten Durchmesser gemessen werden (+26,7%,  $p < 0,0166$  im Einzeltest).

**Tabelle 1a:** Morphologische Parameter für die Kontrolltiere (KON), TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defizienten Tiere, Messwerte und Standardabweichungen

		KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
<b>Ganzkörper</b>	<b>Gewicht [g]</b>	29,1 ± 2,9	24,7 ± 2,0	29,7 ± 2,7	28,5 ± 3,1
<b>Einzelknochen</b>					
<b>Länge</b>	<b>Tibia</b>	19,2 ± 0,3	18,5 ± 0,2	19,5 ± 0,5	18,9 ± 0,8
<b>[mm]</b>	<b>Femur</b>	16,9 ± 0,4	16,3 ± 0,5	17,2 ± 0,3	17,0 ± 0,6
	<b>Humerus</b>	12,9 ± 0,2	12,5 ± 0,2	12,9 ± 0,3	12,9 ± 0,4
<b>Durchmesser</b>	<b>Femur</b>	1,22 ± 0,10	1,12 ± 0,10	1,33 ± 0,13	1,38 ± 0,1
<b>[mm]</b>	<b>Humerus</b>	0,77 ± 0,05	0,78 ± 0,15	0,97 ± 0,13	0,79 ± 0,14

**Tabelle 1b:** Morphologische Parameter der Kontrolltiere, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defizienten Tiere, prozentuale Abweichungen der Knockout-Tiere von den Kontrollen und Signifikanz des Unterschiedes

		TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
<b>Ganzkörper</b>	<b>Gewicht [g]</b>	-15,0% **	1,9%	-2,0%
<b>Einzelknochen</b>				
<b>Länge</b>	<b>Tibia</b>	-3,7% *	1,7%	-1,1%
<b>[mm]</b>	<b>Femur</b>	-3,7%	2,1%	0,8%
	<b>Humerus</b>	-3,4%	-0,3%	0,4%
<b>Durchmesser</b>	<b>Femur</b>	-8,2%	9,2%	+13,7% *
<b>[mm]</b>	<b>Humerus</b>	2,2%	+26,7% **	4,3%

\*  $p < 0,05$  im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant,  
 \*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

## 5.2 Ganzkörpermessungen mit der DXA

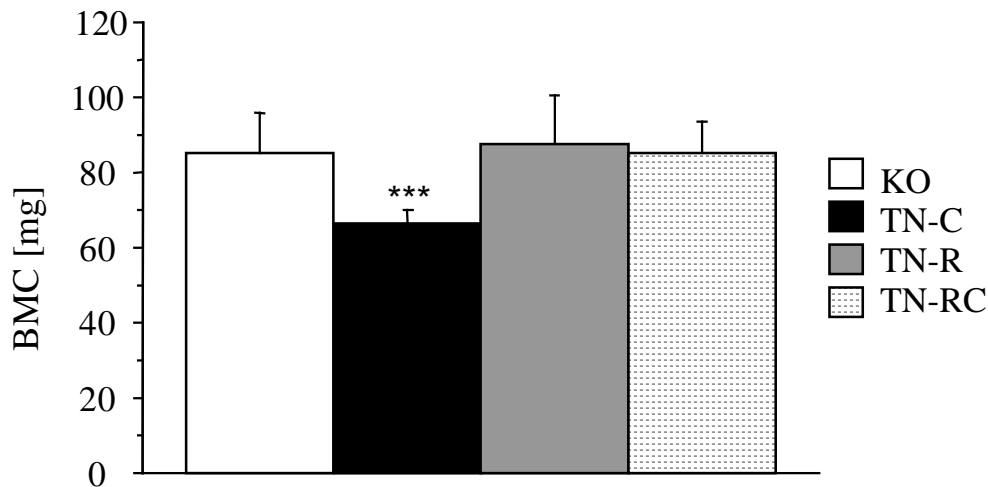
Der Knochenmineralgehalt (BMC) der Kontrolltiere wies einen durchschnittlichen Wert von  $85,4 \pm 10,6$  mg auf. In den Gruppen der TN-R-KO und der TN-C/R-defizienten Tiere wurden ähnliche Messwerte des Mineralgehaltes ohne signifikante Abweichungen ermittelt (TN-R-KO:  $87,6 \pm 13,2$  mg; +2,6%; TN-C/R-KO:  $85,0 \pm 8,2$  mg; -0,4%; n.s.). Signifikante Unterschiede wurden in der TN-C-KO-Gruppe beobachtet, hier zeigte sich eine hoch signifikante Verminderung des BMC ( $66,6 \pm 3,6$  mg; -22,0%;  $p < 0,01$  global) (s. Tab. 2a/b und Abb. 9).

Die Ermittlung des gewichtsnormierten Knochenmineralgehalts (= BMC/Körpergewicht) in der Kontrollgruppe erbrachte einen Wert von  $3,2 \pm 0,2\%$  und wich in der TN-R- und TN-C/R-KO-Gruppe nicht signifikant davon ab (TN-R-KO:  $3,4 \pm 0,4\%$ ; +6,0%; TN-C/R-KO:  $3,3 \pm 0,4\%$ ; +4,3%; n.s.). Grenzwertig signifikant niedriger zeigte sich der gewichtsnormierte Knochenmineralgehalt der TN-C-KO-Tiere ( $3,0 \pm 0,2\%$ ; -6,7%;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 2a/b).

Die Ganzkörperanalyse mit der DXA ermittelte in der Kontrollgruppe eine Knochenprojektionsfläche (Area) von  $14,3 \pm 1,4$  mm<sup>2</sup>, und sowohl die TN-R-KO als auch die Doppel-KO-Tiere zeigten hier nur minimale Unterschiede (TN-R:  $14,4 \pm 2,0$  mm<sup>2</sup>; +1,0%; TN-C/R:  $13,2 \pm 1,0$  mm<sup>2</sup>; -7,7%; n.s.). Signifikant erniedrigte Parameter wurden in der TN-C-KO-Gruppe ermittelt ( $12,4 \pm 0,5$  mm<sup>2</sup>; -13,2%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 2a/b).

Das Gewicht der Weichteilmasse (Lean Mass) der Knockout-Tiere wies in keiner Gruppe signifikante Veränderungen im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv auf (s. Tab. 2a/b). Die gewichtsnormierte Weichteilmasse (= Weichteilmasse/Gewicht) zeigte ebenfalls keine signifikanten Differenzen.

Es konnte ein grenzwertig signifikant erniedrigter Fettgehalt in der TN-C-defizienten Gruppe ermittelt werden ( $p < 0,05$  im Einzeltest), hingegen zeigten sich beim gewichtsnormierten Fettgehalt in keiner Gruppe Veränderungen (s. Tab. 2a/b).

**Abb. 9: Knochenmineralgehalt (DXA) der Ganzkörper**

\*\*\*  $p < 0,0033$  im Einzeltest =  $p < 0,01$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen verschiedenen Gruppen = hoch signifikant

**Tabelle 2a:** Ganzkörper-DXA-Analysen der Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defizienten Tiere; Messdaten und Standardabweichungen

		KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
DXA	BMC [mg]	85,4 ± 10,6	66,6 ± 3,6	87,6 ± 13,2	85,0 ± 8,2
	% BMC [%]	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,4
	Area [mm <sup>2</sup> ]	14,3 ± 1,4	12,4 ± 0,5	14,4 ± 2,0	13,2 ± 1,0
	Weichteilmasse [g]	21,3 ± 2,0	19,1 ± 2,9	20,2 ± 4,6	20,4 ± 3,7
	% Weichteilmasse [%]	79,5 ± 4,7	84,0 ± 4,5	77,4 ± 13,1	78,7 ± 7,4
	Fettmasse [g]	4,7 ± 1,5	2,9 ± 0,9	5,1 ± 3,4	4,6 ± 1,8
	% Fettmasse [%]	7,3 ± 4,6	13,1 ± 4,4	19,3 ± 12,8	18,0 ± 7,2

Legende:

BMC = bone mineral content = Knochenmineralgehalt im DXA Scan in mg

% BMC = gewichtsnormierter Knochenmineralgehalt =  $\text{BMC}/\text{Gewicht DXA} * 100$  in %

Area = Knochenfläche in mm<sup>2</sup>

% Weichteilmasse = gewichtsnormierte Weichteilmasse =  $\text{Weichteilmasse}/\text{Gewicht DXA} * 100$  in %

% Fettmasse = gewichtsnormierte Fettmasse =  $\text{Fettmasse}/\text{Gewicht DXA} * 100$  in %

**Tabelle 2b:** Ganzkörper-DXA-Analysen der Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-KO-Tiere, prozentuale Abweichungen der KO-Tiere von den Kontrollen und Signifikanz des Unterschiedes

		TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
<b>DXA</b>	<b>BMC [mg]</b>	-22,0% ***	2,6%	-0,4%
	<b>% BMC [%]</b>	-6,7% *	6,0%	4,3%
	<b>Area [mm<sup>2</sup>]</b>	-13,2% **	1,0%	-7,7%
	<b>Weichteilmasse [g]</b>	-10,6%	-5,2%	-4,2%
	<b>% Weichteilmasse [%]</b>	5,6%	-2,7%	-1,1%
	<b>Fettmasse [g]</b>	-38,7% *	9,1%	-1,8%
	<b>% Fettmasse [%]</b>	-24,7%	11,4%	4,3%

\*  $p < 0,05$  im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant;  
 \*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant; \*\*\*  $p < 0,0033$  im Einzeltest =  $p < 0,01$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen verschiedenen Gruppen = hoch signifikant

Legende s. Tab. 2a

### 5.3 Einzelknochenmessungen mit der DXA

In der Kontrollgruppe wiesen die Femora einen Knochenmineralgehalt von  $2,7 \pm 0,5$  mg auf. Die Messwerte der TN-C- und TN-R-defizienten Femora waren nicht signifikant verändert (TN-C-KO: -16,2%;  $2,3 \pm 0,3$  mg; n.s.; TN-R-KO: +4,4%;  $2,9 \pm 0,5$  mg; n.s.). Die Doppel-KO-Tiere zeigten eine grenzwertig signifikante Erhöhung des Knochenmineralgehaltes von +18,5% ( $+3,3 \pm 0,3$  mg;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 3a/b).

Die Tibiae der Kontrollgruppe wiesen einen Mineralgehalt von  $2,0 \pm 0,4$  mg auf. Die korrespondierenden Werte der TN-R- und Doppel-KO-Gruppe waren nur moderat erhöht (TN-R-KO:  $2,1 \pm 0,4$  mg; 4,2%; n.s.; TN-C/R-KO:  $2,1 \pm 0,4$  mg; 4,1%; n.s.). Die Tibiae der TN-C-defizienten Gruppe zeigten einen um -26,7% signifikant erniedrigten Mineralgehalt ( $1,5 \pm 0,1$  mg;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 3a/b).

Bei den Humeri der Kontrollgruppe wurde ein Knochenmineralgehalt von  $1,3 \pm 0,3$  mg ermittelt. Der Mineralgehalt dieser Knochen zeigte in keiner der Knockout-Gruppen signifikante Veränderungen (TN-C-KO:  $1,0 \pm 0,1$  mg; TN-R-KO:  $1,4 \pm 0,2$  mg; TN-C/R-KO:  $1,3 \pm 0,3$  mg; n.s.) (s. Tab. 3a/b).

Die BMC-Werte der Wirbelkörper wurden in der Kontrollgruppe mit  $5,9 \pm 1,5$  mg ermittelt. Die Wirbelkörper der TN-R- und TN-C/R-defizienten Tiere wiesen tendenziell erhöhte Messwerte auf (TN-R-KO:  $4,2 \pm 2,5$  mg; -8,8%; n.s.; TN-C/R-KO:  $6,6 \pm 0,7$  mg;



10,4%; n.s.). Der Mineralgehalt der TN-C-negativen Wirbelkörper war um -26,8% grenzwertig signifikant erniedrigt ( $4,3 \pm 1,0$  mg;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 3a/b).

**Tabelle 3a:** Einzelknochen-Analysen mittels DXA: Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defiziente Tiere, Messwerte und Standardabweichungen

		KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
<b>BMC</b> [mg]	<b>Femur</b>	$2,7 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$
	<b>Tibia</b>	$2,0 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,4$
	<b>Humerus</b>	$1,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$
	<b>Wirbel</b>	$5,9 \pm 1,5$	$4,3 \pm 1,0$	$4,2 \pm 2,5$	$6,6 \pm 0,7$
<b>AREA</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Femur</b>	$0,37 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$
	<b>Tibia</b>	$0,32 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,03$
	<b>Humerus</b>	$0,21 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$
	<b>Wirbel</b>	$0,80 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,08$

Legende s. Tab. 2a

**Tabelle 3b:** Einzelknochen-Analysen mit der DXA: prozentuale Abweichungen zu der Kontrollgruppe und Signifikanz des Unterschiedes

		TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
<b>BMC</b> [mg]	<b>Femur</b>	-16,2%	4,4%	+18,5% *
	<b>Tibia</b>	-26,7% **	4,2%	4,1%
	<b>Humerus</b>	-20,2%	9,3%	2,5%
	<b>Wirbel</b>	-26,8% *	-8,8%	10,4%
<b>AREA</b> [mm <sup>2</sup> ]	<b>Femur</b>	5,3%	6,2%	6,4%
	<b>Tibia</b>	-13,0%	7,7%	3,5%
	<b>Humerus</b>	-4,0%	11,5%	5,1%
	<b>Wirbel</b>	-5,2%	5,3%	+9,6% *

\*  $p < 0,05$  im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant;  
\*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

Legende s. Tab. 2a

## 5.4 Einzelknochenmessung mit der pQCT

### 5.4.1 Distale Femurmetaphyse

Der Gesamtknochenmineralgehalt (TOT\_CNT) des Kontrollkollektivs betrug im metaphysären Femurbereich  $1,80 \pm 0,18$  mg/mm. Die Doppel-Knockout-Tiere wiesen einen tendenziell, aber nicht signifikant erhöhten Knochenmineralgehalt von  $2,05 \pm 0,23$  mg/mm (12,5 %; n.s.) auf, und die TN-R-KO-Mäuse erbrachten im Vergleich zum Kontrollkollektiv moderat erniedrigte Werte ( $1,76 \pm 0,38$  mg/mm; -2,4%; n.s.). In der TN-C-defizienten Gruppe konnte ein signifikant erniedrigter TOT\_CNT ermittelt werden ( $1,51 \pm 0,10$  mg/mm; -16,3%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 4a/b und Abb. 10).

Der trabekuläre Knochenmineralgehalt (TRAB\_CNT\_600) betrug in der Kontrollgruppe  $0,34 \pm 0,08$  mg/mm. Nicht signifikant verändert zeigten sich hier die Parameter der TN-C-defizienten Gruppe ( $0,36 \pm 0,07$  mg/mm; +7,5%; n.s.) sowie der TN-C/R-defizienten Gruppe ( $0,37 \pm 0,11$  mg/mm; +10,2%; n.s.). In der TN-R-KO-Gruppe wurden signifikant erhöhte Parameter beobachtet ( $0,47 \pm 0,11$  mg/mm; +38,7%;  $p < 0,05$  global).

Der Knochenmineralgehalt im subkortikalen Kompartiment (CRTSUB\_CNT\_600) betrug in der Kontrollgruppe  $1,48 \pm 0,23$  mg/mm. Die entsprechenden Parameter waren in der TN-R- und TN-C/R-KO-Gruppe nur geringfügig verändert (TN-R-KO:  $1,29 \pm 0,48$  mg/mm; -11,8%; TN-C/R-KO:  $1,68 \pm 0,32$  mg/mm; +13,1%; n.s.) (s. Tab. 4a/b). In der TN-C-defizienten Gruppe wich der subkortikale Mineralgehalt mit einem Wert von  $1,14 \pm 0,15$  mg/mm um -21,8% ( $p < 0,05$  im Einzeltest) grenzwertig signifikant von den Kontrollgruppenparametern ab (s. Tab. 4a/b).

Die Gesamtknochendichte (TOT\_DEN) der Kontrolltiere betrug  $522 \pm 33$  mg/cm<sup>2</sup>. Die Knochendichte der TN-R- und Doppel-KO-Tiere zeigte keine signifikanten Abweichungen (TN-R-KO:  $462 \pm 95$  mg/cm<sup>2</sup>; -11,5%; TN-C/R:  $531 \pm 67$  mg/cm<sup>2</sup>; 0,4%; n.s.). Jedoch wurde in der TN-C-defizienten Gruppe signifikant erniedrigte Parameter von  $452 \pm 47$  mg/cm<sup>2</sup> (-13,3%;  $p < 0,05$  global) ermittelt (s. Tab. 4a/b).

Die trabekuläre Knochendichte (TRAB\_DEN\_600) der Femora lag in der Kontrollgruppe bei  $190 \pm 48$  mg/cm<sup>2</sup>, und in keiner der drei KO-Gruppen konnten hier signifikante Abweichungen ermittelt werden (s. Tab. 4a/b).

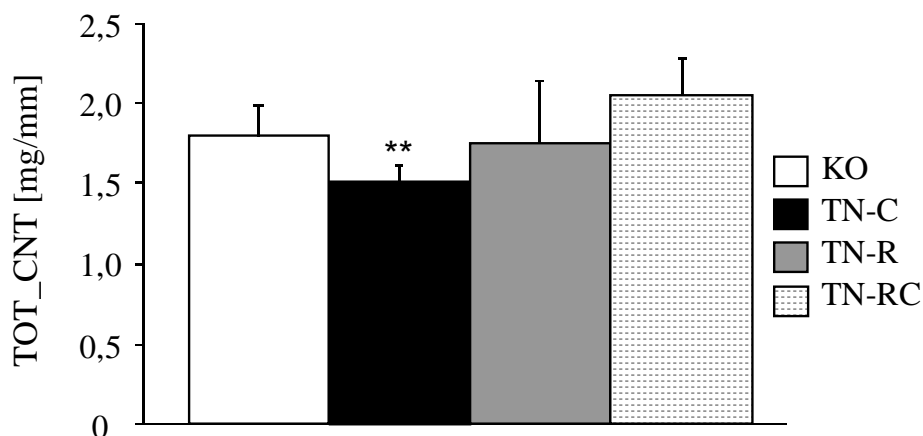
Im subkortikalen Bereich der Femurmetaphyse (CRTSUB\_DEN\_600) des Kontrollkollektivs betrug die Knochendichte  $863 \pm 73$  mg/cm<sup>2</sup>. Die Parameter der TN-R- sowie TN-C/R-KO-Gruppen zeigten keine signifikant veränderten Werte (TN-R-KO:  $765 \pm 125$  mg/cm<sup>2</sup>; -11,3%; TN-C/R:  $878 \pm 95$  mg/cm<sup>2</sup>; +1,4%; n.s.). In der TN-C-defizienten

Gruppe waren die Werte um -11,2% grenzwertig signifikant erniedrigt ( $766 \pm 68 \text{ mg/cm}^2$ ;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 4a/b).

Die Gesamtknochenquerschnittsfläche (TOT\_A) wies in der Kontrollgruppe Werte um  $3,47 \pm 0,25 \text{ mm}^2$  auf, und im TN-C-defizienten Kollektiv wurden keine Abweichungen gefunden ( $3,36 \pm 0,15 \text{ mm}^2$ ; -3,4%; n.s.). Die TN-R- sowie die TN-C/R-defizienten Mäuse wiesen grenzwertig signifikant bis signifikant erhöhte Gesamtknochenquerschnittsflächen (TN-R-KO:  $3,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ; +9,8%;  $p < 0,05$  global; TN-C/R-KO:  $3,89 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ ; +12,2%;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 4a/b).

Bei Veränderung des Schwellenwertes auf  $400 \text{ mg/cm}^3$  wurden keine prinzipiell anderen Ergebnisse gefunden (s. Tab. 4a/b).

**Abb. 10: Gesamtknochenmineralgehalt (pQCT) der Femurmetaphyse**



\*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

**Tabelle 4a:** Analysen der distalen Femurmetaphyse mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defiziente Tiere, Messwerte und Standardabweichungen

	KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
TOT_CNT [mg/mm]	1,80 ± 0,18	1,51 ± 0,10	1,76 ± 0,38	2,05 ± 0,23
TRAB_CNT_600 [mg/mm]	0,34 ± 0,08	0,36 ± 0,07	0,47 ± 0,11	0,37 ± 0,11
TRAB_CNT_400 [mg/mm]	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,27 ± 0,06	0,24 ± 0,05
CRTSUB_CNT_600 [mg/mm]	1,48 ± 0,23	1,14 ± 0,15	1,29 ± 0,48	1,68 ± 0,32
CRTSUB_CNT_400 [mg/mm]	1,60 ± 0,19	1,29 ± 0,13	1,48 ± 0,44	1,81 ± 0,27
TOT_DEN [mg/cm <sup>2</sup> ]	522 ± 33	452 ± 47	462 ± 95	531 ± 67
TRAB_DEN_600 [mg/cm <sup>3</sup> ]	190 ± 48	193 ± 19	214 ± 29	182 ± 30,1
TRAB_DEN_400 [mg/cm <sup>3</sup> ]	134 ± 23	135 ± 6	151 ± 17	136 ± 16,7
CRTSUB_DEN_600 [mg/cm <sup>3</sup> ]	863 ± 73	766 ± 68	765 ± 125	878 ± 95
CRTSUB_DEN_400 [mg/cm <sup>3</sup> ]	818 ± 82	725,2 ± 69,7	721 ± 123	838 ± 101
TOT_A [mm <sup>2</sup> ]	3,47 ± 0,25	3,36 ± 0,15	3,8 ± 0,2	3,89 ± 0,20
TRAB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	1,78 ± 0,14	1,86 ± 0,22	2,18 ± 0,36	1,99 ± 0,29
TRAB_A_400 [mm <sup>2</sup> ]	1,51 ± 0,21	1,56 ± 0,16	1,78 ± 0,30	1,72 ± 0,20
CRTSUB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	1,69 ± 0,14	1,49 ± 0,11	1,64 ± 0,40	1,91 ± 0,21
CRTSUB_A_400 [mm <sup>2</sup> ]	1,97 ± 0,14	1,79 ± 0,13	2,03 ± 0,35	2,17 ± 0,13
%Tra/Tot_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	51,3 ± 2,1	55,4 ± 4,5	57,2 ± 9,73	51,0 ± 6,0
%TRA/TOT_A_400 [mm <sup>2</sup> ]	43,2 ± 4,0	46,4 ± 3,7	46,8 ± 7,9	44,1 ± 3,65

Legende:

- TOT\_CNT = total bone content = Gesamtknochenmineralgehalt in mg/mm
- TOT\_DEN = total bone density = apparente Knochendichte in mg/cm<sup>3</sup>
- TOT\_A = total bone area = Gesamtknochenquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup>
- TRAB\_CNT\_400/600 = trabecular bone content (Peelmode 400/600) = Knochenmineralgehalt im trabekulären Knochenkompartiment (im Abschälmodus 400/600) in mg/mm
- CRTSUB\_CNT\_400/600 = cortical subcortical bone content = Knochenmineralgehalt im kortikalen und subkortikalen Kompartiment in mg/mm
- TRAB\_A\_400/600 = trabecular area = trabekuläre Knochenquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup>
- CRTSUB\_A\_400/600 = cortical subcortical area = kortikale und subkortikale Knochenquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup>
- %TRA/TOT\_A\_400/600 = trabecular area/total area \* 100 = prozentuale Anteil der trabekulären Knochenquerschnittsfläche an der Gesamtquerschnittsfläche in %
- TRAB\_DEN\_400/600/p1 = trabecular bone density (Peelmode 400/600/p1) = trabekuläre apparente Knochendichte in mg/cm<sup>3</sup> (im Abschälmodus 400/600/p1)
- CRTSUB\_DEN\_400/600/p1 = cortical subcortical density (Peelmode 400/600/p1) = subkortikale Knochendichte in mg/cm<sup>3</sup> (im Abschälmodus 400/600/p1)

**Tabelle 4b:** Analysen der distalen Femurmetaphyse mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R, TN-C/R-defiziente Tiere, prozentuale Abweichungen zu den Kontrollen und Signifikanz des Unterschiedes

	<b>TN-C-KO</b>	<b>TN-R-KO</b>	<b>TN-C/R-KO</b>
<b>TOT_CNT [mg/mm]</b>	-16,3% **	-2,4%	12,5%
<b>TRAB_CNT_600 [mg/mm]</b>	7,5%	+38,7% **	10,2%
<b>TRAB_CNT_400 [mg/mm]</b>	6,4%	+35,6% **	19,7%
<b>CRTSUB_CNT_600 [mg/mm]</b>	-21,8% *	-11,8%	13,1%
<b>CRTSUB_CNT_400 [mg/mm]</b>	-19,2% **	-7,3%	11,4%
<b>TOT_DEN [mg/cm<sup>3</sup>]</b>	-13,3% **	-11,5%	0,4%
<b>CRTSUB_DEN_600 [mg/cm<sup>3</sup>]</b>	-11,2% *	-11,3%	1,4%
<b>CRTSUB_DEN_400 [mg/cm<sup>3</sup>]</b>	-11,3%	-11,8%	2,0%
<b>TRAB_DEN_600 [mg/cm<sup>3</sup>]</b>	1,3%	12,4%	-5,1%
<b>TRAB_DEN_400 [mg/cm<sup>3</sup>]</b>	1,0%	12,3%	0,9%
<b>TOT_A [mm<sup>2</sup>]</b>	-3,4%	+9,8% **	+12,2% *
<b>TRAB_A_600 [mm<sup>2</sup>]</b>	4,5%	+22,1% *	13,2%
<b>TRAB_A_400 [mm<sup>2</sup>]</b>	3,6%	18,4%	16,4%
<b>CRTSUB_A_600 [mm<sup>2</sup>]</b>	-11,8% *	-3,2%	11,1%
<b>CRTSUB_A_400 [mm<sup>2</sup>]</b>	-8,9% **	3,2%	+8,9% *
<b>%Tra/Tot_A_600</b>	7,9%	11,4%	0,7%
<b>%TRA/TOT_A_400 [mm<sup>2</sup>]</b>	7,4%	8,3%	3,8%

\* p<0,05 im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant;  
 \*\* p<0,0166 im Einzeltest = p<0,05 global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

Legende s. Tab. 4a

#### 5.4.2 Femurdiaphyse

Der Gesamtknochenmineralgehalt (TOT\_CNT) des Femurschaftes belief sich in der Kontrollgruppe auf  $2,10 \pm 0,19$  mg/mm. Die Doppel-KO-Tiere (TN-C/R-KO:  $2,28 \pm 0,19$  mg/mm; 9,1%; n.s.) und die TN-R-defizienten Tiere (TN-R-KO:  $2,08 \pm 0,31$  mg/mm; -1,2%; n.s.) zeigten keine signifikanten Abweichungen. Die TN-C-defizienten Tiere erbrachten einen grenzwertig signifikant reduzierten Mineralgehalt von  $1,81 \pm 0,10$  mg/mm (-13,8%; p<0,05 im Einzeltest) (s. Tab. 5a/b).

Im kortikalen Kompartiment wiesen die Kontrolltiere einen durchschnittlichen Knochenmineralgehalt (CRT\_CNT) von  $1,80 \pm 0,24$  mg/mm auf. Die TN-R- und auch die Doppel-KO-Tiere zeigten nur geringfügig veränderte Messwerte (TN-R-KO:  $1,68 \pm 0,38$  mg/mm; -6,4%; TN-C/R-KO:  $1,96 \pm 0,20$  mg/mm; +10,2%; n.s.). Die kortikale

Knochenmasse der TN-C-defizienten Tiere war grenzwertig signifikant erniedrigt ( $1,54 \pm 0,10$  mg/mm; -14,2%;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 5a/b).

In der Kontrollgruppe erbrachten die Diaphysen der Femora eine durchschnittliche Gesamtknochenquerschnittsfläche (TOT\_A) von  $2,40 \pm 0,11$  mm<sup>2</sup>. In der TN-C-KO-Gruppe wurden tendenziell geringere Werte von  $2,22 \pm 0,17$  mm<sup>2</sup> (-7,3%; n.s.) ermittelt. Hingegen wiesen die TN-R-KO und Doppel-KO eine signifikant erhöhte Knochenquerschnittsfläche der Diaphyse auf (TN-R-KO:  $2,70 \pm 0,23$  mm<sup>2</sup>, +12,9%; TN-C/R-KO:  $2,64 \pm 0,17$  mm<sup>2</sup>; +10,1%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 5a/b).

Die kortikale Knochenquerschnittsfläche (CRT\_A) der Kontrollgruppe betrug  $1,35 \pm 0,10$  mm<sup>2</sup>. Hier wiesen sowohl die TN-R-KO als auch die TN-C/R-KO tendenziell höhere Parameter auf (TN-R-KO:  $1,36 \pm 0,27$  mm<sup>2</sup>, 0,7%; TN-C/R-KO:  $1,43 \pm 0,12$  mm<sup>2</sup>, 7,4%; n.s.). Die kortikale Querschnittsfläche der TN-C-KO-Mäuse war dagegen grenzwertig signifikant reduziert ( $1,17 \pm 0,05$  mm<sup>2</sup>, -13,4%;  $p < 0,05$  im Einzeltest) (s. Tab. 5a/b).

Die Dicke der Kortikalis (CRT\_THK\_C) im Bereich der Femurdiaphyse belief sich in der Kontrollgruppe auf  $0,30 \pm 0,02$  mm, und in der R-KO-Gruppe wurde ein Wert von  $0,28 \pm 0,07$  mm ermittelt, was keiner signifikanten Veränderung entsprach (-6,9%; n.s.). In der Doppel-KO-Gruppe konnten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen ermittelt werden ( $0,30 \pm 0,03$  mm, 1,8%; n.s.). Signifikant reduziert stellte sich die Kortikalis der TN-C-KO-Gruppe dar ( $0,26 \pm 0,01$  mm, -11,4%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 5a/b).

In der Analyse der Geometrie-basierten Parameter wurde ein polares Trägheitsmoment ( $I_{pol}$ ) von  $0,62 \pm 0,08$  mm<sup>4</sup> im Kontrollkollektiv ermittelt. In der TN-C- und TN-R-KO-Gruppe wurden nur tendenzielle Veränderungen ermittelt. Die Doppel-KO-Tiere wiesen eine signifikante Zunahme des polaren Trägheitsmoments um +22,3% ( $p < 0,05$  global) auf. Das Widerstandsmoment (RP\_CRT\_A) wies in allen drei Knockout-Kollektiven nur tendenziell abweichende Werte auf (s. Tab. 5a/b).

Ergebnisse für weitere pQCT-Parameter sind in Tabelle 5 a und b angegeben.

**Tabelle 5a:** Analysen der Femurdiaphyse mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defiziente Tiere, Messdaten und Standardabweichungen

	KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
TOT_CNT [mg/mm]	2,10 ± 0,19	1,81 ± 0,10	2,08 ± 0,31	2,28 ± 0,19
CRT_CNT [mg/mm]	1,80 ± 0,24	1,54 ± 0,10	1,68 ± 0,38	1,96 ± 0,20
TOT_A [mm <sup>2</sup> ]	2,40 ± 0,11	2,22 ± 0,17	2,70 ± 0,23	2,64 ± 0,17
CRT_A [mm <sup>2</sup> ]	1,35 ± 0,10	1,17 ± 0,05	1,36 ± 0,27	1,43 ± 0,12
%CRT_A [%]	56,2 ± 2,8	52,7 ± 3,5	50,4 ± 10,0	54,4 ± 4,2
CRT_THK_C [mm]	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,07	0,30 ± 0,03
TOT_DEN [mg/cm <sup>3</sup> ]	876 ± 60	821 ± 64	772 ± 119	863 ± 73
CRT_DEN [mg/cm <sup>3</sup> ]	1328 ± 89	1322 ± 64	1237 ± 68	1365 ± 52
IP_CRT_A / I pol [mm <sup>4</sup> ]	0,62 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,73 ± 0,14	0,76 ± 0,08
IP_CM_W [mm <sup>4</sup> ]	0,69 ± 0,11	0,57 ± 0,09	0,75 ± 0,15	0,86 ± 0,09
RP_CRT_A [mm <sup>2</sup> ]	0,64 ± 0,08	0,56 ± 0,06	0,71 ± 0,13	0,74 ± 0,09
RP_CM_W [mm <sup>3</sup> ]	0,72 ± 0,13	0,61 ± 0,07	0,72 ± 0,16	0,85 ± 0,09
IX_CRT_A [mm <sup>4</sup> ]	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,37 ± 0,05
IY_CRT_A [mm <sup>4</sup> ]	0,32 ± 0,06	0,26 ± 0,04	0,38 ± 0,08	0,40 ± 0,04
IXY_CRT_A	0,01 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,0 ± 0,02	0,04 ± 0,03
I min [mm <sup>3</sup> ]	0,28 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,33 ± 0,07	0,33 ± 0,05
I max [mm <sup>3</sup> ]	0,34 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,39 ± 0,07	0,43 ± 0,04
Ratio max/min	1,24 ± ,017	1,41 ± 0,11	1,20 ± 0,10	1,31 ± 0,12
RX_CM_W	0,43 ± 0,04	0,36 ± 0,05	0,42 ± 0,10	0,49 ± 0,07
RY_CM_W	0,39 ± 0,07	0,36 ± 0,05	0,42 ± 0,11	0,47 ± 0,07

Legende:

- TOT\_CNT = total bone content = Gesamtknochenmineralgehalt in mg/mm
- CRT\_CNT = cortical content = kortikaler Knochenmineralgehalt in mg/mm
- TOT\_A = total bone area = Gesamtknochenquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup>
- CRT\_A = cortical area = kortikale Knochenquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup>
- % CRT\_A = cortical area/total area \* 100 in %
- CRT\_THK\_C = cortical thickness = Dicke der Kortikalis in mm
- TOT\_DEN = total bone density = apparente Knochendichte in mg/cm<sup>3</sup>
- CRT\_DEN = cortical density = kortikale Knochendichte in mg/cm<sup>3</sup>
- IP\_CRT\_A = polar area moment of inertia = I pol = polares Trägheitsmoment in mm<sup>4</sup>
- IP\_CM\_W = polar moment of inertia of the cortical bone area = polares Trägheitsmoment der kortikalen Knochenquerschnittsfläche in mm<sup>4</sup>
- RP\_CRT\_A = moment of resistance = Widerstandsmoment in mm<sup>3</sup>
- RP\_CM\_W = moment of resistance = Widerstandsmoment/ max. Abstand zum Zentrum in mm<sup>3</sup>
- IX\_CRT\_A = moment of inertia along x-axis = Trägheitsmoment entlang der x-Achse in mm<sup>4</sup>
- IY\_CRT\_A = moment of inertia along y-axis = Trägheitsmoment entlang der y-Achse in mm<sup>4</sup>
- IXY\_CRT\_A = mixed term = gemischter Wert aus den Trägheitsmomenten
- I MIN = minimal moment of inertia = minimales Trägheitsmoment in mm<sup>4</sup>
- I MAX = maximal moment of inertia = maximales Trägheitsmoment in mm<sup>4</sup>
- I RATIO max/min = ratio of maximal versus minimal moment of inertia = max./min. Trägheitsmoment
- RX\_CM\_W = moment of resistance = axial moment of inertia of the cortical bone area /maximal distance to the y-axis = Widerstandsmoment = Trägheitsmoment der kortikalen Knochens/max. Abstand zur Y-Achse
- RY\_CM\_W = moment of resistance = axial moment of inertia of the cortical bone area /maximal distance to the x-axis = Widerstandsmoment = Trägheitsmoment der kortikalen Knochens/max. Abstand zur X-Achse

**Tabelle 5b:** Analysen der Femurdiaphyse mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R, TN-C/R-defiziente Tiere: prozentuale Abweichungen und Signifikanzlevel

	<b>TN-C-KO</b>	<b>TN-R-KO</b>	<b>TN-C/R-KO</b>
<b>TOT_CNT</b>	-13,8% *	-1,2%	9,1%
<b>CRT_CNT</b>	-14,2% *	-6,4%	10,2%
<b>TOT_A</b>	-7,3%	+12,9% **	+10,1% **
<b>CRT_A</b>	-13,4% *	0,7%	7,4%
<b>%CRT_A</b>	-6,2%	-10,4%	-2,2%
<b>CRT_THK_C</b>	-11,4% **	-6,9%	1,8%
<b>TOT_DEN</b>	-6,4%	-11,9%	-0,7%
<b>CRT_DEN</b>	-0,5%	-6,8%	2,9%
<b>IP_CRT_A / I pol</b>	-16,1%	17,0%	+22,3% **
<b>IP_CM_W</b>	-17,8%	8,4%	+24,3% *
<b>RP_CRT_A</b>	-13,7%	10,4%	16,6%
<b>RP_CM_W</b>	-14,8%	0,0%	18,8%
<b>IX_CRT_A</b>	-13,2%	12,6%	+22,0% **
<b>IY_CRT_A</b>	-19,3%	19,6%	+22,4% *
<b>IXY_CRT_A</b>	380,0%	-151,4%	280,0%
<b>I min</b>	-22,1%	18,4%	+20,3% *
<b>I max</b>	-11,6%	14,4%	+23,7% **
<b>Ratio max/min</b>	13,4%	-3,6%	3,0%
<b>RX_CM_W</b>	-16,7% *	-2,3%	15,6%
<b>RY_CM_W</b>	-9,3%	6,4%	25,8%

\*  $p < 0,05$  im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant;  
 \*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

Legende s. Tab. 5a

#### 5.4.3 Wirbelkörper (L2-L4)

Der Knochenmineralgehalt (TOT\_CNT) der Wirbelkörper betrug in der Kontrollgruppe  $0,94 \pm 0,10$  mg/mm. In dem TN-C- und TN-R-defizienten Kollektiv ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (TN-C-KO:  $0,83 \pm 0,2$  mg/mm; -11,8%; TN-R-KO:  $1,04 \pm 0,11$  mg/mm; +11,3%; n.s.). In der Doppel-KO-Gruppe wurde ein signifikant erhöhter Knochenmineralgehalt von  $1,12 \pm 0,12$  mg/mm (+19,3%;  $p < 0,05$  global) gemessen (s. Tab. 6a/b und Abb. 11).

Im subkortikalen Bereich der Wirbelkörper (SUBCRT\_CNT) konnte in der Kontrollgruppe ein Mineralgehalt von  $0,62 \pm 0,12$  mg/mm ermittelt werden, wovon die TN-C-KO und die TN-R-KO nicht signifikant abwichen (TN-C-KO:  $0,53 \pm 0,16$  mg/mm; -15,4%;



TN-R-KO:  $0,73 \pm 0,14$  mg/mm; +17,1%; n.s.). Der Mineralgehalt der Doppel-KO-Gruppe erwies sich als signifikant erhöht ( $0,85 \pm 0,13$  mg/mm; +36,5%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 6a/b).

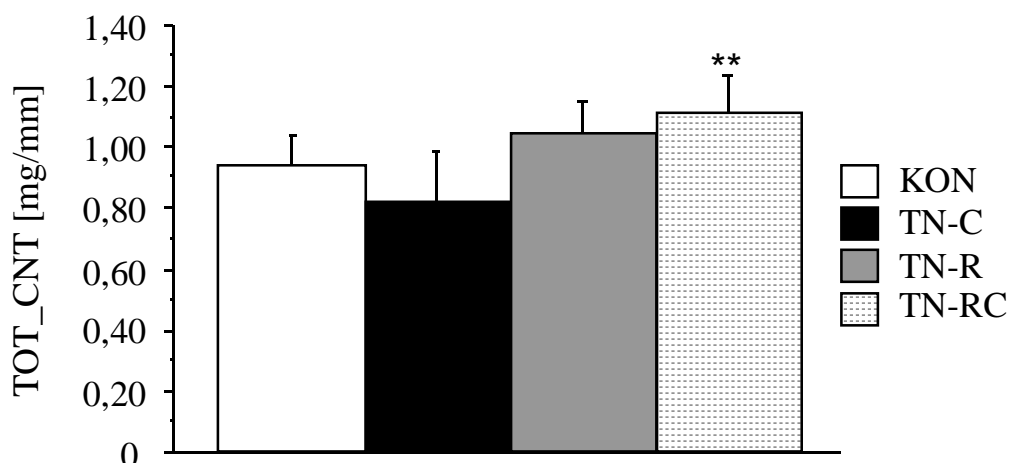
Der trabekuläre Knochenmineralgehalt (TRAB\_CNT) der Wirbelkörper im Kontrollkollektiv betrug  $0,32 \pm 0,07$  mg/mm und wies bei keinem der drei KO-Gruppen signifikante Abweichungen auf (TN-C-KO:  $0,30 \pm 0,02$  mg/mm; -4,9%; TN-R-KO:  $0,32 \pm 0,04$  mg/mm; -0,2%; TN-C/R-KO:  $0,27 \pm 0,04$  mg/mm; -14,6%; n.s.) (s. Tab. 6a/b).

Die apparente Knochendichte (TOT\_DEN) der Wirbelkörper (L2-L4) der Kontrollmäuse lag bei  $542 \pm 32$  mg/cm<sup>2</sup>. Die TN-C- und die TN-R-defizienten Tiere zeigten nur tendenzielle Abweichungen (TN-C-KO:  $502 \pm 64$  mg/cm<sup>2</sup>, -7,4%; TN-R-KO:  $551 \pm 52$  mg/cm<sup>2</sup>, 1,7%; n.s.). Lediglich bei den Doppel-KO-Mäusen konnte eine grenzwertig signifikante Dichtezunahme von +11,6% ( $p < 0,05$  im Einzeltest) bestimmt werden.

Die Dichte im subkortikalen Knochenkompartiment (CRTSUB\_DEN) betrug in der Kontrollgruppe  $644 \pm 47$  mg/cm<sup>2</sup>, und auch in diesem Bereich wurden keine signifikanten Veränderungen in der TN-C- und TN-R-defizienten Gruppe beobachtet. Bei den Doppel-KO-Tieren konnten Parameter von  $712 \pm 33$  mg/cm<sup>2</sup> ermittelt werden, was einer signifikanten Zunahme von +10,5% ( $p < 0,05$  global) entsprach (s. Tab. 6a/b).

Die trabekuläre Knochendichte (TRAB\_DEN) der Kontrollgruppe betrug  $404 \pm 25$  mg/cm<sup>2</sup>. Im trabekulären Bereich zeigten alle drei KO-Gruppen keine signifikanten Veränderungen der Messparameter (s. Abb. 12).

Die Gesamtknochenquerschnittsfläche (TOT\_A) der Kontrolltiere erbrachte Werte von  $1,73 \pm 0,11$  mm<sup>2</sup>. Auch hier zeigten sich in der TN-C- und TN-C/R-defizienten Gruppe keine signifikanten Veränderungen (TN-C-KO:  $1,63 \pm 0,13$  mm<sup>2</sup>; -5,5%; TN-C/R-KO:  $1,85 \pm 0,16$  mm<sup>2</sup>, +6,8%; n.s.). Die TN-R-negativen Mäuse wiesen einen signifikant erhöhten Gesamtknochenquerschnitt auf ( $1,88 \pm 0,09$  mm<sup>2</sup>; +9,1%;  $p < 0,05$  global) (s. Tab. 6a/b).

**Abb. 11: Knochenmineralgehalt (pQCT) der LWK L2-L4**

\*\*  $p < 0,0166$  im Einzeltest =  $p < 0,05$  global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

**Tabelle 6a:** Analysen der Wirbelkörper (L2-L4) mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R-, TN-C/R-defiziente Tiere: Messdaten und Standardabweichungen

	KON	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
TOT_CNT [mg/mm]	0,94 ± 0,10	0,83 ± 0,2	1,04 ± 0,11	1,12 ± 0,12
CRTSUB_CNT_600 [mg/mm]	0,62 ± 0,12	0,53 ± 0,16	0,73 ± 0,14	0,85 ± 0,13
TRAB_CNT_600 [mg/mm]	0,32 ± 0,07	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,27 ± 0,04
TOT_DEN [mg/cm <sup>3</sup> ]	542 ± 32	502 ± 64	551 ± 52	604 ± 48
CRTSUB_DEN_600 [mg/cm <sup>3</sup> ]	644 ± 47	606 ± 64	654 ± 55	712 ± 33
CRTSUB_DEN_400 [mg/cm <sup>3</sup> ]	595 ± 30	575 ± 44	607 ± 49	672 ± 41
CRTSUB_DEN_p1 [mg/cm <sup>3</sup> ]	590 ± 43	551 ± 60	551 ± 60	660 ± 40
TRAB_DEN_600 [mg/cm <sup>3</sup> ]	404 ± 25	385 ± 34	404 ± 31	415 ± 35
TRAB_DEN_400 [mg/cm <sup>3</sup> ]	275 ± 24	276 ± 26	277 ± 26	270 ± 15
TRAB_DEN_p1 [mg/cm <sup>3</sup> ]	469 ± 25	428 ± 75	482 ± 60	521 ± 68
TOT_A [mm <sup>2</sup> ]	1,73 ± 0,11	1,63 ± 0,13	1,88 ± 0,09	1,85 ± 0,16
CRTSUB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	0,95 ± 0,13	0,85 ± 0,19	1,10 ± 0,14	1,18 ± 0,17
TRAB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	0,77 ± 0,12	0,78 ± 0,09	0,79 ± 0,12	0,66 ± 0,13
TRAB_A /TOT_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	44,8 ± 6,9	48,2 ± 8,34	41,9 ± 6,4	36,3 ± 7,3

Legende s. Tab. 4a

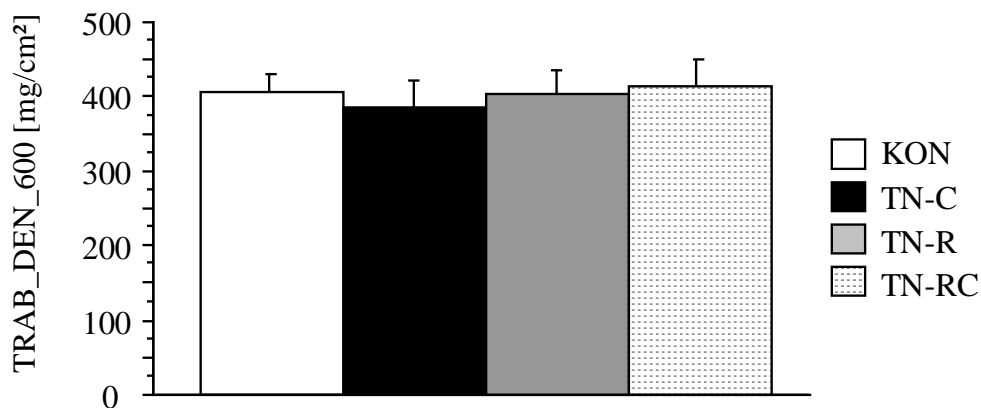
**Tabelle 6b:** Analysen der Wirbelkörper (L2-L4) mittels pQCT: Kontrollen, TN-C-, TN-R, TN-C/R-defiziente Tiere: prozentuale Abweichungen und Signifikanzlevel

	TN-C-KO	TN-R-KO	TN-C/R-KO
TOT_CNT [mg/mm]	-11,8%	11,3%	+19,3% **
CRTSUB_CNT_600 [mg/mm]	-15,4%	17,1%	+36,5% **
TRAB_CNT_600 [mg/mm]	-4,9%	-0,2%	-14,6%
TOT_DEN [mg/cm <sup>3</sup> ]	-7,4%	1,7%	+11,6% *
CRTSUB_DEN_600 [mg/cm <sup>3</sup> ]	-6,1%	1,5%	+10,5% **
CRTSUB_DEN_400 [mg/cm <sup>3</sup> ]	-3,3%	2,0%	+13,0% **
CRTSUB_DEN_p1 [mg/cm <sup>3</sup> ]	-6,7%	-1,0%	+11,8% **
TRAB_DEN_600 [mg/cm <sup>2</sup> ]	-4,8%	-0,2%	2,5%
TRAB_DEN_400 [mg/cm <sup>2</sup> ]	0,6%	0,9%	-1,7%
TRAB_DEN_p1 [mg/cm <sup>2</sup> ]	-8,7%	2,9%	11,2%
TOT_A [mm <sup>2</sup> ]	-5,5%	+9,1% **	6,8%
CRTSUB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	-10,5%	15,4%	+24,2% *
TRAB_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	0,9%	1,7%	-14,2%
TRAB_A /TOT_A_600 [mm <sup>2</sup> ]	7,7%	-6,5%	-18,9% *

\* p<0,05 im Einzeltest, ohne Korrektur für multiple Testung = grenzwertig signifikant;  
 \*\* p<0,0166 im Einzeltest = p<0,05 global mit Korrektur für multiple Testung zwischen den verschiedenen Gruppen = signifikant

Legende s. Tab. 4a

**Abb. 12:** Trabekuläre Dichte der Wirbelkörper L2-L4



## 6. Diskussion

### 6.1 Fragestellung und wichtigste Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Studie war die Charakterisierung des Skelettsystems von TN-C- und TN-C/R-Knockout-Mäusen. Es sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Können Veränderungen der Knochengröße und Knochenzusammensetzung (Knochenmineralgehalt = bone mineral content = BMC) bei Mäusen mit TN-C- und TN-C/R-Defizienz beobachtet werden?
2. Gibt es nachweisbare Alterationen der trabekulären und kortikalen Knochendichte bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren?
3. Gibt es signifikante strukturelle Unterschiede in der distalen Femurmetaphyse sowie in der Femurdiaphyse (-schaft) von TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren?

In Bezug auf diese Fragen, lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen:

1) Es können sowohl in der TN-C-KO-Gruppe als auch in der Doppel-KO-Gruppe signifikante Veränderungen der Knochengröße und des Knochenaufbaus beobachtet werden. Die Tiere mit TN-C-Defizienz wiesen ein signifikant reduziertes Ganzkörpergewicht auf und signifikant kürzere Tibiae. Auch zeigte sich der Gesamtknochenmineralgehalt (BMC) der TN-C-negativen Tiere sowie der gewichtsnormierte Knochenmineralgehalt signifikant reduziert. Weiterhin konnte bei den Tieren der TN-C-defizienten Gruppe eine signifikant erniedrigte Knochenprojektionsfläche (Area) ermittelt werden. Unter den Einzelknochen zeigten sowohl die Tibiae als auch die Wirbelkörper einen signifikant reduzierten Knochenmineralgehalt.

Die Tiere mit TN-C/R-Defizienz wiesen einen signifikant erhöhten Knochenmineralgehalt sowie einen signifikant höheren Einzelknochendurchmesser ihrer Femora auf.

2) Es können bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren sowohl in der trabekulären als auch in der kortikalen Knochendichte signifikante Veränderungen beobachtet werden. Die TN-C-defizienten Tiere wiesen in der Femurmetaphyse eine signifikante Verringerung der apparenten Knochendichte sowie der subkortikalen Knochendichte auf. Die Wirbelkörper (L2-L4) der TN-C/R-KO-Gruppe zeigten eine signifikant erhöhte apparente Knochendichte und eine signifikante Zunahme der subkortikalen Knochendichte.

3) In der distalen Femurmetaphyse der TN-C-defizienten Mäuse beobachteten wir einen signifikant verminderten Gesamtknochenmineralgehalt, kortikalen Knochenmineralgehalt und subkortikalen Knochenmineralgehalt. Die TN-C/R-defizienten

Tiere wiesen hier keine signifikanten Veränderungen auf. Ebenso konnte in der TN-C-defizienten Gruppe eine signifikant erniedrigte apparente Knochendichte und subkortikale Knochendichte der Femurmetaphyse dargestellt werden, in der TN-C/R-Gruppe zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen. Die Gesamtknochenquerschnittsfläche der distalen Femurmetaphyse war in der TN-C/R-defizienten Gruppe signifikant erhöht, nicht jedoch in der TN-C-defizienten Gruppe. Die Femurdiaphyse der TN-C-KO Tiere wiesen einen signifikant reduzierten Gesamtknochenmineralgehalt, eine signifikant reduzierte kortikale Knochenmasse sowie eine signifikant reduzierte kortikale Knochenquerschnittsfläche auf. Auch die Dicke der Kortikalis der Femurdiaphyse erwies sich bei den TN-C-KO-Mäusen signifikant erniedrigt. Die Gesamtknochenquerschnittsfläche war in diesem Bereich in der Doppel-KO-Gruppe dagegen signifikant erhöht. Die abschließende Analyse Geometrie-basierter Parameter erbrachte in der Doppel-KO-Gruppe eine signifikante Zunahme für das polare Trägheitsmoment, jedoch keine erheblichen Veränderungen bei den TN-C-KO Mäusen.

## **6.2 Methodikdiskussion**

### ***6.2.1 Die Bedeutung der Maus als Knockout-Modell in der Forschung***

Die Maus hat als Modell in der medizinischen Forschung in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, da sie genetisch große Ähnlichkeiten mit dem Menschen aufweist (Ezzell 1996; Gassmann et al. 1998). Veränderungen im Erbmaterial, seien sie zufällig oder willkürlich herbeigeführt, stellen geeignete Modelle dar, um genetische Ursachen menschlicher Erkrankungen zu untersuchen (Ezzell 1996; Gassmann et al. 1998).

Bei dem hier verwendeten Mausmodell handelt es sich um Knockout-Tiere. Dieses Tiermodell bietet eine einzigartige Gelegenheit, Alterationen der Knochenarchitektur in einem TN-C- und TN-R-negativen sowie einem TN-C/R-defizienten Modell mit dem eines normalen Organismus zu vergleichen. Der Vorteil ist dabei die Möglichkeit der spezifischen Untersuchung funktioneller Auswirkungen des Fehlens dieser Glykoproteine auf den Knochen.

### ***6.2.2 Auswahl der Tiere***

In verschiedenen Studien wurde die Beteiligung von TN-C an der Knochenentstehung erläutert (Chiquet und Fambrough 1984a; Crossin et al. 1986; Mackie et al. 1987b; Väkevä et al. 1990; Lukinmaa et al. 1991; Mackie und Tucker 1992; Pacifici et al. 1993; Koyama et al.

1996), und somit vermuteten wir nachweisbare Alterationen im Aufbau der Knochen dieser Tiere, die durch eine genauere Analyse der Knochenstruktur erkennbar werden sollten.

Das Alter der in dieser Studie verwendeten Tiere lag bei 24 Monaten, was für Mäuse ein relativ hohes Alter darstellt. Anhand früherer TN-C-Knockout-Studien ist bekannt, dass TN-C-defiziente Tiere lebensfähig waren und keine schwerwiegenden Veränderungen in ihrem Organismus aufwiesen (Saga et al. 1992; Mitrovic und Schachner 1995; Forsberg et al. 1996; Settlers et al. 1997). Wir stellten uns die Frage, ob sich das Fehlen des TN-C-Proteins während der Knochenbildung später erkennbar macht, zum Beispiel durch schnellere Abbauprozesse oder ineffektive Umbauprozesse und daraus folgend eine verminderte Aufrechterhaltung der Knochenmatrix. Wir gehen nicht davon aus, dass jüngere Tiere stärkere Veränderungen im Vergleich zu den in dieser Studie verwendeten Tieren aufgewiesen hätten. Ziel war es vorhandene Defizite oder Veränderungen in Umbau- und Erneuerungsprozessen bei TN-C und TN-C/R-KO-Tieren im fortgeschrittenen Alter zu untersuchen und nachzuweisen.

Studien an Mäusen mit hohem Alter zeigen, dass Knochenumbauprozesse trotz des bereits entstandenen Knochenabbaus nicht abgeschlossen sind. An Knochen von 20 Monate alten Mäusen konnten durch Zugabe eines Wachstumshormons anabole Effekte beobachtet werden, wie zum Beispiel eine Zunahme der Zellproliferation, der Syntheserate notwendiger Knochenproteine und eine verstärkte Knochenmineralisation (Livne et al. 1997). Andere Untersuchungen an 12 Monate alten Mäusen zeigten eine reduzierte Konzentration und Aktivität des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  (Gazit et al. 1998). TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Wachstumsfaktor im Knochen und gilt als Stimulator für Zellproliferation und Produktion der ECM (Roberts et al. 1988; Hock et al. 1990; Dallas et al. 1995). Auch die Knorpel- und Knochenbildung wird in erheblichem Maße durch TGF- $\beta$  beeinflusst (Pfeilschifter et al. 1987; Noda et al. 1989; Marcelli et al. 1990). Es konnte beobachtet werden, dass es anhand von exogen zugeführtem Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) zu vermehrter Knochenbildung, Volumenzunahme im trabekulären Knochenkompartiment und verbesserter Heilungstendenz nach Knochenfrakturen kam (Gazit et al. 1999).

Anhand solcher Studien wurde gezeigt, dass gesunder Knochen trotz des hohen Alters und der bereits abgelaufenen Alterungsprozesse mit Hilfe von Stimulatoren in der Lage ist adäquat auf exogene Stimuli zu reagieren. Weiterhin können in diesem „alten“ Gewebe Prozesse ablaufen, die unter physiologischen Bedingungen in solch einem Umfang nicht mehr nachweisbar sind.

Weitere Untersuchungen am Knochen verglichen die Reparationsvorgänge junger Tiere (1 Monat) mit denen älterer Tiere (26 Monate) (Kaar et al. 2001). Durch den Einbau von Titaniumpartikeln wurden in diesen Knochen Osteolysen induziert und die Dauer der Nachweisbarkeit verglichen. Bei den jungen Tieren waren diese Knochendefekte binnen eines Monats nicht mehr nachweisbar. Im Knochen der älteren Tiere waren die Strukturdefekte nach derselben Zeit um ein Vielfaches stärker ausgeprägt. Anhand dieser Ergebnisse konnten Kaar und Mitarbeiter (2001) verdeutlichen, dass Knochensubstanz abhängig von ihrem Alter unterschiedlich auf exogene Einflüsse reagiert, obwohl älteres Knochengewebe das Potenzial hätte in dem Maße zu reagieren wie junge Knochensubstanz.

### ***6.2.3 DXA und pQCT als Methoden zur Untersuchung von Knochen***

Zur Darstellung von TN-C im Skelettsystem wurden bisher vor allem immunhistochemische Methoden angewendet. Dabei wurden die TN-C-positiven Strukturen mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht (Chiquet-Ehrismann et al. 1986; 1988; Erickson und Taylor 1987, Aufderheide et al. 1988; Hoffmann et al. 1988). Bisherige Untersuchungen der Knochen TN-C-defizienter Tiere konnten Veränderungen im Knochenmark zeigen, jedoch gibt es bisher keine Studie, die sich speziell mit den morphologischen Veränderungen der Knochenstruktur von TN-C- und TN-C/R-Knockout Tieren befasst hat.

Um den Einfluss genetischer Faktoren auf den skelettalen Phänotyp zu identifizieren und deren Mitwirken in Differenzierung, Wachstum, Erhalt und Degeneration des Skelettsystems näher zu untersuchen, ist eine Messung von Knochenmineralgehalt, Knochendichte, Knochenform sowie Knochenaufbau und strukturellen Parametern erforderlich.

Die bisher gebräuchlichste Methode zur nicht-invasiven Messung des Mineralgehaltes im skelettalen System ist die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA). Bei diesem Verfahren erhält der Untersucher eine flächenhafte Knochendichte ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ), jedoch ist die Bestimmung der volumetrischen Knochendichte ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) nicht möglich (siehe Kapitel 2.9.1). Diese Technik ist beim Menschen in der Osteoporosediagnostik bereits fest etabliert (Genant et al. 1996; Adams 1997) und wurde auch im Tiermodell erfolgreich eingesetzt (Rozenberg et al. 1995; Grier et al. 1996; Makan et al. 1997; Rose et al. 1998). Die Anwendung der Verfahren bei Kleintieren, wie Mäusen, ist aufgrund der geringen Körpergrößen eine Herausforderung gewesen, jedoch haben verschiedene Studien gezeigt, dass moderate bis gute Ergebnisse erzielt werden können (Jilka et al. 1996; Klein et al. 1998; Ferretti 1998; Nagy und Claire 2000; Lochmüller et al. 2001; Eckstein et al. 2002a,b, 2004).

Der Vorteil der DXA liegt darin, dass, im Unterschied zu morphometrischen Untersuchungen der Knochen, nicht nur die externe Dimension des Skeletts, sondern die tatsächliche Masse an mineralisiertem Knochengewebe für das gesamte Tier quantitativ erfasst werden kann (Wolf 1991; Eckstein et al. 2002a,b, 2004). Ein weiterer Vorzug ist die Nichtinvasivität dieser Methode, die es erlaubt, weiterführende Untersuchungen (histologisch, biochemisch, biomechanisch) an den Knochen durchzuführen.

Am Beispiel der Maus zeigten Lochmüller et al. (2001), dass sich die Masse an mineralisiertem Gewebe mittels DXA mit guter Präzision messen lässt und dass skelettale Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren reproduzierbar bestimmt werden können (Lochmüller et al. 2001). Sie ermittelten bei Mäusen mit einem Körpergewicht  $\geq 40$  g einen Präzisionsfehler (root mean square average [RMS] Variationskoeffizient (CV%) der Wiederholungsmessung) für die Bestimmung des Ganzkörperknochenmineralgehaltes (BMC) von 4%. Bei Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 g ergab sich ein Präzisionsfehler von bis zu 10% (Lochmüller et al. 2001). Der Präzisionsfehler bei der Bestimmung des BMC der Einzelknochen war für die isolierte Mäusefemur mit 0,1% bis 4,2% am geringsten. Die Wiederholungsmessungen der Tibia ergaben Präzisionsfehler mit einer Spannbreite von 1,4% bis 5,7% und die der Wirbelsäule lagen zwischen 0,7% bis 8,6%.

Eckstein et al. (2002a) validierten das Verfahren im Vergleich zu Veraschungsanalysen. Die DXA-Parameter zeigten bei größeren Tieren ( $> 40$  g) einen genaueren Bezug zum Veraschungsgewicht sowie zum Kalziumgehalt. Eckstein und Mitarbeiter (2002b) ermittelten den BMC von Karkassen (Mäuse ohne Kopf), deren Körpergewicht unter 40 g lag (in-situ), und weiterhin von verschiedenen Einzelknochen (ex-situ). Bei den in-situ Messungen mittels DXA wurden 34 Wildtyp Mäuse mit einer Gewichtsspanne von 20,2 g bis 42,2 g untersucht. (Mit Hilfe von ROI konnten drei verschiedene Bereiche unabhängig voneinander bestimmt werden: der kopflose Körperteil, der Kopf und der Gesamtkörper).

Die Ex-situ-Messungen der Einzelknochen (Tibia, Femur, Lendenwirbel) wurden von 9 Tieren mit einem Körpergewicht von 20 g bis 60 g durchgeführt. Gemessen wurden 12 Knochen (4 Tibiae, 4 Femora, 4 Wirbelsäulen). Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu prüfen wurden die Messungen an verschiedenen Tagen nach Kalibration des Gerätes wiederholt. Eckstein und Mitarbeiter (2002b) konnten eine signifikante Unterschätzung des Knochenmineralgehaltes gegenüber dem Veraschungsgewicht nachweisen (46% bei den Karkassen, 35% bei den Ganzkörpern, 4% beim Kopf). Dennoch ergaben die Ergebnisse eine hohe Korrelation mit einem SEE (standard error of estimate) von nur 6,9% ( $r = 0,98$ ) für die



Karkassen; 6,1% ( $r = 0,98$ ) für den Kopf und 5,7% ( $r = 0,98$ ) für den gesamten Körper. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede für die Messgenauigkeit bei Mäusen mit verschiedenen Körpergewichten ermittelt werden (Eckstein et al. 2002b). Auch das Veraschungsgewicht der Einzelknochen wurde mit Abweichungen von  $-49\%$  bis  $-7\%$  in der DXA deutlich unterschätzt. Hier ergab sich jedoch ebenfalls eine hohe Korrelation mit einem SEE (standard error of estimate) von 6,2% ( $r = 0,994$ ) für die Tibia; 3,8% ( $r = 0,998$ ) für den Femur und 5,3% ( $r = 0,995$ ) für die Wirbelsäule. Der Präzisionsfehler bei der Bestimmung des BMC der Einzelknochen war für das isolierte Mäusefemur mit 0,1% bis 4,2% am geringsten. Die Wiederholungsmessungen der Tibia ergaben Präzisionsfehler mit einer Spannbreite von 1,4% bis 5,7% und die der Wirbelsäule lagen zwischen 0,7% bis 8,6%. Der root mean square (RMS) average CV% (Glüer et al. 1995) lag für die gesamten Messungen bei 4% (Eckstein et al. 2002b).

In einer weiteren Validierungsstudie von Eckstein et al. (2002a) wurden die Ergebnisse der DXA-Analysen (BMC des Ganzkörpers sowie des Fett-Gewebe-Anteils [Fat-tissue-content, FTC] von 28 Tieren) mit chemischen Methoden und dem  $\mu$ CT verglichen. Der BMC (gemessen mit der DXA) wurde im Vergleich zum Veraschungsgewicht um  $29\% \pm 6,4\%$  unterschätzt. Der SEE lag bei 8,5% und der Korrelationskoeffizient betrug  $r = 0,95$ . Der Kalziumgehalt der Knochen (gemessen mit der DXA) wurde um  $28,1\% \pm 1,6\%$  unterschätzt, zeigte jedoch mit dem Veraschungsgewicht einen hohen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,97$ . Der FTC der Tiere wurde mit der DXA um  $27\% \pm 17\%$  unterschätzt, jedoch zeigte der absolute FTC eine hohe Korrelation mit der chemischen Analyse (SEE 18,6%;  $r = 0,94$ ). Für den relativen FTC wurde ein SEE von 8,8% und ein  $r = 0,96$  ermittelt. Der BMC des Femurs (DXA) wurde mit dem  $\mu$ CT verglichen und zeigte ebenfalls eine hohe Korrelation (SEE 4,3%;  $r = 0,99$ ).

Zusammenfassend konnten Eckstein et al. (2002a) zeigen, dass die Methode der DXA den FTC und den BMC (Gesamt- und des Femurs) mit einer großen Genauigkeit im Vergleich zu chemischen Analysen, Veraschung oder  $\mu$ CT ermittelt. Obwohl die DXA den BMC und den FTC unterschätzt, konnte eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Methoden erzielt werden (Eckstein et al. 2002a).

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Nagy und Claire (2000). Sie vermuteten, dass im Weichteilgewebe von Mäusen ein relevanter Mineralgehalt enthalten sei und dass mittels DXA die Knochenasche genauestens ermittelt werden kann, die Gesamtkörperasche jedoch unterschätzt würde (Nagy und Claire 2000).

Ein weiterführendes Verfahren zur Charakterisierung der Knochenstruktur ist die periphere quantitative Computertomographie (pQCT). Dieses Verfahren wird erfolgreich in der Osteoporosediagnostik bei Menschen (Groll et al. 1999) und Ratten (Ferretti 1995) eingesetzt, wurde aber erst kürzlich für die Studien an Mäusen herangezogen (Breen et al. 1998). Obwohl die räumliche Auflösung nicht so gut ist wie die der Histomorphometrie und des  $\mu$ CT, bietet die pQCT einige Vorteile. Die Tiere können in vivo gemessen werden, die Fertilität bleibt erhalten, und somit können sie ebenfalls für Longitudinalstudien in Betracht gezogen werden. Weiterhin führen die Analysen den zu messenden Strukturen keine Schäden zu und dadurch können weitere Untersuchungen vorgenommen werden (Schmidt et al. 2003). Im Unterschied zur DXA erlaubt die pQCT die Bestimmung der volumetrischen Knochendichte ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) im Bereich der Metaphysen langer Röhrenknochen und der Wirbelkörper. Außerdem ermöglicht die pQCT die separate Beurteilung des trabekulären und des kortikalen Knochenkompartiments sowie die Beurteilung Geometrie-basierter Parameter der Knochen (Groll et al. 1999; Schmidt et al. 2003). Die trabekuläre Knochendichte entlang der langen Knochenachse variiert besonders im Bereich der Wachstumsfuge. Somit kann bei der pQCT, bei welcher axiale Schnitte durch den Knochen gelegt werden, vor allem im metaphysären Bereich die Wachstumsfuge fälschlicherweise in die Messung mit einbezogen werden. Deshalb sollte man versuchen den Schnitt konsequent durch die Metaphyse zu legen, um die knochendichtere Wachstumsfuge definitiv auszuschließen (Schmidt et al. 2003).

Eckstein et al. (2002a,b) und Schmidt et al. (2003) untersuchten die Validität der pQCT unter In-vivo- und In-vitro-Bedingungen und verglichen die Ergebnisse mit denen der Histomorphometrie (Schmidt et al. 2003) und der  $\mu$ CT (Eckstein et al. 2002a,b; Schmidt et al. 2003). Beim Vergleich der drei Methoden sollte man sich verdeutlichen, dass diese Methoden unterschiedliche physikalische Eigenschaften messen (axiale Schnitte im pQCT; sagittale Schnitte in der proximalen Tibia, koronare Schnitte in der lumbalen WS bei der Histomorphometrie).

Bei dem Vergleich der pQCT mit dem  $\mu$ CT konnten Eckstein und Mitarbeiter für die mikrostrukturellen Parameter hohe Korrelationen ( $r = 0,95 - 0,99$ ) mit einem SEE von 1,4 – 15% finden. Die genaueste Übereinstimmung erbrachte die Querschnittsfläche ( $r = 0,99$ ; SEE = 1,4%) gefolgt von der kortikalen Fläche ( $r = 0,99$ ; SEE = 2,4%). Diese Ergebnisse zeigen hohe Korrelationen der verschiedenen Methoden untereinander (Eckstein et al. 2002b).

Schmidt und Mitarbeiter (2003) verglichen die Methode der pQCT mit dem  $\mu$ CT sowie mit der Histomorphometrie. Es wurden Knochen (Tibia, Femur, lumbale WS) von 27 Mäusen ex vivo mit allen drei Methoden gemessen und die Daten miteinander verglichen.

Weiterhin wurden 23 Tiere (12 und 13 Wochen alt) in vivo gemessen. Beim Vergleich von pQCT mit dem  $\mu$ CT fanden sie einen hohen linearen Zusammenhang zwischen der trabekulären Dichte der pQCT und dem BV/TV der  $\mu$ CT ( $r^2$  bis 0,94; SEE = 1,0). Jedoch zeigten die beiden Methoden, besonders bei der Messung kortikaler Parameter (Diaphyse), systematische Abweichungen. Die Überschätzung der pQCT wurde von Schmidt und Mitarbeitern (2003) mit der geringeren Auflösung und den partiellen Volumeneffekten erklärt. Die Parameter der Knochenquerschnittsfläche (CSA), kortikalen Fläche, kortikalen Knochenmineralgehalts, kortikalen Dicke und Geometrie-basierten Parameter zeigten trotz dieser Abweichungen eine hohe Übereinstimmung mit der  $\mu$ CT ( $r^2 > 0,77$ ).

Beim Vergleich von pQCT mit der Histomorphometrie betrug das Bestimmtheitsmaß in der Tibia und im Femur  $r^2 = 0,79$  und der Standardfehler SEE = 1,6/2,4 (Schmidt et al. 2003).

Die pQCT zeigte bei Mäusen unter In-vitro-Bedingungen eine gute Präzision, die jedoch in Abhängigkeit von den zu bestimmenden Parametern und dem verwendeten Messmodus größere Schwankungen aufwies. Die beste Präzision konnte in vitro für die Gesamtknochendichte ermittelt werden. Hierbei wies das Femur, vor allem die Metaphyse, die höchste Präzision mit Werten von 1% (RMS average CV% für die Gesamtknochendichte) bis 4,2% (trabekuläre Dichte PM 1: 40%) auf. Die kortikalen Parameter waren in der Präzision denen der trabekulären überlegen. In der Tibia lagen die Präzisionsfehler zwischen 1,1% – 1,7% (Tibiametaphyse, CSA 1,1%, kortikale Querschnittsfläche (CRT\_A) und kortikale Dicke (CRT\_THK) jeweils 1,7%) (Schmidt et al. 2003).

Unter In-vivo-Bedingungen waren die Präzisionsfehler am distalen Femur und der Tibiaschaftmitte größer als unter Ex-vivo-Bedingungen. Am distalen Femurende betrug der RMS CV% 2,3% (subkortikale Dichte; PM 2, 600 mg/cm<sup>2</sup>) bis 5,1% (trabekuläre Dichte; PM 20, 40%). Am Tibiaschaft lag der Präzisionsfehler zwischen 2,2% (für die relative kortikale Fläche) und 7,1% (für das polare Trägheitsmoment). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die pQCT im Vergleich zum  $\mu$ CT und zur Histomorphometrie genaue und reproduzierbare Parameter von Mäuseknochen liefert (Schmidt et al. 2003).

### 6.3 Ergebnisdiskussionen und Interpretationen

Die Präsenz und die Beteiligung des Glykoproteins TN-C während der Skelettentstehung und Skeletterneuerung konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Mackie et al. 1987b; Väkäva et al. 1990; Mackie und Tucker 1992). TN-C wird im Skelett mit hoher Syntheserate produziert (Mackie und Ramsey 1996a,b). Das Protein soll eine wichtige Rolle während der

Knorpelentstehung spielen und die Differenzierung der heranwachsenden Knorpelzellen beeinflussen (Chiquet und Fambrough 1984a,b; Mackie et al. 1987b; Hoffmann et al. 1988; Väkäva et al. 1990; Chuong et al. 1993; Pacifici et al. 1993; Pacifici 1995; Mackie und Ramsey 1996b). Im Knochen konnte die Präsenz von TN-C im kondensierten embryonalen Mesenchym, in den primären Ossifikationszentren des endochondralen Knochens, an der gesamten Trabekeloberfläche sekundärer Ossifikationszentren, an der Grenze zwischen den hypertrophierten Knorpelzellen und den Knochenvorläuferzellen, zwischen der Wachstumsfuge und der Epiphyse sowie in Osteozytenlakunen nachgewiesen werden (Mackie et al. 1987b; Väkäva et al. 1990; Mackie und Ramsey 1996a). Auch das Periost gehört während seiner Entwicklung zu den TN-C-positiven Strukturen. Im Gegensatz zu anderen Geweben verschwindet TN-C beim Erwachsenen nicht aus dem Periost, welches während der Knochenneubildung als Reservoir für Knochenzellen dient (Mackie und Ramsey 1996a, b). TN-C wurde um die Osteoblastenvorläuferzellen und die Osteoblasten, die das Glykoprotein sowohl in vivo als auch in vitro sezernierten, nachgewiesen (Mackie et al. 1987b; Mackie und Tucker 1992). Es beeinflusste nachweislich die Differenzierung und Entwicklung der Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. In TN-C-negativen Knochenzellkulturen konnten Defizite der Osteoblastenfunktionen nachgewiesen werden sowie eine verminderte Kollagensynthese und eine reduzierte Aktivität der alkalischen Phosphatase (Mackie und Ramsey 1996b). Weiterhin konnten Ohta und Mitarbeiter (1998) im Knochenmark TN-C-defizienter Tiere eine herabgesetzte Koloniebildung der Knochenzellen finden .

Aufgrund der Tatsache, dass TN-C während des Wachstums, der Differenzierung und Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktionen eine wichtige Rolle spielt und dass es einen Vermittler zwischen Knochenzellen und deren Umgebung darstellt und für eine optimale Anpassung der Zellen verantwortlich zu sein scheint, ist es erstaunlich, dass die skelettalen Veränderungen der TN-C-defizienten Tiere unserer Studie sehr schwach waren und kein nachweislicher Zusammenhang zwischen den Ergebnissen und dem Fehlen des Glykoproteins TN-C- herzustellen war.

Unsere Ergebnisse zeigten bei den TN-C-KO-Mäusen ein signifikant geringeres Körpergewicht und kürzere Knochen. Es fand sich ein signifikant niedrigerer Gesamtknochenmineralgehalt und ein tendenziell reduzierter gewichtsnormierter Knochenmineralgehalt. Weiterhin wies die TN-C-KO Gruppe ein signifikant reduzierter Knochenmineralgehalt der Tibiae sowie der Wirbelkörper auf.

In der pQCT fand sich ein signifikant reduzierter Gesamt- und subkortikaler Knochenmineralgehalt sowie eine signifikant reduzierte apparente und subkortikale Knochendichte. Die Messungen an der Femurdiaphyse ergaben in dem TN-C-negativen Kollektiv einen signifikant verminderten Gesamt- und kortikalen Knochenmineralgehalt.

Für den TN-C/R-Doppel-KO wurde eine signifikant höhere Knochendichte an den Wirbelkörpern beobachtet. Geometrische und kortikale Parameter (kortikale Fläche und Dicke, mechanisches Trägheitsmoment) zeigten eine signifikante Erniedrigung bei den TN-C-KO und tendenziell höhere Werte bei TN-R- und bei Doppel-KO Tieren.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass sich bei den TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren in der phänotypischen Charakterisierung des Skelettsystems nur relativ geringe Unterschiede zu den Kontrollen aufwiesen. Diese waren in der TN-C-negativen Gruppe in erster Linie auf das verminderte Körpergewicht der Tiere sowie kürzere Knochen zurückzuführen. Eine Erklärung für das reduzierte Gewicht dieser Tiere und die kürzeren Knochen gibt es bisher nicht, dieses Phänomen wurde in der Literatur bisher auch nicht beschrieben. Es muss beachtet werden, dass das Kollektiv mit TN-C-Defizienz aus 6 Tieren bestand und es dementsprechend auch ein Zufallsbefund sein könnte, dass diese 6 Tiere ein niedrigeres Gewicht aufwiesen als die Mäuse ohne TN-C-Defizienz. Die Doppel-KO Tiere zeigten, außer einem signifikant erhöhten Einzelknochendurchmesser der Femora, keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten, so dass die inkonsistenten Ergebnisse für die TN-C- und TN-C/R-Knockout Tiere eher für ein statistisches Artefakt als einen tatsächlichen Effekt durch TN-C-KO am Knochen sprechen.

TN-C-Defizienz wurde bereits in anderen Organsystemen untersucht, so z. B. in der Brustdrüse (Chiquet-Ehrismann et al. 1986), in der wachsenden Zahnglocke (Thesleff et al. 1987), in den Tubuli der sich bildenden Nieren (Aufderheide et al. 1987), im Gewebe des Urogenitalsinus (Takeda et al. 1988), im Kleinhirn (Husmann et al. 1992), in Muskelsehnenverbindungen und im glatten Muskelgewebe (Grumet et al. 1985), in Haarfollikeln (Chiquet-Ehrismann et al. 1986), im kleinen Intestinum (Aufderheide und Ekblom 1988), im Gehirn (Kruse et al. 1985; Crossin et al. 1989; Prieto et al. 1990; Bartsch et al. 1992a,b), im Gewebe der Flügelknospe (Wehrle-Haller et al. 1991) und in der Haut (Jiang und Chuong 1992). In all diesen Geweben konnte kein pathologischer Phänotyp bei TN-C-Defizienz beobachtet werden. Auch biologische Prozesse, wie die Wundheilung und der Geburtsvorgang, wurden unter TN-C-Defizienz auf ihre Fehlfunktionen hin untersucht und als nicht pathologisch befunden (Mackie et al. 1988; Castellucci et al. 1991; Saga et al. 1992).

Aufgrund der Beteiligung an vielfältigen Prozessen des TN-C im gesamten Organismus und dem Fehlen der phänotypischen Veränderungen bei dessen Defizienz, kam es zu interessanten Interpretationen der Negativergebnisse. Erickson formulierte in diesem Zusammenhang, dass die komplexe Bildung von TN-C im Organismus und der fehlende Phänotyp bei dessen Defizienz ein Beispiel für eine überflüssige Expression von Genen in der Evolutionsgeschichte darstellt (Erickson 1993a). Andere Untersucher postulierten, dass der Organismus selbstständig in der Lage ist die Imbalance von Adhäsionskräften zu regeln. Sie belegten dies mit einem reduzierten Gehalt des gegenteilig zu TN-C (nämlich adhäsiv) wirkenden Proteins Fibronektin unter TN-C-Defizienz (Chiquet-Ehrismann et al. 1994b, Oberhauser et al. 1998; Mackie und Tucker 1999). Weitere Erklärungen diesbezüglich versuchten Mackie und Murphy (1998) zu geben. Sie wiesen 3 Isoformen des TN-C-Moleküls nach, die während der Entwicklung durch die peripheren Knorpel- und Knochenvorläuferzellen exprimiert wurden und die Knorpel- und Knochenentwicklung auf unterschiedliche Art und Weise zu beeinflussen schienen. Die Untersucher stellten die Hypothese auf, dass andere Knochenproteine mit ähnlicher Struktur und Funktionsweise Substituenten für TN-C und dessen Isoformen in Knockout-Mäusen darstellen könnten (Mackie und Murphy 1998). Hierfür kommen Proteine in Frage, die einen vergleichbaren Molekülaufbau wie das fehlende TN-C aufweisen und zugleich in ähnlichen Gewebearten sezerniert werden (Erickson et al. 1993a; Mackie und Murphy 1998). In der unmittelbaren Tenascinfamilie schien nur das TN-W in nähere Auswahl zu kommen. Das bisher jüngste Protein dieser Glykoproteinfamilie wurde aus dem Gewebe des Zebrafisches isoliert, und seine Bildung findet unter anderem während der Entstehung des knorpeligen Skeletts statt (Weber et al. 1999). Tenascin-W ist damit das Protein dieser Glykoproteinfamilie, welches neben TN-C im wachsenden Skelett gefunden wurde und als Substituent in TN-C-defizienten Wirbeltieren in Frage kommen könnte (Mackie und Murphy, 1998).

Die Tiere mit TN-R-Defizienz wiesen keine konsistenten Veränderungen der Knochenstrukturen auf. Jedoch ist aus früheren Studien bekannt, dass die Expression von TN-R hauptsächlich im adulten Nervengewebe erfolgt und dass TN-R nicht im peripheren Nervensystem und auch nicht in anderen Organsystemen, wie zum Beispiel dem Skelettsystem, synthetisiert wird (Pesheva et al. 1989; Bartsch et al. 1993; Fuss et al. 1993). Aufgrund dieser Tatsache konnten wir bei den Tieren mit TN-R-Defizienz keine Auswirkung auf den Knochen erwarten und daher kann die Gruppe der TN-R-defizienten Tiere auch als eine Kontrollgruppe betrachtet werden.

#### **6.4 Schlussfolgerung**

TN-C gilt als ein großes Glykoprotein der extrazellulären Matrix und wurde als erstes Mitglied einer expandierenden Glykoproteinfamilie beschrieben (Mackie et al. 1998). Das Protein konnte sowohl im embryonalen als auch im adulten Gewebe nachgewiesen werden, und seine Präsenz im wachsenden und adulten Knochengewebe konnte in vielen unabhängigen Studien bestätigt werden (Erickson et al. 1989).

Die Betrachtung der Ergebnisse lässt deutlich werden, dass die älteren Tiere mit TN-C-Defizienz in der phänotypischen Charakterisierung des Skelettsystems nur relativ geringe Unterschiede zu den Kontrolltieren aufweisen. Trotz der vielen Prozesse, an denen TN-C während der Skelettentstehung beteiligt ist, konnte nur ein geringer phänotypischer Unterschied an diesen Tieren beobachtet werden. Frühere Studien, welche eine Differenz zwischen dem veränderten Genotyp und dem nahezu unauffälligen Phänotyp zeigten, versuchten Erklärungen für die fehlende phänotypische Ausprägung bei TN-C-Defizienz zu finden. Erickson postulierte, dass die komplexe Bildung des Proteins im Organismus ein Beispiel für eine redundante Expression von Genen in der Evolutionsgeschichte sei (Erickson 1993a). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Organismus in der Lage ist, fehlende Proteine durch ähnliche Moleküle funktionell zu ersetzen oder über eine Reduktion von Antagonisten die notwendige Balance herzustellen (Erickson et al. 1993a; Chiquet-Ehrismann et al. 1994b, Mackie und Murphy 1998; Oberhauser et al. 1998; Mackie und Tucker 1999).

## 7. Zusammenfassung

Tenascin-C ist ein Glykoprotein, welches hauptsächlich während der Embryonalentwicklung in der ECM als Antiadhäsionsmolekül eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund der Lokalisation des Glykoproteins schon zu Beginn seiner Identifizierung wurde vermutet, dass TN-C bei der Skelettogenese eine Rolle spielt. Untersuchungen von embryonalem und adultem Knochen haben schließlich ergeben, dass TN-C vor allem während des Wachstums, aber auch während mechanischer Beanspruchung von den Knochenzellen synthetisiert wird. Unklar ist jedoch, ob das Fehlen dieses Glykoproteins während der Entwicklung und nach Wachstumsabschluss im Knochen nachweisbare strukturelle Alterationen verursacht. Wir überprüften die Fragen, ob 1) Veränderungen der Knochengröße und Knochenzusammensetzung (Knochenmineralgehalt, BMC) bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren beobachtet werden können, 2) ob es nachweisbare Alterationen der trabekulären und kortikalen Knochendichte bei TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren gibt und ob 3) signifikante strukturelle Unterschiede in der distalen Femurmetaphyse sowie im Femurschaft von TN-C- und TN-C/R-defizienten Tieren nachweisbar sind.

Es wurden insgesamt 28 weibliche Mäuse im Alter von 24 Monaten untersucht. Darunter befanden sich 7 Kontrolltiere, 6 TN-C-defiziente Tiere, 7 TN-R-defiziente Tiere und 8 Doppelknockout-Tiere. Die Messung des Knochenmineralgehaltes der Ganzkörper und der Einzelknochen (Femur, Tibia, Humerus, Wirbelkörpern) erfolgte mittels Zwei-Energie-Röntgen Absorptiometrie (DXA), die Bestimmung der volumetrischen Knochendichte, des trabekulären und des subkortikalen Knochenkompartiments sowie eine Untersuchung Geometrie-basierter Knochenparameter wurde mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) am Femur und den Lendenwirbelkörpern durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Körpergewicht der TN-C-defizienten Tiere signifikant erniedrigt ist (-15%). Es ergab ein hoch signifikant erniedrigter absoluter BMC für das Gesamtskelett (-22%), eine nicht signifikante Reduktion für die Einzelknochen (-16% bis -27%) sowie ein tendenziell reduzierter relativer BMC (% Körpergewicht: -7%). In der pQCT zeigten sich bei den Einzelknochen der TN-C-defizienten Gruppe eine signifikant niedrigere Knochendichte am distalen Femur (-13%) und eine tendenzielle Verringerung der Knochendichte der Wirbelkörper. Die TN-C/R-defizienten Tiere wiesen in der pQCT eine signifikant erhöhte Knochenquerschnittsfläche des Femurs (+10%) sowie eine grenzwertig signifikant erhöhte Knochendichte der Wirbelkörper (+11,6%) auf.

Anhand der inkonsistenten Befunde bei TN-C- und TN-C/R-Knockout sowie den nur relativ geringfügigen Abweichungen gegenüber den Kontrolltieren können wir zeigen, dass



---

im Knochen älterer Mäuse keine schwerwiegenden Alterationen unter TN-C-, TN-R- und TN-C/R-Defizienz zu erkennen sind. Wie auch in anderen Studien mit TN-C-defizienten Tieren formuliert, ist zu vermuten, dass der Organismus dieser Lebewesen in der Lage ist, Antagonisten dieser Moleküle zu reduzieren oder einen Ersatz durch funktionell vergleichbare Proteine zu schaffen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Adams J.C., Watt F.M.** 1993 Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183-98
2. **Adams J.E.** 1997 Single and dual energy X-ray absorptiometry. *Eur Radiol* 7:20-31
3. **Angelov D.N., Walther M., Streppel M., Guntinas-Lichius O., Neiss W.F., Probstmeier R., Pesheva P.** 1998 Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induces downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci* 18:6218-29
4. **Aspberg A., Miura R., Bourdoulous S., Shimonaka M., Heinegard D., Schachner M., Ruoslahti E., Yamaguchi Y.** 1997 The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10116-21
5. **Aufderheide E., Chiquet-Ehrismann R., Ekblom P.** 1987 Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol* 105:599-608
6. **Aufderheide E., Ekblom P.** 1988 Tenascin during gut development: appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms, and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 107:2341-9
7. **Aukhil I., Slemp C.C., Lightner V.A., Nishimura K., Briscoe G., Erickson H.P.** 1990 Purification of hexabrachion (tenascin) from cell culture conditioned medium, and separation from a cell adhesion factor. *Matrix* 10:98-111
8. **Aukhil I., Joshi P., Erickson H.P.** 1993 Cell- and heparin-binding domains of the hexabrachion arm identified by tenascin expression proteins. *J Biol Chem* 268:2542-53
9. **Banes A.J., Tsuzaki M., Yamamoto J., Fischer T., Brigman B., Brown T., Miller L.** 1995 Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 73:349-65
10. **Barnea G., Grumet M., Milev P., Silvennoinen O., Levy J.B., Sap J., Schlessinger J.** 1994 Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J Biol Chem.* 269:14349-52
11. **Bartsch S., Bartsch U., Dörries U., Faissner A., Weller A., Ekblom P., Schachner M.** 1992a Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* 12:736-49
12. **Bartsch S., Bartsch U., Dörries U., Schachner M.** 1992b Immunohistological Localization of Tenascin in the Developing and Lesioned Adult Mouse Optic Nerve. *Eur J Neurosci* 4:338-352
13. **Bartsch U., Pesheva P., Raff M., Schachner M.** 1993 Expression of janusin (J1-160/180) in the retina and optic nerve of the developing and adult mouse. *Glia* 9:57-69
14. **Bartsch U., Faissner A., Trotter J., Dörries U., Bartsch S., Mohajeri H., Schachner M.** 1994 Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and nonmyelinated part of retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci* 14:4756-68
15. **Basset C.A.L.** 1962 Current concepts of bone formation. *Journal of bone Joint Surgery* 44:1217-1244
16. **Bonewald L.F., Dallas S.L.** 1994 Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 55: 350-7
17. **Bourdon M.A., Wikstrand C.J., Furthmayr H., Matthews T.J., Bigner D.D.** 1983 Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res* 43:2796-805
18. **Bourdon M.A., Matthews T.J., Pizzo S.v., Bigner D.D.** 1985 Immunochemical and biochemical characterization of a glioma-associated extracellular matrix glycoprotein. *J Cell Biochem* 28:183-95

19. **Bourdon M.A., Ruoslati E.** 1989 Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. *J Cell Biol* 108:1149-55
20. **Brand R., Mehr D., Pardubsky P., Buckwalter J., Martin J.** 1997 Does tenascin help adapt cells to mechanical stress? EORS
21. **Breen S.A., Loveday B. E., Millest J., Waterton J.C.** 1998 Stimulation and inhibition of bone formation: use of peripheral quantitative computed tomography in the mouse in vivo. *Lab Anim* 32:467-76
22. **Bristow J., Tee K.M., Gitelman S.E., Mellon S.H., Miller W.L.** 1993 Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol* 122:265-78
23. **Burch G.H., Bedolli M.A., McDonough S., Rosenthal S.M., Bristow J.** 1995 Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn* 203:491-504
24. **Burch G.H., Gong Y., Liu W., Dettman R.W., Curry C.J., Smith L., Miller W.L., Bristow J.** 1997 Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat Genet* 17:104-8
25. **Caplan A.I.** 1988 Bone development. *Ciba Found Symp*:136:3-21
26. **Carnemolla B., Castellani P., Ponassi M., Borsi L., Urbini S., Nicolo G., Dorcaratto A., Viale G., Winter G., Neri D., Zardi L.** 1999 Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol* 154:1345-52
27. **Carter D.H., Sloan P., Aaron J.E.** 1991 Immunolocalization of collagen types I and III, tenascin, and fibronectin in intramembranous bone. *J Histochem Cytochem* 39:599-606
28. **Carter D.R., Bouxsein M.L., Marcus R.** 1992 New approaches for interpreting projected bone densitometry data. *J Bone Miner Res* 7:137-45
29. **Castellucci M., Classen-Linke I., Muhlhauser J., Kaufmann P., Zadri L., Chiquet-Ehrismann R.** 1991 The human placenta: a model for tenascin expression. *Histochemistry* 95:449-58
30. **Chevalier X., Groult N., Larget-Piet B., Zardi L., Hornebeck W.** 1994 Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:1013-22
31. **Chiquet M., Fambrough D. M.** 1984 Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 98:1926-36
32. **Chiquet M., Fambrough D. M.** 1984 Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J Cell Biol* 98:1937-46
33. **Chiquet M., Matthisson M., Koch M., Tannheimer M., Chiquet-Ehrismann R.** 1996 Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol* 74:737-44
34. **Chiquet-Ehrismann R., Mackie E.J., Pearson C. A., Sakakura T.** 1986 Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47:131-9
35. **Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C.A., Beck K., Chiquet M.** 1988 Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53:383-390
36. **Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C.A.** 1989 Participation of tenascin and transforming growth factor-beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res* 49:4322-5
37. **Chiquet-Ehrismann R.** 1990 What distinguishes tenascin from fibronectin? *FASEB J* 4:2598-604
38. **Chiquet-Ehrismann R.** 1991 Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 3:800-4

39. **Chiquet-Ehrismann R., Tannheimer M., Koch M., Brunner A., Spring J., Martin D., Baumgartner S., Chiquet M.** 1994 Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 127:2093-101
40. **Chiquet-Ehrismann R., Hangios C., Schenk S.** 1995 The complexity in regulating the expression of tenascins. *Bioessays* 17:873-8
41. **Chiquet-Ehrismann R.** 1995 Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 51:853-62
42. **Chung C.Y., Erickson H.P.** 1994 Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol* 126:539-48
43. **Chung C.Y., Zardi L., Erickson H.P.** 1995 Binding of tenascin-C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J Biol Chem* 270:29012-7
44. **Chung C.Y., Murphy-Ullrich J.E., Erickson H.P.** 1996 Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 7:883-92
45. **Chung C.Y., Erickson H.P.** 1997 Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C. *J Cell Sci* 110:1413-9
46. **Chuong C.-M., Chen H.-M.** 1991 Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am J Pathol* 138:427-40
47. **Chuong C.-M., Widelitz R.B., Jiang T.-X., Abbot U.K., Lee Y.-S., Chen H.-M.** 1993 Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog Clin Biol Res* 383B:465-74
48. **Cifuentes- Diaz C., Velasco E., Meunier F.A., Goudou D., Belkadi L., Faille L., Murawsky M., Angaut-Petit D., Molgo J., Schachner M., Saga Y., Aizawa S., Rieger F.** 1998 The peripheral nerve and the neuromuscular junction are affected in the tenascin-C-deficient mouse. *Cell Mol Biol* 44:357-79
49. **Cifuentes- Diaz C., Faille L., Goudou D., Schachner M., Rieger F., Angaut-Petit D.** 2002 Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *J Neurosci Res* 67:93-9
50. **Cindik E., Willnecker J., Wolf E., Eckstein F.** 2000 Analyse femoraler Knocheneigenschaften im MT-bGH-transgenen Mausmodell mit der hochauflösenden pQCT. *Osteologie* 85-93
51. **Copertino D.W., Jenkinson S., Jones F.S., Edelman G.M.** 1995 Structural and functional similarities between the promoters for mouse tenascin and chicken cytotactin. *Proc Natl Acad Sci* 92:2131-5
52. **Crossin K.L., Hoffman S., Grumet M., Thiery J.-P., Edelman G.M.** 1986 Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol* 102:1917-30
53. **Crossin K.L., Hoffman S., Tan S.S., Edelman G.M.** 1989 Cytotactin and its proteoglycan ligand mark structural and functional boundaries in somatosensory cortex of the early postnatal mouse. *Dev Biol* 136:381-92
54. **Derr L.B., Chiquet-Ehrismann R., Gandour-Edwards R., Spence J., Tucker R.P.** 1997 The expression of tenascin-C with the AD1 variable repeat in embryonic tissues, cell lines and tumors in various vertebrate species. *Differentiation* 62:71-82
55. **Drenckhahn D. und Kugler P.** 1994 Bindegewebe. In: Drenckhahn D. und Zenker W. Benninghoff Anatomie (Bd.1)
56. **Eckstein F., Lochmuller EM., Koller B., Wehr U., Weusten A., Rambeck W., Hoefflich A., Wolf E.** 2002a Body composition, bone mass and microstructural analysis in GH-transgenic mice reveals that skeletal changes are specific to bone compartment and gender. *Growth Horm IGF Res* 12:116-25

57. **Eckstein F., Pavicic T., Nedbal S., Schmidt C., Wehr U., Rambeck W., Wolf E., Hoefflich A.** 2002b Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice. *Anat Embryol* 206:139-48
58. **Eckstein F., Wunderer C., Boehm H., Kuhn V., Priemel M., Link T.M., Lochmuller EM.** 2004 Reproducibility and side differences of mechanical tests for determining the structural strength of the proximal femur. *J Bone Miner Res* 19:379-85
59. **Edelmann G.M., Jones F.S.** 1992 Cytotactin: a morphoregulatory molecule and a target for regulation by homeobox gene products. *Trends Biochem Sci* 17:228-32
60. **Ekblom M., Fässler R., Tomasini-Johansson B., Nilsson K. Ekblom P.** 1993 Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J Cell Biol* 123:1037-45
61. **Elfteriou F., Exposito J.Y., Garrone R., Lethias C.** 1997 Characterization of the bovine tenascin-X. *J Biol Chem* 272:22866-74
62. **End P., Panayotou G., Entwistle A., Waterfield M.D., Chiquet M.** 1992 Tenascin: a modulator of cell growth. *Eur J Biochem* 209:1041-51
63. **Enneking W.** 1948 The Repair of complete fractures of rat tibias. *Anatomical Records* 101:515-537
64. **Erickson H.P., Inglesias J.L.** 1984 A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 311:267-9
65. **Erickson H.P., Taylor H.C.** 1987 Hexabrachion proteins in embryonic chicken tissues and human tumors. *J Cell Biol* 105:1387-94
66. **Erickson H.P., Bourdon M.A.** 1989 Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol* 5:71-92
67. **Erickson H.P.** 1993a Gene knockouts of c-src, transforming growth factor beta 1, and tenascin suggest superfluous, nonfunctional expression of proteins. *J Cell Biol* 120:1079-81
68. **Erickson H.P.** 1993b Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 5:869-76
69. **Ezzell G.A.** 1996 Genetic and geometric optimization of three-dimensional radiation therapy treatment planning. *Med Phys* 23:293-305
70. **Faissner A., Steindler D.** 1995 Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13:233-54
71. **Faissner A., Götz B., Joester A., Wigger F., Scholze A., Schütte K.** 1996 Tenascin-C glycoproteins in neural pattern formation and regeneration. *Semin Neurosci* 8:347-356
72. **Faissner A.** 1997 The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* 290:331-41
73. **Fell H.B.** 1925 The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J Morphol Physiol* 40:417-459
74. **Ferretti J.L.** 1995 Perspectives of pQCT technology associated to biomechanical studies in skeletal research employing rat models. *Bone* 17:353S-364S
75. **Ferretti J.L.** 1998 Periphral Quantitative Computed Tomography (pQCT) for evaluating structural and mechanical properties of small bone. In: Yuehuei HA, Draughn RA (eds) *Mechanical Testing of Bone and the Bone-ImplantInterface*. CRC Press, Washington DC:393-395
76. **Fischer D., Brown-Ludi M., Schulthess T., Chiquet-Ehrismann R.** 1997 Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. *J Cell Sci* 110:1513-22

77. **Forsberg E., Hirsch E., Fröhlich L., Meyer M., Ekblom P., Aszodi A., Werner S., Fässler R.** 1996 Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci* 93:6594-9
78. **Friedländer D.R., Hoffman S., Edelman G.M.** 1988 Functional mapping of cytotactin: proteolytic fragments active in cell-substrate adhesion. *J Cell Biol* 107:2329-40
79. **Fukamauchi F., Mataga N., Wang Y.J., Sato S., Youshiki A., Kusakabe M.** 1996 Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 221:151-6
80. **Fukamauchi F., Aihara O., Kusakabe M.** 1998 Reduced mRNA expression of neuropeptide Y in the limbic system of tenascin gene disrupted mouse brain. *Neuropeptides* 32:265-8
81. **Fuss B., Wintergerst S., Bartsch U., Schachner M.** 1993 Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J Cell Biol* 120:1237-49
82. **Gassmann M., Hennet T.** 1998 From Genetically Altered Mice to Integrative Physiology. *News Physiol Sci* 13:53-57
83. **Gazit D., Zilbermann Y., Ebner R., Kahn A.** 1998 Bone loss (osteopenia) in old male mice results from diminished activity and availability of TGF-beta. *J Cell Biochem* 70:478-88
84. **Gazit D., Zilberman Y., Turgeman G., Zhou S., Kahn A.** 1999 Recombinant TGF-beta1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice. *J Cell Biochem* 73:379-89
85. **Geffrotin C., Garrido J.J., Tremet L., Vaiman M.** 1995 Distinct tissue distribution in pigs of tenascin-X and tenascin-C transcripts. *Eur J Biochem* 231:83-92
86. **Gehron Robey P.** 1989 The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18:858-902
87. **Genant H.K., Engelke K., Fuerst T., Gluer C.C., Grampp S., Harris ST., Jergas M., Lang T., Lu Y., Majumdar S., Mathur A., Takada M.** 1996 Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res* 11:707-30
88. **Gherzi R., Carnemolla B., Siri A., Ponassi M., Balza E., Zardi L.** 1995 Human tenascin gene. Structure of the 5'-region, identification, and characterization of the transcription regulatory sequences. *J Biol Chem* 270:3429-34
89. **Götz B., Scholze A., Clement A., Joester A., Schütte K., Wigger F., Frank R., Spiess E., Ekblom P., Faissner A.** 1996 Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol* 132:681-99
90. **Götz M., Bolz J., Joester A., Faissner A.** 1997 Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development. *Eur J Neurosci* 9:496-506
91. **Gooch K.J., Tennant C.J.** 1997 Mechanical forces: their effects on cells and tissues. Berlin:Springer/Verlag
92. **Grier S.J., Turmer A.S., Alvis M.R.** 1996 The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 31:50-62
93. **Groll O., Lochmüller E.-M., Bachmeier M., Willnecker J., Eckstein F.** 1999 Precision and intersite correlation of bone densitometry at the radius, tibia and femur with peripheral quantitative CT. *Skeletal Radiol* 28:696-702
94. **Grumet M., Hoffmann S., Crossin K.L., Edelman G.M.** 1985 Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci* 82:8075-9

95. **Gulcher J.R., Nies D.E., Marton L.S., Stefansson K.** 1989 An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci* 86:1588-92
96. **Hagihara K., Miura R., Kosaki R., Berglund E., Ranscht B., Yamaguchi Y.** 1999 Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 410:256-64
97. **Hagios C., Koch M., Spring J., Chiquet M., Chiquet-Ehrismann R.** 1996 Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J Cell Biol* 134:1499-512
98. **Hagios C., Brown-Luedi M., Chiquet-Ehrismann R.** 1999 Tenascin-Y, a component of distinctive connective tissues, supports muscle cell growth. *Exp Cell Res* 253:607-17
99. **Hall B.K.** 1970 Cellular differentiation in skeletal tissues. *Biol Rev Camb Philos Soc* 45:455-84
100. **Hasegawa K., Yoshida T., Matsumoto K., Katsuta K., Waga S., Sakakura T.** 1997 Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol* 93:431-7
101. **Haunso A., Ibrahim M., Bartsch U., Letiembre M., Celio M.R., Menoud P.** 2000 Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Res* 864:142-5
102. **Hauzenberger D., Olivier P., Gundersen D., Ruegg C.** 1999 Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent T lymphocyte adhesion to fibronectin through the binding of its fnIII 1-5 repeats to fibronectin. *Eur J Immunol* 29:1435-47
103. **Hay E.** 1992 Cell biology of extracellular matrix. 2<sup>nd</sup> ed Plenum Press, Inc., New York
104. **Hinchliffe J.R., Johnson D.R.** 1983 Growth in the cartilage. *Cartilage* 2:255-295
105. **Hock J.M., Canalis E., Centrella M.** 1990 Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 126:421-6
106. **Hoffmann S., Crossin K.L., Edelman G.M.** 1988 Molecular forms, binding functions, and developmental expression patterns of cytotactin and cytotactin-binding proteoglycan, an interactive pair of extracellular matrix molecules. *J Cell Biol* 106:519-32
107. **Husmann K., Faissner A., Schachner M.** 1992 Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. *J Cell Biol* 116:1475-86
108. **Hynes R.O.** 1992 Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25
109. **Ingber D.** 1991 Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 3:841-8
110. **Jaatinen T., Ruuskanen O., Truedsson L., Lokki M.L.** 1999 Homozygous deletion of the CYP21A-TNXA-RP2-C4B gene region conferring C4B deficiency associated with recurrent respiratory infections. *Hum Immunol* 60:707-14
111. **Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC.** 1996 Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97:1732-40
112. **Jones F.S., Burgoon M.P., Hoffman S., Crossin K.L., Cunningham B.A., Edelman G.M.** 1988 A cDNA clone for cytotactin contains sequences similar to epidermal growth factor-like repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci* 85:2186-90
113. **Jones F.S., Hoffman S., Cunningham B.A., Edelman G.M.** 1989 A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions. *Proc Natl Acad Sci* 86:1905-9
114. **Jones P.L., Rabinovitch M.** 1996 Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 79:1131-42

115. **Jones F.S., Jones P.L.** 2000 The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-59
116. **Joshi P., Chung C-Y., Aukhil I., Erickson H.P.** 1993 Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci* 106:389-400
117. **Junqueira L.C., Carneiro J.** 1996 Bindegewebe, in: *Histologie*
118. **Kaar S.G., Ragab A.A., Kaye S.J., Kilic B.A., Jinno T., Goldberg V.M., Bi Y., Stewart M.C., Carter J.R., Greenfield E.M.** 2001 Rapid repair of titanium particle-induced osteolysis is dramatically reduced in aged mice. *J Orthop Res* 19:171-8
119. **Kiernan B.W., Garcion E., Ferguson J., Frost E.E., Torres E.M., Dunnett S.B., Saga Y., Aizawa S., Faissner A., Kaur R., Franklin R.J., French-Constant C.** 1999 Myelination and behaviour of tenascin-C null transgenic mice. *Eur J Neurosci* 11:3082-92
120. **Klein R.F., Mitchell S.R., Phillips T.J., Belknap J.K., Orwell E.S.** 1998 Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J Bone Miner Res* 13:1648-56
121. **Koyama E., Shimazu A., Leatherman J.L., Golden E.B., Nah H.D., Pacifici M.** 1996 Expression of syndecan-3 and tenascin-C: possible involvement in periosteum development. *J Orthop Res* 14:403-12
122. **Kruse J., Keilhauer G., Faissner A., Timpl R., Schachner M.** 1985 The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316:146-8
123. **Lethias C., Descollonges Y., Boutillon M.M., Garrone R.** 1996 Flexilin: a new extracellular matrix glycoprotein localized on collagen fibrils. *Matrix Biol* 15:11-9
124. **Lightner V.A., Gumkowski F., Bigner D.D., Erickson H.P.** 1989 Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy. *J Cell Biol* 108:2483-93
125. **Lightner V., Erickson H.P.** 1990 Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. *J Cell Sci* 95:263-77
126. **Lightner V.** 1994 Tenascin: does it play a role in epidermal morphogenesis and homeostasis? *J Invest Dermatol* 102:273-7
127. **Livne E., Laufer D., Blumenfeld I.** 1997 Comparison of in vitro response to growth hormone by chondrocytes from mandibular condyle cartilage of young and old mice. *Calcif Tissue Int* 61:62-7
128. **Lochmüller E.-M., Weusten A, Wolf E., Cindik E., Renner-Müller I., Eikmeier T., Eckstein F.** 1999 Geschlechtsspezifische Analyse der Knochenmasse normaler und Wachstumshormon-transgener Mäuse mittels Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA) *Ann Anat* 181:191-8
129. **Lochmüller E.M., Miller P., Bürklein D., Wehr U., Rambeck W., Eckstein F.** 2000 In situ femoral dual-energy X-ray absorptiometry related to ash weight, bone size and density, and its relationship with mechanical failure loads of the proximal femur. *Osteoporos Int* 11:361-7
130. **Lochmüller E.M., Jung V., Weusten A., Wehr U., Wolf E., Eckstein F.** 2001 Precision of high-resolution dual energy X-ray absorptiometry of bone mineral status and body composition in small animal models. *Eur Cell Mater* 1:43-51
131. **Lotz M.M., Burdsal C.A., Erickson H.P., McClay D.R.** 1989 Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109:1795-805
132. **Lukinmaa P.-L., Mackie E.J., Thesleff I.** 1991 Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 70:19-26
133. **Mackie E.J., Chiquet-Ehrismann R., Pearson C.A., Inaguma Y., Taya K., Kawarada Y., Sakakura T.** 1987a Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci* 84:4621-5



134. **Mackie E.J., Thessleff I., Chiquet-Ehrismann R.** 1987b Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol* 105:2569-79
135. **Mackie E.J., Halfter W., Liverani D.** 1988a Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 107:2757-67
136. **Mackie E.J., Tucker R.P., Halfter W., Chiquet-Ehrismann R., Epperlein H.H.** 1988b The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development* 102:237-50
137. **Mackie E.J., Tucker R.P.** 1992 Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci* 103:765-71
138. **Mackie E.J., Ramsey S.** 1996a Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anat* 188:157-65
139. **Mackie E.J., Ramsey S.** 1996b Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *J Cell Sci* 109:1597-604
140. **Mackie E.J., Abraham L.A., Taylor S.L., Tucker R.P., Murphy L.I.** 1998 Regulation of tenascin-C expression in bone cells by transforming growth factor-beta. *Bone* 22:301-7
141. **Mackie E.J., Murphy L.I.** 1998 The role of tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis. *Microsc Res Tech* 43:102-10
142. **Mackie E.J., Tucker R.P.** 1992 Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci* 103:765-71
143. **Mackie E.J., Tucker R.P.** 1999 The tenascin-C knockout revisited. *J Cell Sci* 112:3847-53
144. **Makan S., Bayley H.S., Webber C.E.** 1997 Precision and accuracy of total body bone mass and body composition measurements in the rat using x-ray-based dual photon absorptiometry. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1257-61
145. **Marcelli C., Yates A.J., Mundy G.R.** 1990 In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. *J Bone Miner Res* 5:1087-96
146. **Martini R., Schachner M., Faissner A.** 1990 Enhanced expression of the extracellular matrix molecule J1/tenascin in the regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Neurocytol* 19:601-16
147. **Martini R.** 1994 Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23:1-28
148. **Matsumoto K., Saga Y., Ikemura T., Sakakura T., Chiquet-Ehrismann R.** 1994 The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C. *J Cell Biol* 125:483-93
149. **McCachren S.S., Lightner V.A.** 1992 Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum* 35:1185-96
150. **Mehr D., Pardubsky P.D., Martin J.A., Buckwalter J.A.** 2000 Tenascin-C in tendon regions subjected to compression. *J Orthop Res* 18:537-45
151. **Milev P., Fischer D., Haring M., Schulthess T., Margolis R.K., Chiquet-Ehrismann R., Margolis R.U.** 1997 The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem* 272:15501-9
152. **Miragall F., Kadmon G., Faissner A., Antoicek H., Schachner M.** 1990 Retention of J1/tenascin and the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the adult olfactory bulb. *J Neurocytol* 19:899-914
153. **Mitrovic N., Schachner M.** 1995 Detection of tenascin-C in the nervous system of the tenascin-C mutant mouse. *J Neurosci Res* 42:710-7

154. **Mitrovic N., Mohajeri H., Schachner M.** 1996 Effects of NMDA receptor blockade in the developing rat somatosensory cortex on the expression of the glia-derived extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *Eur J Neurosci* 8:1793-802
155. **Moscoso L.M., Cremer H., Sanes J.R.** 1998 Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5. *J Neurosci* 18:1465-77
156. **Murphy-Ullrich J.E., Lightner V.A., Aukhil I., Yan Y.Z., Erickson H.P., Hook M.** 1991 Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 115:1127-36
157. **Nagy T.R., Claire A.-I.** 2000 Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res* 8:392-8
158. **Nakao N., Hiraiwa N., Yoshiki A., Ike F., Kusakabe M.** 1998 Tenascin-C promotes healing of Habu-snake venom-induced glomerulonephritis: studies in knockout congenic mice and in culture. *Am J Pathol* 152:1237-45
159. **Nies D.E., Hemesath T.J., Kim J.-H., Gulcher J.R., Stefansson K.** 1991 The complete cDNA sequence of human hexabrachion (Tenascin). A multidomain protein containing unique epidermal growth factor repeats. *J Biol Chem* 266:2818-23
160. **Noda M., Camiliere J.J.** 1989 In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- $\beta$ . *Endocrinology* 124: 2991-1994
161. **Nörenberg U., Wille, H., Wolff, J.M., Frank, R., Rathjen F.G.** 1992 The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs. *Neuron* 8:849-63
162. **Oberhauser A.F., Marszalek P.E., Erickson H.P., Fernandez J-M.** 1998 The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393:181-5
163. **Ohta M., Sakai T., Saga Y., Aizawa S., Saito M.** 1998 Suppression of hematopoietic activity in tenascin-C-deficient mice. *Blood* 91:4074-83
164. **Pacifici M., Iwamoto M., Golden E.B., Leatherman J.L., Lee Y.-S., Chung C.-M.** 1993 Tenascin is associated with articular cartilage development. *Dev Dyn* 198:123-34
165. **Pacifici M.** 1995 Tenascin-C and the development of articular cartilage. *Matrix Biol* 14:689-98
166. **Pearson C.A., Pearson D., Shibahara S., Hofsteenge J., Chiquet-Ehrismann R.** 1988 Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J* 7:2977-82
167. **Pechak D.G., Kujawa M.J., Caplan A.I.** 1986 Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs. *Bone* 7:441-58
168. **Pesheva P., Spiess E., Schachner M.** 1989 J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol* 109:1765-78
169. **Pesheva P., Probstmeier R.** 2000 The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol* 61:465-93
170. **Pfeilschifter J., Mundy G.R.** 1987 Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci* 84:2024-8
171. **Pierschbacher M.D., Ruoslahti E., Sundelin J., Lind P., Peterson P.A.** 1982 The cell attachment domain of fibronectin. Determination of the primary structure. *J Biol Chem* 257:9593-7
172. **Pierschbacher M.D., Ruoslahti E.** 1984 Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-3

173. **Prieto A.L., Jones F.S., Cunningham B.A., Crossin K.L., Edelman G.M.** 1990 Localization during development of alternatively spliced forms of cytotactin mRNA by in situ hybridization. *J Cell Biol* 111:685-98
174. **Prieto A.L., Andersson-Fisone C., Crossin K.L.** 1992 Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytotactin. *J Cell Biol* 119:663-78
175. **Prieto A.L., Edelmann G.M., Crossin K.L.** 1993 Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc Natl Acad Sci* 90:10154-8
176. **Rathjen F.G., Wolff J.M., Chiquet-Ehrismann, R.** 1991 Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development* 113:151-64
177. **Riou J.F., Umbhauer M., Shi D.L., Boucaut J.C.** 1992 Tenascin: a potential modulator of cell-extracellular matrix interactions during vertebrate embryogenesis. *Biol Cell* 75:1-9
178. **Roberts A.B., Flanders D.C., Kon h P., Thompson N.L., Van Obberghen-Schilling E., Wakefield L., Rossi P., de Crombrughe B., Heine U., Sporn M.B.** 1988 Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. *Recent Prog Horm Res* 44:157-97
179. **Rose B.S., Flatt W.P., Martin R.J., Lewis R.D.** 1998 Whole body composition of rats determined by dual energy X-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *J Nutr* 128:246-50
180. **Rozenberg S., Vandromme J., Neve J., Aguilera A., Muregancuro A., Peretz A., Kinhaert J., Ham H.** 1995 Precision and accuracy of in vivo bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 5:47-53
181. **Rupert K.L., Rennebohm R.M., Yu C.Y.** 1999 An unequal crossover between the RCCX modules of the human MHC leading to the presence of a CYP21B gene and a tenascin TNXB/TNXA-RP2 recombinant between C4A and C4B genes in a patient with juvenile rheumatoid arthritis. *Exp Clin Immunogenet* 16:81-97
182. **Saga Y., Tsukamoto T., Ekblom P.** 1991 Murine tenascin: cDNA cloning, structure and temporal expression of isoforms. *Gene* 104:177-85
183. **Saga Y., Yagi T., Ikawa Y., Sakarura T., Aizawa S.** 1992 Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821-31
184. **Sakai T., Kawakatsu H., Ohta M., Saito M.** 1994 Tenascin induction in tenascin nonproducing carcinoma cell lines in vivo and by TGF-beta 1 in vitro. *J Cell Physiol* 159:561-72
185. **Schmidt C., Priemel M., Kohler T., Weusten A., Muller R., Amling M., Eckstein F.** 2003 Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT). *J Bone Miner Res* 18:1486-96
186. **Settles D.L., Kuskabe M., Steindler D.A., Fillmore H., Erickson H.P.** 1997 Tenascin-C knockout mouse has no detectable tenascin-C protein. *J Neurosci Res* 47:109-17
187. **Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F., Zardi L.** 1991 Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 19:525-31
188. **Soini Y., Kamel D., Apaja-Sakkinen M., Virtanen I., Lehto V.-P.** 1993 Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. *J Clin Pathol* 46:218-21
189. **Spring J., Beck K., Chiquet-Erismann R.** 1989 Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell* 59:325-34

190. **Steindler D.A., Cooper N.G.F., Faissner A., Schachner M.** 1989 Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol* 131:243-60
191. **Suzuki M., Naruse K., Asano Y., Okamoto T., Nishikimi N., Sakurai T., Nimura Y., Sokabe M.** 1997 Up-regulation of integrin beta 3 expression by cyclic stretch in human umbilical endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 239:372-6
192. **Svendsen O.L., Hassager C., Skodt V., Christiansen C.** 1995 Impact of soft tissue on in vivo accuracy of bone mineral measurements in the spine, hip, and forearm: a human cadaver study. *J Bone Miner Res* 10:868-73
193. **Takeda H., Oike Y., Sakakura T.** 1988 Immunofluorescent localization of tenascin during development of the mouse urogenital sinus: possible involvement in genital duct morphogenesis. *Differentiation* 39:131-8
194. **Tan S.S., Crossin K.L., Hoffmann S., Edelmann G.M.** 1987 Asymmetric expression in somites of cytotoxin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc Natl Acad Sci* 84:7977-81
195. **Taylor H.C., Lightner V.A., Beyer W.F., Beyer Jr., McMaslin D., Briscoe G., Erickson H.P.** 1989 Biochemical and structural studies of tenascin/hexabrachion proteins. *J Cell Biochem* 41:71-90
196. **Thesleff I., Mackie E., Vanio S., Chiquet-Ehrismann R.** 1987 Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development* 101:289-296
197. **Thor G., Probstmeier R., Schachner M.** 1987 Characterization of cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J* 6:2581-2586
198. **Tucker R.P.** 1993 Tenascin expression in the mouse: in situ localization and induction in vitro by bFGF. *J Cell Sci* 104:69-76
199. **Tucker R.P., Hagios C., Chiquet-Ehrismann R.** 1999 Tenascin-Y in the developing and adult avian nervous system. *Dev Neurosci* 21:126-33
200. **Umbhauer M., Riou J.-F., Spring J., Smith J.C., Boucaut J.-C.** 1992 Expression of Tenascin mRNA in mesoderm during *Xenopus laevis* embryogenesis: the potential role of mesoderm patterning in tenascin regionalization. *Development* 116:147-157
201. **Väkevä L., Mackie E., Kantomaa T., Thesleff I.** 1990 Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage and bone of rats and mice. *Anat Rec* 228:69-76
202. **Vaughan L., Huber S., Chiquet M., Winterhalter K.H.** 1987 A major, six-armed glycoprotein from embryonic cartilage. *EMBO J* 6:349-353
203. **Vrucinic-Filipi N., Chiquet-Ehrismann R.** 1993 Tenascin function and regulation of expression. *Symp Soc Exp Biol* 47:155-162
204. **Wakabayashi T., Yoshida J., Takaoka T., Sadamoto T., Mizuno M., Kimura S.** 1997 Enzyme immunoassay of glioma cell tenascin secretion and augmentation by tumor necrosis factor-alpha. *Neurol Med Chir* 37:392-7
205. **Webb C.M., Zaman G., Mosley J.R., Tucker R.P., Lanyon L.E., Mackie E.J.** 1997 Expression of tenascin-C in bones responding to mechanical load. *J Bone Miner Res* 12:52-58
206. **Weber P., Montag D., Schachner M., Bernhardt R.R.** 1998 Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol* 35:1-16
207. **Weber P., Bartsch U., Rasband M., N., Czaniera R., Lang Y., Bluethmar H., Margolis R.U., Levinson S. R., Shrager P., Montag D., Schachner M.** 1999 Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 19:4245-62

- 
208. **Wehrle-Haller B., Koch M., Baumgartner J., Spring J., Chiquet M.** 1991 Nerve-dependent and – independent tenascin expression in the developing chick limb bud. *Development* 112:627-637
209. **Weller A., Beck S., Ekblom P.** 1991 Amino acid sequence of mouse Tenascin and differential expression of two Tenascin isoforms during embryogenesis. *J Cell Biol* 112:355-362
210. **Wolff J.** 1892 *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* Verlag August Hirschwald, Berlin
211. **Wolf E., Rapp K., Wanke R., Hermanns W., Pirchner F., von Butler-Wemken I., Brem G.** 1991 Growth characteristics of metallothionein-human growth hormone transgenic mice as compared to mice selected for high eight-week body weight and unselected controls. II. Skeleton. *Growth Dev Aging* 55:237-248
212. **Yang Z., Mendoza A.R., Welch T.R., Zipf W.B., Yu C.Y.** 1999 Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module): a mechanism for gene deletions and disease associations. *Journal of Biol Chem* 274:12147-12156
213. **Yano Y., Geibel J., Sumpio B.E.** 1997 Cyclic strain induces reorganisation of integrin alpha 5 beta 1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem* 64:505-513

## 9. Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele liebe Menschen mit beigetragen. Ich werde hier gar nicht alle aufzählen können, möchte Ihnen aber trotzdem für Ihre Hilfe und Motivation danken.

Herrn Prof. Dr. med. Felix Eckstein darf ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, für die Anregungen und für die stetige Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung der Dissertation danken. Er hat mit seinem Engagement und seiner Begeisterung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel und für die wertvollen Anregungen und Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben bin ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reinhard Putz zu Dank verpflichtet.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Deller die freundliche Überlassung der Tiere und die hilfreichen Ratschläge danken.

Herrn Volker Kuhn danke ich für die vielen theoretischen und praktischen Hilfestellungen sowie den Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt München, die mich während dieser Zeit mit Rat und Tat unterstützten.

Vielen Dank auch an Frau S. Völs, die sich die Zeit genommen hat meine Arbeit im Sinne der Rechtsschreibung zu überprüfen.

Besonderer Dank gilt meinem Verlobten Dominik Bürklein, der mir konstruktiv zur Seite stand und für mich die Statistik etwas verständlicher machte.

Und ganz zum Schluß, aber nicht zuletzt, möchte ich meiner Familie meine Dankbarkeit ausdrücken. Sie war es, die mir den Rahmen gestellt hat, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte und die mich über die vielen Studienjahre begleitet und gestützt hat.

**10. Lebenslauf****PERSÖNLICHE DATEN**

---

Name: Miriam Herberholz  
 Geburtsdatum, -ort: 28.05.1979 in Leipzig  
 Eltern: Dr. med. Brigitte Herberholz und Johannes Herberholz

**SCHULBILDUNG**

---

1985 – 1992 Polytechnische Oberschule Zettlitz  
 1992 – 1997 Sophiengymnasium Colditz  
 07/1997 Allgemeine Hochschulreife Sophiengymnasium Colditz

**STUDIUM**

---

1997 – 2000 LMU München – Studium der Humanmedizin  
 2000 – 2003 TU München – Studium Humanmedizin  
 2003 – 2004 LMU München – Studium der Humanmedizin  
 09/1999 Ärztliche Vorprüfung  
 03/2001 1. Staatsexamen  
 03/2003 2. Staatsexamen  
 11/2004 3. Staatsexamen

**PRAKTIKA**

---

08/2000 Universitätsklinikum rechts der Isar, München  
 Famulatur in der Abteilung für Unfallchirurgie  
 09/2001 Universitätsklinik Karl-Franzens-Universität, Graz/ Österreich  
 Famulatur in der Abteilung für Neurochirurgie  
 02/2002 Universitätsklinikum rechts d. Isar, München  
 Famulatur in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten  
 08/2002 Praxis Dr. B. Herberholz, Geringswalde  
 Famulatur im Bereich Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten  
 10/03 – 02/04 Städtisches Krankenhaus München – Neuperlach  
 Praktisches Jahr, 1. Tertial: Abteilung für Innere Medizin  
 02/04 – 05/04 Städtisches Krankenhaus München – Harlaching  
 Praktisches Jahr, 2. Tertial: Abteilung für Chirurgie  
 06/04 – 09/04 Städtisches Krankenhaus Kinderklinik Dritter Orden, München  
 Praktisches Jahr, 3. Tertial: Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin

**LEHRTÄTIGKEITEN und WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN**

---

WS 03/04; WS 04/05 Präparierassistentin im Kursus der Makroskopischen Anatomie  
 (Anatomische Anstalt LMU München)

**PERSÖNLICHES LITERATURVERZEICHNIS**

---

**M. Herberholz, T. Deller, R. Fässler, F. Eckstein**

*Skelettaler Phänotyp von Tenascin-Knockout-Mäusen mit hohem Lebensalter,*  
*Posterdemonstration, 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft,*  
 1. - 4. Oktober 2002 in Würzburg

**M. Herberholz, T. Deller, R. Fässler, F. Eckstein**

*Skelettaler Phänotyp von Tenascin-Defizienten-Mäusen mit hohem Lebensalter,*  
*Posterdemonstration, Deutsche Gesellschaft für Biomechanik, Anatomische Anstalt*  
 München, 29.05. - 31.05.2003 in München