

Heparansulfate als Regulatoren der Knorpelhomöostase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katja Jochmann

aus Oberhausen

im Februar 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp
2. Gutachter: Prof. Dr. Perihan Nalbant
3. Gutachter: Prof. Dr. Elke Winterhager

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2016

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/41462

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230704-092448-0

Alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	11
1.1 Anatomie der Gelenke	11
1.1.1 Anatomie des Kniegelenks	12
1.1.2 Struktur des Gelenkknorpels	13
1.2 Bildung von Knochen und Gelenken	15
1.2.1 Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation	15
1.2.2 Gelenkentwicklung.....	17
1.3 Arthrose	18
1.3.1 Modellsysteme für Arthrose.....	20
1.3.2 Molekulare Mechanismen bei Arthrose	21
1.4 Proteoglykane.....	24
1.4.1 Heparansulfat-Biosynthese.....	26
1.4.2 Störungen der Heparansulfat-Synthese und assoziierte Krankheitsbilder	27
1.4.3 Funktion von Heparansulfaten bei Arthrose	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Chemikalien.....	33
2.1.1 Enzyme	34
2.1.2 Kits	34
2.1.3 Antikörper	34
2.1.4 Oligonukleotide	35
2.1.5 Verbrauchsmaterial	35
2.1.6 Geräte	36
2.1.7 Software.....	37
2.1.8 Lösungen und Puffer	37
2.1.9 Mausstämme.....	39
2.2 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	39
2.2.2 Nested PCR zur Genotypisierung von einzelnen Zell-Klonen.....	40
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.4 Laser Mikrodisektion.....	41
2.2.5 Microarray	42
2.3 Tierexperimentelle Methoden.....	42
2.3.1 Präparation von genomischer DNA zur Genotypisierung von Mäusen	42
2.3.2 Zeitspezifische Induktion der Cre-Rekombinase durch Doxycyclin oder Tamoxifen	42
2.3.3 Chirurgische Induktion von Arthrose	42
2.3.4 Evaluierung von Arthrose	43
2.4 Histologische Methoden	44
2.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	44

2.4.2	Anfertigung von Kryoschnitten.....	44
2.4.3	Histologische Färbeprotokolle	45
2.4.4	Immunhistochemie	46
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	47
2.5.1	Nachweis von Aggrecan Degradationsproduktion in Femurkopf- Explant-Kulturen	47
2.5.2	Dimethylmethyleneblau-Assay	48
2.5.3	SDS-PAGE	48
2.5.4	Western Blot.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse sind trotz Veränderungen des Gelenkknorpels vor Arthrose geschützt	50
3.1.1	Die Cluster im Gelenkknorpel von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen bestehen aus <i>Ext1</i> -defizienten Zellen	51
3.1.2	<i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse sind vor spontaner Arthrose geschützt	53
3.1.3	Die Höhe der Wachstumsfuge von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen ist vermindert	56
3.1.4	Die Cluster in der Wachstumsfuge bestehen aus <i>Ext1</i> -defizienten Zellen....	57
3.1.5	Das Volumen der Knochentrabekel von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen ist vermindert.....	58
3.1.6	Vermehrte Osteoklasten-Aktivität in <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen	60
3.2	Die klonale Deletion von <i>Ext1</i> ändert die Knorpelhomöostase und schützt vor Arthrose	61
3.2.1	Etablierung der chirurgischen Induktion von Arthrose	61
3.2.2	Induktion der klonalen Rekombination im Alter von sechs Wochen	63
3.2.3	Die klonale Deletion von <i>Ext1</i> schützt vor induzierter Arthrose	64
3.2.4	Die <i>Ext1</i> -defiziente Zellen im Gelenkknorpel ähneln Chondrozyten der Radiärzone.....	65
3.2.5	Veränderte Balance zwischen Auf- und Abbau der Knorpel-ECM in <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen	68
3.2.6	Aktivierung Integrin-abhängiger Signalkaskaden in <i>Ext1</i> -defizienten Zellen.....	72
3.3	Die verminderte Sulfatierung in <i>Ndst1</i>-defizienten Mäusen ändert die Knorpelhomöostase und schützt vor Arthrose	73
3.3.1	<i>Ndst1</i> -heterozygote Mäuse sind vor induzierter Arthrose geschützt.....	74
3.3.2	Verminderte Aggrecan-Degradation im Gelenkknorpel von <i>Ndst1</i> - heterozygoten Mäusen.....	74
3.3.3	Der Gelenkknorpel von <i>Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}</i> Mäusen ist dicker.....	76
3.3.4	<i>Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}</i> Mäuse sind vor induzierter Arthrose geschützt.....	77
3.3.5	Microarray Analyse von <i>Ndst1</i> -defizientem Gelenkknorpel.....	77
4	Diskussion	81
4.1	Die klonale Deletion von <i>Ext1</i> verursacht Änderungen des Gelenkknorpels, der Wachstumsfuge und der Trabekel	81
4.1.1	Die <i>Ext1</i> -defizienten Zellen sind keine klassischen hypertrophen Chondrozyten	82
4.1.2	Mögliche Ursachen für die verschiedenen Phänotypen <i>Ext1</i> -defizienter Zellen.....	83
4.1.3	Die Orientierung <i>Ext1</i> -defizienter Zellen ist gestört	84

4.2 Arthrose	85
4.2.1 Die Deletion von <i>Ext1</i> schützt vor Arthrose	85
4.2.2 Die Deletion von <i>Ndst1</i> schützt vor Arthrose	86
4.3 Heparansulfate als Regulatoren der Knorpelhomöostase	87
4.3.1 Eine veränderte Knorpelhomöostase kann zum Schutz vor OA beitragen	87
4.3.2 Änderungen der Mechanotransduktion und Integrin-abhängiger Signalkaskaden	90
4.3.3 Putativ veränderte Signalwege in <i>Ext1</i> - und <i>Ndst1</i> -defizientem Knorpelgewebe	91
4.4 Ausblick	93
5 Zusammenfassung	95
6 Abstract	97
7 Literaturverzeichnis	99
8 Anhang	109
8.1 Klonale Deletion von <i>Ndst1</i> im Gelenkknorpel	109
8.2 Maus Genotypisierungs-PCRs.....	109
8.3 LCM Nested PCRs.....	111
Danksagung	113
Publikationen	114
Lebenslauf	115
Erklärungen	116

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
β -Gal	β -Galaktosidase
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinases with a thrombospondin motif</i>
APS	Ammoniumpersulfat
b.b.	Blockier-Lösung (<i>blocking buffer</i>)
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C4ST	CS-4O-Sulfotransferase
C6ST	CS-6O-Sulfotransferase
Col	Kollagen (<i>collagen</i>)
Cre	Cre-Rekombinase
CS	Chondroitinsulfat
CS/DS2ST	CS/DS-2O-Sulfotransferase
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotriphosphat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DS	Dermatansulfat
ECM	extrazelluläre Matrix
et al.	und weitere
ETDA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Ext	Exostosin
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
for	<i>forward</i>
g.s.	Ziegen-Serum (<i>goat serum</i>)
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
Gdf	<i>Growth differentiation factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glukosamin
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GlcNAc6ST	N-Acetyl-Glukosamin-6O-Sulfotransferase
HA	Hyaluronan
Hh	Hedgehog

HMO	hereditäres multiple Osteochondrome Syndrom
HS	Heparansulfat
HS2ST	HS-2O-Sulfotransferase
HS3ST	HS-3O-Sulfotransferase
HS6ST	HS-6O-Sulfotransferase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IdoA	Iduronsäure
IF	Immunfluoreszenz
IGD	interglobuläre Domäne
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
KOH	Kaliumhydroxid
KS	Keratansulfat
KSGal6ST	KS-Galaktose-6O-Sulfotransferase
LCM	<i>Laser capture microdissection</i>
LFC	laterale femurale Kondyle
Lig.	Ligament
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LPC	<i>Laser pressure catapulting</i>
LTP	laterals tibiales Plateau
MeOH	Methanol
MFC	mediale femurale Kondyle
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTP	mediales tibiales Plateau
n	Anzahl (<i>number</i>)
Ndst	N-Deacetylase-N-Sulfotransferase
O/N	Über Nacht (<i>over night</i>)
OA	Arthrose (<i>osteoarthritis</i>)
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykan
Ptch	<i>Patched</i>
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone related Protein</i>
rev	<i>reverse</i>
RA	Retinsäure (<i>retinoic acid</i>)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)

RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetracyclin-kontrollierter transkriptioneller Aktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Shh	Sonic hedgehog
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLRPG	<i>small leucin-rich proteoglycan</i>
Smo	Smoothened
Sox	<i>SRY Box containing gene 9</i>
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TRAP	Tatrat-resistente saure Phosphatase
U	Unit
WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Anatomie des Kniegelenks.....	13
Abb. 1.2	Aufbau des Gelenkknorpels.....	14
Abb. 1.3	Schema der Knochenentwicklung.....	17
Abb. 1.4	Pathologische Veränderungen des Gelenks bei OA.....	19
Abb. 1.5	Aggrecan Struktur und ADAMTS und MMP Schnittstellen.....	22
Abb. 1.6	GAGs setzen sich aus verschiedenen Disacchariden zusammen.....	25
Abb. 1.7	Schema und Phänotyp der klonalen Deletion von <i>Ext1</i> in <i>Col2</i> -exprimierenden Chondrozyten.....	29
Abb. 3.1	Safranin Weigert Färbung von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}</i> Mäusen zeigt Osteochondrome und Klone vergrößerter Zellen im Gelenkknorpel.....	51
Abb. 3.2	β -Galaktosidase-Färbung und LCM von Clustern bestätigt den <i>Ext1^{inv/inv}</i> Genotyp.....	52
Abb. 3.3	<i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse sind vor spontaner OA geschützt.....	54
Abb. 3.4	Die Höhe der Wachstumsfuge von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen ist vermindert.....	56
Abb. 3.5	LCM-Analyse der Wachstumsfuge von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen bestätigt <i>Ext1^{inv/inv}</i> Genotyp.....	58
Abb. 3.6	Zwölf Monate alte <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse zeigen eine Verminderung der Knochentrabekel.....	59
Abb. 3.7	<i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse haben eine verminderte Trabekel-Anzahl.....	60
Abb. 3.8	Sechs Monate alte <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse haben eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität.....	61
Abb. 3.9	Operative Induktion von OA im Kniegelenk.....	62
Abb. 3.10	Etablierung der Doxycyclin-Menge zur Induktion der Rekombination in <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen.....	64
Abb. 3.11	Die klonale Deletion von <i>Ext1</i> schützt vor induzierter OA.....	65
Abb. 3.12	Die <i>Ext1</i> -defizienten Cluster im Gelenk exprimieren kein Col X.....	66
Abb. 3.13	Die <i>Ext1</i> -defizienten Klone im Gelenkknorpel der <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse ähneln Chondrozyten der Radiärzone.....	68
Abb. 3.14	Die perizelluläre Matrix der <i>Ext1</i> -defizienten Zellen in <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen ist verändert.....	70
Abb. 3.15	Nachweis von Aggrecan-Degradationsprodukten in Knorpel-Explant-Kulturen von <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäusen.....	72
Abb. 3.16	Die Cluster im Gelenkknorpel der <i>Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}</i> Mäuse zeigen eine Aktivierung Integrin-abhängiger Signalkaskaden.....	73
Abb. 3.17	<i>Ndst1</i> -heterozygote Mäuse sind vor induzierter OA geschützt.....	74
Abb. 3.18	Verminderte Degradation von Aggrecan durch <i>Mmps</i> und <i>Adamts</i> in <i>Ndst1^{+/-}</i> Mäusen.....	75
Abb. 3.19	Der Gelenkknorpel von vier Wochen alten <i>Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}</i> Mäusen ist dicker als bei der Kontrolle.....	76
Abb. 3.20	<i>Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}</i> Mäuse sind vor induzierter OA geschützt.....	77
Abb. 3.21	RNA-Isolierung aus Gelenkknorpel.....	78
Abb. 8.1	Nachweis von <i>Ndst1</i> -defizienten Zellen in <i>Col2-Cre^{ERT};Ndst1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}</i> Mäusen.....	109

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Standard PCR Protokoll und Cycler Programm	40
Tab. 2.2	Histologisches Evaluierungssystem nach Glasson et al., 2010.....	43
Tab. 2.3	Programm zur Dehydrierung und Einbettung von Gewebe in Paraffin.....	44
Tab. 3.1	In <i>Ndst1</i> ^{+/-} Mäusen verstärkt exprimierte Zielgene	79
Tab. 3.2	In <i>Ndst1</i> ^{+/-} Mäusen vermindert exprimierte Zielgene	80

1 Einleitung

Arthrose, in der englischen Fachliteratur als *osteoarthritis* (OA) bezeichnet, gilt weltweit als häufigste degenerative Erkrankung des Skelettsystems. Sie bezeichnet einen Gelenkverschleiß, der über das durch normale Alterungsprozesse hervorgerufene Maß hinausgeht. Charakteristisch für OA ist eine zunehmende Degeneration des Gelenkknorpels und seiner angrenzenden Strukturen, hervorgerufen durch langjährige Überbelastung, Fehlstellungen der Gelenke oder Verletzungen. Bei Patienten kann dies zu Bewegungseinschränkungen, Schmerzen und einer Beeinträchtigung der Lebensqualität führen. Da OA besonders im höheren Lebensalter auftritt, ist aufgrund des demografischen Wandels mit einem Anstieg der OA-Inzidenz zu rechnen. Neben den persönlichen Belastungen für die Patienten verursacht dies enorme volkswirtschaftliche Kosten durch Leistungen des Gesundheitssystems, Arbeitsunfähigkeit und Frühberentungen (Rabenberg, 2013).

Trotz der großen Häufigkeit von OA sind die Ursachen der Erkrankung teilweise wenig verstanden und die Therapieoptionen auf die Behandlung von Krankheits-Symptomen begrenzt. Auf molekularer Ebene ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von OA ein gestörtes Verhältnis von Auf- und Abbau der Knorpelmatrix. In dieser Arbeit soll die Funktion von Heparansulfaten, linearen Polysacchariden der extrazellulären Matrix, beim Erhalt der Gelenkhomeostase untersucht werden, um zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Krankheit beizutragen.

1.1 Anatomie der Gelenke

Die Verbindungen zwischen den Knochen des Körpers werden durch Gelenke gebildet. Anhand anatomischer Kriterien unterscheidet man sogenannte „unechte Gelenke“ (Synarthrosen) von „echten Gelenken“ (Diarthrosen). Während Synarthrosen eine durchgehende, aus Knorpel oder Bindegewebe bestehende Verbindung aufweisen, besitzen Diarthrosen als charakteristisches Merkmal einen Gelenkspalt, der einen größeren Bewegungsspielraum ermöglicht. Der Gelenkspalt ist ein mit Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit) gefüllter Hohlraum, der zwischen den mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen liegt und nach außen durch die sogenannte Gelenkkapsel begrenzt wird. Diese besteht aus einer äußeren Hülle aus Bindegewebe und der innenliegenden Synovialmembran, einem epithel-ähnlichen Gewebe, deren Zellen die Synovialflüssigkeit produzieren. Viele Diarthrosen werden durch Bänder (Ligamente) stabilisiert und durch weitere Strukturen wie Gelenkzwischen­scheiben (Menisci articulares) oder Schleimbeutel (Bursae synoviales) in ihrer Funktion unterstützt (Schünke, 2000).

1.1.1 Anatomie des Kniegelenks

Da die Experimente dieser Arbeit vorwiegend am Kniegelenk (*Articulatio genus*) durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle die Anatomie dieses Gelenks genauer erläutert werden. Das Kniegelenk ist eines der größten und kräftigsten Gelenke des menschlichen Körpers. Es verbindet den Oberschenkelknochen (Femur) mit dem Schienbein (Tibia) und der Kniescheibe (Patella). Das Kniegelenk ist ein zusammengesetztes Gelenk, welches aus zwei Anteilen besteht: dem Gelenk zwischen Femur und Tibia (Femorotibialgelenk) und dem zwischen Femur und Patella (Femoropatellargelenk). Bei dem Femorotibialgelenk (Abb. 1.1) stehen zwei Gelenkflächen des Femurs, die als innere (mediale) und äußere (laterale) Kondyle des Gelenks bezeichnet werden, dem relativ flachen tibialen Plateau gegenüber. Sowohl die femuralen Kondylen als auch das tibiale Plateau sind mit einer Schicht von Gelenkknorpel überzogen. Zwischen ihnen liegen die Menisken. Sie bestehen aus Faserknorpel und sind mit der Gelenkkapsel verwachsen. Durch ihre halbmondförmige Struktur passen sie sich der Form der Gelenkflächen an, vergrößern die Auflagefläche zwischen Femur und Tibia und sorgen daher für eine gleichmäßigere Verteilung von mechanischen Belastungen (Aumüller et al., 2014).

Stabilisiert wird das Gelenk durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ligamente. Medial zwischen den Kondylen liegen die beiden Kreuzbänder (Ligamenta cruciata). Das vordere Kreuzband (Ligamentum cruciatum anterius) verläuft von seinem Ansatzpunkt posterior lateral superior nach anterior medial inferior und sichert so die Tibia gegenüber Verschiebungen nach anterior. Das hintere Kreuzband (Ligamentum cruciatum posterius) zieht sich dagegen von anterior medial superior nach posterior lateral inferior an der Tibia und schützt vor einer Verschiebung der Tibia nach posterior. Beide Bänder gemeinsam stabilisieren das Knie gegenüber Drehbewegungen nach innen. Von außen wird das Kniegelenk durch zwei Seitenbänder gestützt, die als Innen- und Außenband (Ligamentum collaterale mediale/laterale) bezeichnet werden, und sich medial bzw. lateral vom Femur zur Tibia ziehen. Anterior befindet sich die Patellarsehne (Ligamentum patellae), die den Oberschenkelmuskel an der Tibia verankert. In diese Sehne eingebettet ist die Patella. Anatomisch gesehen gehört auch das Gelenk zwischen Tibia und Wadenbein (Fibula), das Tibiofibulargelenk, zum Kniegelenk; es besitzt jedoch eine eigene Gelenkkapsel (Aumüller et al., 2014).

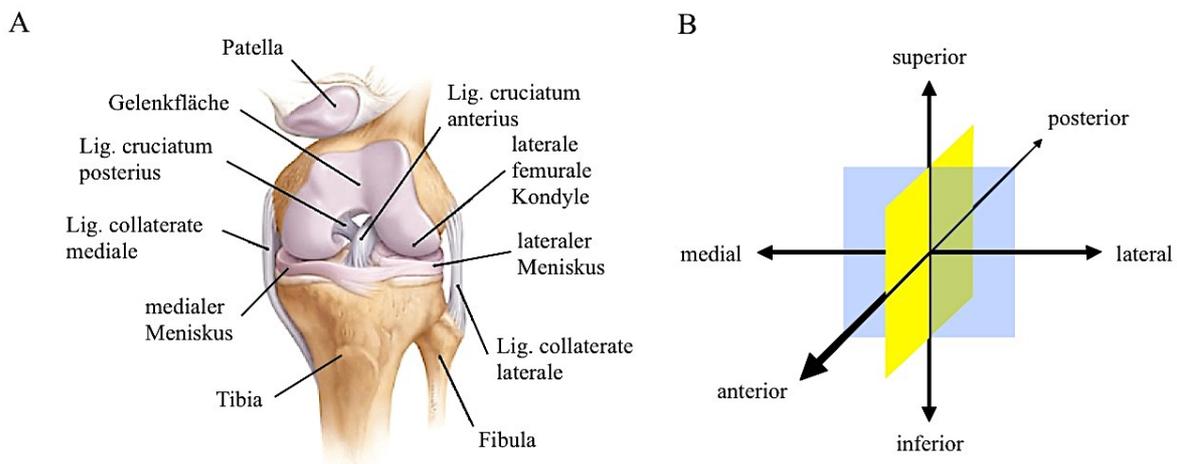


Abb. 1.1 Anatomie des Kniegelenks. (A) Schemazeichnung des Kniegelenks in frontaler Ansicht. Eingezeichnet und beschriftet sind die am Gelenk beteiligten Knochen, der Knorpel der Gelenkflächen und Menisci sowie die Ligamente, die das Gelenk stabilisieren. (B) Beim Kniegelenk werden die Richtungen der räumlichen Achsen als superior – inferior (oben - unten), medial – lateral (innen - außen) und anterior – posterior (vorne - hinten) bezeichnet. Alle histologischen Präparate in der Arbeit wurden in frontaler (blau) oder sagittaler Ebene (gelb) angefertigt (verändert nach Tandeter und Shvartzman, 1999).

1.1.2 Struktur des Gelenkknorpels

Beim adulten Menschen sind die Oberflächen der Diarthrosen von hyalinem (= transparentem) Knorpel bedeckt. Hyaliner Knorpel ist ein avaskuläres, anervales Gewebe, bestehend aus Knorpelzellen (Chondrozyten), die eine extrazelluläre Matrix (ECM) reich an Kollagenfasern und Proteoglykanen (PGs) synthetisieren. Trotz ihrer kritischen Funktion für den Erhalt des Gewebes nehmen die Chondrozyten nur ca. 3-5 % des Gesamtvolumens ein und werden durch Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit und dem subchondralen Knochen ernährt. Im Gegensatz zu anderem hyalinen Knorpelgewebe ist der Gelenkknorpel nicht von einem Perichondrium, einer straffen Schicht aus Bindegewebe, umgeben. Dies verringert die Reibung zwischen den Gelenkflächen. Aufgrund des nicht vorhandenen Perichondriums und der fehlenden Durchblutung hat der Gelenkknorpel jedoch nur eine sehr geringe Regenerationskapazität. Dies macht ihn anfällig für degenerative Prozesse.

Die mechanischen Eigenschaften des Knorpels werden größtenteils von einem Netzwerk aus Kollagenfasern mit dem negativ geladenen PG Aggrecan bestimmt. Aggrecan bildet gemeinsam mit den ECM-Komponenten Hyaluronan (*hyaluronic acid*, HA) und Link-Protein Komplexe von 200 mDa und mehr. Durch die negativen Ladungen wird Wasser im Gewebe gebunden und ein erhöhter osmotischer Druck erzeugt. Dieser bewirkt gemeinsam mit den Kollagenfasern eine Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber Kompressions-, Zug- und Scherkräften (Han et al., 2011).

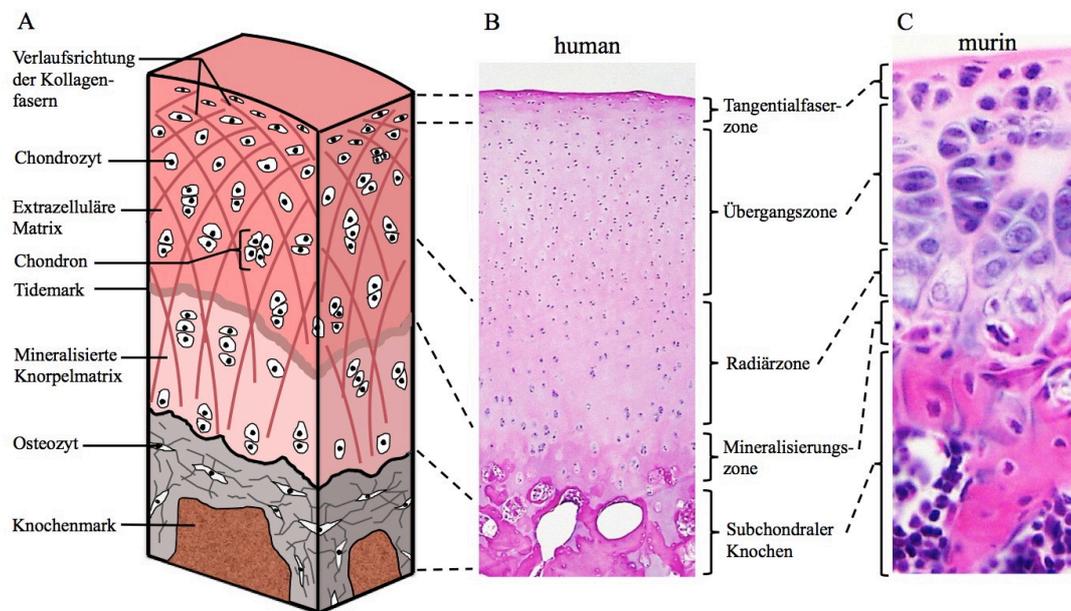


Abb. 1.2 Aufbau des Gelenkknorpels. (A) Schematische Darstellung des Gelenkknorpels. Es werden vier verschiedene Zonen unterschieden, die als Tangentialfaser-, Übergangs-, Radiär- und Mineralisierungszone bezeichnet werden. Die Tidemark markiert den Übergang der nicht-mineralisierten Knorpelschichten zur kalzifizierten ECM der Mineralisierungszone. Darunter liegt der subchondrale Knochen mit dem Knochenmark. Alle Schichten sind sowohl in humanem (B) als auch murinem Gewebe (C) erkennbar (verändert nach Hill, 2016a, b; Schünke, 2000).

Anhand morphologischer Kriterien und der Zusammensetzung und Struktur der ECM kann man im Gelenkknorpel vier verschiedene Zonen unterscheiden (Abb. 1.2). Die Oberfläche des Knorpels wird als Tangentialfaserzone bezeichnet und besteht aus wenigen Zellschichten abgeflachter Chondrozyten. Die ECM dieser Zone ist reich an Kollagenfasern, die annähernd parallel zur Knorpeloberfläche verlaufen. Der PG-Anteil ist im Vergleich zu den anderen Zonen gering. Darunter befindet sich die sogenannte Übergangszone, in der sich runde Chondrozyten ohne eine spezifische Ausrichtung gegenüber der Gelenkfläche befinden. Die Kollagenfasern dieser Zone überschneiden sich kreuzförmig und werden mit zunehmender Tiefe dicker. Der PG-Anteil ist höher als in der Tangentialfaserzone, wodurch diese Zone resistenter gegenüber Druck ist. Darauf folgt die Radiärzone, in der die Chondrozyten säulenartig übereinander angeordnet sind. Die Kollagenfasern dieser Zone sind, wie auch die Säulen der Chondrozyten, annähernd orthogonal zur Gelenkfläche orientiert und dicker als in den darüber liegenden Zonen. An der unteren Grenze der Radiärzone befindet sich die sogenannte Tidemark, eine Grenzlinie, die den Übergang des hyalinen Knorpels der oberen drei Schichten zur kalzifizierten Mineralisierungszone markiert. Diese Zone bildet das Verbindungsglied zwischen den elastischen, oberen Knorpelschichten mit dem darunter liegenden Knochen. Sie ist geprägt von eher kleinen Chondrozyten, von denen manche völlig von kalzifizierter Matrix umschlossen sind (Schünke, 2000).

Die hier beschriebenen Knorpelschichten sind auch bei der Maus, dem Modellorganismus, der in dieser Arbeit verwendet wurde, vorhanden. Durch die geringere Dicke des Gelenkknorpels sind sie jedoch weniger gut voneinander abzugrenzen. Zudem ist das Verhältnis von Zellen zu ECM bei Mäusen größer als beim Menschen (Abb. 1.2 C).

1.2 Bildung von Knochen und Gelenken

In der Embryonalentwicklung des Menschen beginnt die Bildung des Skelettsystems in den Extremitäten bereits in der 5. Woche nach der Befruchtung der Eizelle und setzt sich nach der Geburt noch bis zur Pubertät fort (Gardner und O'Rahilly, 1968). Bei der Knochenbildung, Ossifikation genannt, unterscheidet man die direkte Umwandlung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Knochen (desmale Ossifikation) von der enchondralen Ossifikation, bei der sich zuerst Chondrozyten bilden, die sukzessive durch Knochen ersetzt werden. Die Knochen des Schädeldaches, Teile des Schlüsselbeins und die meisten knöchernen Anteile des Gesichts werden durch desmale Ossifikation gebildet, während das axiale und appendikuläre Skelett durch den Prozess der enchondralen Ossifikation entstehen (Erlebacher et al., 1995). Interessanterweise sind zahlreiche Faktoren, welche die enchondrale Ossifikation regulieren, auch an der Entstehung von OA beteiligt. Die Hypertrophie von Chondrozyten, die Degradation von Knorpelmatrix und die Einwanderung von Blutgefäßen sind gleichermaßen charakteristisch für die enchondrale Ossifikation und die Entstehung von OA. Dies führte zur Hypothese, dass eine fehlgeleitete Rekapitulation des physiologischen Entwicklungsprozesses der Knochenentstehung zur Pathogenese von OA beiträgt (Dreier, 2010).

Parallel zur Entwicklung der Knochen werden die Gelenke gebildet. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Gelenkentstehung. Bei der Ersten wachsen ursprünglich getrennte Skelettelemente aufeinander zu. Dieser Prozess ist jedoch die Ausnahme und findet nur bei wenigen Gelenken, wie z.B. dem Kiefergelenk, statt. Die Mehrzahl der Gelenke, darunter auch das Kniegelenk, wird sekundär in den zuvor kontinuierlichen Knorpelanlagen enchondraler Knochen gebildet.

1.2.1 Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation

Die enchondrale Ossifikation ist ein mehrstufiger Prozess, der durch ein Netzwerk verschiedener Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren eng kontrolliert wird. Zu den wichtigsten Regulatoren gehören der sezernierte Wachstumsfaktor Indian hedgehog (Ihh), die Bone morphogenetic proteins (BMPs), die Fibroblast growth factors (FGFs) und die Wingless-type MMTV integration site family members (WNTs) (Kronenberg, 2003). Der Prozess beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen zu einer kompakten

Anlage (Abb. 1.3). Dies geschieht am Ort des späteren Knochens und wird durch den Transkriptionsfaktor SRY-box containing gene 9 (Sox9) reguliert. Die Zellen im Zentrum der Anlage differenzieren zu Chondrozyten, die eine Matrix aus PGs und Col II synthetisieren (Horton, 1993). Umhüllt wird die Anlage von einer Schicht Fibroblasten-ähnlicher Zellen, welche als Perichondrium bezeichnet wird. Das Perichondrium und die Zellen innerhalb der Knorpelanlage interagieren über Signalmoleküle miteinander und steuern so ihre Differenzierung (Caplan und Pechak, 1987).

Die zuerst kleinen, runden Chondrozyten innerhalb der Knorpelanlage (distale Chondrozyten) durchlaufen nun weitere Entwicklungsstadien, wobei sich die am weitesten differenzierten Zellen im Zentrum der Anlage befinden. Die Chondrozyten proliferieren und lagern sich in Säulen übereinander. Sie werden als kolumnare Chondrozyten bezeichnet und ermöglichen ein Längenwachstum der Anlage. Im Zentrum der Knorpelanlage hören die Zellen auf zu proliferieren und differenzieren zu prähypertrophen und schließlich zu hypertrophen Chondrozyten. Während dieses Prozesses vergrößern die Zellen ihr Volumen um ein Vielfaches. Dies trägt maßgeblich zum Längenwachstum des Knochens bei. Gleichzeitig ändert sich auch das Expressionsprofil der Zellen: prähypertrophe Chondrozyten sezernieren den Wachstumsfaktor Ihh, während hypertrophe Chondrozyten das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen Typ X (Col X) und die Matrix Metalloprotease 13 (Mmp13) produzieren. Die veränderte Matrix bildet das Grundgerüst für die nachfolgende Ossifikation (Linsenmayer et al., 1991; Ortega et al., 2004).

Zeitgleich mit der hypertrophen Differenzierung entwickeln sich perichondrale Zellen zu Osteoblasten und bilden eine Knochenmanschette (Periost) um die Knorpelanlage. Die hypertrophen Chondrozyten werden von Osteoblasten und Osteoklasten, die gemeinsam mit Blutgefäßen aus dem Periost einwandern, durch Knochen ersetzt (Maes et al., 2010). Dabei degradieren die Osteoklasten die Knorpelmatrix und ermöglichen somit den Aufbau einer neuen, von den Osteoblasten gebildeten, Col I-reichen und mineralisierten Knochenmatrix. Die verknöcherte Zone wird als primäres Ossifikationszentrum, oder Diaphyse, bezeichnet und ist an den distalen Enden vom Knorpel der Epiphyse begrenzt. Postnatal bilden sich zentral in der Epiphyse sekundäre Ossifikationszentren, in denen analog zum primären Ossifikationszentrum Chondrozyten die hypertrophe Differenzierung durchlaufen und schließlich durch Knochen ersetzt werden. Zwischen den verknöcherten Regionen bleibt zunächst eine Zone aus Knorpel erhalten, die ihre embryonale Struktur und Organisation erhält und damit weiteres Längenwachstum ermöglicht. Diese Zone wird als Wachstums- oder Epiphysenfuge bezeichnet und verknöchert beim Menschen am Ende der Pubertät, wodurch kein weiteres Längenwachstum mehr möglich ist (zusammengefasst in

Kronenberg, 2003). Bei Mäusen dagegen bleiben Chondrozyten in der Wachstumsfuge erhalten, diese proliferieren jedoch nicht weiter.

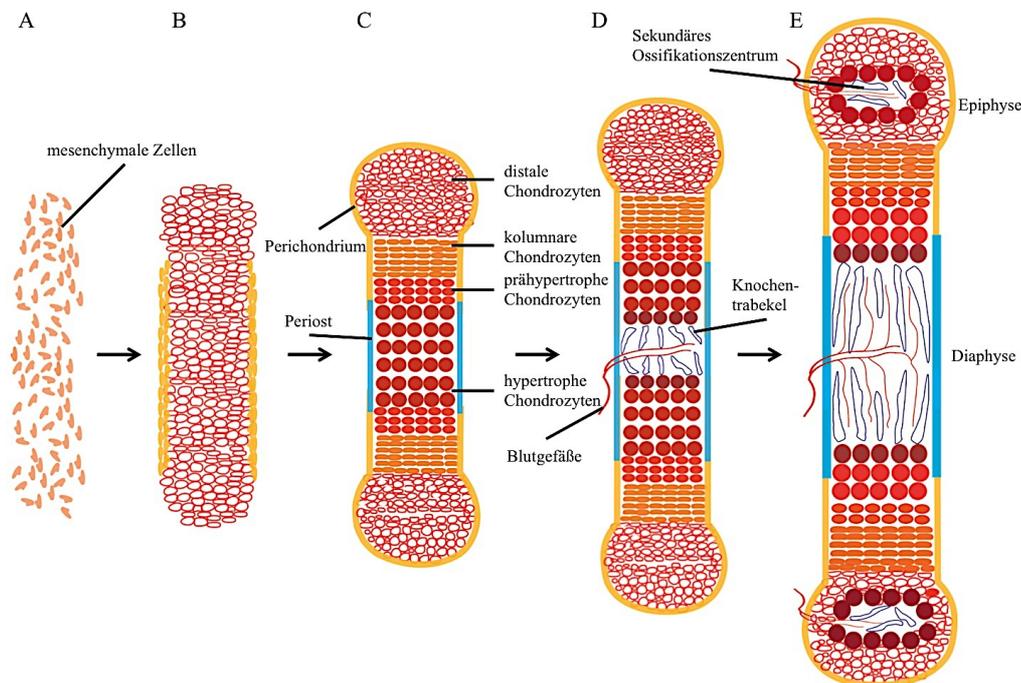


Abb. 1.3 Schema der Knochenentwicklung. (A, B) Am Ort des späteren Knochens kondensieren mesenchymale Zellen und differenzieren zu Chondrozyten. (C) Sie sind umgeben vom Perichondrium (orange). Die distalen Chondrozyten an den Enden der Knochenanlage differenzieren zu schnell proliferierenden kolumnaren Chondrozyten. Anschließend erfolgt die hypertrophe Differenzierung zu prähypertropen und hypertropen Chondrozyten. Zeitgleich verknöchert das Perichondrium und wird zum Periost (blau). (D) Mit den Blutgefäßen wandern Osteoklasten und Osteoblasten ein, welche die Knorpelmatrix ab- und Knochen aufbauen. (E) Der Schaft der Röhrenknochen wird als Diaphyse bezeichnet. Postnatal entwickeln sich an seinen distalen Enden (Epiphysen) sekundäre Ossifikationszentren (verändert nach Wuelling und Vortkamp, 2011).

1.2.2 Gelenkentwicklung

Der erste Schritt der sekundären Gelenkentwicklung ist die Spezifizierung von Vorläuferzellen innerhalb der Knorpelanlage am Ort des zukünftigen Gelenks (zusammengefasst in Decker et al., 2014; Pitsillides und Ashhurst, 2008). Die Mechanismen und Signalkaskaden, welche diesen Prozess regulieren, sind bislang weitgehend unklar. Die Vorläuferzellen bilden eine Zone aus kompakten, flachen Zellen (Interzone), die sich senkrecht zur Längsachse der Knorpelanlage ausbildet. Die Zellen der Interzone sind über *gap junctions* eng miteinander verbunden und exprimieren die Marker *Wnt9a* und *Growth and differentiation factor 5 (Gdf5)* (Archer et al., 2003; Storm und Kingsley, 1996). Mit Hilfe der Marker *Wnt9a* und *Gdf5* wurden *lineage tracing* Experimente durchgeführt. Diese haben gemeinsam mit Mikrodisektions-Versuchen gezeigt, dass die Zellen der Interzone nicht nur eine transiente Funktion bei der Induktion der Gelenkbildung haben, sondern für die Bildung der Gelenke notwendig sind und aktiv zum Aufbau des Gelenk-

knorpels, des Synoviums und der Ligamente beitragen (Holder, 1977; Koyama et al., 2008; Rountree et al., 2004).

Der Ursprung der Interzone-Zellen ist zurzeit nicht vollständig aufgeklärt. Die Tatsache, dass sich die Interzone innerhalb der knorpeligen Anlage bildet, führte zur Hypothese, dass es sich bei diese Zellen um dedifferenzierte Chondrozyten der ursprünglichen Knorpelanlage handelt (Craig et al., 1987; Nalin et al., 1995). Weitere *lineage tracing* Versuche konnten dies teilweise bestätigen, allerdings zeigten sie auch, dass zusätzlich noch Col II negative Zellen aus der Umgebung der Knorpelanlage in die Interzone einwandern und zu den Strukturen des Gelenks beitragen (Hyde et al., 2008; Pacifici et al., 2006).

Nach der Spezifikation der Interzone differenzieren Interzone-Zellen, die direkt an die Knorpelanlage angrenzen, zu Gelenkknorpel. Die Zellen, die jedoch außerhalb der Knorpelanlage an die Interzone angrenzen, aktivieren die Expression des *transforming growth factor β receptor 2* (*Tgfbr2*). Sie tragen zur Bildung der Synovialmembran, der Meniskus-Oberfläche, der Ligamente und der *groove of ranvier* bei, einem putativen Stammzell-Reservoir. Die Expression von *Tgfbr2* scheint insbesondere in der Entwicklung der Gelenke des Autopods von Bedeutung zu sein, da die Deletion des Gens zur Fusion der Gelenke in dieser Region führt (Spagnoli et al., 2007).

Der letzte Schritt der Gelenkentwicklung ist die Entstehung der Gelenkhöhle, bei der in der Mitte der zellreichen Interzone ein flüssigkeitsgefüllter Spalt entsteht. Entgegen früherer Annahmen trägt der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose jedoch vermutlich nur wenig zur Entstehung der Gelenkhöhle bei (Mitrovic, 1977; Nalin et al., 1995). Wahrscheinlicher ist es, dass die Zellen durch eine gesteigerte Synthese von HA die Spaltbildung ermöglichen. Studien haben gezeigt, dass die Zellen der Interzone vor und während der Zeit der Bildung der Gelenkhöhle verstärkt HA synthetisieren (Matsumoto et al., 2009). Da über das CD44 Antigen, einem Rezeptor für HA, niedrige Level von HA die Zell-Adhäsion und hohe Level die Separation vermitteln, kann so die Bildung der Gelenkhöhle gesteuert werden. Neben HA sind auch Heparansulfate (HS) an der Regulation der Gelenkentwicklung beteiligt. Störungen der HA- oder HS-Synthese gehen häufig mit Fehlbildungen oder Fusionen der Gelenke einher (Matsumoto et al., 2009; Mundy et al., 2011).

1.3 Arthrose

Arthrose ist eine degenerative Erkrankung der beweglichen Gelenke, deren Hauptmerkmale Zellstress und Degradation der Knorpel-ECM sind. Weltweit wird sie als die häufigste Gelenkerkrankung des Menschen angesehen. Die Krankheit kann durch langjährige Überbelastung oder Verletzungen des Gelenkknorpels verursacht werden (Roach et

al., 2007). In beiden Fällen wird das Gleichgewicht zwischen Knorpel Auf- und Abbau gestört, wodurch schlecht angepasste Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden. Diese sind zuerst nur auf zellulärer Ebene als ein geänderter Stoffwechsel nachweisbar, gehen jedoch im weiteren Verlauf der Krankheit mit zunehmenden Veränderungen aller am Gelenk beteiligten Gewebe einher (Abb. 1.4 A).

Die Oberfläche des Knorpels wird aufgeraut, wodurch es zum schrittweisen Abrieb der Knorpelschichten kommt. Gleichzeitig wird der Gelenkknorpel durch die Entstehung tiefer Einrisse (Fissuren) irreversibel geschädigt. Der so geschädigte Knorpel kann mechanische Belastungen wie Druck oder Stöße schlechter abfangen. Dies führt zu vermehrtem Stress des darunterliegenden subchondralen Knochens, der als Reaktion vermehrt gebildet wird (subchondrale Sklerose). Seitlich am Gelenk bildet sich zudem neuer Knochen aus. Diese als Osteophyten bezeichneten Auflagerungen sind ein fehlgeleiteter Versuch, die Gelenkfläche zu vergrößern und so die Belastung zu reduzieren. Sekundär kann es zu Entzündungen des Gelenks kommen. Die Gelenkkapsel wird dicker und die Muskeln, Sehnen und Bänder des Gelenks werden geschwächt. Abgegrenzt wird die OA von Erkrankungen des arthritischen Formenkreises wie der rheumatoiden Arthritis, welche primär eine Entzündung der Gelenke darstellt und erst sekundär zu Veränderungen der Gelenkstruktur führt (Wieland et al., 2005).

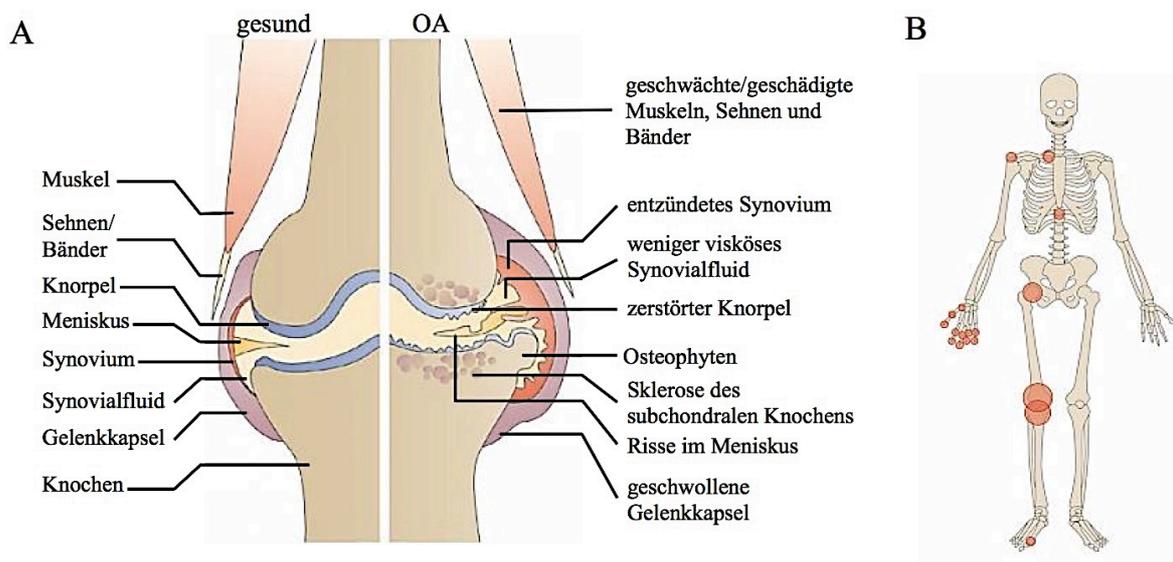


Abb. 1.4 Pathologische Veränderungen des Gelenks bei OA. (A) Schemazeichnung eines gesunden (links) und von OA betroffenen Kniegelenks (rechts). Das gesunde Knie ist frei von degenerativen Veränderungen, der Knorpel ist intakt und es liegt keine Entzündung vor. OA zeichnet sich durch Läsionen des Gelenkknorpels aus, die zur Entwicklung von Osteophyten, subchondraler Sklerose und sekundär zur Entzündung des Synoviums führen können. Die Gelenkkapsel ist dadurch geschwollen; die am Gelenk beteiligten Muskeln, Bänder und Sehnen sind geschwächt. (B) Die am häufigsten von OA betroffenen Gelenke sind das Knie und die Hüfte. Wirbelsäule, Schultern, Zehen und Finger sind seltener betroffen (verändert nach Wieland et al., 2005).

Bei Patienten können eines oder mehrere Gelenke von OA betroffen sein, dies sind typischerweise die mechanisch stark beanspruchten Gelenke des Knies und der Hüfte, aber auch die Fingerendgelenke (Abb. 1.4 B). Risikofaktoren sind ein zunehmendes Alter, das Geschlecht der Patienten (Frauen sind häufiger betroffen als Männer), sowie Überbelastung der Gelenke beispielsweise durch Unfälle oder Übergewicht. Zudem trägt die genetische Prädisposition der Patienten zum Krankheitsverlauf bei. Nach einem anfänglichen asymptomatischen Stadium leiden viele der Patienten unter starken Schmerzen und einer eingeschränkten Funktionalität der Gelenke. Die therapeutischen Optionen reichen von Schmerztherapie, Krankengymnastik und Gewichtsreduktion bis zu operativen Maßnahmen. In allen Fällen werden jedoch nur die Symptome der Krankheit behandelt. Eine kausale Therapie, welche die Ursachen der Erkrankung beseitigt, ist derzeit nicht möglich. Zusammengenommen verursacht OA durch die hohe Anzahl an Betroffenen erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem und eine Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten (Rabenberg, 2013; Wieland et al., 2005).

1.3.1 Modellsysteme für Arthrose

In der OA-Forschung werden je nach Fragestellung Proben von Patienten oder verschiedene *in vivo* oder *in vitro* Modellsysteme verwendet. Bei Studien an humanem Probenmaterial ist die Heterogenität der Patienten, die sich hinsichtlich ihrer genetischen Prädisposition, Vorerkrankungen, sowie Krankheitsverlauf und -ursache stark unterscheiden, eine der größten Schwierigkeiten. Verschiedene Modellsysteme bieten eine bessere Standardisierung, kontrollierte Bedingungen und dadurch eine erhöhte Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Tiermodelle wie das Schaf, das Minipig oder das Kaninchen eignen sich aufgrund einer dem Menschen ähnlichen Knorpelstruktur für die experimentelle Forschung. Eines der am häufigsten verwendeten Modellorganismen ist jedoch die Maus. Aufgrund ihrer geringen Größe sind ihre Gelenkstruktur und die mechanischen Belastungen nicht gut mit dem Menschen vergleichbar. Zudem besteht ihr Knorpel nur aus wenigen Zellschichten und ist daher dem Menschen weniger ähnlich als andere Modellorganismen. Diese Nachteile werden jedoch durch die Möglichkeit der genetischen Manipulation und wieder wettgemacht (zusammengefasst in Thysen et al., 2015).

In der Maus kann OA chemisch oder chirurgisch erzeugt werden. Meist wird dazu das Kniegelenk verwendet, weil es beim Menschen das am häufigsten von OA betroffene Gelenk ist. Es ist zudem leicht zugänglich und erlaubt trotz der geringen Körpergröße der Maus intra-artikuläre Manipulationen. Bei der chemischen Induktion von OA können z. B.

ECM-degradierende Enzyme in das Gelenk injiziert und so akute OA ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu wird bei der chirurgischen Induktion von OA das Kniegelenk destabilisiert. Es existieren zahlreiche OP-Modelle, bei denen durch die Durchtrennung verschiedener Ligamente des Knies das Gelenk unterschiedlich stark destabilisiert wird. In dieser Arbeit wurde ein Verfahren gewählt, bei dem die beiden Kreuzbänder und das Innenband durchtrennt werden. Durch diese OP entwickelt sich innerhalb kurzer Zeit eine massive OA (zusammengefasst in Thysen et al., 2015).

1.3.2 Molekulare Mechanismen bei Arthrose

Auf molekularer Ebene ist eines der Hauptmerkmale von OA ein gestörtes Verhältnis von Synthese und Degradation der Knorpel-ECM. Die Hauptkomponenten des Knorpels, Aggrecan und Kollagen, werden dabei durch Metalloproteasen wie *A disintegrin and metalloproteinases with a thrombospondin motif* (ADAMTSs) und MMPs sukzessive zerstört. Der Abbau von Aggrecan ist eines der ersten Anzeichen von OA und bis zu einem gewissen Punkt reversibel. Im Gegensatz dazu findet die Degradation der Kollagenfasern erst später im Krankheitsverlauf statt und kann nicht wieder rückgängig gemacht werden. Eine direkte Folge des Abbaus von Aggrecan und Kollagen ist eine verminderte Resistenz des Knorpels gegenüber mechanischer Belastung, wodurch ein weiteres Fortschreiten der Krankheit beschleunigt wird (zusammengefasst in Troeberg und Nagase, 2012).

1.3.2.1 Degradation von Aggrecan und Kollagen durch Metalloproteasen

Das PG Aggrecan ist aus drei globulären Domänen (G1 bis G3), einer kurzen Keratansulfat- (KS) reichen Domäne und zwei sehr Chondroitinsulfat- (CS) reichen Abschnitten aufgebaut (Abb. 1.5). Über den N-Terminus können zahlreiche Aggrecan-Moleküle an HA gebunden sein. Dadurch entstehen hochmolekulare Komplexe, die durch die Vielzahl der negativen Ladungen der CS-Ketten Wasser im Gewebe binden können. Der Abbau von Aggrecan beeinträchtigt daher die mechanischen Eigenschaften des Knorpels. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass insbesondere der Abbau von Aggrecan durch Mitglieder der ADAMTS-Proteinfamilie für die Pathogenese von OA von Bedeutung ist (Sandy et al., 1992).

Von den 19 verschiedenen im Menschen bekannten ADAMTSs hat ADAMTS-5 *in vitro* die höchste Aggrecanase-Aktivität, gefolgt von ADAMTS-4 (Gendron et al., 2007). Beide Enzyme können in der interglobulären Domäne (IGD) von Aggrecan zwischen der G1- und G2-Region die Bindung zwischen Glutaminsäure³⁷³ und Alanin³⁷⁴ (Glu³⁷³~Ala³⁷⁴) spalten (Abb. 1.5). Durch diesen Prozess wird der CS-reiche, C-terminale Teil von Aggrecan abgespalten, der für die mechanischen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich ist.

Im Mausmodell schützt daher die homozygote Deletion von Adamts-5 vor chirurgisch induzierter OA (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005). Zudem entwickeln auch transgene Mäuse, deren Aggrecan durch eine Mutation nicht an Glu³⁷³~Ala³⁷⁴ gespalten werden kann, weniger OA im chirurgischen Modell als Kontrollen (Little et al., 2007). Im Gegensatz dazu führt die Deletion von Adamts-1 oder -4 bei Mäusen nicht zu einem Schutz vor OA (Glasson et al., 2004; Little et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass Adamts-5 in der Maus die wichtigste Aggrecanase bei der Entstehung von OA ist. Beim Menschen gibt es jedoch Hinweise darauf, dass auch Adamts-4 an der Pathogenese von OA beteiligt ist (Song et al., 2007).

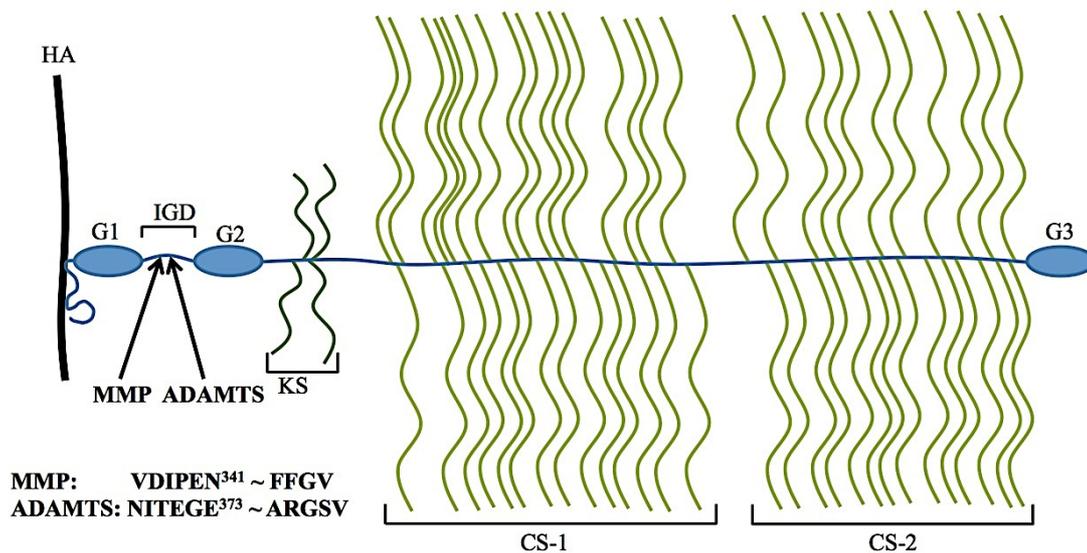


Abb. 1.5 Aggrecan Struktur und ADAMTS und MMP Schnittstellen. Aggrecan besteht aus drei globulären Domänen (G1 bis G-3), einem kurzen Abschnitt mit Bindungsstellen für KS und zwei CS-tragenden Bereichen (CS-1 und -2). Über seinen N-Terminus ist Aggrecan an HA gebunden. In der interglobulären Domäne (IGD) zwischen G1 und G2 befinden sich Schnittstellen für MMPs und ADAMTSs.

Verschiedene Mitglieder der MMP-Familie, darunter MMP3, -7, -9 und -13 sind ebenfalls im Knorpel exprimiert und können wie die ADAMTSs Aggrecan in der IGD spalten. Sie verwenden jedoch eine eigene Schnittstelle, die zwischen Asparagin³⁴¹ und Phenylalanin³⁴² (Asn³⁴¹~Phe³⁴²) liegt (Abb. 1.5). Durch beide Protease-Familien werden spezifische Neo-Epitope erzeugt (ADAMTSs: NITEGE, MMPs: VDIPEN), die durch Antikörper detektiert und daher zum experimentellen Nachweis der Aggrecan-Degradation verwendet werden können. Die Degradation von Aggrecan durch MMPs an Asn³⁴¹~Phe³⁴² ist in humanen OA-Proben nachweisbar, es wird jedoch vermutet, dass sie vor allem in späteren OA-Stadien von Bedeutung ist (Lark et al., 1997).

Neben dem Abbau von Aggrecan ist die Degradation von Kollagenfasern ein Hauptmerkmal von OA. Im Gelenkknorpel bilden Col II-Fasern ein Netzwerk, das dem Knorpel seine Zugfestigkeit verleiht. Neben der Degradation von Aggrecan ist der Abbau von Col II

daher ein zentrales Merkmal von OA (Billinghurst et al., 1997). Studien haben gezeigt, dass bei der Degradation des Kollagen-Netzwerkes insbesondere MMP13 von Bedeutung ist. Die Expression der Protease ist in OA-Gewebe von Patienten und im induzierten Mausmodell erhöht (Chia et al., 2009; Mitchell et al., 1996). Zudem wurden gezeigt, dass Mmp13 defiziente Mäuse durch eine verminderte ECM-Degradation vor chirurgisch induzierter OA geschützt sind, während die konditionale Überexpression von MMP13 zu spontaner Degradation von Knorpel führt (Little et al., 2009; Neuhold et al., 2001).

1.3.2.2 Regulation der Protease-Aktivität

Die Balance zwischen Auf- und Abbau der Knorpelmatrix wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Neben der Regulation der Matrix-Synthese beeinflussen ECM-degradierende Proteasen maßgeblich die Knorpelhomöostase. Die Aktivität der Proteasen wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebenen reguliert. Die Expression von ADAMTSs und MMPs wird unter anderem durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimuliert. Auch der *runx-related transcription factor 2* (Runx2), der unter physiologischen Bedingungen die enchondrale Ossifikation reguliert und in gesundem Gelenkknorpel nicht exprimiert ist, fördert die Expression von MMP13. Während der Entstehung von OA wird Runx2 in artikulären Chondrozyten hochreguliert. Runx2^{+/-} Mäuse zeigen weniger Degradation der ECM und entwickeln weniger OA im chirurgisch induzierten Modell (Kamekura et al., 2006).

Auch mechanische Belastungen können die Expression von MMPs und ADAMTSs beeinflussen. Sowohl zu viel auch zu wenig mechanische Belastung begünstigt die Degeneration von Gelenkknorpel (Vanwanseele et al., 2002). Eine moderate mechanische Stimulation des Knorpels scheint jedoch die Expression von ECM-degradierenden Proteasen zu inhibieren und so vor OA zu schützen. An der Mechanotransduktion sind unter anderem FGF-2 und Integrine beteiligt. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (zusammengefasst in Buckwalter et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation liegt darin, dass die Proteasen als Proenzyme synthetisiert werden und zu ihrer Aktivierung eine inhibitorische Domäne abgespalten werden muss. Dies geschieht im Knorpelgewebe unter anderem durch MMP3 (Nagase, 1997).

Auch nach ihrer Aktivierung kann die Knorpel-degradierende Wirkung der Proteasen im Gewebe durch Inhibitoren der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP)-Familie unterdrückt werden. Beim Menschen wurden vier verschiedene TIMPs identifiziert

(TIMP-1 bis -4). Von allen TIMPs ist bekannt, dass sie MMPs inhibieren können. Proteasen der ADAMTS-Familie werden jedoch nur von TIMP-3 reguliert (Hashimoto et al., 2001). Interessanterweise interagieren sowohl MMPs und ADAMTSs als auch TIMPs mit HS-Ketten (Flannery et al., 2002; Yu et al., 2000; Zeng et al., 2006). Studien haben gezeigt, dass die Deletion des HSPGs Syndecan-4 durch eine verminderte Aggrecan-Degradation vor induzierter OA schützt. Die genauen Mechanismen, wie HSPGs die Aktivität der Proteasen regulieren sind zurzeit jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.4 Proteoglykane

Einer der Hauptbestandteile der ECM von Chondrozyten ist eine heterogene Gruppe von Makromolekülen, die als Proteoglykane (PG) bezeichnet werden. Als gemeinsames Merkmal besitzen sie ein Core-Protein, an das eine oder mehrere lineare Glykosaminoglykan (GAG) Polysaccharid-Ketten kovalent gebunden sind. Die GAGs bestehen aus 50 bis 150 sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aus einer Uronsäure und einem Aminozucker und sind durch Sulfatierungen negativ geladen. Anhand der chemischen Struktur der verwendeten Disaccharide unterteilt man die GAGs in Keratansulfat (KS), Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS) und Heparansulfat (HS) (Abb. 1.6).

Die Disaccharide bestehen bei KS aus Galaktose (Gal) und N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) und bei CS aus Glukuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-Galaktosamin (GalNAc). Bei DS setzen sich die Disaccharide aus einem GlcA oder der durch Epimerisierung der GlcA entstandenen Iduronsäure (IdoA) und GalNAc zusammen, bei HS aus GlcA oder IdoA und GlcNAc. Die Anzahl der Modifikations-Möglichkeiten ist bei KS am geringsten, während HS mit vier verschiedenen Sulfatierungen und einer Epimerisierung das am höchsten modifizierte GAG ist. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die spezifische Modifikation der Zuckerketten eine zentrale Funktion bei der Regulation verschiedenster physiologischer und pathologischer Prozesse einnimmt (Esko und Selleck, 2002).

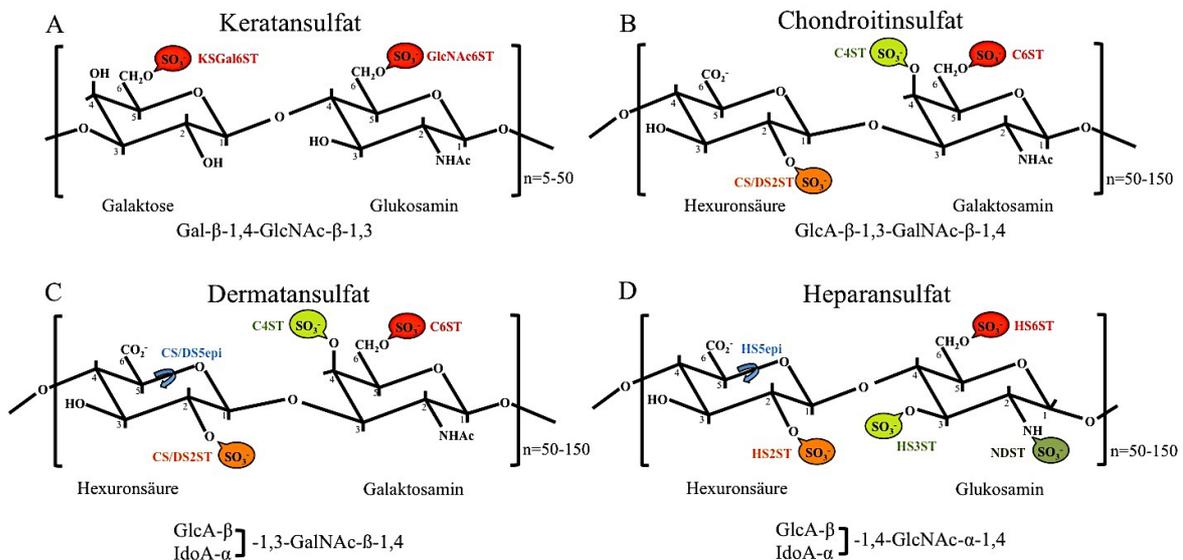


Abb. 1.6 GAGs setzen sich aus verschiedenen Disacchariden zusammen. Die Disaccharide von KS (A), CS (B), DS (C) und HS (D) können an zwei, drei, vier oder fünf Positionen modifiziert sein. Jede Modifikation und das zugehörige Enzym sind in einer eigenen Farbe dargestellt. Verwendete Abkürzungen: Gal: Galaktose; GalNAc: N-Acetyl-Galaktosamin; GlcA: Glukuronsäure; IdoA: Iduonsäure; GlcNAc: N-Acetyl-Glukosamin; C4ST: CS-4O-Sulfotransferase; C6ST: CS-6O-Sulfotransferase; CS/DS2ST: CS/DS-2O-Sulfotransferase; GlcNAc6ST: N-Acetyl-Glukosamin-6O-Sulfotransferase; HS2ST: HS-2O-Sulfotransferase; HS3ST: HS-3O-Sulfotransferase; HS6ST: HS-6O-Sulfotransferase; KSGal6ST: KS-Galaktose-6O-Sulfotransferase; NDST: N-Deacetylase-N-Sulfotransferase (verändert nach Bulow und Hobert, 2006).

Neben der Art der Zuckerkette beeinflusst auch das Core-Protein die Struktur und Funktion des PGs. Anhand ihrer Lokalisation werden sie in vier Hauptgruppen (intrazellulär, membranständig, perizellulär und extrazellulär) unterteilt. Die Mitglieder der einzelnen Gruppen können aufgrund der Gen- bzw. Protein-Homologie und der Verwendung spezifischer Protein-Module genauer klassifiziert werden (Iozzo und Schaefer, 2015).

Die Gruppe der intrazellulären PGs beinhaltet nur ein einziges Molekül, das Serglycin. Es ist in sekretorischen Granula von Mastzellen enthalten und trägt als einziges PG Seitenketten aus Heparin, einer hochsulfatierten Form des HS. Die Gruppe der membranständigen PGs der Zelloberfläche besteht dagegen aus elf verschiedenen PGs, die HS- und/oder CS-Ketten tragen und sich nach Art der Verankerung in der Zellmembran in transmembran- (z. B. Syndecan und Phosphacan) und GPI-verankerte Moleküle (Glypican 1 bis 6) unterteilen lassen. Die PGs der dritten, perizellulären Gruppe sind bedeutsamer Bestandteil von Basalmembranen und tragen ebenfalls überwiegend HS-Ketten. Zu dieser Gruppe zählen Perlecan, Agrin, und die Kollagene XV und XVIII. Die letzte Hauptgruppe hat die meisten Mitglieder und besteht größtenteils aus CS und KS tragenden PGs. Man kann sie weiter in Hyalectane (HA und Lectin bindende PGs wie Aggrecan und Versican), die 18 kleinen Leucin-reichen PGs (*small leucin-rich* PG, SLRPG) und Spock unterteilen,

welches aufgrund seiner Struktur zu keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden kann (Iozzo und Schaefer, 2015).

Anhand dieser Klassifizierung wird deutlich, dass die hoch modifizierten PGs sich auf den Zellen oder direkt angrenzend befinden und der Grad der Modifikation der GAGs mit zunehmender Entfernung abnimmt. Somit können die komplexen HSPGs direkt an der Zelle die Funktion von Co-Rezeptoren erfüllen und die Bildung von Gradienten von Wachstumsfaktoren regulieren, während die extrazellulären PGs wesentliche strukturelle Komponenten der ECM darstellen (Iozzo und Schaefer, 2015).

1.4.1 Heparansulfat-Biosynthese

Die Biosynthese von HS-Ketten findet im Golgi-Apparat statt und beginnt mit der Synthese eines Verbindungs-Tetrasaccharids an einem konservierten Serin-Rest eines Core-Proteins. Während dieses Schrittes werden nacheinander Xylose, zwei Moleküle Galaktose und GlcA durch die Enzyme Xylosyltransferase, Galaktosyltransferase I und II sowie Glukuronyltransferase I angelagert. Diese Verbindungssequenz findet auch bei der Synthese von CS Verwendung. Erst der nächste Zucker entscheidet, ob eine HS- oder CS-Kette gebildet wird. Bei der HS-Biosynthese geschieht dies durch das Enzym Exostosin like 2 (Extl2), welches ein Molekül GlcNAc auf die Kette überträgt. Anschließend lagert ein heteromerer Komplex der Glycosyltransferasen Exostosin1 und 2 (Ext1 und 2), alternierend Einheiten von GlcA und GlcNAc an die wachsende Zuckerkette an (Lind et al., 1998). Zeitgleich wird die Kette durch das Zusammenspiel verschiedener Enzyme modifiziert. So ersetzen vier verschiedene N-Deacetylase/N-Sulfotransferasen (Ndst1 bis 4) die Acetylgruppe des GlcNAc durch eine Sulfatgruppe. Weitere Modifikationen sind die C5-Epimerisierung von GlcA zu IdoA durch das Enzym Glukonyl C5-Epimerase (HSEpi) und zusätzliche Sulfatierungen an der 2O Position der GlcA bzw. IdoA und der 3O und 6O Position des GlcNAc. Diese Reaktionen werden durch die Sulfotransferase HS2ST, sechs verschiedene HS3STs und drei verschiedene HS6ST katalysiert (Esko und Lindahl, 2001).

Die Modifikationen finden nicht gleichmäßig verteilt entlang der ganzen Zuckerkette statt; vielmehr entstehen stärker sulfatierte Bereiche (NS Domänen), die voneinander durch größtenteils unmodifizierte und damit acetylierte Bereiche (NA Domänen) getrennt sind. Die Komplexität des Systems wird dadurch erhöht, dass die für die HS-Biosynthese benötigten Enzyme in verschiedenen Geweben und auch Entwicklungsstadien differenziell exprimiert werden und Sulfatierungen durch die extrazellulären HS-6O-Endosulfatasen (Sulf) -1 und -2 wieder entfernen können. Viele Studien deuten darauf hin, dass sowohl

das Level als auch die Struktur der Modifikationen die Interaktion von HS mit verschiedenen extrazellulären Molekülen wie Wachstumsfaktoren oder Proteasen beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die Mitglieder der Hedgehog (HH), FGF, BMP und WNT Familien mit hoher Affinität an HS-Ketten binden. Da durch diese Interaktion z. B. die Reichweite von Morphogenen in der Embryonalentwicklung (HH, WNT) oder die Bindung an ihre Rezeptoren (FGF) beeinflusst wird, sind HSPGs an der Regulation verschiedenster physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt (Bishop et al., 2007).

1.4.2 Störungen der Heparansulfat-Synthese und assoziierte Krankheitsbilder

Da die ubiquitär exprimierten HSPGs an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt sind, können Störungen der HS-Synthese bereits in der frühen Embryonalentwicklung zu teilweise schweren Fehlbildungen führen. Studien im Mausmodell haben gezeigt, dass der komplette Verlust von HS-Ketten, hervorgerufen durch die homozygote Deletion der Gene *Ext1* oder *Ext2*, bereits vor der Gastrulation letal ist (Lin et al., 2000; Stickens et al., 2005). Mäuse, die ein hypomorphes *gene-trap* Allel von *Ext1* tragen und nur 20 % der Wildtyp-HS-Menge produzieren können, sterben meist vor dem embryonalen Tag 16,5 an Herzfehlern und Defekten des Blutgefäßsystems (Kozziel et al., 2004). *Ext1*-heterozygote Mäuse sind jedoch lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Phänotypen.

1.4.2.1 Das hereditäre multiple Osteochondrome Syndrom

Beim Menschen verursacht die heterozygote Mutation eines der Allele von *Ext1* oder *Ext2* das hereditäre multiple Osteochondrome Syndrom (HMO) (Ahn et al., 1995; Stickens et al., 1996). HMO ist eine seltene, genetisch heterogene Erkrankung, deren Prävalenz auf 1:50.000 bis 1:100.000 geschätzt wird (Hennekam, 1991; Schmale et al., 1994). Genetische Analysen von Patienten haben gezeigt, dass in 70 bis 95 % der Fälle Mutationen oder Deletionen in der codierenden Region von *EXT1* oder *EXT2* nachweisbar sind, wodurch eine Störung der HS-Synthese als Ursache von HMO identifiziert wurde (Pedrini et al., 2011; Wuyts und Van Hul, 2000).

Charakteristisch für die Erkrankung ist die Entstehung gutartiger knorpeliger Tumore (Osteochondrome) im Kindesalter. Die Osteochondrome entwickeln sich bevorzugt symmetrisch an den langen Röhrenknochen in Gelenknähe oder auf der Oberfläche von flachen Knochen wie dem Schulterblatt. Mit dem Schluss der Wachstumsfugen am Ende der Pubertät treten keine weiteren Tumore auf. Typischerweise bestehen die Tumore aus einem Knochenschaft, der aus dem Knochen auswächst und von einer Knorpelkappe bedeckt ist. Histologische Analysen haben gezeigt, dass die Chondrozyten der Knorpelkappe eine Struktur bilden, die der enchondralen Wachstumsfuge ähnelt und durch die das

Osteochondrom wachsen kann. In den Patienten können die wachsenden Osteochondrome die Beweglichkeit von Gelenken einschränken, Nerven oder Blutgefäße komprimieren und/oder zu Schmerzen führen. Derzeit liegt die einzige Therapiemöglichkeit in der chirurgischen Entfernung der Tumore. Zusätzlich zu den Osteochondromen kann die Krankheit insbesondere bei hoher Tumorfrequenz mit einem verminderten Größenwachstum, Knochendeformationen und OA assoziiert sein. Das Risiko für eine maligne Transformation zu Chondrosarkomen liegt bei etwa 1 bis 5 % (Legeai-Mallet et al., 1997; Pedrini et al., 2011).

1.4.2.2 Das *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mausmodell für HMO

Zur Klärung des molekularen Ursprungs von HMO wurden neben der Analyse von Patienten-Proben auch Versuche an verschiedenen Mauslinien durchgeführt. Eines der verwendeten Modellsysteme beruht auf der klonalen, homozygoten Deletion von *Ext1* in Chondrozyten (Jones et al., 2010). Um die Ursache der Erkrankung beim Menschen zu imitieren, wird in diesem Modellsystem das Gen *Ext1* in einigen wenigen Chondrozyten deletiert (*Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}*). Dazu wird in Chondrozyten, unter dem *Col2*-Promotor, der reverse Tetracyclin-kontrollierte transkriptionelle Aktivator (rtTA) exprimiert. Durch Gabe von Doxycyclin am postnatalen Tag 8 (P8) wird der rtTA aktiviert, bindet am tetO/CMV Promotor und induziert die Expression der Cre-Rekombinase. Diese katalysiert die Inversion des zweiten Exons des *Ext1* Gens, welches von LoxP sites mit entgegengesetzter Orientierung flankiert ist. Dadurch wird ein Stopp-Codon erzeugt, welches das *Ext1* Allel inaktiviert (Abb. 1.7 A).

Bereits im Alter von vier Wochen sind lateral der Wachstumsfuge von mutanten Mäusen *Ext1*-defiziente Klone von Chondrozyten detektierbar (Abb. 1.7 B), welche die Organisation der Wachstumsfuge unterbrechen und sich im Alter von zwei Monaten zu massiven Osteochondromen entwickeln (Abb. 1.7 C). Mit ihrer Knorpelkappe, der eigenen Wachstumsfuge und der verknöcherten Verbindung zum Femur entsprechen sie dem menschlichen Krankheitsbild (Jones et al., 2010). Zusätzlich zu den Osteochondromen zeigen die mutanten Mäuse Anomalien des Gelenkknorpels (Abb. 1.7 E). Histologisch sind in der Übergangszone und der Radiärzone des Knorpels Gruppen von vergrößerten Zellen zu erkennen, deren perizelluläre Matrix eine intensive Färbung mit Safranin O zeigt. Das Vorliegen dieser Zellen wurde als frühes Symptom von OA gewertet. Detaillierte Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt (Piombo, 2010).

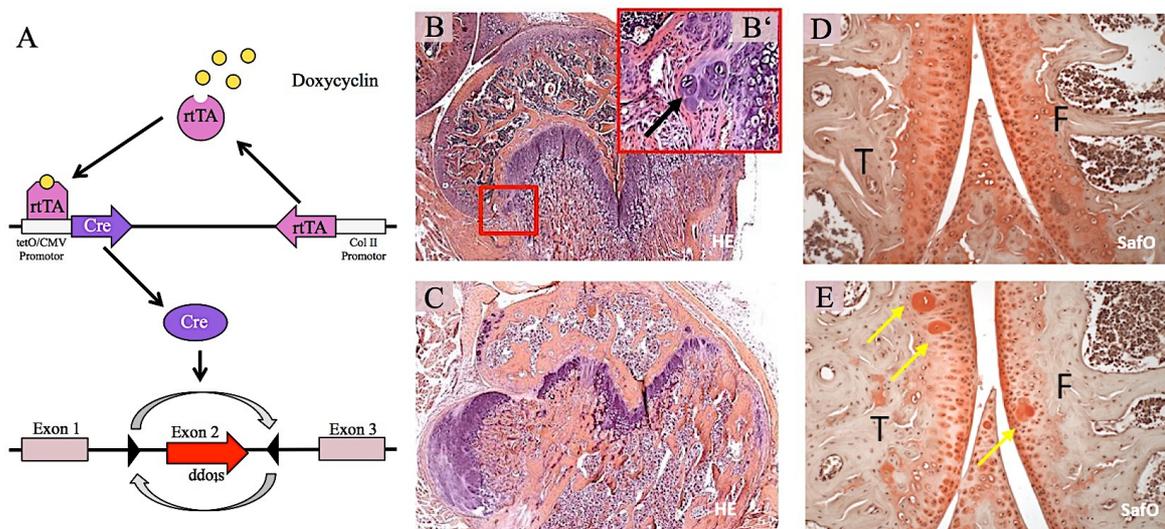


Abb. 1.7 Schema und Phänotyp der klonalen Deletion von *Ext1* in *Col2*-exprimierenden Chondrozyten. (A) Durch Bindung von Doxycyclin an den unter dem *Col2*-Promotor exprimierten reversen Tetracyclin-kontrollierten transkriptionellen Aktivator (rtTA) wird dieser aktiviert. Er bindet an den tetO/CMV Promotor und induziert die Expression der Cre-Rekombinase, welche die Inversion des von entgegengesetzt orientierten LoxP sites flankierten Exon2 bewirkt und damit ein Stopp-Codon erzeugt (verändert nach Piombo, 2010). (B, C) Hämatoxylin/Eosin-Färbung von sagittalen Schnitten des Femurs von vier (B) und acht Wochen (C) alten *Col2-rtTA-Cre; Ext1^{fl/fl}* Mäusen. Kleine Klone von Zellen an der Seite der Wachstumsfuge (Vergrößerung in B', Pfeil) entwickeln sich innerhalb von vier Wochen zu massiven Osteochondromen. (D, E) Im Gelenkknorpel von mit Safranin O gefärbten Kniegelenken sind bei *Col2-rtTA-Cre; Ext1^{fl/fl}* Mutanten (E) Cluster von Zellen mit atypischer Morphologie detektierbar (Pfeile), die in Kontrollen nicht vorhanden sind (E). T: Tibia, F: Femur. (B, C) 100x Vergrößerung.; (B', D, E) 200x Vergrößerung. (verändert nach Piombo, 2010)

1.4.2.3 Störungen der Heparansulfat-Modifikation

Zahlreiche Studien belegen, dass neben der Menge der synthetisierten HS-Ketten auch das Sulfatierungs-Muster großen Einfluss auf zahlreiche physiologische Prozesse, darunter auch die enchondrale Ossifikation, haben kann. Es existieren zahlreiche Mausstämme mit Deletionen in verschiedenen HS-modifizierenden Enzymen wie *Ndst1*, *HSEpi*, *HS2ST*, *HS6ST* und der extrazellulären Sulfatasen *Sulf1* und *-2*. Ihr Skelett-Phänotyp ist bisher jedoch wenig detailliert untersucht. Gemeinsam ist vielen dieser Stämme eine verminderte Körpergröße, Knochenfehlbildungen und Fusionen verschiedener Gelenke (Bullock et al., 1998; Habuchi et al., 2007; Li et al., 2003; Pallerla et al., 2007; Ratzka et al., 2008).

In dieser Arbeit wurden neben den zuvor beschriebenen *Ext1* Mutanten, die ein verändertes HS-Level haben, Mausstämme mit einer Deletion von *Ndst1* untersucht. Die Sulfatierung des GlcNAc durch eine der vier verschiedenen *Ndsts* ist der erste Schritt der Modifikation von neu synthetisierten HS-Ketten und die nachfolgenden Epimerisierungen und O-Sulfatierungen sind davon abhängig. Von den *Ndsts* zeigen *Ndst1* und *-2* das breiteste Expressionsmuster und sind in unterschiedlichen Mengen in allen untersuchten embryonalen und adulten Geweben exprimiert. Während die Deletion von *Ndst2* jedoch

überraschenderweise nur zu einem auf Mastzellen begrenzten Phänotyp führt (Forsberg et al., 1999), zeigen Mäuse mit kompletter Deletion von *Ndst1* unter anderem Mittellinien-Defekte, Störungen der Entwicklung des Neuralrohrs, der Augen, der Lunge und dem Skelettsystem. Etwa ein Drittel der Mäuse stirbt embryonal zwischen E14,5 und E18,5, die anderen perinatal an mangelnder Lungenfunktion. Der Skelettphänotyp beinhaltet Defekte in der Entwicklung des Schädels und der Gesichtsknochen, eine verzögerte Mineralisierung der Wirbel und der langen Röhrenknochen, sowie ein teilweise gespaltenes Sternum (Pallerla et al., 2007). Verschiedene Aspekte des *Ndst1*-Phänotyps ähneln somit dem Phänotyp von Embryonen mit Defekten im FGF- oder HH-Signalweg. Das in diesen Mutanten synthetisierte HS zeichnet sich durch ein geringes Level an N-Sulfatierung aus, was zu einer verminderten Bindung von Shh und Fgf2 führt (Grobe et al., 2005; Pallerla et al., 2007). Eine detaillierte Analyse der Auswirkungen der Mutationen in der Entwicklung oder dem Erhalt des Gelenkknorpels steht jedoch noch aus.

1.4.3 Funktion von Heparansulfaten bei Arthrose

Zahlreiche Studien haben demonstriert, dass das HS-Sulfatierungsmuster für die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse von Bedeutung ist. Im Skelettsystem gibt es, neben der schon bekannten Funktion von HS-Ketten bei der enchondralen Ossifikation, verschiedene Hinweise, dass sie auch zum Erhalt des Gelenkknorpels beitragen. Dabei scheint unter anderem die 6O-Sulfatierung des Glukosamins von Bedeutung zu sein. Diese Sulfatierung wird von drei verschiedenen HS6STs erzeugt und kann extrazellulär durch Sulf1 und -2 wieder entfernt werden. In OA ist die Expression der HS6ST2 vermindert und die von Sulf1 und -2 erhöht, wodurch man auf eine reduzierte 6O-Sulfatierung in OA-Gewebe schließen kann (Otsuki et al., 2008). Zudem führte die Verminderung der HS6ST2 Level durch siRNA in einer humanen Chondrozyten-Zelllinie zur Inhibition der Expression von Sox9 und Aggrecan, während die Expression von MMP3 induziert wurde (Wang et al., 2011). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von Sulf1 oder -2 dagegen zu stärkerer OA im chirurgisch induzierten Modell und beim Altern von Mäusen (Otsuki et al., 2010).

Neben den Enzymen, die an der HS-Synthese beteiligt sind, wurde auch die Funktion der perizellulären HSPGs Perlecan und Syndecan bei OA analysiert. Perlecan ist im Gelenkknorpel unter anderem an der Mechano-Rezeption beteiligt. Studien haben gezeigt, dass eine mutierte Form des Perlecan, die keine HS-Ketten trägt, in einem chirurgischen OA-Modell vor der Entstehung von Knorpelschäden, Synovitis und Osteophyten schützt. Dies wurde mit veränderten FGF-Signalen verknüpft (Kaneko et al., 2013; Shu et al., 2015).

Auf der anderen Seite scheint Perlecan jedoch auch chondroprotektive Eigenschaften zu vermitteln: So entwickeln Mäuse mit verminderter Perlecan-Synthese einen Skelettphänotyp ähnlich dem humanem Schwartz-Jampel Syndrom, das charakterisiert ist durch Myotonie, Knochen- und Gelenkanomalien, Mineralisierungsdefekte und OA (Rodgers et al., 2007). Zudem zeigen Proben von humanen stark von OA betroffenen Gelenken einen Anstieg der Perlecan-Level auf mRNA- und Protein-Ebene. Dies wurde als Versuch, die ECM zu stabilisieren, interpretiert (Tesche und Miosge, 2004).

Die Expression des transmembranen HSPGs Syndecan 4 ist verstärkt in humanem und murinem OA Gewebe. Die Deletion von Syndecan 4 sowie die Injektion von anti-Syndecan 4 Antikörpern schützen vor Knorpelschäden in einem chirurgischen OA Modell. Dies wird durch eine verminderte Aktivität der Proteasen Mmp3 und Adamts5 vermittelt (Echtermeyer et al., 2009).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

OA ist eine degenerative Erkrankung der Gelenke, die durch den fortschreitenden Verlust von ECM und Veränderungen aller am Gelenk beteiligten Gewebe gekennzeichnet ist. Einer der größten Risikofaktoren für OA ist ein zunehmendes Alter. Durch den demografischen Wandel in unserer Gesellschaft stellt OA daher ein schwerwiegendes Problem für zahlreiche Patienten und eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Trotz jahrelanger Forschung ist der Einfluss einer Vielzahl von Faktoren, wie auch der HSPGs, auf den Krankheitsverlauf von OA bisher wenig verstanden. Erste Studien haben allerdings gezeigt, dass HSPGs einen Einfluss auf die Entstehung von OA nehmen können. Mäuse mit Deletion von *Sulf1* oder *-2* entwickeln beispielsweise stärkere OA als die jeweiligen Kontrollen, während die Deletion des HSPGs Syndecan-4 vor OA schützt (Echtermeyer et al., 2009; Otsuki et al., 2008). Ziel dieser Arbeit war daher, am Mausmodell genauer zu analysieren, wie sowohl die Menge als auch das Sulfatierungsmuster von HS-Ketten zum Erhalt des Gelenkknorpels beitragen und die Entstehung von OA beeinflussen.

Ausgehend von der Beobachtung von Knorpel-Anomalien in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen in einer früheren Arbeit (Piombo, 2010) sollte zuerst der Gelenkphänotyp der Mäuse histologisch analysiert werden. Dazu sollten Kontrollen und Mutanten verschiedener Altersstufen systematisch untersucht und die Entstehung spontaner OA dokumentiert werden. Anschließend sollte ein chirurgisches OA-Modell etabliert und zur Analyse unterschiedlicher *Ext1*- oder *Ndst1*- defizienter Mausstämmen verwendet werden.

Da der homozygote Verlust sowohl von *Ext1* als auch von *Ndst1* letal ist, sollten heterozygote Tiere oder Mäuse mit einer knorpelspezifischen Deletion der Gene untersucht werden. Zuerst sollten Mäuse mit reduzierter *Ext1* Gen dosis (*Ext1*^{+/-}) oder klonaler Deletion von *Ext1* in Chondrozyten (*Col2-rtTA-Cre;Ext1*^{f/f}) analysiert werden, um die Auswirkung eines verminderten HS-Levels aufzuklären. Um zusätzlich die Folgen eines veränderten Sulfatierungs-Musters auf die Entstehung von OA zu untersuchen, sollten *Ndst1*-heterozygote Mäuse analysiert werden. In allen Mausstämmen sollte chirurgisch OA induziert und Auswirkungen histologisch untersucht werden. Anschließend sollte ausgehend von den beobachteten Effekten mit Hilfe von Immunfluoreszenzen und Microarray-Analysen ein Expressionsprofil der mutanten Chondrozyten erstellt werden. Zusätzlich sollte mit Hilfe von Knorpel-Explant-Kulturen eine mögliche Auswirkung der Deletion von *Ext1* oder *Ndst1* auf die Aggrecan-Degradation untersucht werden, um eventuelle Änderungen der OA-Entstehung zu erklären.

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits, Antikörper, Oligonukleotide, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software, Lösungen und Puffer sowie Mausstämme mit ihren Herstellern bzw. der Bezugsquelle aufgelistet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit Milli QTM gereinigtem Wasser hergestellt und autoklaviert oder, falls hitzelabile Bestandteile enthalten waren sterilfiltriert. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße sowie Glasware wurden vor Verwendung autoklaviert. Verbrauchsmaterial für die Zellkultur waren gamma-sterilisierte Einwegmaterialien. Soweit nicht anders angegeben basieren alle folgenden Methoden auf Protokollen des Instituts für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen.

2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Calbiochem (Bad Soden)
ATP	Thermo Scientific (Dreieich)
DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
DPX-Eindeckmedium	Fluka (Deisenhofen)
Entwickler	Kodak (Stuttgart)
Ethanol	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Calbiochem (Bad Soden)
Immersol TM 518F	Zeiss (Oberkochen)
Isopropanol	VWR (Darmstadt)
Kanamycin	Calbiochem (Bad Soden)
Ketamin (10 %)	Ceva Tiergesundheit GmbH (Düsseldorf)
Methanol	Fischer Scientific (Schwerte)
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Dreieich)
Paracarp (50mg/ml)	IDT Biologika GmbH (Dessau-Roßlau)
Protease Inhibitor Cocktail III	Calbiochem (Bad Soden)
Protein Ladder-Mix	Thermo Scientific (Dreieich)
Tissue-Tek® O.C.T. TM Medium	Sakura Finetek Europe (Alphen am Rhein, NL)
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek Europe (Alphen am Rhein, NL)
Weigert Lösung A und B	Polyscientific Co. (Bay Shore, USA)
Xylazin (2 %)	Ceva Tiergesundheit GmbH (Düsseldorf)

2.1.1 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Chondroitinase ABC	Sigma (Taufkirchen)
DNase I, RNase free (10 U/μl)	Roche (Mannheim)
DreamTaq-Polymerase (5 U/μl)	Thermo Scientific (Dreieich)
FastDigest Restriktionsenzyme (1 FDU/μl)	Thermo Scientific (Dreieich)
Hyaluronidase	Sigma (Taufkirchen)
Papain (16-40 units/mg Protein)	Sigma (Taufkirchen)
Proteinase K (10 mg/ml)	Roche (Mannheim)
RNaseA (10 mg/ml)	Roche (Mannheim)
T7- & SP6-Polymerase (20 U/μl)	Roche (Mannheim)
Trypsin	Life Technologies (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Life Technologies (Darmstadt)

2.1.2 Kits

Kit	Hersteller
Agilent RNA Pico	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
DAB-staining	Thermo Scientific (Dreieich)
DirectPCR-Tail	Peqlab (Erlangen)
NucleoSpin RNA XS	Machery-Nagel (Düren)
Superscript III	Life Technologies (Darmstadt)
Mini Dialysis 8kDa cut-off	GE Healthcare (Solingen)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Methode/Verdünnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Kaninchen α p-ERK 1/2	IF/1:100 (g.s.)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Maus α FAK	IF/1:100 (g.s.)	Merck Millipore (Darmstadt)
Kaninchen α p-FAK	IF/1:100 (g.s.)	Life Technologies (Darmstadt)
Kaninchen α Myosin	IF/1:100 (g.s.)	Thermo Scientific (Dreieich)
Kaninchen α NITEGE	WB/1:1000 (b.b.)	Thermo Scientific (Dreieich)
Kaninchen α VDIPEN	WB/1:1000 (b.b.)	Amanda J. Fosang, Melbourne, AUS

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Methode/Verdünnung	Hersteller
Esel α Kaninchen IRDye 680CW	WB, 1:20.000 (b.b.)	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Ziege α Kaninchen Alexa 488	IF, 1:1000 (g.s.)	Thermo Scientific (Dreieich)
Pferd α Maus biotinyliert	IF, 1:100 (b.b.)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Streptavidin-Alexa 488	IF, 1:1000 (b.b.)	Thermo Scientific (Dreieich)

2.1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

2.1.4.1 Genotypisierungs-Primer

Name	Sequenz (5' - 3')
Cre Rec for	GAG TGA TGA GGT TCG CAA GA
Cre Rec rev	CTA CAC CAG AGA CGG
Ext1flox for	GAG TCC ATC CTG CTC TGC AT
Ext1flox rev	TTG TTG CAT GGG AAA GAC AA
Ext1flox rev inv	CCA AAC TGG TTT CAA GCT
Ndst1 for	CAT CCT CTG AGG TGA CCG C
Ndst1 wt rev	CCA GGG CGT CAG GGC CTC CTG
Ndst1 mut rev	CCC AGA TGG CGA GAC TGA GG
Rosa rtTA A	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
Rosa rtTA B	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC
Rosa rtTA C	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
Nested A-Outer:	ACC AGC TAC AGA TCA ACA (beide Allele)
Nested B-Outer:	CTC ACC TTC CCA TTT AGT (<i>Ext1^{fl}</i>)
Nested C-Outer:	AGG CTT AGT TAT TTG GGG (<i>Ext1^{inv}</i>)
Nested A-Inner:	ACC CCT CCC CCA CCT GAT TTA (beide Allele)
Nested B-Inner:	GCG CAC GCC TTT AAT CCC A (<i>Ext1^{fl}</i>)
Nested C-Inner:	ACT TTC TGT CTG GTT CCT CGT (<i>Ext1^{inv}</i>)

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
15 / 50ml Falcons	Corning (Amsterdam)
Chirurgische Einmal-Skalpelle (Nr.15)	B. Braun Melsungen AG (Tuttlingen)
Chirurgisches Nahtmaterial	RESORBAWundversorgung GmbH & Co. KG
PGA Resorba, DSM 13metric 1,5, USP 4-0, ungefärbt	(Nürnberg)
Cryofilm type II C(9)	SECTION-LAB Co. Ltd., Japan
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Injektions-Kanüle 0,4 x 20 mm, 27G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Nitrocellulose-Filterpapier 0,8 µm	Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulose-Membran	BioRad (München)
Objektträger SuperfrostPlus	Roth (Karlsruhe)
Paraplast-Paraffin	Roth (Karlsruhe)
Tuberkulin-Spritze	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Whatman Papier	Macherey-Nagel (Düren)
Zellkultur-Platten	Corning (Amsterdam)

2.1.6 Geräte

Gerät	Modell; Hersteller
Einbettstation	EG 1150C; Leica (Wetzlar)
Elektrophoresekammern (horizontal)	PerfectBlue Maxi S Plus; Peqlab (Erlangen)
Elektrophoresekammern (vertikal)	PerfectBlue Twin M; Peqlab (Erlangen)
Platten-Reader	GENios Pro; Tecan (Männedorf)
Feinwaage	AL 54; Mettler Toledo (Gießen)
Gel-Dokumentationsanlage	Gel iX20 Imager; INTAS (Göttingen)
Gewebeeinbettautomat	STP 120; Microm (Walldorf)
Kamera	Spot 23.0; DiagnosticInstruments (Sterling Heights, MI)
Kryotom	HM560; Microm (Walldorf)
Mikroliterpipetten	Research; Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	Axioplan 2, Axiovert 200M; Zeiss (Göttingen)
Mikrotom	HM340E; Microm (Walldorf)
Reinstwasser-System	Milli-Q Biocel; Millipore (Schwalbach)
Spektrophotometer	NanoDrop 1000; Peqlab (Erlangen)
Infrarot Scanner	Odyssey CLx Scanner; LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
PCR-Geräte	Mastercycler epgradientS; Eppendorf (Hamburg) Thermocycler T3000; Biometra (Göttingen)
pH-Meter	SevenEasy; Mettler Toledo (Gießen)
Pipettierhilfe	S1 Pipet Filler; Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Rotationsrad	Rotator Drive STR4; Bibby Scientific (Staffordshire)
Schüttelinkubator	HMR20; HLC (Bovenden)
Schwenktisch	Duomax 1030; Heidolph (Schwabach)
Stereomikroskop	MZ FLIII; Leica (Wetzlar)
Sterilbank	HERAsafe, MSC-Advantage; Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Stromquelle	Consort EV 231; Peqlab (Erlangen)
Thermobad	HAAKE SWB 25 Thermo Electron Corporation
Thermomixer	Thermomixer Comfort; Eppendorf (Hamburg)
Thermo-Magnet-Rührer	RCT basic IKA (Staufen)
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2; Scientific Industries (Bohemia, NY)
Waage	PL 3002; Mettler Toledo (Gießen)
Westernblot-Transfertank	EasyPhor PAGE WetBlotter; Biozym (Oldendorf)
Zellkultur-Inkubatoren	C200; Labotect (Göttingen)
Zentrifugen:	5810R mit Rotor F45-30-11 für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße, mit Rotor A-4-62 für Falcon-Gefäße, 5417C, 5415D, Eppendorf (Hamburg)

2.1.7 Software

Software	Hersteller	Version	Verwendung
Excel/Word	Microsoft	14.2.5	Datenanalyse
GraphPad Prism	GraphPad Software SDCU	5.04	Datenanalyse
Image Studio	LI-COR	3.1	WB-Dokumentation
Intas	GDS	3.22	Agarosegel-Dokumentation
MetaMorph	Molecular Devices	6.3r6	Immunfluoreszenz-Aufnahmen
ND-1000	Coleman Technologies	3.2.1	DNA und RNA Analyse
Photoshop	Adobe	11.0	Bildbearbeitung
Spot	Diagnostic Instruments	4.6	Aufnahmen von histologischen Färbungen

2.1.8 Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blocking Buffer	LI-COR Odyssey blocking buffer 1:3 verdünnt in TBS
Chondroitinase-Puffer	0,1 M Tris (pH 7,3) 10 mM EDTA
Dialyse-Puffer	10 mM EDTA (pH 8,0)
DMMB Stammlösung	0,0016 % (w/v) Dimethylmethylenblau 0,2 % (w/v) Natriumformiat 0,2 % (v/v) Ameisensäure
Fast Green Farblösung	0,1 % (w/v) Fast Green in 1 % (v/v) Essigsäure
10 % Ziegen-Serum	10 % (v/v) Ziegenserum in PBS
GuHCl Extraktions-Puffer	50 mM Natriumacetat (pH 5,8) 4 M Guanidin Hydrochlorid 10 mM EDTA 0,1 M Capronsäure
Hyaluronidase-Puffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaCH ₃ CO ₂ pH 5,0
Ketamin/Xylazin Narkose	5 ml 0,9 % (w/v) NaCl 1 ml 10 % (w/v) Ketamin 0,25 ml 2 % (w/v) Xylazin
LCM Lyse-Puffer	50 mM TrisHCl, pH=8 0,5 % (v/v) Tween
6x Orange G-Auftrags-Puffer	30 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Orange G
Papain-Puffer	0,1 M Natriumacetat (pH 5,5) 5 mM EDTA 5 mM L-Cystein HCl frisch ansetzen

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1x PBS	10x PBS 1:10 verdünnt in Wasser
PFA	4 % (w/v) in 1x PBS
SafraninO Farblösung	0,1 % (w/v) Safranin O
Scott's Buffer	83 mM MgSO ₄ 24 mM NaHCO ₃
4x SDS-PAGE Lade-Puffer	250 mM Tris Base, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 8 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
10x SDS-PAGE Lauf-Puffer	250 mM Tris Base 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
SDS-PAGE Sammelgel	5 % (v/v) Acrylamid 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 1:1000 TEMED
1x SDS-PAGE Transfer-Puffer	50 mM Borsäure mit NaOH auf pH 8,5 einstellen dann + 10 % (v/v) MeOH
SDS-PAGE Trenngel	8 % (v/v) Acrylamid 400 mM Tris/HCl (pH 6,8) 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 1:1000 TEMED
1x TAE	40 mM Tris-Base 10 mM EDTA pH 8,0 (Essigsäure)
20x TBS	3 M NaCl 1 M Tris-Base (pH 7,4)
1x TBS-T	1x TBS mit 1 % (v/v) Tween 20
TE	10 mM Tris-Base (pH 8,0) 1 mM EDTA
Toluidinblau-Farblösung	0,2 % (w/v) Toluidinblau 1 % (w/v) Dinatriumtetraborat-Decahydrat

Puffer	Zusammensetzung
TRAP-Farblösung	1 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat in 100 µl N-N Dimethylformamid auflösen, 10 ml TRAP Puffer hinzugeben 6 mg Fast red Violet LB-Salz hinzufügen direkt verwenden
TRAP-Puffer	40 mM Natriumacetat 10 mM Natriumtartrat pH 5
Weigert Farblösung	Weigert Lösung A und B zu gleichen Teilen mischen und filtrieren
X-Gal Wasch-Puffer	2 mM MgCl ₂ 0,01 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,02 % (v/v) NP40 in 1xPBS
X-Gal Farblösung	2 mM MgCl ₂ 0,01 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,02 % (v/v) NP40 in 1xPBS 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x 3 H ₂ O 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,1 % (w/v) X-Gal

2.1.9 Mäusstämme

Stamm	genetische Bezeichnung	Referenz
<i>Col2 Cre</i>	<i>Tg(Col2a1-Cre)1Star</i>	(Terpstra et al., 2003)
<i>Col2-Cre^{ERT}</i>	<i>Tg(Col2a1-Cre/ERT)KA3Smac</i>	(Nakamura et al., 2006)
<i>Col2-rtTA-Cre</i>	<i>Tg(Col2a1-rtTA,tetO-Cre)22Pjro</i>	(Grover und Roughley, 2006)
<i>Ext1^{fl}</i>	<i>Ext1^{tm1.1Kjns}</i>	(Jones et al., 2010)
<i>Ndst1^{fl}</i>	<i>Ndst1^{tm1Grob}</i>	(Grobe et al., 2005)
<i>Rosa^{LacZ}</i>	<i>Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}</i>	(Soriano, 1999)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Sie basiert auf drei aufeinander folgenden Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 95 °C denaturiert. Anschließend lagern sich kurze Oligonukleotide (Primer) sequenzspezifisch an die DNA-Einzelstränge an und flankieren die zu amplifizierende Sequenz. Ausgehend von den hybridisierten Primern synthetisiert die DNA-Polymerase einen DNA-Doppelstrang

komplementär zur vorhandenen Matrize. Die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle 2.1 zeigt einen Standard PCR-Ansatz sowie ein allgemeines PCR-Programm. Die eingesetzte DNA-Menge, Anlagerungs-Temperatur, Elongationszeit und Anzahl der Zyklen wurden den Primern und des Verwendungszweckes entsprechend angepasst (siehe 8.2).

Tab. 2.1 Standard PCR Protokoll und Cycler Programm

Standard PCR Ansatz		Standard PCR Programm	
H ₂ O	21 µl	94 °C	2 min
10 x Taq-Puffer	2,5 µl	94 °C	30 s
Sense-Primer (100 mM)	0,1 µl	58 °C	30 s
Antisense-Primer (100 mM)	0,1 µl	72 °C	1 min
dNTPs (100 mM)	0,2 µl	72 °C	4 min
DreamTaq- Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	4 °C	
DNA	1 µl		

← 30 Zyklen

2.2.2 Nested PCR zur Genotypisierung von einzelnen Zell-Klonen

Die *nested* (verschachtelte) PCR ist eine Methode zur Amplifikation sehr geringer DNA-Mengen. Bei der Methode werden zwei aufeinander folgende PCRs durchgeführt, wobei das Amplifikat der ersten Reaktion als Matrize für die zweite PCR dient. Die Primer der zweiten Reaktion binden *downstream* der ersten Primer und haben eine höhere Anlagerungs-Temperatur. So wird die Amplifikation unspezifischer Fragmente vermindert und der gewünschte Sequenzbereich in hoher Spezifität generiert.

In dieser Arbeit wurde die *nested* PCR zur Genotypisierung einzelner Zell-Klone, die durch Laser Capture Microdissection (LCM) isoliert wurden, verwendet. Mit Hilfe der Methode wurde überprüft ob die Zellen das funktionale (flox) und/oder das invertierte Allel von Ext1 besitzen. Das gesamte Lysat einer LCM-Probe wurde zuerst für eine 3-Primer PCR eingesetzt, in der das flox- und das invertierte Allel gleichzeitig amplifiziert wurden (PCR Protokoll: Ext1 *nested Outer*). Anschließend erfolgte die weitere Amplifikation der Allele in zwei getrennten PCR-Reaktionen (PCR Protokoll: Ext1 *nested InnerB* und *C*). Dazu wurden je 5 µl des PCR Produktes der ersten PCR als Matrize für die zweite PCR verwendet. Die resultierenden PCR Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe von DNA- und RNA-Fragmenten wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Es wurden Gele mit 1 oder 2 % Agarose in 1x TAE angefertigt und zur späteren

Visualisierung der Nukleinsäuren mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zum Auftragen wurde 6x Orange G Ladepuffer in einer Endkonzentration von 1x Orange G zu den Proben gegeben. Die Banden wurden bei einer elektrischen Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt und das resultierende Bandenmuster mit einem Geldokumentationsystem unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 345 nm fotografiert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand eines DNA-Standards bestimmt.

2.2.4 Laser Mikrodissektion

Zur lasergestützten Mikrodissektion von Gewebe wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet: Laser Capture Microdissection (LCM) für die Isolierung genomischer DNA aus Paraffinschnitten und Laser Pressure Catapulting (LPC) zur RNA-Isolierung aus Kryoschnitten.

2.2.4.1 Laser Capture Microdissection

Für die LCM wurden 6 µm Paraffinschnitte von Kniegelenken 4 Wochen alter Mäuse angefertigt (siehe 2.4.1) und auf P.A.L.M. Membran Objektträger überführt (1 mm Glas Objektträger, mit einer 1,35 µm Polyethylen-Naphtalat Membran beschichtet). Die Schnitte wurden O/N getrocknet, deparaffiniert und mit Mayers Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Einzelne Zell-Klone wurde mit dem P.A.L.M. Microbeam System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Modus: RoboLPC) direkt in LCM Lyse-Puffer isoliert und nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 0,1 mg/ml) für 60 min in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 60 °C verdaut. Nach Hitzeinaktivierung (30 min, 85 °C) wurde das gesamte Lysat direkt zur Genotypisierung mittels *nested* PCR verwendet.

2.2.4.2 Laser Pressure Catapulting

Für die RNA Isolierung aus dem Gelenkknorpel und der Wachstumsfuge von 4 Wochen alten Mäusen wurden 7 µm Kryoschnitte von unfixierten Femurköpfen angefertigt auf Glas Objektträger aufgezogen. Es wurden jeweils acht Schnitte auf einem Objektträger platziert. Das Gewebe wurde in vorgekühlten Lösungen fixiert (30 s, 70 % EtOH) und danach 45 s in H₂O depc gewaschen. Anschließend wurden die Präparate dehydriert (30 s, 70 % EtOH; 30 s, 95 % EtOH; 30 s, 100 % EtOH) und bis zur LPC in 100 % EtOH bei -80 °C gelagert. Die Objektträger wurden erst direkt vor der LPC getrocknet. Das Gewebe von allen acht Schnitten auf einem Objektträger wurde mit Hilfe des P.A.L.M. Microbeam Systems (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Modus: Line AutoLPC) direkt in den Deckel eines 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäßes, der mit 20 µl Puffer RAI + TCEP (NucleoSpin RNA XS Kit) präpariert war, transferiert. Die Proben wurden sofort danach auf Trockeneis

eingefroren und bei -80 °C gelagert. Bei der späteren RNA-Isolierung wurde das Lysat aus jeweils 8 Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu einer Probe vereinigt und mit dem NucleoSpin RNA XS Kit nach Herstellerangaben isoliert. Konzentration sowie Qualität der RNA wurden mittels Agilent RNA Pico Kit analysiert.

2.2.5 Microarray

RNA wurde per LPC aus der Wachstumsfuge und dem Gelenkknorpel von vier Wochen alten Mäusen isoliert und mit dem Nucleospin RNA XS Kit (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die weiteren Arbeitsschritte wurden am BioChip Labor des Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Circa 50 pg RNA wurden mit Hilfe des Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN) präpariert. Hybridisierung, Waschschriffe und Färbung der Arrays wurde nach dem Standard Affymetrix GeneChip Protokoll (Version 2) durchgeführt. Der Scan der Arrays wurde auf dem GC Scanner 3000 mit G7 Update durchgeführt.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Präparation von genomischer DNA zur Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA der Tiere aus Biopsien der Schwanzspitze isoliert. Dazu wurden das Gewebe in 100 µl DirectPCR-Tail Reagenz mit 0,2 mg/ml Proteinase K O/N hydrolytisch gespalten. Nach Hitzeinaktivierung für 45 min bei 85 °C wurde 1 µl des Lysates direkt zur PCR eingesetzt.

2.3.2 Zeitspezifische Induktion der Cre-Rekombinase durch Doxycyclin oder Tamoxifen

Zur Zeit- und Gewebespezifischen Deletion von Zielgenen wurden verschiedene transgene Mausstämme verwendet. Die Expression der Cre-Rekombinase in *Col2-rtTA-Cre* Mäusen wurde durch i.p. Injektion von 80 µg Doxycyclin/Gramm Körpergewicht in die laktierende Mutter an P8 oder 1-20 µg/Gramm Körpergewicht i.p. im Alter von 6 Wochen induziert. Alternativ wurde eine Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombinase verwendet, die aus einem Fusionsprotein der Cre-Rekombinase mit einem modifizierten Östrogen-Rezeptor besteht (*Col2Cre-ERT*). Zur Induktion der Rekombination wurde P7 Mäusen 100 µg Tamoxifen i.p. injiziert.

2.3.3 Chirurgische Induktion von Arthrose

Die Induktion von Arthrose (OA) in Mäusen wurde durch eine chirurgische Destabilisierung des Kniegelenks der linken Hintergliedmaße hervorgerufen. Dazu wurden 8 Wochen alte Mäuse durch eine i.p. Injektion von 100 µl/10 g Körpergewicht

Ketamin/Xylazin-Lösung (entspricht 160 mg Ketamin/kg, 8 mg Xylazin/kg) narkotisiert und die Knie enthaart. Nach Desinfektion mit 70 % EtOH wurde unter mikroskopischer Kontrolle mit einem sterilem Skalpell ein ca. 0,5 cm langer, medial-longitudinaler Hautschnitt durchgeführt. Mit dem Skalpell wurden das Innenband (Ligamentum collaterale tibiale), sowie die beiden Kreuzbänder (Ligamentum cruciatum anterius und posterius) durchtrennt. Die Haut des Knies wurde anschließend mit sterilem Nahtmaterial verschlossen. An den rechten Hintergliedmaßen wurde zur Kontrolle eine Sham-OP durchgeführt. Dazu wurde die Haut wie am anderen Bein medial-longitudinal aufgeschnitten und die Bänder des Kniegelenkes identifiziert. Anschließend wurde die Haut ohne Inzision der Ligamente wieder verschlossen.

Nach der OP wurden die Tiere drei Tage lang zur Analgesie mit 5 mg Paracarp/kg behandelt und täglich der Gesundheitszustand kontrolliert. Zu definierten Zeitpunkten nach der OP wurden die Knie der Mäuse entnommen, fixiert, dekalzifiziert, in Paraffin eingebettet und histologisch analysiert. Zur Etablierung der OP-Methode wurden die Zeitpunkte von 2, 4, 6 und 8 Wochen nach der OP gewählt, in allen späteren Versuchen 4 Wochen.

2.3.4 Evaluierung von Arthrose

Die Evaluierung der OA erfolgte anhand von histologisch gefärbten Präparaten nach einem semiquantitativen System zur Einschätzung von OA in Mäusen (Glasson et al., 2010). Der Grad der OA wird anhand von morphologischen Kriterien bestimmt und reicht von Grad 0 (keine OA) bis Grad 6 (sehr starke OA) (Tab. 2.2). Es wurden pro Knie mindestens fünf Schnittebenen im Abstand von jeweils ca. 160 µm evaluiert. Dabei wurden alle vier Quadranten des Knies einzeln bewertet und anschließend der Mittelwert gebildet.

Tab. 2.2 Histologisches Evaluierungssystem nach Glasson et al., 2010

Grad	Morphologie des Knorpels
0	normal
0,5	Verlust von Safranin O ohne strukturelle Veränderungen
1	kleine Unebenheiten ohne Verlust von Knorpel
2	vertikale Einrisse direkt unterhalb der superfiziellen Zone
3	Einrisse/Erosion bis zur kalzifizierten Zone bei ≤ 25 % der Knorpeloberfläche
4	Einrisse/Erosion bis zur kalzifizierten Zone bei 25 – 50 % der Knorpeloberfläche
5	Einrisse/Erosion bis zur kalzifizierten Zone bei 50 – 75 % der Knorpeloberfläche
6	Einrisse/Erosion bis zur kalzifizierten Zone bei ≥ 75 % der Knorpeloberfläche

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die meisten histologischen Analysen in dieser Arbeit wurden anhand von Paraffinschnitten durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe in PBS präpariert und anschließend bei 4 °C in 4 % PFA O/N fixiert. Embryonales Gewebe wurde danach mit PBS gewaschen und direkt im Gewebe-Einbettautomaten dehydriert und mit Paraffin durchtränkt, während die Knie adulter Mäuse nach der Fixierung zuvor noch bei 37 °C in 25 % EDTA (pH 7,4) für 14 Tage dekalzifiziert wurden. Das EDTA entzieht dabei dem Knochen das Kalzium wodurch er besser mit dem Mikrotom geschnitten werden kann. Entsprechend des Alters der Tiere wurden unterschiedliche Zeiten der Dehydrierung gewählt (Tab. 2.3). Nach dem Einbetten des Gewebes in Paraffin wurden die fertigen Präparate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Anfertigung der Paraffinschnitte wurden auf einem Rotationsmikrotom 5 µm (E14,5 und E16,5 Embryonen) bzw. 7 µm (postnatale Stadien) dicke Schnitte des Gewebes angefertigt, im Wasserbad gestreckt und auf Glas-Objektträger aufgezogen. Bis zur Verwendung wurden die fertigen Schnitte bei 4 °C gelagert.

Tab. 2.3 Programm zur Dehydrierung und Einbettung von Gewebe in Paraffin

	E14,5 und E16,5	Postnatale Stadien
70 % EtOH	10 min	1,5 h
80 % EtOH	10 min	1,5 h
95 % EtOH	10 min	1,5 h
100 % EtOH	10 min	1,5 h
100 % EtOH	10 min	1,5 h
100 % EtOH	10 min	1 h
Xylol	20 min	30 min
Xylol	30 min	30 min
Paraffin	1 h	30 min
Paraffin	1 h	1 h
Paraffin	1 h	1 h

2.4.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Für die RNA-Isolierung per LPC sowie für verschiedene Färbungen wurden unfixierte Kryoschnitte benötigt. Dazu wurde das Gewebe nach der Präparation in PBS direkt in Tissue Tek O.C.T. Compound Einbettmedium eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° gelagert.

Für die RNA-Isolierung wurden Maus-Femurköpfe bei einer Temperatur von -18 °C (Klinge: -18 °C, Block: -16 °C) mit einer Schnittdicke von 7 µm geschnitten und auf Glas-Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden maximal drei Tage bei -20 °C gelagert, bevor sie verwendet wurden.

Für die Herstellung unfixierter, nicht dekalzifizierter Kryoschnitte von Knien wurde Cryofilm type II C(9) (SECTION-LAB Co. Ltd. Japan) verwendet. Dazu wurde bis zur gewünschten Schnittebene getrimmt, der Cryofilm direkt auf den Block geklebt, angedrückt und geschnitten. Die Folie stabilisierte das Gewebe und verhinderte ein Splittern des Knochens. Das Gewebe wurde auf der Folie klebend für anschließende Färbungen verwendet.

2.4.3 Histologische Färbeprotokolle

2.4.3.1 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung ist eine histologische Routinefärbung zur Darstellung saurer Moleküle. Für die Färbung wurden die deparaffinierte, rehydrierte Schnitte 5 min in 0,2 % Toluidinblau mit 1 % Borax gefärbt und anschließend in 30 %, 50 %, 75 %, 95 % und 100 % Ethanol entfärbt und dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal 10 min in Xylol gewaschen und mit DPX-Eindeckmedium eingedeckt.

2.4.3.2 Safranin Weigert Färbung

Safranin Weigert wird zur Darstellung von Knorpelgewebe verwendet. Die Intensität der orange-roten Färbung ist direkt proportional zum GAG-Gehalt des Gewebes. Die Nuklei werden durch Weigerts Eisen-Hämatoxylin schwarz, der Hintergrund durch Fast Green grün angefärbt.

Die Schnitte wurden deparaffiniert, rehydriert und 10 min in Weigerts Eisen Hämatoxylin gefärbt. Danach wurden die Schnitte 10 min unter laufendem Leitungswasser gewaschen und 5 min in 0,1 % Fast Green gefärbt. Die Schnitte wurden kurz in 1 % Essigsäure gespült und dann 5 min in 0,1 % Safranin O Lösung gefärbt. Dann wurden die Schnitte gewaschen und dehydriert in 95 % EtOH, 100 % EtOH und Xylol und mit DPX-Eindeckmedium eingedeckt.

2.4.3.3 TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung (Tatrat-resistente saure Phosphatase) dient dem Nachweis von Osteoklasten. Sie beruht auf der hydrolytischen Aktivität des Enzyms bei sauren pH-Werten. Im Gegensatz zur unspezifischen sauren Phosphatase der Makrophagen ist das Enzym der Osteoklasten auch in Gegenwart von Tatrat aktiv.

Für die Färbung wurden Paraffinschnitte deparaffiniert und rehydriert und 20-30 min in TRAP-Farblösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte gewaschen, bei Bedarf mit 0,1 % Fast Green gegengefärbt und mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt. Die Farblösung wurde immer frisch angesetzt und direkt verwendet.

2.4.3.4 X-Gal Färbung von Gewebe

Für die X-Gal Färbung wurde Gewebe in PBS präpariert, 90 min bei 4 °C in 4 % PFA fixiert und anschließend dreimal für je 10 min bei 4 °C in X-Gal Wasch-Puffer geschüttelt. Dann folgte eine Inkubation des Gewebes im Dunklen in X-Gal Farblösung bei 37 °C bis zur ausreichenden Färbung des Gewebes (2-4 Stunden). Dabei wird das in der Farblösung enthaltene 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) durch das *lacZ*-kodierte Enzym β -Galaktosidase in den unlöslichen, blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo umgesetzt. Danach wurde in PBS gewaschen und das Gewebe O/N in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert. Adulte Knie wurden zusätzlich noch bei 37 °C für 2 Wochen in 25 % EDTA dekalzifiziert und dann in Tissue Tek O.C.T. Compound Einbettmedium eingefroren. Es wurden Kryoschnitte angefertigt und auf Glas-Objektträger aufgezogen, in PBS gewaschen und 2 min in 0,1 % Kernechtrot gegengefärbt. Danach wurde mit 1x PBS gewaschen und in wässrigem Eindeckmedium (Aquatex) eingedeckt.

2.4.4 Immunhistochemie

Für die Immunfluoreszenz-Analysen mit den Antikörpern gegen FAK, pFAK, Myosin und pERK wurden Paraffinschnitte deparaffiniert, durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert und in 5 min in PBS gewaschen.

Für die Färbung von pFAK wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C mit 10000 U/ml Hyaluronidase in PBS verdaut. Nach einem Waschschrift in PBS wurde für 1h bei RT in 10 % Ziegen Serum geblockt. Danach wurde der erste Antikörper 1:100 verdünnt in Blockierlösung (10 % Ziegen Serum) bei 4°C O/N inkubiert. Nach drei Waschschriften in PBS wurde der zweite Antikörper (Ziege anti Maus Alexa 488) 1:1000 verdünnt in Blockierlösung für 1h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschriften in PBS wurde einmal zur Permeabilisierung der Zellen in PBS + 0,1 % Triton gewaschen und anschließend 5 min mit DAPI die Zellkerne gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde mit MOWIOL eingedeckelt.

Für die Färbung von pERK und Myosin wurden dasselbe Protokoll wie bei der Färbung für pFAK durchgeführt. An Stelle des Hyaluronidase-Verdau wurde jedoch zum Antigen-Retrieval das Gewebe für 3 min bei 900 W in der Mikrowelle in 10 mM Citratpuffer aufgeköcht, dann bei 10 min bei 270 W weitergekocht und 20 min bei RT abgekühlt. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Färbung mit dem Blockieren der unspezifischen Bindungen fortgesetzt.

Bei der Färbung für FAK wurden alle Schritte bis zu den Waschschriften nach der ersten Antikörper-Inkubation wie bei pFAK durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde

jedoch ein biotinylierter Ziege anti Maus Antikörper 1:100 in Blockierlösung eingesetzt. Dieser wurde 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten in PBS wurde ein Streptavidin-Alexa 488 Antikörper 1:1000 verdünnt in Blockierlösung für 1h bei RT hinzugefügt. Danach wurde wie bei pFAK gewaschen, mit DAPI gefärbt und eingedeckelt. Die Immunfluoreszenz-Analysen mit den Antikörpern gegen Aggrecan, Col II, IX, X und XII, COMP, Fibronectin, Matn-1, -3, -4 und Perlecan wurden in Kooperation mit dem Institut für experimentelle Neonatologie der Universität Köln durchgeführt (Groma et al., 2011). Dazu wurde das Gewebe deparaffiniert, rehydriert und mit 5 mg/ml Hyaluronidase für 30 min bei 37°C verdaut. Die Proben wurden anschließend 10 min in 4 % PFA nachfixiert und 10 min mit 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert. Anschließend wurde für eine Stunde bei RT in 10 % FCS und 5 % Ziegen Serum in TBS geblockt. Der primäre Antikörper wurde O/N in 5 % FCS in TBS bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit TBS gewaschen, und der sekundäre Antikörper in Blockierlösung hinzugegeben.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Nachweis von Aggrecan Degradationsproduktion in Femurkopf-Explant-Kulturen

Ein Schritt bei in der Pathogenese von Arthrose ist die Degradation von Proteoglykanen des Gelenkknorpels. Bei der Proteolyse von Aggrecan durch Adams und Mmp entstehen spezifische Abbauprodukte, die mittels Western Blot nachgewiesen werden können. Dazu werden die Femurköpfe von drei Wochen alten Mäusen für drei Tage in Kultur genommen und anschließend die freigesetzten Aggrecan Neoepitope im Medium sowie im Knorpel analysiert (Stanton et al., 2011).

Beide Femurköpfe von drei Wochen alten Mäusen wurden in sterilem PBS präpariert und in einer 48-Well Platte in 400 µl DMEM/F12 Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Hälfte der Proben wurde zur Stimulation der Degradation mit 10 µM Retinsäure (RA) behandelt. Nach 72 h wurde das Medium abgenommen, die Femurköpfe in je 200 µl GuHCl Extraktions-Puffer gegeben und 48 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Extraktions-Puffer abgenommen und das verbliebene Gewebe O/N bei 60 °C in Papain-Verdau Lösung bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Medium, GuHCl-Extrakt und Papain-Verdau wurden bis zur weiteren Verwendung bei bei -20 °C gelagert.

Medium und GuHCl Extrakt wurden für 12 h bei 4 °C gegen das 500-fache Volumen Dialyse-Puffer dialysiert, wobei der Puffer einmal gewechselt wurde. Danach wurde die GAG-Konzentration mit Hilfe des Dimethylmethylenblau-Assays (siehe 2.5.2) bestimmt. Diese Werte wurden zur Normalisierung der Proben auf die Gesamt-GAGs verwendet.

Dazu wurden zuerst die Gesamt-GAGs in den einzelnen Proben durch die Addition der Werte des Mediums, des GuHCl-Extraktes und des Papain-Verdaus. Anschließend wurde von jeder Probe eine Gesamtmenge von 50 µg GAGs, verteilt auf Medium, GuHCl Extrakt und Verdau für die weitere Analyse verwendet (Stanton et al., 2011).

Zur Analyse per Western Blot wurden Medium und GuHCl Extrakt lyophilisiert und in je 50 µl Chondroitinase-Puffer mit 0,5 µl Protease Inhibitor Cocktail III aufgenommen. Danach wurde je 1 µl Chondroitinase ABC hinzu pipettiert und die Proben O/N bei 37 °C deglycosyliert. Die Proben wurden direkt per Western Blot analysiert (siehe 2.5.3 und 2.5.4).

2.5.2 Dimethylmethylenblau-Assay

Zur Bestimmung der GAG-Konzentration von Proben der Knorpel-Explant-Kulturen (Medium, GuHCl Extrakt und Papain Verdau) wurde der Dimethylmethylenblau (DMMB)-Assay durchgeführt (Stanton et al., 2011). Bei diesem Assay bindet der Farbstoff DMMB an die sulfatierten GAGs, wodurch sich sein Absorptionsmaximum verschiebt. Diese Verschiebung ist im Bereich zwischen 0,5 bis 5 µg sulfatierte GAGs/ml linear und kann fotometrisch detektiert werden.

Zur Durchführung wurden 40 µl der Proben in eine 96-Well Platte pipettiert. Um bei der Messung innerhalb des linearen Bereiches der Standardkurve zu bleiben wurde das Medium unverdünnt, der GuHCl Extrakt 1:1 und der Papain-Verdau 1:10 verdünnt verwendet. Als Standard wurden je 40 µl einer CS Standardlösung in Konzentrationen von 5 – 60 µg/ml verwendet (Endkonzentration nach Zugabe des DMMB: 1,3 µg/ml bis 8,28 µg/ml). Als Negativkontrolle wurde Medium bzw. Dialyse-Puffer verwendet. Zu allen Proben und Standards wurden 250 µl DMMB Stammlösung pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Dies wurde innerhalb von 10 min durchgeführt, bevor sich in der Lösung Präzipitate bildeten. Anschließend wurde die Konzentration der Proben anhand der Standardkurve berechnet. Falls die Konzentration der Proben außerhalb des linearen Bereiches lag, wurde erneut in einer anderen Verdünnung gemessen.

2.5.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Die in dieser Arbeit verwendeten Gele bestanden aus einem 5 % Acrylamid Sammelgel, in dem die Proben konzentriert und einem 8 % Trenngel, in dem die Proben nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden.

Die Proben wurden mit 4x SDS-Proben-Puffer versetzt (Endkonzentration 1x) und die Proteine der Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben neben einem Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in 1x Elektrophorese-Puffer erst bei einer Spannung von 8 V/cm Gel und nach Erreichen des Trenngels bei 15 V/cm Gel bei 4°C bis zur gewünschten Auftrennung der Proben laufen gelassen.

2.5.4 Western Blot

Für die Antikörper-Detektion der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran (Immobilion-FL Transfer Membrane, Millipore) transferiert. Dazu wurde die Membran kurz in MeOH aktiviert und in Transfer-Puffer gewaschen. Der Transfer auf die Membran wurde bei einer Spannung von 19 V und 4°C O/N durchgeführt. Anschließend wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und danach die unspezifischen Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blocking-Lösung (LI-COR Odyssey blocking buffer, 1:3 verdünnt in TBS) abgesättigt. Dann wurde der primäre Antikörper (Kaninchen α NITEGE oder Kaninchen α VDIPEN) 1:1000 verdünnt in Blocking-Lösung für 4 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschsritten in TBS wurden die Membranen für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (Esel α Kaninchen IRDye 680CW) 1:20.000 verdünnt in Blocking-Lösung inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet dabei spezifisch an den ersten Antikörper und ist zur Visualisierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach drei weiteren Waschsritten in TBS erfolgten Detektion und Quantifizierung der Banden mit Hilfe eines LI-COR Odyssey CLx Scanners mittels der Image Studio Software.

3 Ergebnisse

3.1 *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse sind trotz Veränderungen des Gelenkknorpels vor Arthrose geschützt

Der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mausstamm ist ein etabliertes Modellsystem für die humane autosomal dominante Erbkrankheit HMO und beruht auf einer am postnatalen Tag 8 (P8) induzierten, klonalen Deletion von *Ext1* in *Col2*-exprimierenden Chondrozyten. Neben der Entstehung von Osteochondromen sind in den Gelenken der Mäuse Läsionen im artikulären Knorpel vorhanden, welche in früheren Arbeiten als erstes Anzeichen von Arthrose (OA) gedeutet wurden (Piombo, 2010).

Um zu untersuchen, ob durch die veränderten Zellen in den Gelenken der Tiere OA entsteht, wurden die Knie drei Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäuse frontal geschnitten, mit Safranin Weigert gefärbt und histologisch analysiert (Abb. 3.1 A, B). Die Knochen Femur, Tibia und Patella, die femurale und tibiale Wachstumsfuge, die Kreuzbänder und die Menisci waren deutlich zu erkennen. Durch die frontale Schnittebene waren zudem alle vier Quadranten des Knies (mediale femurale Kondyle, laterale femurale Kondyle, mediales tibiales Plateau und laterales tibiales Plateau) gleichzeitig auswertbar, wie es zur Analyse von OA empfohlen wird (Glasson et al., 2010).

Im Vergleich zur Kontrolle waren bei der Mutante Osteochondrome erkennbar, die seitlich aus der Wachstumsfuge auswuchsen (Abb. 3.1 A, B). In dem hier gezeigten Beispiel liegen sowohl medial (links) als auch lateral (rechts) der femuralen Wachstumsfuge Tumore vor. Das mediale Osteochondrom zeigt eine für das Modellsystem und den humanen Phänotyp typische Morphologie. Es besteht aus einer Kappe aus Chondrozyten, die durch Safranin Weigert rot angefärbt und über einen kurzen, mit Spongiosa gefüllten Knochenschaft mit dem Femur verbunden ist. An dieser Stelle ist die Kortikalis des Femurs durchbrochen, wodurch die Spongiosa des Femurs und des Osteochondroms eine Einheit bilden. Beim lateralen Osteochondrom ist in der vorliegenden Schnittebene lediglich die Knorpelkappe sichtbar.

In der Detailansicht war bei der Kontrolle erkennbar, dass der Gelenkknorpel eine glatte Oberfläche besaß, alle Chondrozyten-Populationen vorhanden waren und eine typische Färbung mit Safranin Weigert vorlag. Der Gelenkknorpel war damit frei von degenerativen Veränderungen; es lag somit keine OA vor (Abb. 3.1 C). Im Vergleich dazu waren in der Mutante in allen Schichten des Gelenkknorpels Gruppen von teilweise stark vergrößerten Chondrozyten erkennbar (Abb. 3.1 D, Pfeile). Die Zellen innerhalb dieser Cluster und ihre perizelluläre Matrix waren intensiv mit Safranin Weigert gefärbt. Dies deutet auf ein erhöhtes PG-Level hin. Trotz der veränderten Zellen war die Oberfläche des

Gelenkknorpels jedoch frei von degenerativen Veränderungen wie Einrissen in den Knorpel oder Verlust der oberen Zellschichten. Nach den Kriterien des OARSI-Systems lag daher auch in der Mutante keine OA vor (siehe 2.3.4). Trotzdem ist es denkbar, dass die Mäuse im Alter aufgrund der geänderten Struktur des Knorpels mehr OA als die Kontrollen entwickeln

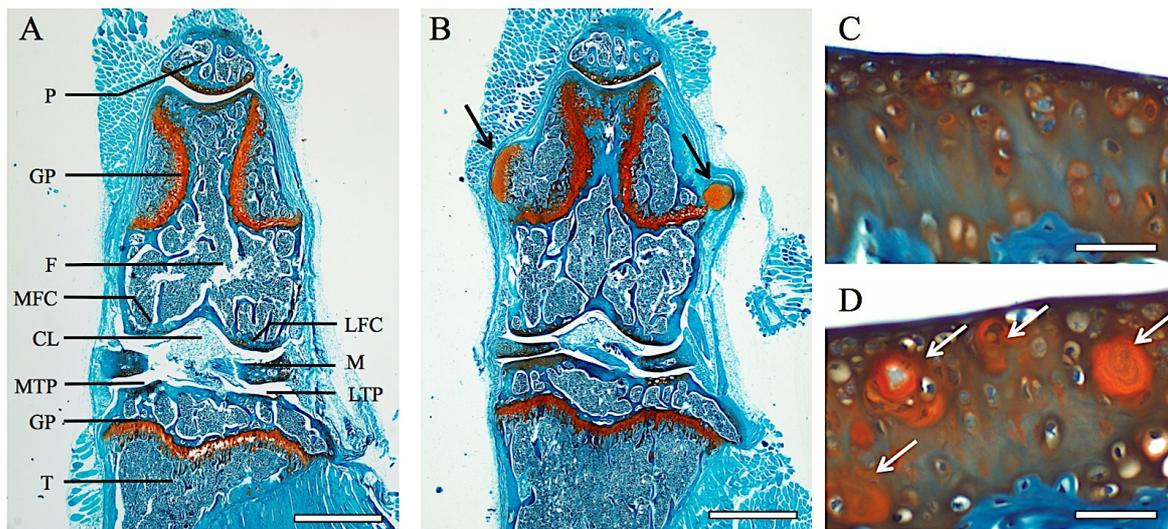


Abb. 3.1 Safranin Weigert Färbung von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäusen zeigt Osteochondrome und Klone vergrößerter Zellen im Gelenkknorpel. Safranin Weigert Färbung der rechten Knie drei Monate alter Mäuse. (A) Frontaler Schnitt durch das Kniegelenk einer *Ext1^{fl/fl}* Kontrolle. (B) Aus der Wachstumsfuge von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Tieren entstehen Osteochondrome (schwarze Pfeile). (D) Im Gelenkknorpel von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mutanten sind Cluster vergrößerter Zellen zu sehen (weiße Pfeile), die in Kontrollen nicht vorhanden sind (C). Abkürzungen: P: Patella, GP: Wachstumsfuge (*growth plate*), F: Femur, CL: Kreuzband, M: Meniskus, T: Tibia, MFC: mediale femurale Kondyle, MTP: mediales tibiales Plateau, LFC: laterale femurale Kondyle, LTP: laterales tibiales Plateau (A, B) Maßstabsbalken: 1mm, 25x Vergrößerung, (C, D) Maßstabsbalken 50 µm, 200x Vergrößerung.

3.1.1 Die Cluster im Gelenkknorpel von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen bestehen aus *Ext1*-defizienten Zellen

Das HMO Mausmodell der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse beruht darauf, dass die Deletion von *Ext1* durch eine geringe Dosis Doxycyclin und das verwendete Cre-Allel nur in einem geringen Prozentsatz der *Col2*-exprimierenden Chondrozyten induziert wird. Dadurch bestehen sowohl der Gelenkknorpel als auch die Wachstumsfuge der Mäuse aus einem Mosaik aus Wildtyp- und mutanten Zellen. Frühere Studien haben durch *in situ* Hybridisierungen und Laser-Mikrodissektions (LCM)-Experimente gezeigt, dass die frühen Stadien der Osteochondrome aus Chondrozyten bestehen, die ursprünglich aus der Wachstumsfuge stammen und homozygot für das invertierte *Ext1*-Allel sind. Die Klone im Gelenkknorpel wurden jedoch nicht analysiert (Jones et al., 2010; Piombo, 2010).

Um zu untersuchen, ob die veränderten Zellen im Gelenkknorpel analog zu den Osteochondromen der Wachstumsfuge aus *Ext1*-defizienten Zellen bestehen, wurde ein Reporter-Allel (*Rosa^{LacZ}*) in die Mauslinie eingebracht. Das *Rosa^{LacZ}*-Allel diente der Visualisierung der Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war. Zusätzlich wurde der Genotyp der Zellen durch LCM analysiert.

Der Gelenkknorpel sechs Wochen alter *Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Kontrolltiere und *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mutanten wurde zuerst histologisch analysiert (Abb. 3.2 A, B). In der Kontrolle waren weder vergrößerte Zellen noch die Expression des LacZ-Gens mittels β -Galaktosidase-Färbung sichtbar. Bei der Mutante waren die schon zuvor beobachteten atypischen Chondrozyten im Knorpel erkennbar. Dabei waren sowohl die vergrößerten Zellen im Inneren des Klones als auch einige der direkt an den Klon angrenzenden Chondrozyten blau gefärbt. Dies zeigt, dass die β -Galaktosidase in diesen Zellen exprimiert wurde. Das umliegende, histologisch unauffällige Gewebe zeigte keine β -Galaktosidase-Expression. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass wie erwartet in den Clustern der Mutante die Cre-Rekombinase aktiv war.

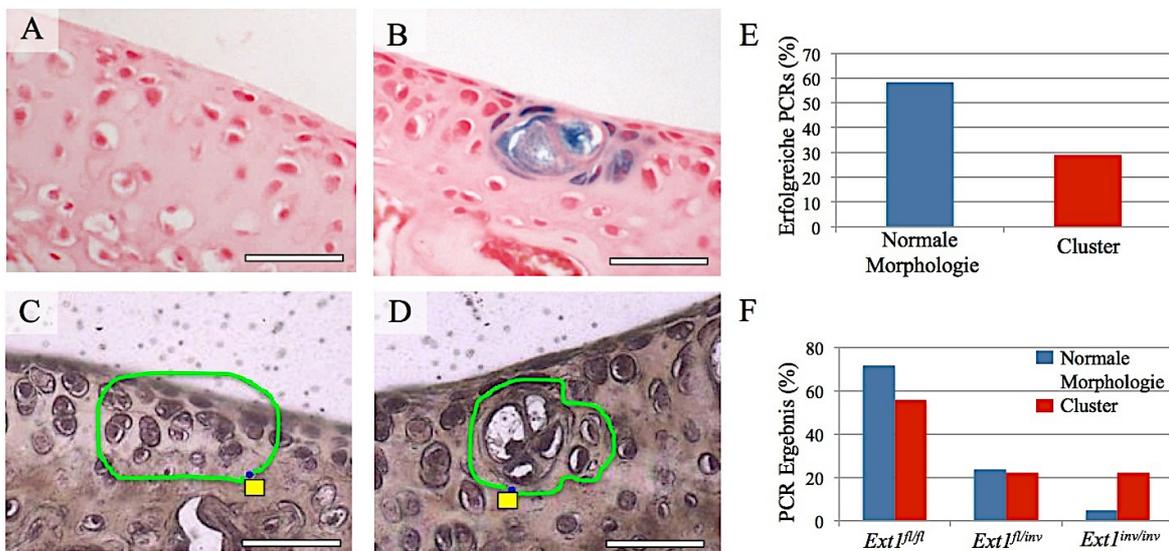


Abb. 3.2 β -Galaktosidase-Färbung und LCM von Clustern bestätigt den *Ext1^{inv/inv}* Genotyp.

(A, B) LacZ/Kernechtrot Färbung von Kniegelenken sechs Wochen alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäuse. (C-F) LCM Analyse drei Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse. Die Cluster im Gelenkknorpel zeigen eine blaue LacZ-Färbung (B), während in der Kontrolle (A) keine Färbung detektierbar ist. (C-F) Aus dem Gelenkknorpel wurden definierte Regionen (grüne Markierungen) mit normaler (C) oder veränderter Morphologie (D) mittels LCM isoliert und genotypisiert. (E) Prozentsatz der erfolgreichen PCRs in %. (F) Die Ergebnisse der erfolgreichen Genotypisierungs-PCRs. Maßstabsbalken 50 μ m, 200x Vergrößerung.

Um den Genotyp der Zellen genauer zu untersuchen, wurden LCM-Experimente an drei Monate alten *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäusen durchgeführt. Dies war notwendig, weil das Exon 2 des *Ext1^{fl/fl}* Allels von entgegengesetzt gerichteten LoxP-Sites flankiert ist und daher von der Cre-Rekombinase nicht ausgeschnitten, sondern invertiert wird.

Theoretisch wären daher trotz Cre-Aktivität drei verschiedene Genotypen für *Ext1* möglich: homozygot Wildtyp, wenn keine Rekombination stattgefunden hat oder das Exon zweifach invertiert wurde, heterozygot bei Inversion von nur einem Allel, oder homozygot mutant bei Inversion beider Allele.

Um dies zu überprüfen, wurden durch LCM insgesamt 36 morphologisch unauffällige Regionen und 31 Bereiche mit vergrößerten Zellen von Gewebeschnitten isoliert und mittels *nested*-PCR genotypisiert (Abb. 3.2 C-F). In Bereichen mit normaler Morphologie konnte aus 58 % der Proben und damit doppelt so häufig wie bei den Clustern (29 %) ein PCR Produkt amplifiziert werden.

Der Großteil (71 %) der Proben mit normaler Morphologie war homozygot für das Wildtyp-Allel (*Ext1^{fl/fl}*), 24 % waren heterozygot (*Ext1^{+/inv}*) und lediglich 5 % homozygot für das invertierte Allel (*Ext1^{inv/inv}*). Von Proben mit atypischer Morphologie waren 56 % homozygot Wildtyp und jeweils 22 % heterozygot oder homozygot für das mutante Allel. Insgesamt war damit der Anteil der als homozygot Wildtyp oder heterozygot genotypisierten Zellen bei den morphologisch veränderten Zellen geringer als bei dem umliegenden Gewebe, der Anteil der als homozygot mutant genotypisierten Zellen jedoch größer. Die als heterozygot oder homozygot für das Wildtyp-Allel genotypisierten Klone lassen sich vermutlich durch Ungenauigkeiten bei der Isolation der Zellen durch LCM erklären. Zusammengenommen deuten daher die Ergebnisse beider Methoden darauf hin, dass die Cluster im Gelenk aus *Ext1^{inv/inv}* Zellen bestehen und damit keine HS-Ketten produzieren können, während das sie umgebende Gewebe von Wildtyp-Zellen gebildet wird.

3.1.2 *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse sind vor spontaner Arthrose geschützt

Die *Ext1*-defizienten Cluster der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäuse wurden in einer vorangegangenen Arbeit aufgrund ihres vergrößerten Volumens als hypertrophe Chondrozyten und damit als ein frühes Anzeichen von OA interpretiert (Piombo, 2010). Im Alter von drei Monaten waren jedoch abgesehen von den Clustern keine histologischen Anzeichen von OA, wie Risse im Knorpel oder der Verlust von PGs detektierbar (siehe Abb. 3.1 C, D). Um zu untersuchen, wie sich die Cluster im Verlauf der Zeit entwickeln und ob die Cluster langfristig zur Entstehung von OA führen, wurde Knorpel der Altersstufen P13, sowie 3, 6, 12 und 18 Monate von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäusen und Kontrollen anhand von Gewebeschnitten analysiert (Abb. 3.3).

Histologisch waren bereits fünf Tage nach Induktion der Rekombination an P8 im Gelenkknorpel der Mutanten Cluster leicht vergrößerter Zellen erkennbar (Abb. 3.3 F, weißer Pfeil). Sie waren nur geringfügig größer als die umliegenden Zellen und ihre ECM war ähnlich intensiv gefärbt wie der restliche Knorpel. Bis zum Alter von drei Monaten vergrößerten sich die Chondrozyten innerhalb der Cluster stark, während die direkt angrenzenden Zellen eine abgeflachte Form annahmen. Beide Arten von Zellen zeigten die für die Cluster typische intensive Färbung mit Safranin Weigert. Interessanterweise blieb diese Morphologie in den weiteren Altersstufen gleich: die Größe, die Anzahl der Zellen, aus denen sie bestanden und die intensive Färbung schienen sich nicht zu ändern und waren auch im Alter von 18 Monaten noch erkennbar.

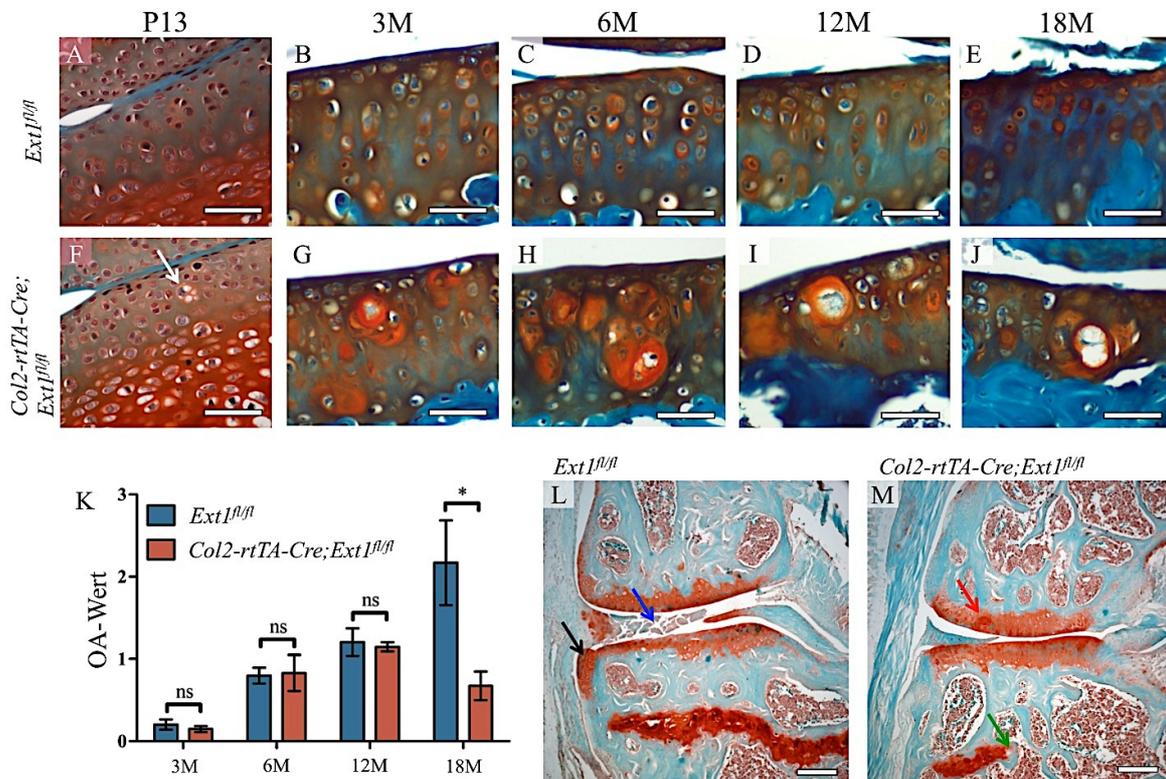


Abb. 3.3 *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse sind vor spontaner OA geschützt. Von Kniegelenken verschiedener Altersstufen wurden frontale Schnitte angefertigt, mit Safranin Weigert gefärbt und die OA Entwicklung mit Hilfe des OARSIS Scoring-Systems bestimmt. (D-M) Der Gelenkknorpel von Kontrollen (A-E) und Mutanten (F-J) wurde im Alter von P13 (A, F), drei Monaten (B, G), sechs Monaten (C, H), zwölf Monaten (D, I) und 18 Monaten (E, J) untersucht. (K) Statistische Auswertung des OA-Wertes der verschiedenen Altersstufen, $n \geq 3$, $*p < 0,05$. (F) Bereits fünf Tage nach der Induktion sind im Gelenkknorpel der Mutante Gruppen veränderter Zellen sichtbar (weißer Pfeil). (L) Im Alter von 18 Monaten zeigt das Knie der *Ext1^{fl/fl}* Kontroll-Maus Anzeichen von Arthrose: Osteophyten (schwarzer Pfeil), Schäden des Meniskus (blauer Pfeil) und Läsionen des Gelenkknorpels. (M) Im Gelenkknorpel der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mutante dagegen sind, abgesehen von den Clustern (roter Pfeil), keine pathologischen Veränderungen erkennbar. Zusätzlich zu den Clustern im Gelenk ist die Wachstumsfuge der Mutante geschlossen (grüner Pfeil) und das Trabekelvolumen vermindert. (A-J) Maßstabsbalken: 50 μ m, 200x Vergrößerung, (L, M) Maßstabsbalken: 200 μ m, 100x Vergrößerung.

Um die Entstehung von OA zu untersuchen, wurde ein semiquantitatives Scoring-System verwendet (Glasson et al., 2010). Das Erscheinungsbild des Gelenkknorpels wird bei diesem System anhand histologischer Kriterien evaluiert, wobei die Skala von 0 (gesunder Gelenkknorpel) bis 6 (vollständiger Verlust des Gelenkknorpels bis auf den subchondralen Knochen) reicht (siehe 2.3.4). Entgegen der Vermutung, dass die mutanten Mäuse spontane OA entwickeln, ließ sich bis zum Alter von 12 Monaten kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellen. Bei beiden Genotypen zeigte sich innerhalb eines Jahres lediglich ein altersbedingter, statistisch nicht signifikanter Anstieg des OA-Wertes von 0,2 bei drei Monaten über 0,8 bei 6 Monaten auf 1,1 bei zwölf Monaten. Im Alter von 18 Monaten dagegen war der OA-Wert der Kontrollen statistisch signifikant gegenüber den Mutanten erhöht (Kontrolle: 2,1; Mutante 0,7) (Abb. 3.3 K). Histologisch war dies daran zu erkennen, dass bei der Kontrolle die abgeflachten Chondrozyten der Knorpeloberfläche teilweise zerstört waren, wodurch die Gelenkoberfläche aufgeraut war. Zudem zeigte sich ein Verlust an PGs, erkennbar an einer verminderten Färbung mit Safranin Weigert (Abb. 3.3 E).

Neben der Degradation des Gelenkknorpels waren bei der Kontrolle noch weitere OA-Symptome zu erkennen, die nach den Kriterien des OARSI-Scores jedoch nicht in den OA-Wert eingehen: der Meniskus war fragmentiert, der subchondrale Knochen vermehrt gebildet und an der Seite der Gelenkfläche waren Osteophyten detektierbar (Abb. 3.3. L). Bei den Mutanten waren sowohl Knorpeloberfläche als auch der PG-Gehalt des Gelenkknorpel weniger stark verändert als bei der Kontrolle, der Meniskus war intakt und es lagen keine Osteophyten vor. (Abb. 3.3. J, M). Insgesamt entwickeln die *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl};Rosa^{LacZ}* Mäuse also trotz der Veränderungen des Gelenkknorpels weniger OA als die Kontrollen.

Zusätzlich zu den Veränderungen im Gelenkknorpel wurden in den 18 Monate alten Mutanten phänotypische Änderungen der Knochenstruktur detektiert. Die Wachstumsfuge des Femurs, visualisiert durch die Färbung mit Safranin Weigert, war in den Kontrollen durch den gesamten Querschnitt des Knochens vorhanden, während sie bei den Mutanten an manchen Stellen vollständig durchbrochen war (Abb. 3.3 M, grüner Pfeil). Zudem schien auch das Volumen des trabekulären Knochens vermindert zu sein. Um dies genauer zu untersuchen wurden die Wachstumsfuge und die Knochen trabekel in verschiedenen Altersstufen analysiert.

3.1.3 Die Höhe der Wachstumsfuge von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen ist vermindert

Um die Verminderung der Wachstumsfuge in 3, 6, 12 und 18 Monate alten Mäusen mit *Ext1^{fl/fl}* oder *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Genotyp zu quantifizieren, wurde anhand von Safranin Weigert gefärbten Schnitten die durchschnittliche Höhe der Wachstumsfuge mit dem Programm ImageJ gemessen. In der Wachstumsfuge der Kontrolle waren im Alter von drei Monaten kolumnare und hypertrophe Chondrozyten zu erkennen. Sie war im Mittelwert 130 μm dick. Dieser Wert stieg in sechs Monate alten Mäusen auf 174 μm , die Zellularität der Wachstumsfuge schien jedoch abzunehmen. Im Alter von 12 und 18 Monaten nahmen Zellularität und durchschnittliche Höhe der Wachstumsfuge ab (130 bzw. 112 μm). Insgesamt war jedoch in jeder Altersstufe die Wachstumsfuge durchgängig vorhanden und intensiv mit Safranin Weigert gefärbt (Abb. 3.4 A-D).

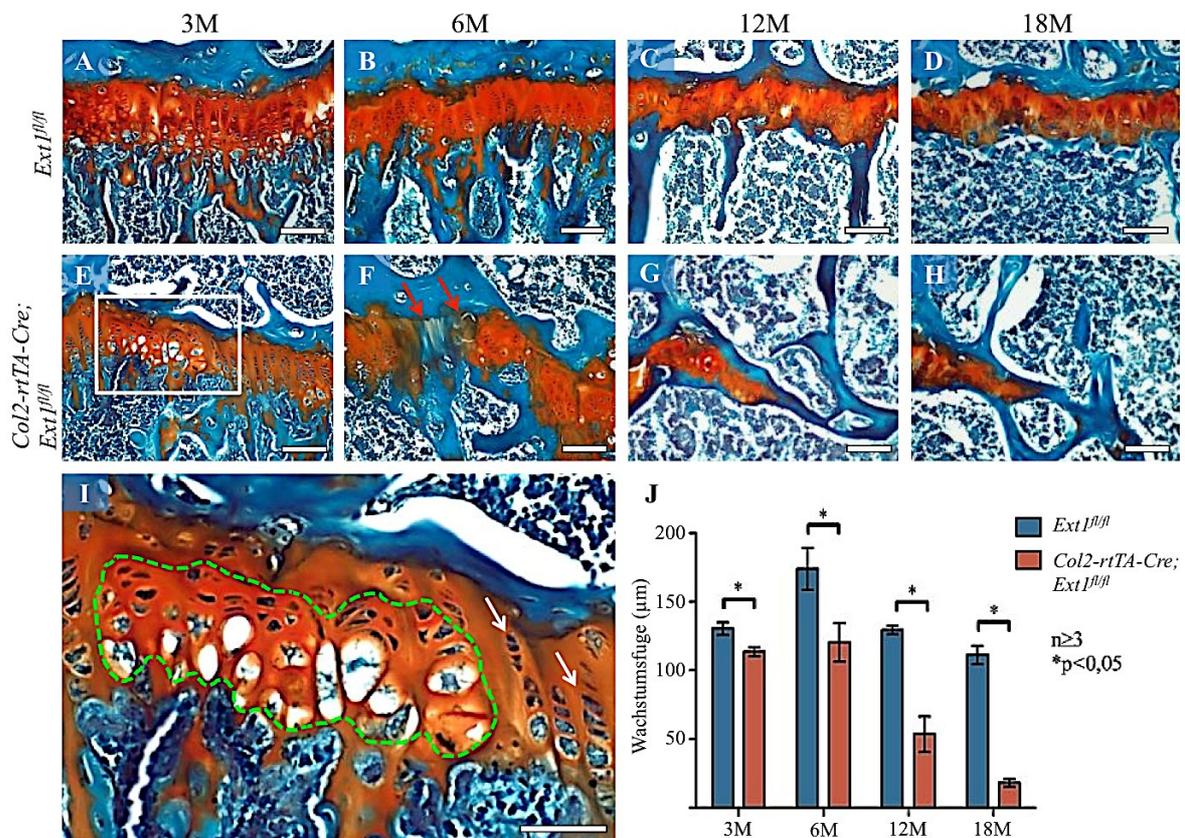


Abb. 3.4 Die Höhe der Wachstumsfuge von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen ist vermindert. Die durchschnittliche Höhe der femoralen Wachstumsfuge von Kontrollen (A-D) und *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mutanten (E-H) wurde anhand von Safranin Weigert gefärbten Gewebeschnitten in verschiedenen Altersstufen bestimmt. (A, E) 3 Monate, (B, F) 6 Monate, (C, G) 12 Monate, (D, H) 18 Monate. (I) Vergrößerung des Ausschnitts aus E. (J) Quantifizierung der Höhe der Wachstumsfuge mit ImageJ. Die Höhe der Wachstumsfuge der Mutanten ist im Vergleich zur Kontrolle in allen Altersstufen signifikant reduziert. (I) Im Alter von 3 Monaten sind innerhalb der Wachstumsfuge der Mutante Zellen mit veränderter Morphologie und Orientierung erkennbar (grüne Markierung), die sich neben normal geordnetem Säulenknorpel befinden (weiße Pfeile). Im Alter von 6 Monaten ist die Wachstumsfuge der Mutanten an manchen Stellen komplett durchbrochen (F, rote Pfeile). (A-H) Maßstabsbalken: 100 μm , Vergrößerung: 200x, (I), Maßstabsbalken 50 μm , Vergrößerung 200x.

Bei der Mutante dagegen waren im Alter von drei Monaten analog zum Gelenkknorpel atypische Klone von Zellen innerhalb der Wachstumsfuge vorhanden (Abb. 3.4 E, I, grüne Markierung). Die Orientierung der Zellen innerhalb der Klone schien gestört zu sein, während die Chondrozyten, die direkt an den Klon angrenzten, geordnete Säulen bildeten (Abb. 3.4 I, weiße Pfeile). Die Höhe der Wachstumsfuge war im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert von 130 auf 114 μm . Im Alter von 6 Monaten nahm die Zellzahl in gleichem Maße wie in der Kontrolle ab. Zusätzlich war jedoch die Wachstumsfuge an wenigen Stellen durchbrochen und ihre Höhe weiterhin vermindert (120 μm). Bei 12 und 18 Monaten verstärkte sich dieser Phänotyp und die Höhe der Wachstumsfuge verringerte sich auf 53 bzw. 18 μm (Kontrolle: 130 bzw. 112 μm).

Insgesamt führte die klonale Deletion von *Ext1* neben den schon bekannten Phänotypen der Osteochondrome und Gelenk-Läsionen damit zu einem progredienten Schluss der Wachstumsfuge. Eine mögliche Ursache könnten die Klone unorganisierter Zellen sein, die in der Wachstumsfuge drei Monate alter Mutanten detektiert wurden. Im nächsten Versuch wurde daher überprüft, ob diese Zellen aus HS-defizienten Chondrozyten bestehen.

3.1.4 Die Cluster in der Wachstumsfuge bestehen aus *Ext1*-defizienten Zellen

In der Wachstumsfuge drei Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse wurden Klone von Zellen mit veränderter Morphologie detektiert. Um den Genotyp dieser Zellen zu bestimmen, wurde von histologischen Schnitten drei Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse Gewebe mit normaler oder veränderter Morphologie durch LCM isoliert und mittels *nested* PCR genotypisiert (Abb. 3.5).

Insgesamt wurden 14 Gewebeproben mit normaler Morphologie analysiert. Bei 37 % der Proben (5 Proben) war die PCR nicht auswertbar. Bei den anderen neun Proben zeigte die PCR, dass sie passend zum Phänotyp homozygot für das Wildtyp-Allel waren. Anschließend wurden neun Klone mit atypischer Morphologie untersucht. Bei 44 % der Proben war kein PCR Produkt nachweisbar. Von den erfolgreichen genotypisierten Proben war keine homozygot für das Wildtyp-Allel, 17 % waren heterozygot und 83 % als homozygot für das mutante Allel. Der Vergleich der PCR Ergebnisse der Zellen mit normaler oder veränderter Morphologie zeigt deutlich, dass, analog zu den Clustern im Gelenkknorpel, die veränderten Klone der Wachstumsfuge aus *Ext1^{inv/inv}* Zellen bestehen und damit kein HS produzieren können.

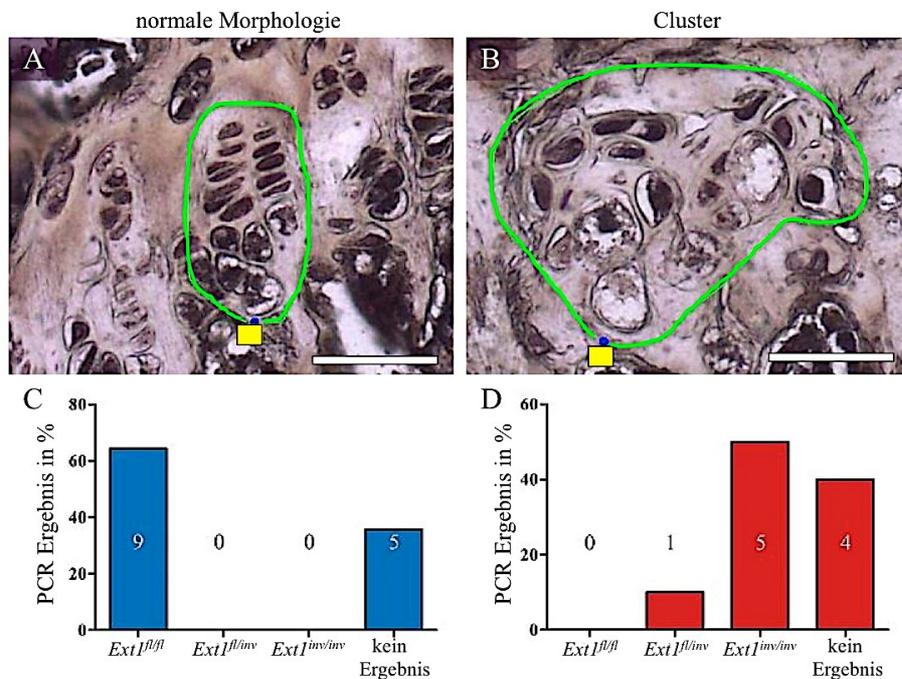


Abb. 3.5 LCM-Analyse der Wachstumsfuge von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen bestätigt *Ext1^{inv/inv}* Genotyp. LCM Analyse von normalen (A, C) und veränderten Regionen (B, D, grüne Markierungen) aus der femoralen Wachstumsfuge 3 Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse. (C, D) Ergebnis der Genotypisierung mittels *nested*-PCR. Während die Regionen mit normaler Morphologie homozygot für das flox-Allel sind (C), bestehen Cluster mit veränderter Morphologie aus Zellen, die homozygot für das invertierte Allel sind. Maßstabsbalken: 50 μ m, Vergrößerung: 200x.

3.1.5 Das Volumen der Knochentrabekel von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen ist vermindert

In vorherigen Experimenten wurde in 18 Monate alten *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen eine Verminderung des trabekulären Knochens detektiert. Um dies zu quantifizieren und festzustellen, ab welchem Zeitpunkt dieser Unterschied besteht, wurde das Volumen der Trabekel in 3, 6, 12 und 18 Monate alten Mäusen untersucht (Abb. 3.6). Während bei drei Monate alten Mäusen noch kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante erkennbar war (15,4 % bei der Kontrolle und 18,7 % bei der Mutante), bestand bei einem Alter von sechs Monaten eine signifikante Reduktion des Trabekelvolumens der Mutante von 17,6 % auf 4,8 %. Im weiteren Verlauf sank das Volumen beider Genotypen weiter auf 7,1 bei der Kontrolle und 1,3 % bei der Mutante. Bis zum Alter von 18 Monate blieben diese Werte in etwa gleich (Kontrolle: 9,1 %, Mutante 1,5 %) (Abb. 3.6 C).

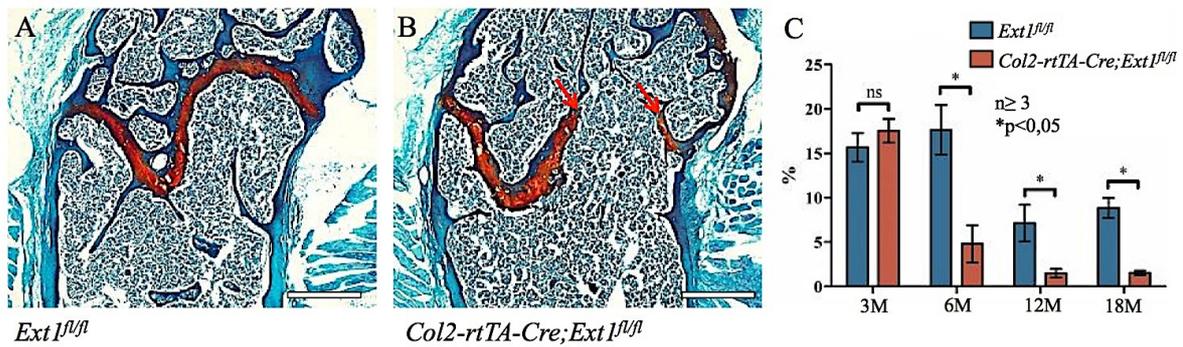


Abb. 3.6 Zwölf Monate alte *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse zeigen eine Verminderung der Knochen trabekel. Safranin Weigert Färbung von zwölf Monate alten Kontrollen (A) und *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mutanten (B). Die Anzahl der Knochen trabekel scheint vermindert zu sein. Gleichzeitig ist der schon zuvor detektierte Schluss der Wachstumsfuge sichtbar (rote Pfeile). (C) Statistische Auswertung Trabekelvolumen /Gesamtvolumen unterhalb der Wachstumsfuge mit ImageJ. Ab einem Alter von sechs Monaten ist das Trabekelvolumen der Mutanten signifikant reduziert. Maßstabsbalken: 1mm, Vergrößerung: 25x.

Da das Trabekelvolumen von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen ab einem Alter von sechs Monaten im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant vermindert war, wurden für eine detailliertere Analyse histologische Präparate dieser Altersstufe (vier Kontrollen und fünf Mutanten) mit Hilfe der Bioquant Software ausgewertet (Abb. 3.7). Dazu wurden mit einer Maske definierte Bereiche unterhalb der tibialen Wachstumsfuge möglichst zentral im Knochen ausgewählt (rote Markierung). Anschließend wurde, neben den Knochenparametern Trabekelvolumen (*bone volume*, BV) und Gesamtvolumen (*total volume*, TV), zusätzlich die Knochenoberfläche (*bone surface*, BS) gemessen. Aus diesen Werten wurde dann der Anteil des trabekulären Knochens am Gesamtvolumen (BV/TV), der Anteil der Knochenoberfläche am Gesamtvolumen (BS/TV), das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV), sowie Dicke, Anzahl und Abstand der Trabekel berechnet. Der BV/TV-Wert war im Mittelwert bei den Mutanten von 24,46 % auf 5,2 % signifikant reduziert. Dies deckt sich mit den zuvor durchgeführten Experimenten. Die Knochenoberfläche (BS/TV) war bei der Mutante ebenfalls vermindert. Mit einer Reduktion von 7,6 auf 2,12 % war diese Änderung zwar weniger stark als die des Knochenvolumens, allerdings trotzdem signifikant. Insgesamt lag in der Mutante also weniger trabekulärer Knochen vor.

Um nun die Form der Trabekel zu untersuchen, wurden der BS/BV-Wert und die Trabekeldicke bestimmt. Der BS/BV war bei den Mutanten mit 59,87 % fast doppelt so hoch wie bei der Kontrolle mit 35,74 %, woraus man ablesen könnte, dass die mutanten Trabekel unregelmäßiger geformt sind, allerdings war diese Änderung statistisch nicht signifikant. Auch die Dicke der Trabekel war ähnlich (49,96 % zu 40,79 %).

Das verminderte Knochenvolumen der Mutanten lässt sich durch eine verminderte Anzahl der Trabekel erklären: diese war bei der Mutante von 6,51 Trabekeln/mm auf 1,06 Trabekel/mm signifikant reduziert. Der Abstand zwischen den Trabekeln war dementsprechend von 0,17 auf 1,14 mm erhöht.

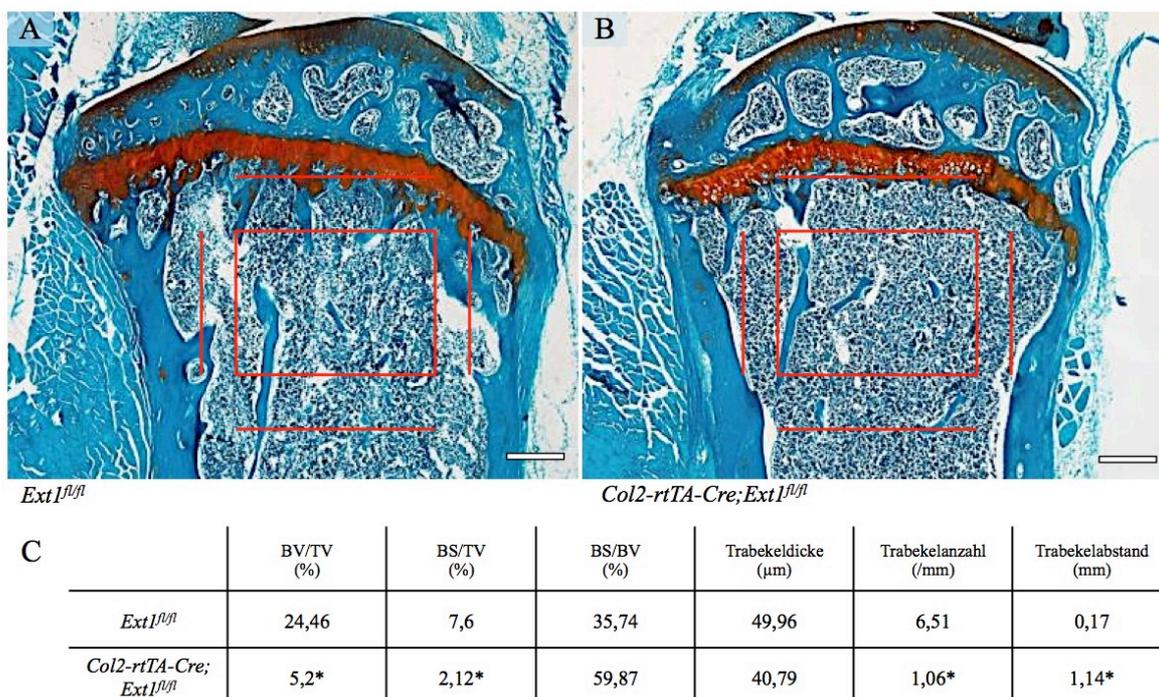


Abb. 3.7 *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse haben eine verminderte Trabekel-Anzahl. Gewebeschnitte der Tibia von sechs Monate alten Kontrollen (A) und *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen (B) wurden mit Safranin Weigert gefärbt und mit Hilfe der Bioquant Software analysiert (C). Tabelle C zeigt den Mittelwert von vier bzw. fünf Mäusen pro Genotyp. Alle Knochenparameter sind in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle vermindert, lediglich BS/BV und der Trabekelabstand sind erhöht. Statistische Auswertung mit Mann-Whitney Test, * $p < 0,05$. Maßstabsbalken: 250 μm, Vergrößerung: 50x.

3.1.6 Vermehrte Osteoklasten-Aktivität in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen

Um zu untersuchen, ob ein vermehrter Knochenabbau durch Osteoklasten der Grund für das verminderte Trabekelvolumen der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse war, wurden eine TRAP-Färbung auf Gewebeschnitten von Knien sechs Monate alter Mäuse durchgeführt (Abb. 3.8 A, B). Diese Färbung weist das Vorliegen der Tetracyclin-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) nach, welche spezifisch von Osteoklasten exprimiert wird. Wie bei der Messung des Trabekelvolumens mit der Bioquant Software, wurde unterhalb der tibialen Wachstumsfuge ein Bereich ausgewählt und analysiert. Für die statistische Auswertung wurde der Mittelwert der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Wie schon in den Versuchen zuvor, war auch bei dieser Auswertung das Trabekelvolumen der Mutanten signifikant auf 22 % des Kontrollwertes reduziert. Die TRAP-gefärbte Fläche war ebenfalls signifikant reduziert, jedoch nur auf 35,8 % der Kontrolle. Der Quotient von TRAP-positiver Fläche zur Trabekelfläche war tendenziell bei der Mutante erhöht. Daraus

kann geschlossen werden, dass das verminderte Knochenvolumen wahrscheinlich auf eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität zurückzuführen ist.

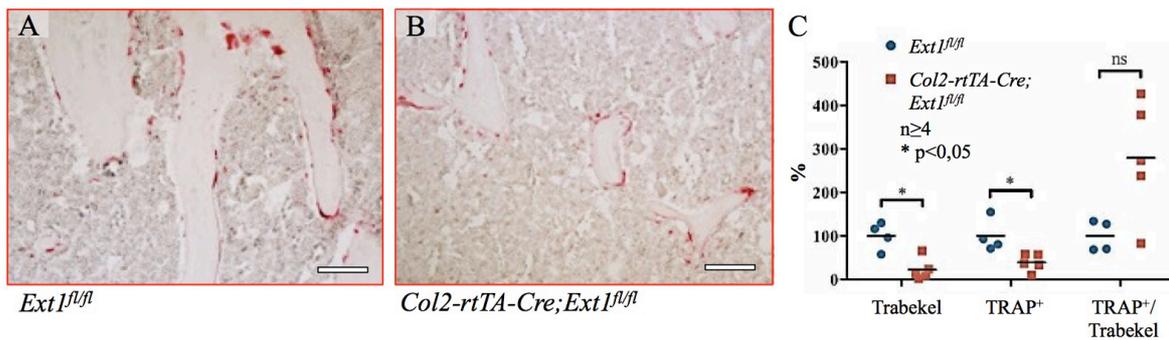


Abb. 3.8 Sechs Monate alte *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse haben eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität. TRAP Färbung von Gewebeschnitten der Tibia sechs Monate alter Kontrollen (A) und *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen (B). Von definierten Regionen (siehe Abb. 3.7) wurden Trabekelvolumen und TRAP-positive Fläche (rot) bestimmt und statistisch ausgewertet (C), wobei der Mittelwert der Kontrolle als 100 % festgelegt wurde. Das Trabekelvolumen und die TRAP-positive Fläche sind vermindert, während die TRAP-positive Fläche im Bezug zum Trabekelvolumen erhöht ist. Maßstabsbalken: 100 μ m, Vergrößerung: 100x.

3.2 Die klonale Deletion von *Ext1* ändert die Knorpelhomöostase und schützt vor Arthrose

Der Phänotyp der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse und die Tatsache, dass sie vor spontaner OA geschützt sind, führte zur Frage, welche Funktion HS bei der Entstehung von OA ausüben. Frühere Arbeiten haben bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HS und der Entstehung von OA geliefert. In diesen Arbeiten wurden unter anderem die Auswirkungen einer vermehrten Sulfatierung oder die Deletion von verschiedenen HS *core*-Proteinen untersucht, die Auswirkungen einer verminderten Synthese von HS wurden aber bisher noch nicht analysiert (Echtermeyer et al., 2009; Kaneko et al., 2013; Otsuki et al., 2008; Shu et al., 2015; Wang et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die Entstehung von OA in zwei verschiedenen Mausstämmen mit reduzierter HS-Synthese genauer untersucht. Dazu wurden neben dem zuvor beschriebenen Mausstamm, der eine klonale Deletion von *Ext1* trägt (*Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}*), zusätzlich eine Mauslinie mit einer verminderten *Ext1* Gendosis (*Ext1^{+/-}*) untersucht.

3.2.1 Etablierung der chirurgischen Induktion von Arthrose

Um innerhalb kurzer Zeit bei Mäusen OA hervorzurufen, wurde ein chirurgisches Modellsystem für OA etabliert. Bei der OP wurde jeweils das linke Knie der Maus durch eine Durchtrennung der Kreuzbänder und des Innenbandes destabilisiert, wodurch der Knorpel sukzessive zerstört wurde (Abb. 3.9). Beim rechten Knie wurde als Kontrolle nur eine Sham-OP durchgeführt (Abb. 3.9 A). Dazu wurde wie bei dem anderen Knie ein Hautschnitt durchgeführt, das Gelenk jedoch nicht destabilisiert.

Zur Etablierung der Methode wurden acht Wochen alte Wildtyp-Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6J operiert und die Kniegelenke zwei, vier, sechs und acht Wochen nach der OP histologisch analysiert (Abb. 3.9 D-G). Die frontalen Schnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und die Entstehung der OA mit Hilfe des OARSI Scoring-Systems quantifiziert. Dabei wurden zuerst alle vier Quadranten des Knies einzeln ausgewertet (MTP: mediales tibiales Plateau, MFC: mediale femurale Kondyle, LTP: laterales tibiales Plateau, LFC: laterale femurale Kondyle), und anschließend der Mittelwert über alle Quadranten gebildet (Abb. 3.9 B, C).

Während die sham-operierten Kontroll-Knie keine Anzeichen von Arthrose zeigten, war bei den destabilisierten Knien der Knorpel bereits zwei Wochen nach der OP an manchen Stellen des Knies vollständig zerstört (Abb. 3.9 D, rote Pfeile). In allen vier Quadranten des Knies lag ein OA-Wert von ca. 2,8 vor. Zwei Wochen später stieg der Wert medial leicht an (MTP: 3,2; MFC: 4,2), lateral war der Wert jedoch deutlich niedriger (LTP: 0,8; LFC: 1,4). Im Durchschnitt ergab sich damit mit 2,4 ein ähnlicher OA-Wert wie zwei Wochen nach der OP. Bei den Zeitpunkten sechs und acht Wochen nach der OP stieg der Wert für das gesamte Knie jeweils weiter an (3,3 und 3,7). Dieser Anstieg war in allen vier Quadranten des Knies sichtbar. In fast allen operierten Tieren lagen die OA-Werte der beiden medialen Quadranten höher als die der lateralen Seite. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass das Knie bei der OP von der medialen Seite aus geöffnet wird und so auf dieser Seite größere Beschädigungen verursacht wurden.

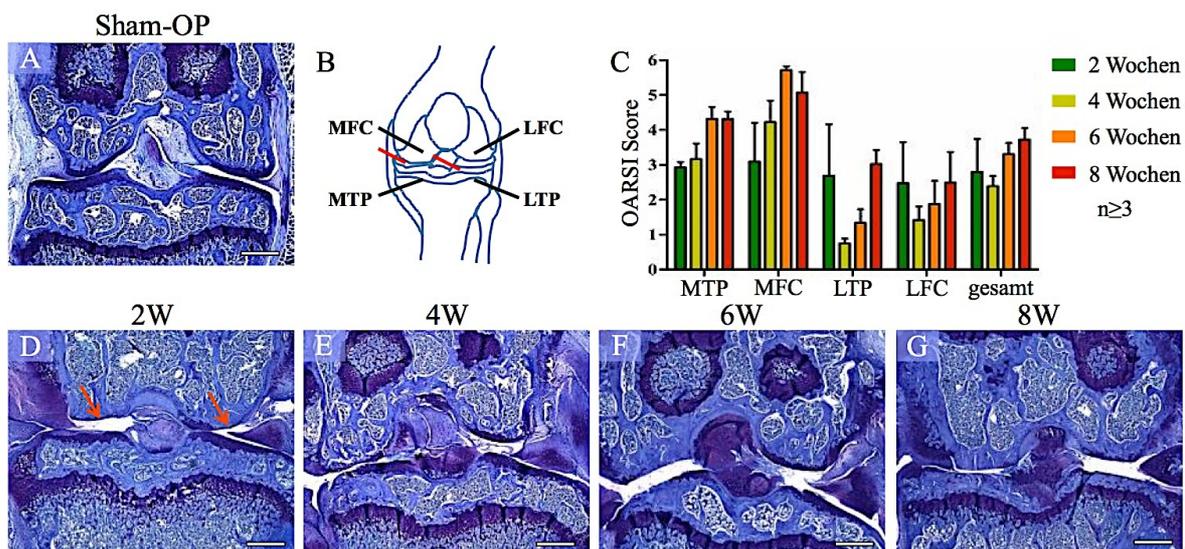


Abb. 3.9 Operative Induktion von OA im Kniegelenk. (A) Bei der Etablierung der chirurgischen Induktion von Arthrose in Wildtyp-Mäusen diente jeweils das linke Knie der Mäuse als Kontrolle. (B) Beim rechten Knie wurde das Ligamentum collaterale mediale sowie die beiden Ligamenta cruciata durchtrennt (rote Markierungen). Die Knie wurden zwei (D), vier (E), sechs (F) oder acht (G) Wochen nach der OP frontal geschnitten, mit Toluidinblau gefärbt und analysiert. (C) Die statistische Auswertung der Arthrose aller vier Quadranten des Knies (MTP: mediales tibiales Plateau, MFC: mediale femurale Kondyle, LTP: laterales tibiales Plateau, LFC: laterale femurale

Kondyle) sowie der durchschnittliche Wert zeigen tendenziell einen Anstieg des OA-Wertes im Verlauf der Zeit. Maßstabsbalken: 250 μm , Vergrößerung: 50x.

Insgesamt ließ sich durch die OP erfolgreich OA in Mäusen induzieren. Der Gelenkknorpel wurde sehr stark beschädigt und war an manchen Stellen bis auf den subchondralen Knochen erodiert. Für die folgenden Versuche wurde der Zeitpunkt von vier Wochen nach der OP verwendet, weil deutliche Anzeichen von OA sichtbar waren, aber noch verhältnismäßig viel Gelenkknorpel vorhanden war. Zudem war der Phänotyp weniger variabel als zwei Wochen nach der OP.

3.2.2 Induktion der klonalen Rekombination im Alter von sechs Wochen

Wie zuvor beschrieben entwickeln *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse, bei denen die Rekombination im Alter von acht Tagen induziert wurde, bis zu einem Alter von zwei Monaten bereits massive Tumore an den Seiten der Wachstumsfuge (Jones et al., 2010). Theoretisch könnten diese Tumore die Entstehung von OA nach der chirurgischen Induktion beeinflussen, z.B. indem sie die Beweglichkeit des Gelenks einschränken. Um dies zu vermeiden, sollte die klonale Rekombination möglichst kurz vor der OP induziert werden, so dass die entstehenden Osteochondrome relativ klein bleiben, aber lange genug vorher, um die Cluster im Gelenkknorpel zu erzeugen. Da die Klone fünf Tage nach der Induktion an P8 noch sehr klein waren und noch nicht ihre typische Morphologie zeigten (siehe Abb. 3.3), wurde als neuer Induktionszeitpunkt das Alter von 6 Wochen, also zwei Wochen vor der OP festgelegt.

Zu diesem Zeitpunkt wurden *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen verschiedene Mengen Doxycyclin (1, 5 und 20 $\mu\text{g/gbw}$) i.p. injiziert. Zwei Wochen später wurden die Kniegelenke histologisch auf das Vorhandensein von Clustern im Gelenkknorpel untersucht. Unabhängig von der injizierten Menge Doxycyclin waren bei allen untersuchten Proben atypische Zellen im Gelenkknorpel zu detektieren, die sich weder in Anzahl noch Größe unterschieden (Abb. 3.10 A-C). Zusätzlich wurden 10 Wochen nach der Induktion Anzahl und Größe der detektierten Osteochondrome ausgewertet. Während bei der Anzahl der Tumore kein Unterschied vorlag, zeigte die Menge des injizierten Doxycyclins eine positive Korrelation mit der Größe der Osteochondrome (Abb. 3.10 D-F). Nach den Ergebnissen dieses Versuchs wurde daher die klonale Rekombination für die OP Versuche durch die Gabe von 1 $\mu\text{g/gbw}$ im Alter von sechs Wochen durchgeführt.

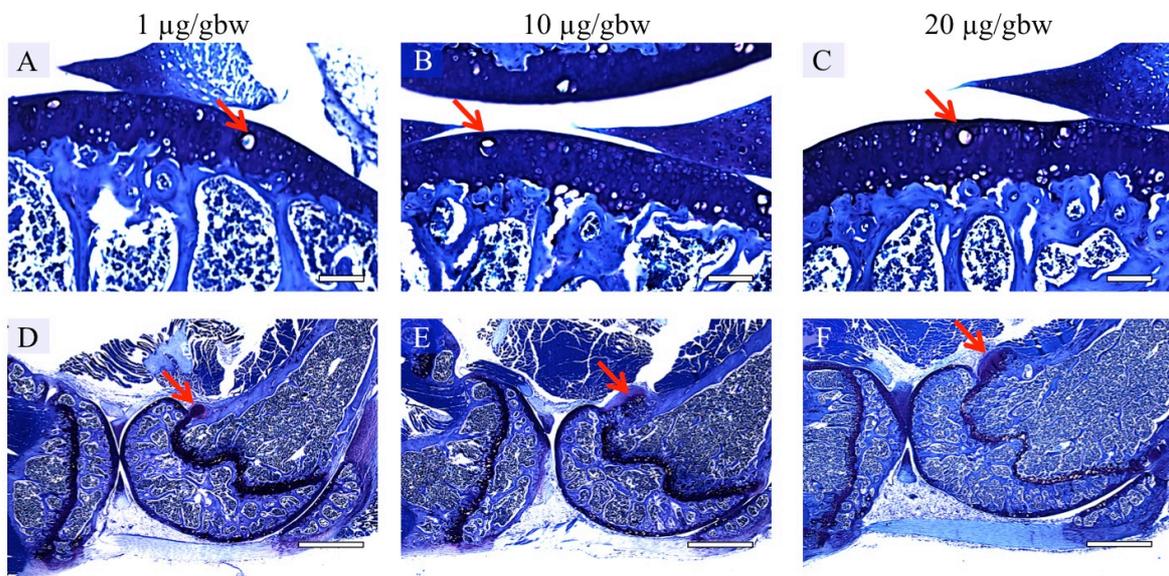


Abb. 3.10 Etablierung der Doxycyclin-Menge zur Induktion der Rekombination in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen. Sechs Wochen alten Mäusen wurden 1,10 oder 20 µg/gbw Doxycyclin i.p. injiziert. Zwei Wochen (A-C) oder zehn Wochen später (D-F) wurden histologische Schnitte mit Toluidinblau gefärbt. Bei allen Konzentrationen sind Cluster im Gelenk detektierbar (A-C rote Pfeile). Zusätzlich sind Osteochondrome zu erkennen (D-F, rote Pfeile). (A-C) Maßstabsbalken: 100 µm, 100x Vergrößerung, (D-F) Maßstabsbalken 1mm, 25x Vergrößerung.

3.2.3 Die klonale Deletion von *Ext1* schützt vor induzierter Arthrose

Bei zwei Monate alten *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* und *Ext^{+/inv}* Mäusen wurde chirurgisch die Entstehung von OA induziert. Dazu wurde jeweils das linke Kniegelenke durch die Durchtrennung der Kreuzbänder destabilisiert, während bei dem rechten Knie lediglich eine Sham-OP durchgeführt wurde. Vier Wochen nach der OP wurden die Knie histologisch analysiert und der Grad der OA mit Hilfe des OARSI Scoring-Systems ausgewertet (Abb. 3.11). Bei der statistischen Auswertung wurde jeweils der Mittelwert des OA-Wertes der Kontrollen auf 100 % festgelegt, um eventuelle biologische Unterschiede zwischen den Würfen auszugleichen. Alle anderen OA-Werte wurden im Verhältnis zu diesem Wert berechnet.

Vier Wochen nach der OP hatten sowohl Kontrollen als auch *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse OA entwickelt. Der OA-Wert lag bei den Mutanten medial, lateral und auf das gesamte Knie bezogen unter dem der Kontrolle (medial: 113 zu 69 %, lateral: 87 zu 79 % und gesamt: 100 zu 90 %). Dieser Unterschied war für den medialen Teil des Knies und das gesamte Knie statistisch signifikant, während lateral lediglich derselbe Trend bestand. Die Werte der sham-operierten Knie lagen sowohl bei den Mutanten als auch bei den Kontrollen im Mittelwert zwischen 3 und 6 % des Wildtyp-OP-Mittelwertes (Abb. 3.11 A). Es lag demnach keine OA vor. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der zuvor durchgeführten histologischen Analyse der Kontrollen und Mutanten, bei denen im Alter von drei Monaten bei den Mutanten ebenfalls keine OA vorlag (siehe Abb. 3.3 C).

Bei der Analyse der *Ext1*-heterozygoten Mäuse ließ sich kein offensichtlicher Unterschied zwischen der Kontrolle und der Mutante feststellen, weder bei der OP noch bei der Sham-OP (Abb. 3.11 B, D). Nach der OP lag der OA-Wert medial bei der Kontrolle bei 122 % und bei der Mutante bei 128 %, lateral bei 78 bzw. 79 % und im Gesamtwert bei 100 zu 104 %. Nach der Sham-OP waren keine Anzeichen von OA zu erkennen, alle Werte lagen zwischen 4 und 10 %. Zusammengefasst bestätigen diese Versuche die Beobachtung, dass die klonale Deletion von HS in einem kleinen Prozentsatz von Chondrozyten vor OA schützt; eine Verminderung der *Ext1* Gendosis im gesamten Gewebe führte jedoch nicht zu einem detektierbaren Unterschied.

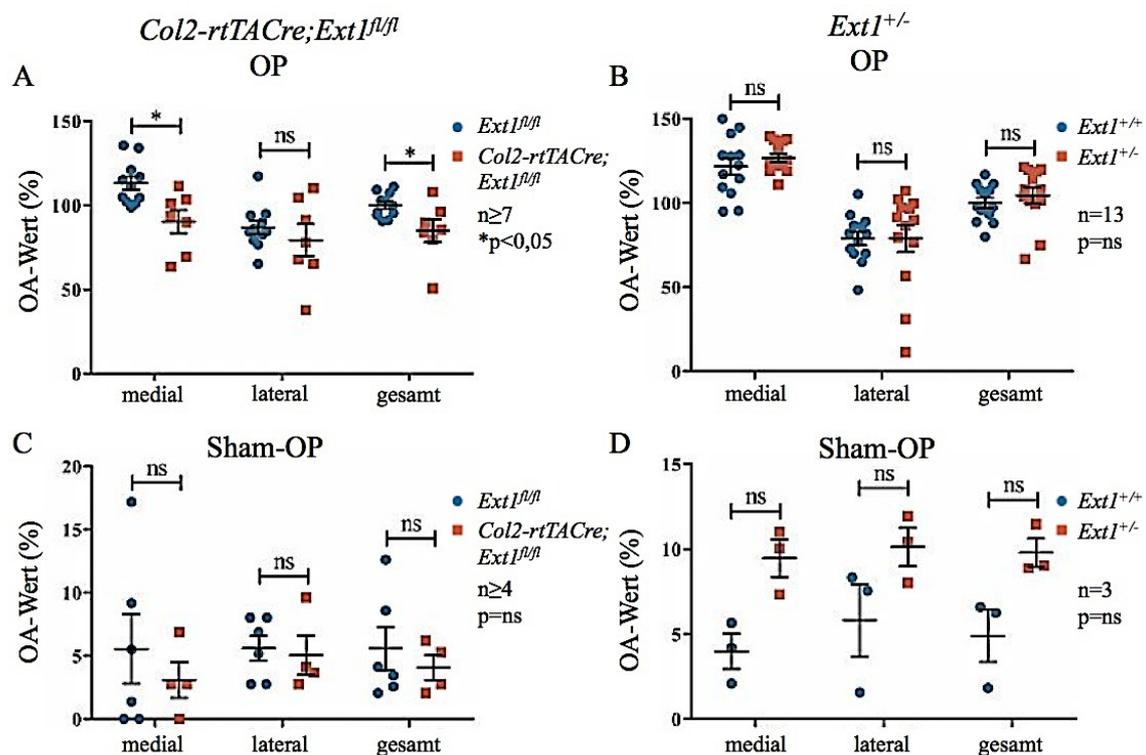


Abb. 3.11 Die klonale Deletion von *Ext1* schützt vor induzierter OA. (A) *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse zeigen einen niedrigeren OA-Wert als die Kontroll-Tiere nach chirurgischer Induktion von OA. (C) *Ext1*-heterozygote Mäuse zeigen keinen Unterschied zur Kontrolle. (B,D) Die sham-operierten Knie zeigen keine OA, weder bei den Mutanten noch bei den Kontrollen. Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

3.2.4 Die *Ext1*-defiziente Zellen im Gelenkknorpel ähneln Chondrozyten der Radiärzone

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass das Vorliegen *Ext1*-defizienter Klone entgegen früherer Erwartungen vor der Entstehung spontaner und induzierter OA schützt. Diese Annahmen beruhten auf der Beobachtung, dass die *Ext1*-defizienten Cluster aus deutlich vergrößerten Zellen bestehen. Die Cluster wurden daher als hypertrophe Chondrozyten interpretiert, die ein Anzeichen für OA darstellen. Um diesen Widerspruch

aufzuklären, wurden die Cluster immunhistochemisch und histologischen näher charakterisiert.

Zuerst wurde in Kooperation mit dem Institut für experimentelle Neonatologie der Universität Köln immunhistochemisch überprüft, ob in den Klonen Col X, ein Marker für hypertrophe Chondrozyten vorliegt (Abb. 3.12). Im Hellfeld sind die Klone anhand ihrer Morphologie deutlich erkennbar, ebenso die Wachstumsfuge. Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass Col X in *Ext1*-defizienten Clustern im Gelenk nicht nachweisbar war. Die hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge waren jedoch positiv für Col X. Dies bedeutet, dass der Nachweis an sich erfolgreich war. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse daher, dass die Zellen der Cluster trotz ihrer Größe keine typischen hypertrophen Chondrozyten sind, wie sie in der Wachstumsfuge vorliegen.

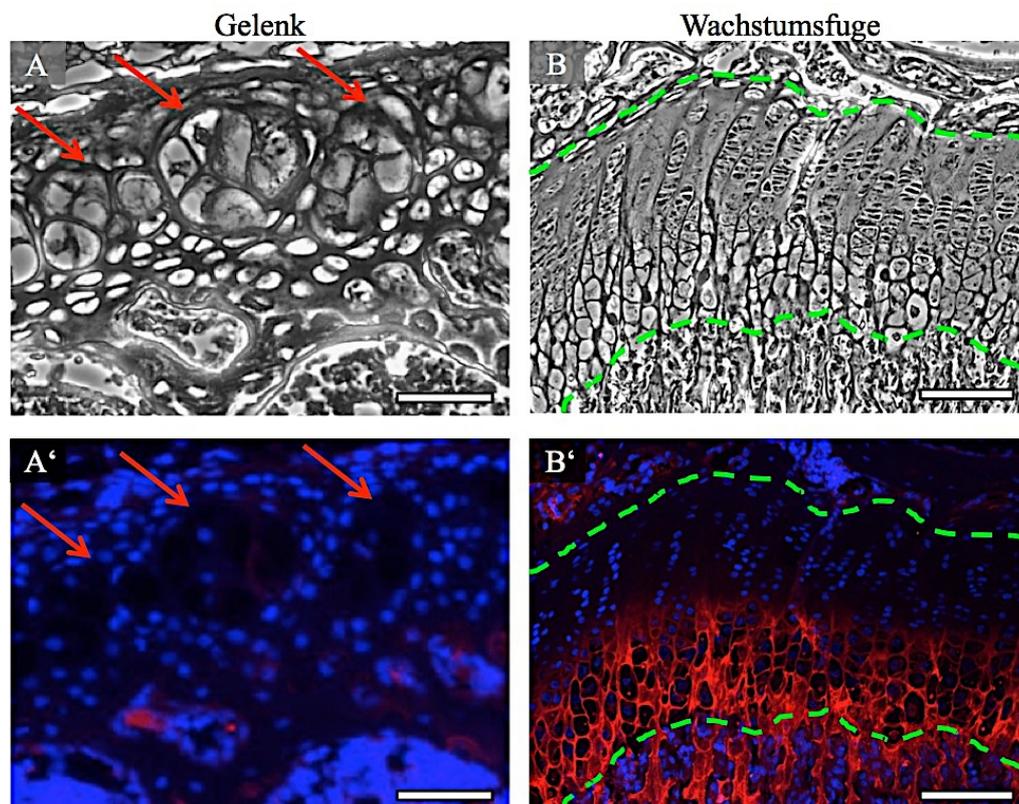


Abb. 3.12 Die *Ext1*-defizienten Cluster im Gelenk exprimieren kein Col X. Immunfluoreszenznachweis von Col X in Gelenkknorpels (A, A') und Wachstumsfuge (B, B') vier Wochen alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse. (A, B) Hellfeld, (A', B') Immunfluoreszenz Aufnahme; blau: DAPI, rot: Col X. Die *Ext1*-negativen Klone im Gelenkknorpel sind negativ für Col X (A, A', rote Pfeile). (B, B') Die hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimieren Col X. Die grünen markieren die Grenzen der Wachstumsfuge. (A, A') Maßstabsbalken: 50 μm , 200x Vergrößerung, (B, B') Maßstabsbalken: 100 μm , 100x Vergrößerung.

Um den Phänotyp der Zellen anschließend näher einzugrenzen, wurden in Kooperation mit dem Imaging Center Essen Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,5 µm hergestellt und mit Toluidinblau gefärbt. Durch die dünnere Schnittdicke sind mehr morphologische Details erkennbar als bei den zuvor verwendeten 7 µm Paraffinschnitten. Es wurden die Femurköpfe von vier Wochen alten Kontrollen und Mutanten verwendet, da sie im Gegensatz zu ganzen Kniegelenken nur aus Knorpel Gelenkknorpel, Blasenknorpel und Wachstumsfuge bestehen. Damit ist gewährleistet, dass in den histologischen Präparaten keine kalzifizierten Bereiche enthalten sind, die mit dieser Methode nicht geschnitten werden können (Abb. 3.13).

Auf Abb. 3.13 D ist der Gelenkknorpel einer Kontrolle abgebildet. Die abgeflachten Chondrozyten der Tangentialfaserzone und die darunterliegenden runderen Zellen der Übergangs- und Radiärzone sind deutlich zu sehen. Die Tidemark ist als dunkelblau gefärbte Linie erkennbar. In der Wachstumsfuge der Kontrolle sind Chondrozyten in allen Stadien von distalen bis zu terminal hypertrophen Zellen vorhanden. Die Zellen vergrößern im Verlauf der hypertrophen Differenzierung drastisch ihr Volumen (Abb. 3.13 E).

Abb. 3.13 F zeigt den Gelenkknorpel und den darunterliegenden Blasenknorpel einer *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Maus. Auffälligstes Merkmal der atypischen Zellen (roter Pfeil) ist ein großer Anteil von nicht- bis hell angefärbtem Zytoplasma. Der Nucleus der Zellen ist annähernd rund und von ER umgeben. Im direkten Vergleich mit der Wachstumsfuge wird deutlich, dass die mutanten Zellen des Gelenkknorpels die hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge an Größe (grüner Stern) deutlich übertreffen. Zusätzlich scheint das Zytoplasma der Zellen anders strukturiert zu sein. Die beiden Zelltypen ähnelten sich daher entgegen früherer Annahmen morphologisch nur wenig. Dies bestätigt das Ergebnis der zuvor durchgeführten Col X Färbung, dass die Cluster keine typischen hypertrophen Chondrozyten sind.

Insgesamt kommen die HS-defizienten Klone eher dem Erscheinungsbild von Chondrozyten der Radiärzone im Wildtyp nahe (Abb. 3.13 D, grüner Pfeil). Auch diese Zellen hatten ein großes Volumen von Zytoplasma und eine vergleichbare Größe wie die mutanten Klone. Anders als die mutanten Zellen waren sie jedoch nicht in Gruppen von mehreren Zellen angeordnet. Zudem beschränkt sich ihre Position auf die tiefe Zone nahe der Tidemark, während die mutanten Zellen bis an die Tangentialzone heranreichten.

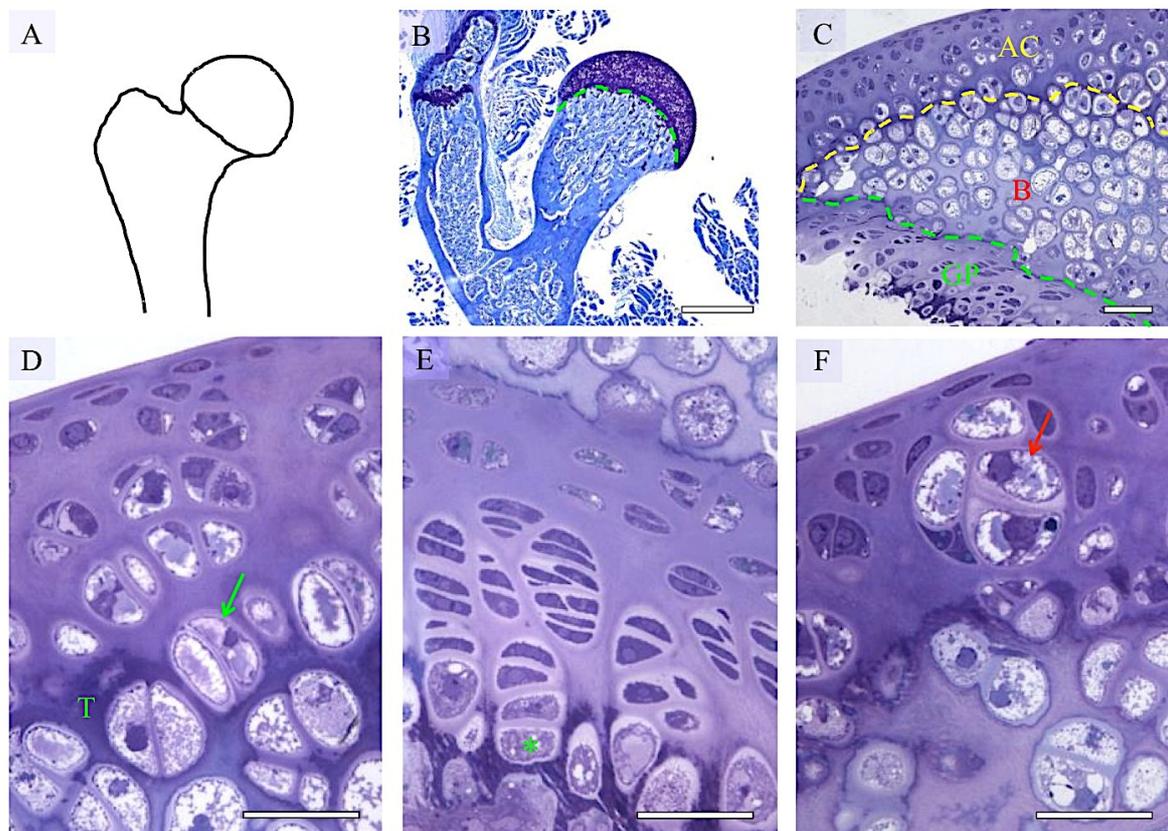


Abb. 3.13 Die *Ext1*-defizienten Klone im Gelenkknorpel der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse ähneln Chondrozyten der Radiärzone. Die Femurköpfe vier Wochen alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* und Kontroll-Mäuse wurden in Plastik eingebettet, Semidünnschnitte (0,5 μm) angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. (A) Schematische Darstellung des Femurkopfes. (B) Die Grenze des Femurkopfes zum Knochen grün markiert. (C) Im Alter von vier Wochen besteht der Femurkopf nur aus Gelenkknorpel (AC, gelbe Markierung), Blasenknorpel (B) und Wachstumsfuge (GP, rote Markierung). Im Gelenkknorpel (D) und in der Wachstumsfuge der Kontrolle (E) sind verschiedene Zellschichten erkennbar. Im Gelenkknorpel ist die Tidemark (T) gut erkennbar. Die Zellen des Clusters im Gelenkknorpel der Mutante (F, roter Pfeil) ähneln morphologisch mehr den Zellen der Radiärzone des Wildtyp-Gelenkknorpels (D, grüner Pfeil) und nicht den hypertrophen Zellen der Wachstumsfuge (E, grüner Stern). (B) Maßstabsbalken: 200 μm , 100x Vergrößerung. (C-E) Maßstabsbalken: 50 μm , 400x Vergrößerung.

3.2.5 Veränderte Balance zwischen Auf- und Abbau der Knorpel-ECM in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen

Eines der Hauptmerkmale von OA ist eine gestörte Balance zwischen der Synthese und der Degradation von ECM. Die verstärkte Färbung der *Ext1*-defizienten Zellen mit Safranin O deutet darauf hin, dass diese Balance in den Klonen in Richtung Knorpel-Aufbau verändert ist. Dies könnte eine mögliche Ursache für den beobachteten Schutz der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse vor OA darstellen. Das vermehrte Vorliegen von ECM-Komponenten kann entweder durch eine verstärkte Synthese und/oder durch eine verminderte Degradation durch Proteasen verursacht werden. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten immunhistochemisch die Level verschiedener ECM-Komponenten und proteinbiochemisch die Degradation von Aggrecan untersucht.

3.2.5.1 Verstärkte Level von Matrix-Komponenten in *Ext1*-defizienten Zellen

Zuerst wurde die Zusammensetzung der ECM der *Ext1*-defizienten Zellen in Kooperation mit dem Institut für experimentelle Neonatologie der Universität Köln analysiert. Dazu wurden immunhistochemische Analysen für zehn verschiedene ECM-Komponenten an Kniegelenken zwei Monate alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen durchgeführt (Abb. 3.14). Zwei der untersuchten Proteine – COMP und Matrilin-1 – waren sowohl in den Clustern als auch im umliegenden Wildtyp-Gewebe in ähnlichen Mengen detektierbar (Matrilin 1 nicht gezeigt). Die Analysen für das Glycoprotein Fibronectin waren nicht eindeutig (nicht gezeigt). Bei den sieben anderen untersuchten Proteinen – Aggrecan, Perlecan, Matrilin-3 (Matn-3), Matrilin-4 (Matn-4), sowie den Kollagenen II, IX, X und XII - waren Änderungen der Proteinlevel im Vergleich mit dem umliegenden Gewebe erkennbar.

Von diesen sieben Proteinen waren im Wildtyp-Knorpel, der die Klone umgibt, Matn-3, Col II, Col XII, Aggrecan, Perlecan und Matn-4 nachweisbar. Col IX und Col X konnten nicht detektiert werden. Im Verhältnis zum Wildtyp-Gewebe waren in der perizellulären Matrix der atypischen Klone die Level von Aggrecan, Perlecan, Matn-4 und Col IX deutlich erhöht. Auch Matn-3 und Col II lagen in den Klonen verstärkt vor, jedoch war der Unterschied hier schwächer ausgeprägt. Die Level für Col XII, einem Marker für Gelenknorpel, waren von den analysierten Proteinen als einzige in den Klonen deutlich reduziert. Insgesamt zeigen diese Versuche jedoch, dass zahlreiche strukturelle Komponenten der ECM verstärkt vorliegen. Gleichzeitig ist die Zusammensetzung ist jedoch anders als die Wildtyp-ECM, da manche Komponenten unterschiedlich stark verändert sind. Beides könnte zum Schutz der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse vor der Entstehung von OA beitragen.

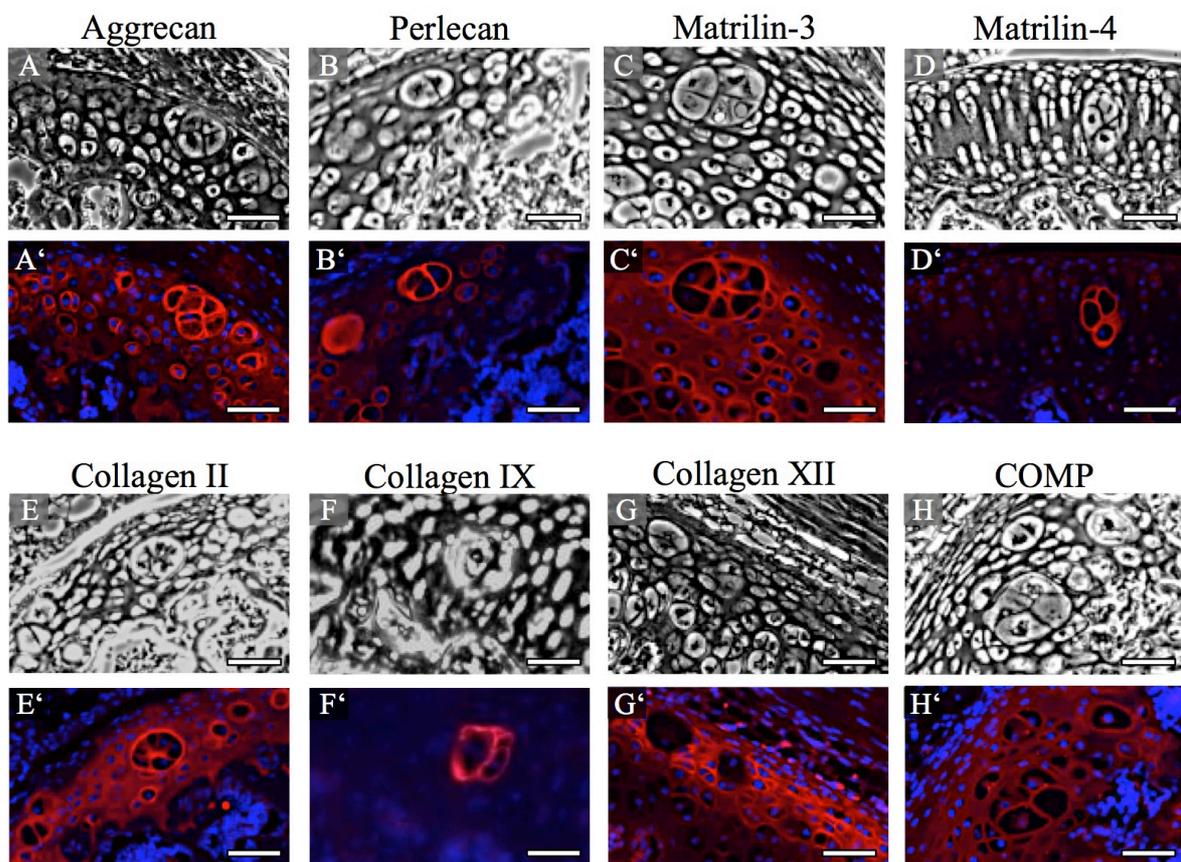


Abb. 3.14 Die perizelluläre Matrix der *Ext1*-defizienten Zellen in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen ist verändert. Die Zusammensetzung der ECM der *Ext1*-defizienten Cluster von vier Wochen alten *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen wurde durch Immunfluoreszenz-Analysen auf Gewebeschnitten von Knien untersucht. Die Gelenk-Cluster wurden im Hellfeld lokalisiert (A-H) und anschließend die verschiedenen Antikörper-Färbungen fotografiert (A'-H', blau: DAPI, rot: Antikörperfärbung). Aggrecan (A'), Perlecan (B'), Matrilin-4 (D') und Col IX (F') sind in der perizellulären Matrix der Gelenk-Cluster deutlich stärker exprimiert als im umliegenden Gewebe. Die Level von Matn-3 (C') und Col II (E') sind nur geringfügig stärker als in der ECM der umgebenden Zellen. (G') Die Wildtyp-Zelllen produzieren Col XII, die Cluster sind jedoch Col XII-negativ. (H') COMP ist sowohl in den Wildtyp-Zellen als auch in den Clustern in gleichen Mengen vorhanden. Maßstabsbalken: 50 μ m, 200x Vergrößerung.

3.2.5.2 Veränderte Aggrecan-Degradation in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen

Die Beobachtung, dass neben Aggrecan zahlreiche ECM-Komponenten in den *Ext1*-defizienten Clustern verstärkt nachweisbar sind, könnte durch eine vermehrte Expression oder eine verminderte Degradation durch Proteasen erklärt werden. Da die Degradation von Aggrecan eines der Hauptmerkmale von OA ist, könnte eine verminderte Protease-Aktivität gleichzeitig erklären, warum die *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse vor OA geschützt sind. Um dies zu untersuchen wurde die Menge von Aggrecan-Degradationsprodukten in Wildtyp und mutantern Knorpel mit Hilfe von Knorpel-Explant-Kulturen analysiert.

Die Degradation von Aggrecan durch Proteasen der Mmp- und Adamts-Familien erfolgt an spezifischen Schnittstellen. Die generierten Neo-Epitope können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden (Mmp: VDIPEN; Adamts: NITEGE). Dazu wurden die Femurköpfe drei Wochen alter Mäuse für drei Tage in Zellkultur-Medium kultiviert. Von jeder Maus wurde einer der Femurköpfe zur Stimulation des Knorpelabbaus mit 10 μ M Retinsäure (RA) behandelt, der andere diente als Kontrolle. Das Medium wurde abgenommen und die GAGs aus den Femurköpfen durch einen GuHCl-Extraktionspuffer extrahiert. Das verbleibende Knorpelgewebe wurde zusätzlich proteolytisch verdaut. Anschließend wurde die Menge der GAGs in Medium, GuHCl-Extrakt und Verdau bestimmt. Die Menge GAGs, die für die Analyse per Western Blot eingesetzt wurde, wurde jeweils auf die Gesamtmenge GAGs der Probe normalisiert (siehe 2.5.1). Das Medium und der GuHCl Extrakt von mindestens drei Mäusen gleichen Genotyps wurde zu einer Probe vereinigt (Abb. 3.15).

In den unbehandelten Proben waren weder bei den Kontrollen noch bei den Mutanten Mmp-spezifische Degradationsprodukte nachweisbar (nicht gezeigt). Nach der Stimulation mit RA waren jedoch sowohl im Medium als auch im GuHCl-Extrakt VDIPEN-Neo-Epitope detektierbar. Im Vergleich zu der Kontrolle wurde bei der Mutante 73,9 % mehr degradiertes Aggrecan in das Medium freigesetzt. Im Gegensatz dazu waren im GuHCl-Extrakt 24,1 % weniger Degradationsprodukte nachweisbar (Abb. 3.15 A).

Anschließend wurde der Abbau von Aggrecan durch Adamts-4/5 mit Hilfe des NITEGE-Antikörpers untersucht. In unbehandelten Proben waren im Medium keine Abbauprodukte detektierbar. Die Proben des RA-behandelten Mediums waren nicht auswertbar (nicht gezeigt). Im GuHCl-Extrakt waren jedoch sowohl in unbehandelten Proben als auch nach der Behandlung mit RA Aggrecan-Neopeptide nachweisbar. Ohne RA war die Menge der Adamts-spezifischen Abbauprodukte im Vergleich zur Kontrolle um 10,6 % erhöht; die Behandlung mit RA verminderte die Degradation jedoch um 55,2 %. Insgesamt deutet dieser Versuch darauf hin, dass die Degradation von Aggrecan bei *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen reduziert ist. Er sollte jedoch wiederholt werden, um die Ergebnisse zu validieren.

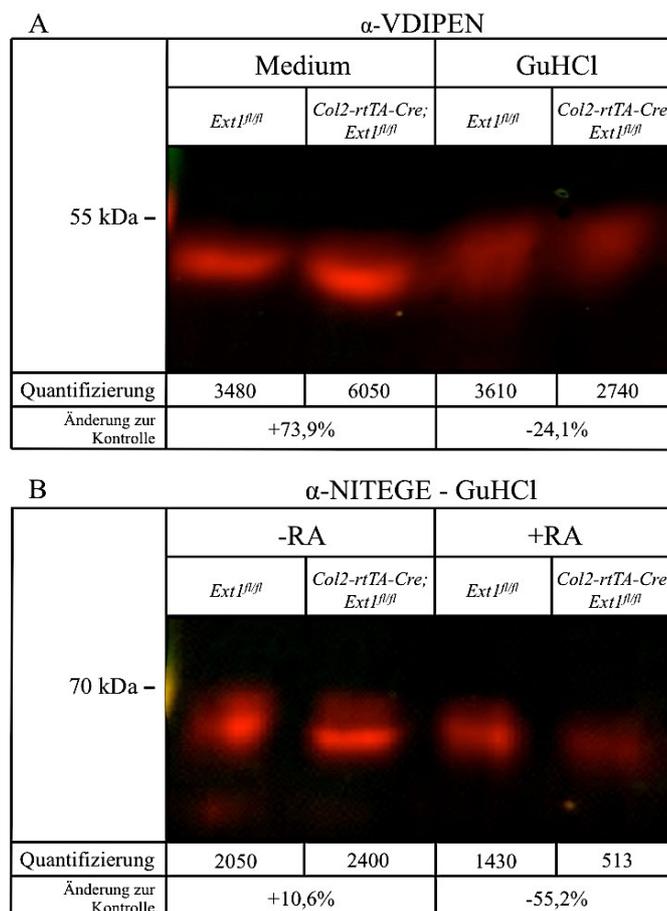


Abb. 3.15 Nachweis von Aggrecan-Degradationsprodukten in Knorpel-Explant-Kulturen von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen. Im Medium und GuHCl-Extrakt von Knorpel-Explant-Kulturen wurde die Degradation von Aggrecan durch Mmp (A) und Adams (B) nachgewiesen. (A) In mit 10 μ M RA behandelten Kulturen sind im Medium 73,9 % mehr und im GuHCl-Extrakt 24,1 % weniger MMP-spezifische Aggrecan-Degradationsprodukte nachweisbar. (B) Im GuHCl-Extrakt von unbehandelten Kulturen ist bei der Mutante 10,6 % mehr Aggrecan-Abbau durch Adams detektierbar, nach der Behandlung mit RA reduziert sich dieser Wert auf 55,2 % der Kontrolle.

3.2.6 Aktivierung Integrin-abhängiger Signalkaskaden in *Ext1*-defizienten Zellen

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass die ECM der *Ext1*-defizienten Zellen verändert ist. Änderungen der ECM können von Zellen durch Adhäsionsmoleküle oder Adapterproteine, die in der Zellmembran verankert sind, wahrgenommen werden und in Signale umgesetzt werden. An diesem Prozess sind Membranrezeptoren, wie Integrine, beteiligt. Mit ihrer extrazellulären Domäne binden sie verschiedene ECM-Komponenten und stellen intrazellulär einen Kontakt zum Zytoskelett her. Als zentrales Signalmolekül ist die focal adhesion kinase (FAK) an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Die Aktivierung von FAK geht mit einer Autophosphorylierung einher und reguliert unter anderem Migration, Proliferation und Überleben der Zellen (Legate et al., 2009). Um erste Hinweise zu erlangen, ob in den Clustern die Integrin Signaltransduktion verändert ist, wurden immunhistochemisch die Level von FAK und der aktivierten, phosphorylierten

Form von FAK (pFAK) untersucht (Abb. 3.16). In den Klonen waren sowohl FAK als auch pFAK deutlich stärker nachweisbar als im umliegenden Gewebe. Zudem waren Myosin und die phosphorylierte Form der *extracellular signal-regulated kinase* (pERK) deutlich stärker nachweisbar als in den umliegenden Zellen (Abb. 3.16 C, D). Dies deutet darauf hin, dass in den Klonen Änderungen in der Aktivierung von Integrin-abhängigen Signalwegen vorliegen.

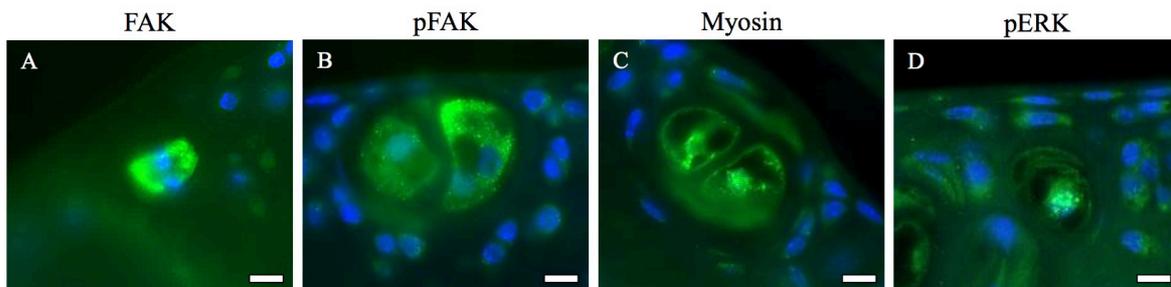


Abb. 3.16 Die Cluster im Gelenkknorpel der *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse zeigen eine Aktivierung Integrin-abhängiger Signalkaskaden. Immunhistochemische Analyse des Gelenkknorpels vier Wochen alter *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäuse. (A-D) grün: Antikörperfärbung, blau: DAPI. FAK (A), pFAK (B), Myosin (C) und pERK (D) sind deutlich stärker im Cluster detektierbar als im umliegenden Gewebe. Maßstabsbalken: 20 μ m, 630x Vergrößerung.

3.3 Die verminderte Sulfatierung in *Ndst1*-defizienten Mäusen ändert die Knorpelhomöostase und schützt vor Arthrose

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass die klonale Deletion von *Ext1* zu einem Schutz vor OA führt, während eine verminderte *Ext1* Gendosis keine detektierbaren Auswirkungen hatte. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass nicht nur die HS-Level, sondern auch das Sulfatierungs-Muster einen Einfluss auf die Entstehung von OA haben können. So führt z.B. ein erhöhtes Sulfatierungslevel, hervorgerufen durch die Deletion der 60 Endosulfatasen Sulf 1 oder 2, zu einer verstärkten Entstehung von OA (Otsuki et al., 2010). Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Reduktion der HS-Sulfatierung einen Schutz vor OA bietet. Dazu wurden Mäuse mit einer Deletion von *Ndst1* analysiert. Die homozygote Deletion des Gens führt zu einer deutlichen Reduktion insbesondere der N- und 2O-Sulfatierung (Grobe et al., 2005; Ledin et al., 2004). Dies verursacht jedoch schwere Entwicklungsstörungen an verschiedenen Organsystemen wie dem Gehirn, der Lunge oder dem Skelett und ist daher embryonal oder perinatal letal (Grobe et al., 2005; Pallerla et al., 2007). Daher wurden in dieser Arbeit *Ndst1*-heterozygote Mäuse untersucht. Bei diesen Tieren sind die Veränderungen des Sulfatierungslevels milder, weshalb sie lebensfähig sind (Grobe et al., 2005).

3.3.1 *Ndst1*-heterozygote Mäuse sind vor induzierter Arthrose geschützt

Um den Einfluss einer verminderten Sulfatierung auf die Entstehung von OA zu analysieren, wurde in Wildtyp- und *Ndst1*-heterozygoten Mäusen chirurgisch OA induziert (siehe 3.2.3 und 3.3.4). Wie auch bei den *Ext1*-defizienten Tieren wurde vier Wochen nach der OP die Entstehung der OA histologisch untersucht. Dazu wurden die OA-Werte anhand von frontalen Schnitten der Kniegelenke von Kontrollen und Mutanten bestimmt. Der Mittelwert des OA-Wertes der Kontrollen wurde jeweils auf 100 % festgelegt (Abb. 3.17).

Die Sham-OP verursachte weder bei den Kontroll-Tieren noch bei den Mutanten OA. Bei den operierten Knien war dagegen der OA-Wert der *Ndst1*-heterozygoten Tiere sowohl medial als auch lateral in Bezug zu den Kontrollen vermindert (medial: 144 zu 131 %, lateral: 56 zu 31 %). Diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant. Im Mittelwert über das ganze Knie war jedoch eine signifikante Reduktion des OA-Wertes von 100 auf 81 % erkennbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Reduktion der HS-Sulfatierung durch Deletion eines *Ndst1*-Allels vor induzierter OA schützt.

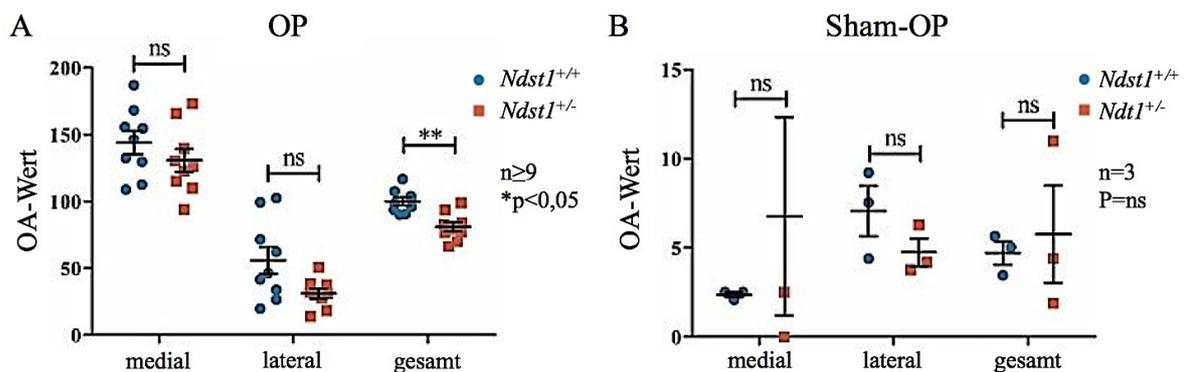


Abb. 3.17 *Ndst1*-heterozygote Mäuse sind vor induzierter OA geschützt. (A) Nach chirurgischer Induktion von OA haben *Ndst1*^{+/-} Mäuse einen niedrigeren OA-Wert als die Kontroll-Tiere. (B) Die Sham-OP verursacht weder bei den Mutanten noch bei den Kontroll-Tieren OA.

3.3.2 Verminderte Aggrecan-Degradation im Gelenkknorpel von *Ndst1*-heterozygoten Mäusen

Um zu untersuchen, ob die verminderte Anfälligkeit für OA durch eine reduzierte Aktivität von Proteasen verursacht wird, wurde die Aggrecan-Degradation anhand von Femurkopf-Explant-Kulturen, analog zur Analyse der *Col2Cre-Ndst1*^{fl/fl} Mäuse, untersucht. Zuerst wurde der Abbau von Aggrecan durch Proteasen der Mmp-Familie, nachgewiesen durch das VDIPEN-Epitop, analysiert (Abb. 3.18 A). Sowohl im Medium als auch im GuHCl-Extrakt waren nur in den mit 10 μ M RA stimulierten Proben Aggrecan-Abbauprodukte detektierbar. Die Menge der Neo-Epitope war in den Mutanten sowohl im Medium als

auch im GuHCl-Extrakt um 41,4 bzw. 47,9 % des Kontrollwertes reduziert. Dies deutet auf einen verminderten Abbau der ECM durch Mmps hin.

Anschließend wurde die Aggrecan-Degradation durch Adamts untersucht (Abb. 3.18 B). Im Medium waren nach Stimulation der Degradation in den Mutanten leicht vermehrte Level an Neo-Epitopen nachweisbar. Im GuHCl-Extrakt war jedoch sowohl in den unbehandelten als auch in den mit RA stimulierten Proben eine deutliche Reduktion der Adamts-Aktivität um 60 bzw. 56,5 % der Kontrolle detektierbar. Zusammengefasst scheint der Abbau der ECM sowohl durch Mmps als auch durch Adamts in den Mutanten vermindert zu sein. Dies könnte den Schutz vor OA erklären. Der Versuch sollte jedoch wiederholt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen.

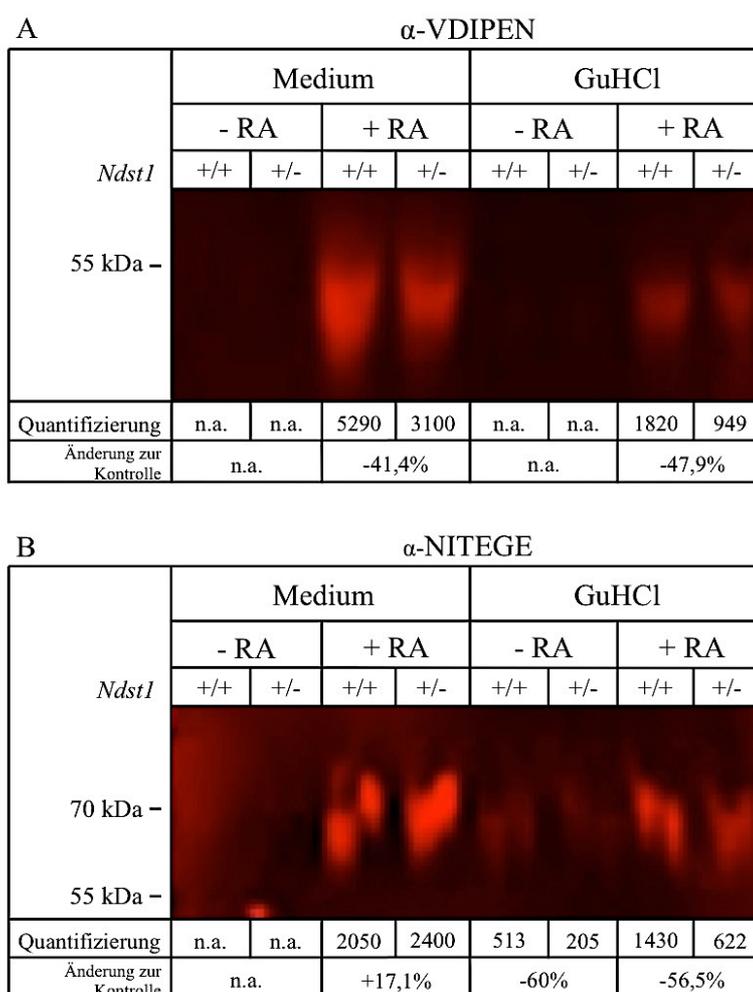


Abb. 3.18 Verminderte Degradation von Aggrecan durch Mmps und Adamts in *Ndst1*^{+/-} Mäusen. Im Medium und GuHCl-Extrakt von Knorpel-Explant-Kulturen wurde die Degradation von Aggrecan durch Mmp (A) und Adamts (B) mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. (A) In mit 10 μ M RA behandelten Kulturen sind im Medium 41,4 % und im GuHCl-Extrakt 47,9 % weniger Mmp-spezifische Neo-Epitope nachweisbar. (B) Im Medium von unbehandelten Kulturen ist bei der Mutante 17,1 % mehr Aggrecan-Abbau durch Adamts detektierbar. Im GuHCl-Extrakt ist die Degradation in unbehandelten Proben jedoch um 60 % und in den mit RA stimulierten Proben um 56,5 % reduziert.

3.3.3 Der Gelenkknorpel von *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäusen ist dicker

Gleichzeitig mit den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen haben Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt, dass der embryonale Knorpel-Phänotyp von *Ndst1^{-/-}* Mäusen überraschend mild ist (nicht publiziert). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Mäuse mit einer gewebespezifischen Deletion von *Ndst1* in Chondrozyten (*Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}*) lebensfähig sind. Da dies der Fall war, wurde der Gelenkknorpel von vier Wochen alten Kontrollen (*Ndst1^{fl/fl}*), Mäusen mit dem Verlust eines *Ndst1*-Allels in Chondrozyten (*Col2Cre;Ndst1^{+/-}*) und Mäusen mit einer Deletion beider *Ndst1*-Allele im Knorpel (*Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}*) untersucht. Dazu wurden frontale Schnitte von Kniegelenken mit Safranin Weigert gefärbt, analysiert und die durchschnittliche Dicke des Gelenkknorpels mit dem Programm ImageJ gemessen (siehe Abb. 3.19).

Histologisch ähnelte der Gelenkknorpel der Mutanten stark dem der Kontrolle. Bei allen Genotypen waren die verschiedenen Schichten des Gelenkknorpels erkennbar. Die Zellularität innerhalb des Knorpels war vergleichbar. Zudem lagen auch beim Gehalt der PGs, erkennbar an der Intensität der Färbung mit Safranin Weigert, keine offensichtlichen Änderungen vor. Allerdings zeigte sich, dass die Dicke des Knorpels verändert war. Bei der Kontrolle lag im Mittelwert eine Dicke von 104 μm vor. Der Verlust eines *Ndst1*-Allels führte zu einer signifikanten Steigerung der Dicke um 18 % auf 123 μm . Der Verlust des zweiten Allels führte zu einer weiteren Steigerung auf 132 μm (+27 %). Dies zeigt, dass eine zunehmende Reduktion der Sulfatierung mit einem dickeren Gelenkknorpel und damit potentiell mit einer erhöhten Resistenz gegen OA korreliert.

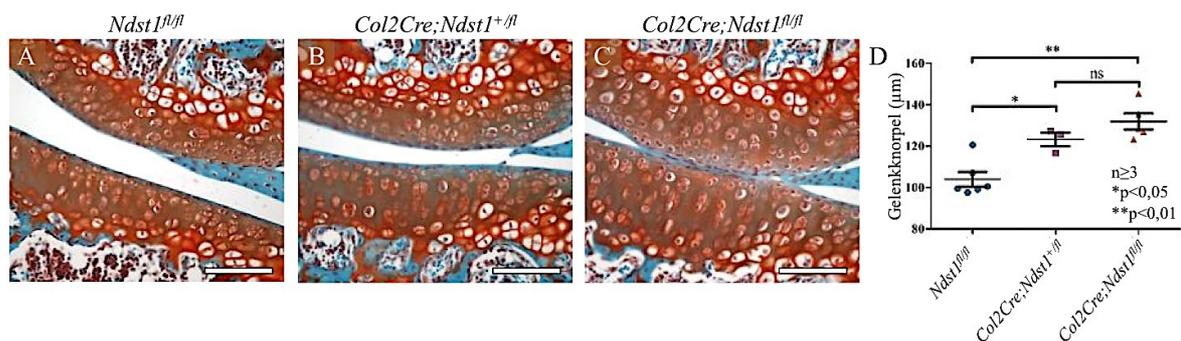


Abb. 3.19 Der Gelenkknorpel von vier Wochen alten *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäusen ist dicker als bei der Kontrolle. Die Dicke des Gelenkknorpels von Kontrollen (A), *Col2Cre;Ndst1^{+/-}* (B) und *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäusen (C) wurde anhand von frontalen, mit Safranin Weigert gefärbten Schnitten bestimmt und statistisch ausgewertet (D). Sowohl der Knorpel der *Col2Cre;Ndst1^{+/-}* als auch der *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäuse ist signifikant dicker als bei der Kontrolle. Zwischen *Col2Cre;Ndst1^{+/-}* und *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäusen ist kein statistisch signifikanter Unterschied messbar. Maßstabsbalken: 100 μm , 200x Vergrößerung.

3.3.4 *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäuse sind vor induzierter Arthrose geschützt

Um zu überprüfen, ob die gewebespezifische Deletion von *Ndst1* in Chondrozyten durch eine erhöhte Knorpeldicke zu einem Schutz vor OA führt, wurde auch bei diesem Mausstamm chirurgisch OA induziert. Falls die im Knorpel vorliegende Reduktion der Sulfatierungslevel mit einer verminderten Anfälligkeit für OA korreliert, müssten diese Tiere einen stärkeren Schutz vor OA zeigen als die *Ndst1*-heterozygoten Tiere. Wie zuvor wurden Kontrollen und Mutanten vier Wochen nach der OP histologisch analysiert und statistisch ausgewertet (Abb. 3.20).

Der OA-Wert der *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäuse war sowohl medial als auch lateral im Bezug zu der Kontrolle vermindert (medial: 118 zu 102 %, lateral: 82 zu 73 %); diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Für den Gesamtwert ergab sich allerdings eine signifikante Verminderung des OA-Wertes von 100 auf 87 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die homozygote Deletion von *Ndst1* im Knorpel vor OA schützt. Der Schutz vor OA ist entgegen der vorherigen Hypothese jedoch nicht stärker als bei den *Ndst1*-heterozygoten Tieren.

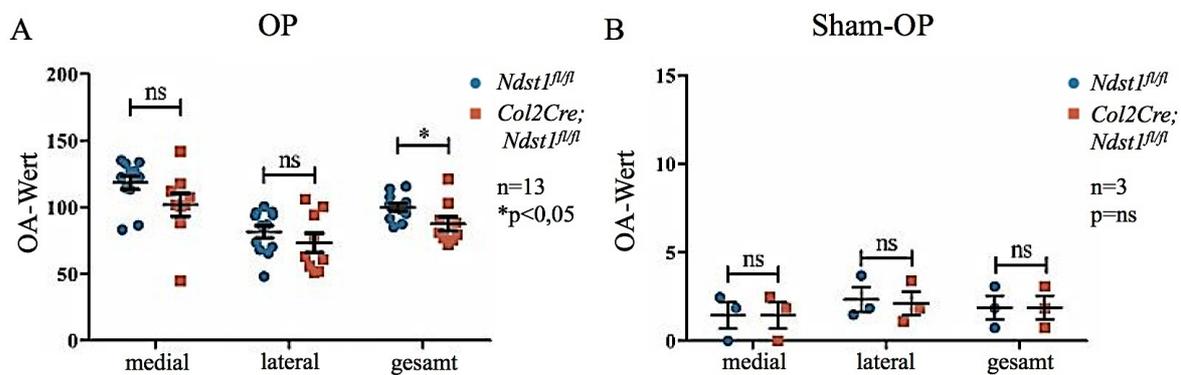


Abb. 3.20 *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäuse sind vor induzierter OA geschützt. (A) Nach chirurgischer Induktion von OA haben *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mäuse einen niedrigeren OA-Wert als die Kontroll-Tiere. (B) Die sham-operierten Knie zeigen keine OA, weder bei den Mutanten noch bei den Kontrollen. Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

3.3.5 Microarray Analyse von *Ndst1*-defizientem Gelenkknorpel

Um Aufschluss über die molekularen Ursachen zu erhalten, warum ein vermindertes Sulfatierungslevel vor OA schützt, wurde eine Microarray-Analyse von *Ndst1*-defizientem Gelenkknorpel durchgeführt. Für diesen Versuch wurde der *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mausstamm verwendet, da in den mutanten Tieren das Sulfatierungs-Level stärker vermindert ist als in den *Ndst1*-heterozygoten Tieren. Zudem war der Knorpel der Mutanten im Alter von vier Wochen dicker als bei der Kontrolle (siehe Abb. 3.19).

Für den Array wurde der Gelenkknorpel von Kontroll-Tieren und *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Mutanten durch Laser Capture Catapulting (LCC) von Femurkopf-Kryoschnitten isoliert (Abb. 3.21). Dazu wurde auf den Schnitten der Gelenkknorpel identifiziert und durch einen

Laser-Impuls in ein Reaktionsgefäß katapultiert. Aus dem Gewebe wurde anschließend die gesamte RNA aufgereinigt. Insgesamt wurden pro Genotyp drei Proben hergestellt. Qualität und Konzentration der Proben wurden mit Hilfe des Agilent RNA Pico Kits analysiert. Zuerst wurde die *RNA integrity number* (RIN), ein Maß für die Qualität von RNA, bestimmt. Die Skala reicht von 0 (vollständig degradiert) bis 10 (keine Degradation). Die isolierten Proben hatten mit RIN-Werten zwischen 7,1 und 8,4 eine gute Qualität. Die Konzentration der Proben lag bei allen Proben zwischen 17 und 77 pg/μl. Aufgrund der geringen RNA-Konzentration musste die RNA vor der weiteren Analyse amplifiziert werden. Sowohl die Amplifikation als auch der Microarray wurden im Biochip-Labor der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

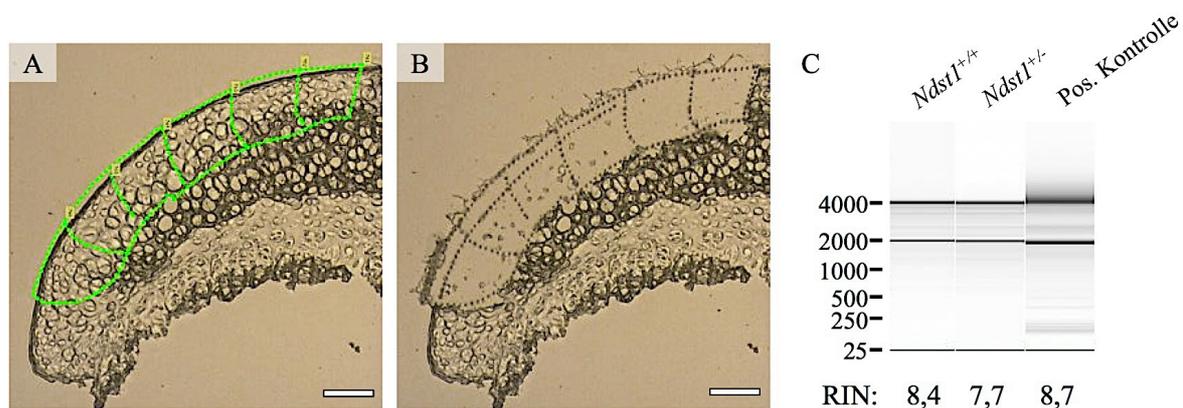


Abb. 3.21 RNA-Isolierung aus Gelenkknorpel. Auf Kryoschnitten der Femurköpfe von *Ndst*^{+/+} Kontrollen und *Ndst1*^{+/-} Mutanten wurde der Gelenkknorpel ausgewählt (A, grüne Markierung) und anschließend durch LPC isoliert (B). Aus dem Gewebe wurde die gesamte RNA aufgereinigt und ihre Qualität bestimmt (C). Maßstabsbalken: 100 μm, 100x Vergrößerung

Im Microarray wurden insgesamt 788 differenziell exprimierte RNAs identifiziert. Von diesen zeigten 553 RNAs einen mindestens 1,5-fachen Unterschied (*fold change*) zwischen Kontrolle und Mutante ($p < 0,05$, für eine Tabelle aller Zielgene und Rohdaten, siehe beigefügte CD). In den beiden folgenden Tabellen sind die zehn Zielgene mit dem jeweils größten Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante aufgeführt. Die in Tabelle 3.1 genannten Gene sind in der Mutante stärker als in der Kontrolle exprimiert, die in Tabelle 3.2 schwächer.

Im Vergleich zur Kontrolle war das am stärksten hochregulierte Gen der Transkriptionsfaktor *zinc finger protein 28* (*Zfp28*). Bei *Zfp28* handelt es sich um ein Paralog von ZNF470, einem multi-zinkfinger Protein mit KRAB-A und -B Motiven. ZNF470 hat in der enchondralen Ossifikation seine höchste Expression in der frühen Phase der Chondrozyten-Differenzierung, kurz bevor die Expression von *Col2a1* ansteigt (Hering et al., 2004). Ein anderes hochreguliertes Gen war der Transporter *ATP-binding cassette subfamily B member 1* (*Abcb1*). ABC Proteine transportieren aktiv eine Vielzahl von

Molekülen durch extra- und intrazelluläre Membranen. *Abcb1* gehört zur Unterklasse der *multiple drug resistance* (MDR)-Transporter und hat ein breites Substrat-Spektrum. Interessanterweise wurde gezeigt, dass *Abcb1* am Export von HA in die ECM und damit an der Matrix-Synthese beteiligt ist (Pehm und Schumacher, 2004).

Tab. 3.1 In *Ndst1*^{+/-} Mäusen verstärkt exprimierte Zielgene

Gen-Symbol	Name	fold change
<i>Zfp28</i>	zinc finger protein 28	11,22
<i>Qrsll</i>	glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1	10,58
<i>Dek</i>	DEK proto-oncogene (DNA binding)	10,27
<i>AA414993</i>	expressed sequence AA414993	9,03
<i>AA414993</i>	expressed sequence AA414993	6,46
<i>Abcb1</i>	ATP-binding cassette subfamily B member 1	5,5
<i>AA386476</i>	expressed sequence AA386476	5,26
<i>Nipsnap1</i>	4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1	4,78
<i>Ppm1d</i>	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	4,73
<i>Myh1</i>	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	4,72

Unter den in den Mutanten negativ regulierten Genen waren zwei an der DNA-Reparatur beteiligte Gene, *SLX1 structure-specific endonuclease subunit homolog B* (*Slx1b*) und *OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2* (*Otub2*). *Slx1b* ist an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt (Svendsen et al., 2009). *Otub2* ist ein Enzym, das Ubiquitin-Gruppen entfernen kann. Bei der DNA-Reparatur werden durch die Ubiquitinierung von Proteinen durch die E3 Ubiquitin Ligase RNF8 an der DNA-Reparatur beteiligte Faktoren rekrutiert. Die Deletion von *Otub2* beschleunigt daher die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, unterdrückt jedoch die homologe Rekombination (Kato et al., 2014). Mit Versican ist auch ein PG unter den am stärksten herunterregulierten Genen. Wie auch Aggrecan gehört es zu der Gruppe der extrazellulären Hyalectane. Es bindet N-terminal an HA und kann zahlreiche CS-Ketten tragen. Studien haben gezeigt, dass Versican in humanem OA-Gewebe vermehrt synthetisiert wird (Nishida et al., 1994).

Besonders interessant ist jedoch, dass sich mit *Mmp3* und Cathepsin S gleich zwei Proteasen unter den Genen befinden, die in den Mutanten besonders stark negativ reguliert waren. *Mmp3* kann einerseits selbst ECM-Komponenten wie Kollagenfasern, PGs, Fibronectin und Elastin degradieren und andererseits andere Proteasen aktivieren und so zum Abbau der ECM beitragen. Cathepsin S kann wie auch *Mmp3* verschiedene ECM-Proteine degradieren (Kirschke et al., 1989). Die Expression beider Proteasen ist in OA-

Proben erhöht (Bau et al., 2002; Hou et al., 2002). Eine verminderte Expression der Proteasen kann zum Schutz der Tiere vor OA beitragen. Gleichzeitig bestätigen die Daten des Arrays die vorherige Beobachtung, dass eine verminderte HS-Sulfatierung zu einer reduzierten ECM-Degradation durch Proteasen führt (siehe Abb. 3.18).

Tab. 3.2 In *Ndst1*^{+/-} Mäusen vermindert exprimierte Zielgene

Gen-Symbol	Name	Fold change
Zfp945	zinc finger protein 945	-7,58
Ctss	Cathepsin S	-6,08
Srp54b	signal recognition particle 54B	-5,59
Slx1b	SLX1 structure-specific endonuclease subunit homolog B	-4,74
Spty2d1	SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1	-4,72
Kantr	Kdm5c adjacent non-coding transcript	-4,38
Otub2	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2	-4,22
Vcan	Versican	-3,83
Mmp3	Matrix Metalloproteinase 3	-3,81
Mllt3	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	-3,76

4 Diskussion

OA ist die häufigste Erkrankung des Skelettsystems des Menschen und wird durch Abbau der PGs und Kollagenfasern des Gelenkknorpels charakterisiert. Die fortschreitende Degeneration des Knorpels führt im Verlauf der Krankheit zu einer verminderten Beweglichkeit und Schmerzen der Gelenke. Trotz intensiver Forschung sind die molekularen Mechanismen der Erkrankung nur wenig verstanden. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass HSPGs, die an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt sind, auch die Entstehung von OA beeinflussen können. In dieser Arbeit wurde daher die Funktion von HS-Ketten bei OA analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl verminderte HS-Level als auch eine reduzierte HS-Sulfatierung vor der Entstehung von OA schützen.

4.1 Die klonale Deletion von *Ext1* verursacht Änderungen des Gelenkknorpels, der Wachstumsfuge und der Trabekel

In einer früheren Arbeit wurden im Gelenkknorpel von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen, einem Modellsystem für HMO, welches auf einer klonalen Deletion der Glycosyltransferase *Ext1* beruht, Gruppen vergrößerter Zellen beobachtet (Piombo, 2010). Diese Zellen bildeten eine PG-reiche ECM und grenzten sich vom umliegenden Gewebe ab. Um zu untersuchen, ob die Läsionen zur spontanen Entstehung von OA führen, wurden Mäuse verschiedener Altersstufen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die mutanten Mäuse unerwartet vor spontaner OA geschützt waren. Zusätzlich wurde ein Schluss der Wachstumsfuge und ein vermindertes Trabekelvolumen detektiert. Innerhalb der Wachstumsfuge waren dabei Klone von unorganisierten Zellen erkennbar. Durch die Verwendung eines Reporter-Allels und LCM-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Klone im artikulären Knorpel als auch in der Wachstumsfuge aus *Ext1*-defizienten Zellen bestehen. Dies deckt sich mit Ergebnissen einer parallel durchgeführten Studie, in der in einem ähnlichen Mausmodell in den Läsionen des Gelenkknorpels ebenfalls die Expression eines Reporter-Allels nachweisbar war (Sgariglia et al., 2013).

Eine frühere Arbeit hat zudem gezeigt, dass auch die Osteochondrome, die in *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen entstehen, aus *Ext1*-defizienten Zellen bestehen (Jones et al., 2010). Zusammengefasst führt also der Verlust von *Ext1* in Chondrozyten je nach Position im Gewebe zu verschiedenen Phänotypen: Im Gelenkknorpel bilden sich Cluster vergrößerter Chondrozyten, in der Mitte der Wachstumsfuge unorganisierte Klone und am Rand der

Wachstumsfuge Osteochondrome. Aus diesen Beobachtungen lassen sich mehrere Fragen ableiten, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden sollen:

1. Sind die vergrößerten Zellen im Gelenkknorpel hypertrophe Chondrozyten?
2. Warum führt die Deletion von *Ext1* in Chondrozyten zu so unterschiedlichen Phänotypen?
3. Durch welche Mechanismen kommt die gestörte Orientierung der *Ext1*-defizienten Zellen zustande?

4.1.1 Die *Ext1*-defizienten Zellen sind keine klassischen hypertrophen Chondrozyten

Die *Ext1*-defizienten Cluster wurden in früheren Arbeiten aufgrund ihrer Größe und der Expression von Col X mit hypertrophen Chondrozyten verglichen. Allgemein leitet sich der Begriff „hypertroph“ von altgriechisch *hyper* = über und *trophein* = ernähren ab und bedeutet demnach vergrößert bzw. vermehrt. In diesem Sinn sind die Zellen des Clusters durch ihr enormes Volumen durchaus als hypertrophe (= vergrößerte) Chondrozyten zu bezeichnen. Im Gegensatz dazu wird der Ausdruck „hypertropher Chondrozyt“ jedoch für ein spezifisches Entwicklungsstadium während der enchondralen Ossifikation verwendet. Es bezeichnet die vergrößerten, postmitotischen Zellen der Wachstumsfuge, die den Marker Col X exprimieren und später durch Knochen ersetzt werden. In dieser Arbeit zeigte die Auswertung von Semidünnschnitten, dass die Zellen der Cluster histologisch eher Zellen der tiefen Radiärzone des Gelenkknorpels als hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge ähneln. Gleichzeitig konnte immunhistochemisch keine Expression von Col X in den Clustern detektiert werden, obwohl der Nachweis in der Wachstumsfuge erfolgreich war (siehe Abb. 3.12). Zuletzt persistieren die Cluster im Gelenkknorpel der Mäuse und sind auch in 18 Monate alten Mäusen noch nachweisbar. Im Gegensatz dazu sterben hypertrophe Zellen der Wachstumsfuge durch Apoptose oder transdifferenzieren in Osteoblasten (zusammengefasst in Tsang et al., 2015). Zusammengefasst bestehen die Klone also nicht aus typischen hypertrophen Chondrozyten, wie sie in der Wachstumsfuge vorliegen.

Diese Daten stehen scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Publikation, in der in einem ähnlichen Mausmodell die Expression von Col X in Läsionen des Gelenkknorpels nachgewiesen wurde (Sgariglia et al., 2013). Sgariglia et al. induzierten die Cre-Rekombinase früh postnatal (P5). Der Zeitpunkt der Induktion ist daher sehr ähnlich wie in dieser Arbeit (P8) und deshalb vermutlich nicht der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse. Die Anzahl der induzierten Zellen war jedoch deutlich höher als in dieser Arbeit. Dadurch war das Verhältnis von *Ext1*-defizienten Clustern zu

umgebenden Wildtyp-Zellen verändert. Möglicherweise sind in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell noch genügend Wildtyp-Zellen vorhanden, um durch sezernierte Faktoren die terminale hypertrophe Differenzierung der Cluster zu unterdrücken, während bei Sgariglia et al. dies dosisabhängig nicht mehr der Fall ist. Eine andere Erklärung für den Unterschied zwischen beiden Modellsystemen wäre, dass es sich um verschiedene Mausstämme handelt. Ein veränderter genetischer Hintergrund kann zu einem stärker ausgeprägten Phänotyp führen.

4.1.2 Mögliche Ursachen für die verschiedenen Phänotypen *Ext1*-defizienter Zellen

Die Deletion von *Ext1* in Chondrozyten führt zu drei verschiedenen Phänotypen: im Gelenk bilden sich Cluster, innerhalb der Wachstumsfuge Gruppen unorganisierter Zellen und am Rand der Wachstumsfuge Osteochondrome. In allen Fällen wird die Deletion von *Ext1* an P8 unter der Kontrolle des *Col2*-Promotors induziert. Dieser Promotor ist jedoch gleichermaßen in Zellen der Wachstumsfuge und des Gelenkknorpels aktiv. Beide Zelltypen sind Chondrozyten; sie unterscheiden sich aber durch ein geändertes Expressionsprofil voneinander und sind auch histologisch klar voneinander abzugrenzen. Demnach haben die mutanten Zellen im Gelenk zum Zeitpunkt der Induktion einen anderen Differenzierungsstatus als die Zellen in der Wachstumsfuge und reagieren daher wahrscheinlich anders auf die *Ext1*-Deletion. Die Unterschiede zwischen den Klonen innerhalb der Wachstumsfuge und den Tumoren am Rand lassen sich damit jedoch nicht erklären.

Eine theoretische Möglichkeit ist, dass die Osteochondrome durch eine ektopische Aktivierung des Cre-Allels nicht aus Chondrozyten, sondern aus Zellen des Perichondriums hervorgehen. So hat eine Studie gezeigt, dass die Deletion von *Ext1* in *Gdf5*-positiven Zellen des Gelenks, des Perichondriums und der lateralen Chondrozyten der Epiphyse zur Bildung ektopischen Knorpels führen kann (Huegel et al., 2013). Falls die Ursprungszelle des Tumors also kein Chondrozyt wäre, könnte sie anders auf die Deletion reagieren. Die Beobachtung, dass die frühen Osteochondrome jedoch Knorpel-Marker wie Col II und Ucpa exprimieren, deutet allerdings auf einen Chondrozyten als Ursprung der Tumore hin (Jones et al., 2010).

Eine andere Erklärung ist, dass die Zellen abhängig von ihrer Position im Gewebe unterschiedliche Signalmoleküle aus ihrer direkten Umgebung erhalten. Die Klone in der Mitte der Wachstumsfuge sind von stark proliferierendem Säulen-Knorpel umgeben, während die Osteochondrome an der Seite der Wachstumsfuge lokalisiert sind. In dieser Region wird die *groove of ranvier*, ein Stammzell-Reservoir, vermutet. Die Zellen im

Gelenkknorpel befinden sich dagegen inmitten artikulärer Chondrozyten, die eine geringere Proliferationsrate aufweisen, dafür aber mehr ECM produzieren. Die direkte Umgebung der Zellen und damit wahrscheinlich auch die vorliegenden Level von Signalmolekülen sind demnach verschieden.

Anders als die sie umgebenden Wildtyp-Zellen tragen die *Ext1*-defizienten Cluster keine HS-Ketten auf der Oberfläche. Daher ist es möglich, dass sie auf Signale nicht normal reagieren können (siehe 4.3.3). Welche Signalwege dies sind und wie sie zu den verschiedenen Phänotypen beitragen, sollte in weiteren Studien geklärt werden. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Entstehung der Osteochondrome von Bedeutung da die einzige Therapiemöglichkeit der Erkrankung derzeit in der chirurgischen Entfernung der Tumore besteht.

4.1.3 Die Orientierung *Ext1*-defizienter Zellen ist gestört

Ein weiterer interessanter Aspekt der *Ext1*-defizienten Zellen ist, dass sie eine gestörte Orientierung aufweisen und sich deutlich vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Dies ist besonders an den Klonen innerhalb der Wachstumsfuge, die im Gegensatz zu den umliegenden Wildtyp-Zellen keine geordneten Säulen ausbilden, erkennbar. Zudem wurde anhand von histologischen Präparaten von HMO-Patienten gezeigt, dass die Wachstumsfuge der Osteochondrome eher unorganisiert ist. Auch dies deutet auf Störungen der Orientierung hin (de Andrea et al., 2010).

In der normalen enchondralen Wachstumsfuge bilden sich Säulen in zwei Schritten aus. Als erstes teilen sich Chondrozyten entlang der orthogonalen Achse der Wachstumsfuge. Dabei bleiben sie in engem Zell-Zell-Kontakt. Anschließend rotieren die Tochterzellen umeinander, so dass sie schließlich übereinander liegen. Die molekularen Mechanismen, die diesen Prozess regulieren, sind weitestgehend unbekannt. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass neben dem Zell-Zell-Kontakt eine Form des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs, der *planar cell polarity* (PCP)-Signalweg, daran beteiligt ist (Li und Dudley, 2009; Randall et al., 2012). Während bei dem kanonischen WNT-Signalweg die Transkription von Zielgenen durch die Akkumulation von β -catenin reguliert wird, beeinflusst der PCP-Signalweg unabhängig von β -catenin über die Aktivierung der GTPasen Rac und Rho sowie der *JUN-N-terminal kinase* (JNK) das Zytoskelett und die Polarität von Zellen (zusammengefasst in Niehrs, 2012).

Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des PCP-Signalwegs *in vitro* die Bildung von Säulen fördert, während die Inaktivierung des Signalwegs im Huhn zu einer gestörten Organisation der Wachstumsfuge führt (Li und Dudley, 2009; Randall et al., 2012).

HSPGs der Glypican- und Syndecan-Familien können sowohl Wnt als auch den Rezeptor Frizzled binden und so als Co-Rezeptoren den Wnt-Signalweg verstärken (Carvallo et al., 2010; Sakane et al., 2012). Es ist daher denkbar, dass durch die fehlenden HS-Ketten der Klone der Wnt Signalweg inhibiert und dadurch die Orientierung innerhalb des Gewebes gestört wird.

Neben veränderten Wnt-Signalen kann auch der Zell-Matrix Kontakt, vermittelt durch Integrine, die Orientierung von Zellen beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass in Mäusen mit einer konditionalen Deletion von $\alpha 10$ - oder $\beta 1$ -Integrin die Organisation der Wachstumsfuge gestört ist (Aszodi et al., 2003; Raducanu et al., 2009). Immunhistochemische Analysen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass zumindest in den Clustern im Gelenkknorpel Integrin-Signale verstärkt sind (siehe 3.2.6). In weiteren Versuchen sollte daher die Expression der Integrine sowie des PCP-Signalwegs untersucht werden.

4.2 Arthrose

Zahlreiche Studien belegen, dass in OA-Gewebe eine Vielzahl von Genen differentiell reguliert ist. Eine der Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Ergebnisse liegt darin, dass oftmals nicht klar ist, ob die Änderung im Expressionslevel zu einer Verstärkung der OA beiträgt oder ein Versuch der Kompensation ist. Studien an genetisch manipulierten Mäusen ermöglichen es jedoch, die Funktion spezifischer Gene bei der Ätiologie von OA zu untersuchen. Für die Analyse der Funktion von HSPGs bei OA wurden in früheren Studien entweder Mausstämme, in denen die HS-core-Proteine Perlecan oder Syndecan-4 deletiert waren, oder in denen der Grad der Sulfatierung erhöht war (*Sulf1* oder -2), untersucht. (Echtermeyer et al., 2009; Otsuki et al., 2010; Shu et al., 2015). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit Mäuse mit reduzierten HS-Leveln (*Ext1*^{+/-} und *Col2-rtTA-Cre;Ext1* ^{β/β}) und einer verminderten Sulfatierung (*Ndst1*^{+/-} und *Col2Cre;Ndst* ^{β/β}) analysiert.

4.2.1 Die Deletion von *Ext1* schützt vor Arthrose

Die Auswirkungen reduzierter HS-Level auf die OA-Entstehung wurde anhand von zwei Mausstämmen mit untersucht: Mäusen mit einer klonalen Deletion von *Ext1* in Chondrozyten (*Col2-rtTA-Cre;Ext1* ^{β/β}) und Tieren mit einer um 50 % reduzierten Gendosis (*Ext1*^{+/-}). Bei *Ext1*-heterozygoten Tieren waren jedoch keine Unterschiede in der OA-Entstehung zur Kontrolle messbar (siehe 3.2.3). Dies ist damit zu erklären, dass sich die um 50 % reduzierte Gendosis wahrscheinlich nicht in einer 50 %-igen Reduktion der synthetisierten HS widerspiegelt. Diese Hypothese wird von

einer Studie gestützt, in der Mäuse mit einer *gene-trap* Mutation untersucht wurden. *Ext1^{gt/gt}* Mäuse exprimierten nur 3 % der normalen *Ext1*-mRNA, was jedoch zur Synthese von 18 % der Wildtyp HS-Menge führte. Das Sulfatierungsmuster der synthetisierten HS-Ketten ähnelte zudem sehr stark nativem HS, lediglich die Länge der Ketten war reduziert (Yamada et al., 2004). In den *Ext1*-heterozygoten Mäusen liegt daher wahrscheinlich keine oder nur eine milde Reduktion der synthetisierten HS-Menge vor, so dass die Entstehung von OA nicht beeinflusst wird.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass, entgegen früherer Annahmen, die klonale Deletion von *Ext1* sowohl vor spontaner als auch induzierter OA schützt. Dies wirft die Frage auf, welche Mechanismen am Schutz vor OA beteiligt sind und wie, ausgehend von klonalen Veränderungen, das gesamte Knie geschützt werden kann.

4.2.2 Die Deletion von *Ndst1* schützt vor Arthrose

Zusätzlich zu den Auswirkungen verminderter HS-Level auf die Entstehung von OA wurde der Einfluss eines verminderten Sulfatierungsgrades anhand von zwei Mausstämmen mit einer Deletion im *Ndst1*-Gen untersucht. Da *Ndst1* Sulfatgruppen auf HS-Ketten überträgt, ist bei einer Deletion dieses Enzyms eine Verminderung der HS-Sulfatierungslevel zu erwarten. In unterschiedlichen Studien wurde die Sulfatierung verschiedener Gewebe untersucht (Grobe et al., 2005; Ledin et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass die Deletion von *Ndst1* in allen untersuchten Geweben zu ähnlichen Änderungen führte. Besonders die N-Sulfatierung und die 2O-Sulfatierung der HS-Ketten waren stark reduziert. Die Sulfatierung an der 6O-Position war dagegen nur wenig vermindert. Die Heterozygotie für *Ndst1* verursacht ähnliche, nur sehr viel milder ausgeprägte Unterschiede. Das Sulfatierungsmuster in *Ndst1*-defizientem Gelenkknorpel wurde bisher nicht untersucht, es sind aber vergleichbare Änderungen zu erwarten (Grobe et al., 2005; Ledin et al., 2004).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme bedeutet dies, dass in *Ndst1^{+/-}*-Mäusen leicht untersulfatiertes HS synthetisiert wird. Dagegen ist bei den *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}*-Mäusen *Ndst1* knorpelspezifisch deletiert. Demnach müsste die Sulfatierung der HS-Ketten, insbesondere die N- und die 2O-Sulfatierung, im Knorpelgewebe stark reduziert sein. Bei einem dosisabhängigen Effekt der Sulfatierungsmenge wäre daher zu erwarten, dass die homozygote Deletion von *Ndst1* im Knorpel zu einem stärkeren Phänotyp führt als der heterozygote Verlust von *Ndst1*.

Interessanterweise haben die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch gezeigt, dass beide Mausstämme in gleichem Maße vor induzierter OA geschützt waren. Eine Möglichkeit dies zu erklären ist, dass Unterschiede zwischen den Mausstämmen mit dem verwendeten Modellsystem nicht detektiert werden konnten, da bei diesem System innerhalb kurzer Zeit eine sehr starke OA hervorgerufen wird. Dies könnte mildere Unterschiede zwischen den Stämmen maskieren. Eine andere Erklärung könnte in dem Unterschied zwischen den beiden Mauslinien liegen. In *Ndst1*-heterozygoten Mäusen liegt der Verlust des *Ndst1*-Allels nicht nur im Gelenkknorpel, sondern in allen am Gelenk beteiligten Geweben vor. Bei den *Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* Tieren ist *Ndst1* dagegen nur im Knorpel deletiert, die anderen Gewebe weisen jedoch einen Wildtyp-Genotyp auf. Da OA eine Erkrankung des gesamten Gelenks ist, kann in den heterozygoten Tieren beispielsweise das Synovium durch ein geändertes Expressionsprofil zum Schutz vor OA beitragen.

4.3 Heparansulfate als Regulatoren der Knorpelhomöostase

Sowohl *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* als auch *Ndst1*-defiziente Mäuse waren im induzierten Modell vor OA geschützt. Dies zeigt, dass sowohl die klonale Deletion als auch die verminderte Sulfatierung der HS-Ketten die Knorpelhomöostase bei OA beeinflussen. Dabei sind verschiedene Mechanismen denkbar, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden sollen:

1. Durch eine vermehrte ECM-Synthese oder verminderte Degradation ist die Balance der Knorpelhomöostase in Richtung Knorpelaufbau verschoben.
2. Die Mechanotransduktion der Zellen ist verändert.
3. Die Regulation von Signalwegen, die zum Erhalt des Knorpels beitragen, wie FGF, BMP und HH, ist verändert.

4.3.1 Eine veränderte Knorpelhomöostase kann zum Schutz vor OA beitragen

Eines der Hauptmerkmale von OA ist eine gestörte Balance zwischen der Synthese und der Degradation der ECM. In den vor OA geschützten *Ndst1* und *Ext1*-Mutanten wurden sowohl Indizien für eine gesteigerte Matrix-Synthese als auch für eine verminderte ECM-Degradation gefunden. Beides kann zu einem Schutz der Mäuse vor OA beitragen.

4.3.1.1 Schlüsselkomponenten der perizellulären Matrix werden in *Ext1*-defizienten Zellen vermehrt synthetisiert

Die Level verschiedener Matrix-Komponenten wurden in dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht (siehe 3.2.5). Dabei zeigte sich, dass das Level von Aggrecan, dem häufigsten PG im Knorpelgewebe, im Vergleich zum umliegenden Wiltyp-Knorpel deutlich verstärkt war. Dieses Ergebnis deckt sich mit der erhöhten Färbung der Cluster mit Safranin O, welche saure PGs nachweist.

Aggrecan ist durch seine CS-Ketten maßgeblich für die mechanischen Eigenschaften des Gewebes verantwortlich und kann zudem mit einem Netzwerk anderer perizellulärer und extrazellulärer Strukturproteine interagieren. Zu diesen zählen auch die Kollagene Typ II und IX, sowie Matn-3 und -4, die ebenfalls vermehrt in den Clustern vorlagen. Col II und IX sind Teile des Kollagen-Netzwerkes und werden über Adapterproteine wie Matn mit Aggrecan-HA-Komplexen verknüpft (zusammengefasst in Klatt et al., 2011). Da die Degradation von Aggrecan und Col II ein Hauptmerkmal von OA ist, ist es möglich, dass die gesteigerte Matrix-Synthese das Gewebe lokal vor OA schützt.

Die Level für das HSPG Perlecan waren in den Clustern ebenfalls deutlich verstärkt. In normalem Gewebe kann Perlecan über seine HS-Ketten FGFs in der perizellulären Matrix binden und zur Aktivierung des FGF-Signalwegs beitragen. (Vincent et al., 2007). Aufgrund der *Ext1*-Defizienz der Zellen trägt das Perlecan der Cluster jedoch keine HS-Ketten. Diese Situation ähnelt einem Mausmodell, bei dem die HS-tragende Domäne von Perlecan deletiert wurde (*Hspg2*^{Δ3-/Δ3}). Interessanterweise waren diese Tiere vor Knorpelschäden, subchondraler Sklerose, der Bildung von Osteophyten und Synovitis geschützt (Shu et al., 2015). Der Schutz der Mäuse wurde auf Änderungen des FGF-Signalwegs und eine verminderte Expression von *Mmp3* zurückgeführt (Shu et al., 2015). Es ist daher möglich, dass die *Ext1*-defizienten Cluster, durch die fehlenden HS-Ketten, nur verminderte FGF-Signale erhalten und dies zum Schutz vor OA beiträgt. Da bereits gezeigt wurde, dass die Bindung von *Fgf-2* an HS-Ketten von *Ndst1*^{-/-}-Gewebe vermindert ist, ist dieser Mechanismus auch für die in dieser Arbeit analysierten *Ndst1*-defizienten Mäuse denkbar (Grobe et al., 2005). Dies sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Von den untersuchten Proteinen war Col XII das einzige mit verminderten Leveln. Wie auch Col IX ist Col XII ein Mitglied der FACIT (*fibril associated collagens with interrupted triple helices*) Kollagen-Familie (Oh et al., 1992). Es wird vermutet, dass es an der Vernetzung von ECM-Komponenten beteiligt ist und dadurch den Widerstand des Gewebes gegenüber Scherkräften verstärkt. Es wurde gezeigt, dass es unter anderem mit

Col I, Fibronectin, Decorin und COMP interagiert (Agarwal et al., 2013; Font et al., 1996). Über seine Funktion im Gelenkknorpel ist jedoch nur wenig bekannt. Eine Studie hat allerdings gezeigt, dass, trotz seiner möglichen Funktion bei der Vernetzung von ECM-Komponenten, die Expression von Col XII in OA-Knorpel von Patienten erhöht ist (Johnson et al., 2015). Ob dies jedoch zur Entstehung von OA beiträgt oder ein Versuch der Zellen zur Kompensation darstellt, ist unklar und sollte näher analysiert werden.

Analog zu diesen Versuchen sollte auch der Gelenkknorpel der *Ndst1* Mäusen auf eine gesteigerte Synthese von Matrix-Komponenten analysiert werden. Wie bei der Analyse der *Ext1*-defizienten Klone sollte in zukünftigen Versuchen ein Mausstamm mit einer klonalen Deletion von *Ndst1* im Knorpel verwendet werden (*Col2Cre^{ERT};Ndst^{fl/fl}*). Durch Gabe einer geringen Dosis Tamoxifen wird das Gen in nur wenigen Zellen des Gelenkknorpels inaktiviert. Dies ermöglicht es, auf einem Gewebeschnitt Wildtyp- und mutante Zellen im direkten Vergleich zu analysieren, wodurch auch mildere Änderungen detektiert werden können. Die Mauslinie und das Induktionsprotokoll wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit etabliert (siehe 8.1).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sowohl Komponenten des PG- als auch des Kollagen-Netzwerkes verstärkt vorliegen. Dies kann zum Schutz der Mäuse vor OA beitragen. Gleichzeitig ist die Zusammensetzung der ECM jedoch anders als die der umgebenden Wildtyp-Zellen, da manche Komponenten unterschiedlich stark verändert sind.

4.3.1.2 Verminderte Proteasen-Aktivität in *Ext1*- und *Ndst1*-defizientem Gelenkknorpel

In Femurkopf-Explant-Kulturen wurde untersucht, ob der Abbau von Aggrecan durch Proteasen der Mmp- und Adams-Familien verändert ist. Erste Ergebnisse zeigten, dass im GuHCl-Extrakt RA-stimulierter Femurkopfköpfe von *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* und *Ndst1^{+/-}* Mäusen weniger Mmp- und Adams-spezifische Aggrecan-Degradationsprodukte nachweisbar waren (siehe 3.2.5.2 und 3.3.2). Im Medium waren jedoch teilweise mehr Abbauprodukte detektierbar. Obwohl die Experimente wiederholt werden müssen, zeigen sie, dass möglicherweise die Aktivität der Proteasen durch eine klonale Deletion von *Ext1* oder verminderte Sulfatierungslevel reduziert wird.

Diese Ergebnisse werden durch den in *Col2Cre;Ndst^{fl/fl}* Mäusen durchgeführten Microarray bestärkt. Dieser zeigte, dass, obwohl insgesamt nur geringe Unterschiede zum Wildtyp vorlagen, interessanterweise gleich zwei Proteasen (Mmp3 und Cathepsin S), unter den zehn am stärksten negativ regulierten Genen identifiziert wurden. Beide Proteasen können ECM-Komponenten wie Kollagenfasern, PGs, Fibronectin und Elastin

degradieren (Kirschke et al., 1989). Mmp3 ist zudem an der Aktivierung anderer Proteasen beteiligt und kann so zusätzlich zum Abbau der Matrix beitragen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression beider Proteasen in OA-Proben erhöht ist (Bau et al., 2002; Hou et al., 2002). Eine verminderte Expression im Gelenkknorpel könnte daher zum Schutz der Mäuse vor OA beitragen.

Gleichzeitig wurden in der Arbeitsgruppe in einem Proteomics-Ansatz verschiedene Proteine identifiziert, die im Knorpel von *Ndst1*-heterozygoten Mäusen und Kontroll-Tieren unterschiedlich häufig vertreten waren. Der Vergleich dieser Daten mit dem Microarray ergab übereinstimmende Gene, darunter *Adams-5* und der *Myeloid-Associated Differentiation Marker* (Myadm). Diese sollten ebenfalls validiert werden und könnten so zu einem vertieften Verständnis der OA-Pathogenese beitragen.

4.3.2 Änderungen der Mechanotransduktion und Integrin-abhängiger Signalkaskaden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *Ext1* Veränderungen der ECM-Zusammensetzung verursacht. Da sich in allen Geweben des Körpers Zellen und ihre ECM wechselseitig beeinflussen, kann dies sowohl die Ursache als auch das Resultat veränderter Signale sein. Die genauen Mechanismen, die im Knorpel an der Transduktion mechanischer Signale aus der Matrix in der Zelle beteiligt sind, sind nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass verschiedene Ionenkanäle, wie z. B. der in artikulären Chondrozyten stark exprimierte Kanal *transient receptor potential vanilloid 4* (TRPV4), eine Funktion bei diesem Prozess übernehmen. Sie können unter anderem durch Druck auf die Zelle, welcher die Zellmembran dehnt, geöffnet werden und so der Wahrnehmung mechanischer Belastungen dienen. Aber auch Adapterproteine, welche die Zelle mit der perizellulären Matrix verbinden, wie die Integrine, sind an der Mechanotransduktion beteiligt (Loeser, 2014). Da Deletion von $\alpha 10$ - oder $\beta 1$ -Integrin die Organisation von Chondrozyten stört und dies dem unorganisierten Phänotyp der *Ext1*-defizienten Zellen ähnelt, wurde in dieser Arbeit eine mögliche Aktivierung Integrin-abhängiger Signalkaskaden untersucht (Aszodi et al., 2003; Raducanu et al., 2009).

Integrine sind heterodimere transmembran-Rezeptoren, die aus einer von 18 verschiedenen α - und einer von acht β -Untereinheiten bestehen. Durch nicht-kovalente Dimerisierung der α - und β -Untereinheiten in 24 verschiedenen Kombinationen wird die Spezifität der Bindung der Liganden vermittelt. Mit ihrer extrazellulären Domäne binden sie an ihre Liganden, während sie intrazellulär einen Kontakt zu verschiedenen Proteinen herstellen und so die Signale weiterleiten. Im Gelenkknorpel interagieren Integrine unter anderem

mit Fibronectin, Col II und Col VI und regulieren so Proliferation, Überleben, Differenzierung und Matrix-Homöostase (zusammengefasst in Alam et al., 2007).

Die Aktivierung von Integrinen durch die Bindung von ECM-Komponenten rekrutiert intrazellulär Tyrosinkinasen wie c-Src oder FAK. FAK wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Dies führt unter anderem zur Aktivierung von Proteinen der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Familie, zu der auch *extracellular-signal regulated kinase* (ERK), JNK und p38 gehören. Diese sind *downstream* an der Regulation von Zielgenen beteiligt. Je nach Kontext kann dies sowohl anabolisch als auch katabolisch wirken (Legate et al., 2009).

Immunhistochemische Analysen zeigten, dass in *Ext1*-defizienten Clustern FAK, pFAK und pERK deutlich stärker nachweisbar waren als im umliegenden Gewebe, was auf aktivierte Integrin-Signale hindeutet (siehe 3.2.6). Welche Integrine daran beteiligt sind und welche Auswirkungen dies für die Zellen hat, sollte in zukünftigen Versuchen überprüft werden.

4.3.3 Putativ veränderte Signalwege in *Ext1*- und *Ndst1*-defizientem Knorpelgewebe

An der veränderten Balance zwischen Auf- und Abbau des Knorpels können neben einer veränderten Mechanotransduktion auch verschiedene Signalwege, wie FGF, HH oder BMP, beteiligt sein. Wegen der Vielzahl der Interaktionen von HS mit Wachstumsfaktoren, ihren Inhibitoren und Rezeptoren ist es jedoch wahrscheinlich, dass mehrere Signalwege und Mechanismen gleichzeitig am Schutz der Mäuse vor OA beteiligt sind.

4.3.3.1 Verminderte durch HSPGs vermittelte FGF-Signale können den Knorpel schützen

Es ist durch verschiedene Studien belegt, dass HSPGs durch Bindung von FGFs auf der Zelloberfläche als Co-Rezeptor fungieren und daher FGF-Signale verstärken können (Rapraeger et al., 1991; Yayon et al., 1991). Die Wirkung der FGFs hängt dabei unter anderem von den von der Zelle exprimierten FGF-Rezeptoren (FGFR) ab. Dies sind im Knorpel vor allem der eher katabolisch wirkende FGFR1 und der eher anabole FGFR3 (Yan et al., 2011). In der Maus schützt daher die Deletion von *Fgfr1* vor Knorpelschäden durch induzierte OA, während die Deletion von *Fgfr3* zu einer gesteigerten Knorpel-Erosion führt. (Valverde-Franco et al., 2006; Weng et al., 2012).

Da HS-Ketten als Co-Rezeptor für FGF-Signale wirken, ist es wahrscheinlich, dass sowohl in den *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* Mäusen als auch in den *Ndst1*-defizienten Mäusen verminderte FGF-Signale vorliegen. In weiteren Versuchen sollte daher analysiert werden,

welche Rezeptoren für Fgfs in den Mutanten exprimiert werden und ob veränderte FGF-Signale am Schutz der Mäuse vor OA beteiligt sind.

4.3.3.2 BMP-Signale können im Knorpel anabolisch und katabolisch wirken

Auch der BMP-Signalweg kann die Entstehung von OA beeinflussen. Die BMPs bilden die größte Gruppe innerhalb der *transforming growth factor β* Superfamilie und wurden ursprünglich durch ihre Fähigkeit, Knorpel- und Knochenbildung zu induzieren, identifiziert. Neben ihrer Funktion bei der Knochenbildung sind sie jedoch auch an der Regulation vieler anderer biologischer Prozesse beteiligt. Ähnlich wie bei den FGFs können HS-Ketten die biologische Aktivität von BMPs verstärken, indem sie BMPs binden und ihren Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentieren (Takada et al., 2003). Gleichzeitig sind HSPGs an der Regulation der Diffusion und Lokalisation der BMPs im Gewebe beteiligt. (Matsumoto et al., 2010).

Im Gelenkknorpel können sie einerseits die Synthese von ECM stimulieren und so vor OA schützen. (Chubinskaya et al., 2008). Zudem führt in Mäusen die Inhibition von BMP-Signalen durch Überexpression des Inhibitors Noggin zu verstärkter experimenteller OA, während Noggin-Haploinsuffizienz vor Knorpelschäden schützt (Lories et al., 2006). Im Gegensatz dazu fördern BMP-2 und -4 die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten und damit die Expression von MMP13, wodurch ein Fortschreiten der Erkrankung beschleunigt werden kann. Ob die BMPs eher anabolisch oder katabolisch wirken, hängt daher vermutlich stark vom Kontext ab (van der Kraan et al., 2010).

Insgesamt ist denkbar, dass in den in dieser Arbeit analysierten Mausstämmen veränderte BMP-Signale vorliegen. Aufgrund der fehlenden HS-Ketten bzw. der verminderten Sulfatierung sind die BMP-Signale vermutlich abgeschwächt. Dies sollte jedoch experimentell überprüft werden, beispielsweise durch die Analyse von pSMADs.

4.3.3.3 Der HH-Signalweg kann die Degradation von ECM und OA-Entstehung fördern

Ihh ist ein Morphogen, das konzentrationsabhängig über weite Strecken hinweg die Differenzierung von Zellen reguliert. In der enchondralen Ossifikation wird Ihh von prähypertrophen Chondrozyten synthetisiert und reguliert die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten. Zudem scheinen HH-Signale auch bei dem Erhalt des Gelenkknorpels von Bedeutung zu sein. So ist in humanem OA-Gewebe die Expression von IHH verstärkt. Dies fördert die Hypertrophie der artikulären Chondrozyten und damit die Expression von MMP13 (Wei et al., 2012). In der Maus schwächt die Inhibition des HH-Signalwegs durch Gabe eines Inhibitors oder die postnatale Deletion von *Ihh* in

Chondrozyten daher die Entstehung von chirurgisch induzierter OA ab (Lin et al., 2009; Zhou et al., 2014). Dies ist mit einer verminderten Expression von Mmp13 und Col X sowie einer erhöhten Expression von Col II und Aggrecan verbunden.

Die Funktion von HH als Signalmolekül ist von der Interaktion mit HSPGs abhängig (Bellaïche et al., 1998; Koziel et al., 2004). Dabei regulieren HSPGs nicht nur den HH-Transport durch das Gewebe, sondern sind auch an der Sekretion des Morphogens durch die signalisierenden Zellen und an der Rezeption auf der empfangenden Zelle beteiligt (zusammengefasst in Bandari et al., 2015). In den HS-Mutanten liegen daher eventuell verminderte HH-Signale vor.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sowohl die klonale Deletion von *Ext1* als auch die Deletion von *Ndst1* vor der Entstehung von OA schützen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Deletion von *Syndecan-4* und die Expression eines mutanten Perlecans ebenfalls vor OA schützen, während *Sulf1*- oder *-2*-defiziente Tiere verstärkt OA entwickeln (Echtermeyer et al., 2009; Otsuki et al., 2010). In Kombination mit den hier gewonnenen Daten scheinen verminderte HS-Level und/oder Gesamt-Sulfatierung einen chondroprotektiven Effekt zu haben, während eine vermehrte Sulfatierung mit einer erhöhten Anfälligkeit für OA korreliert.

Bei näherer Analyse der HS-Ketten von *Ndst1* und *Sulf1*- und *-2*-defizienten Mäusen wird jedoch deutlich, dass nicht nur die Gesamt-Sulfatierung verändert ist, sondern dass sich auch das Sulfatierungsmuster unterscheidet. Während bei *Sulf1*- oder *-2*-defizienten Mäusen hauptsächlich die 6O-Sulfatierung verstärkt vorliegt, ist diese bei Deletion von *Ndst1* nur wenig verändert (Lamanna et al., 2006). Stattdessen sind vor allem die N-Sulfatierung und 2O-Sulfatierung vermindert (Grobe et al., 2005; Ledin et al., 2004). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob neben dem Sulfatierungslevel auch die Position der Sulfatierung die OA-Entstehung beeinflusst.

Um dies näher zu analysieren wäre es hilfreich, Mäuse mit Deletionen in anderen HS-modifizierenden Enzymen, wie HSEpi oder HS2ST, zu untersuchen. Da HSEpi die einzige C5-Epimerase bei der HS-Synthese ist, erzeugen *HSEpi*-defiziente Zellen HS-Ketten ohne IdoA. Da IdoA zudem das Substrat für die HS2ST darstellt, ist auch die 2O-Sulfatierung stark vermindert, die 6O-Sulfatierung ist jedoch erhöht (Dierker et al., 2015; Li et al., 2003). Bei HS2ST-defizienten Mäusen sind ähnliche Änderungen des Sulfatierungsmusters vorhanden. Auch in diesen Mäusen ist die 2O-Sulfatierung vermindert und die 6O-Sulfatierung erhöht, wodurch eine Verminderung der Gesamt-

Sulfatierung kompensiert wird (Merry et al., 2001). Aufgrund der verstärkten Sulfatierung an der 6O-Position ist es denkbar, dass auch Tiere dieser Mauslinie, ähnlich wie die *Sulfl* und -2-defizienten Mäuse, vermehrt OA entwickeln. Gleichzeitig ließe sich auf diesem Weg die Funktion der 2O-Sulfatierung näher untersuchen.

Interessanterweise führt die Deletion HS-modifizierender Enzyme je nach Gewebe zu teilweise sehr spezifischen und starken Phänotypen, wie Fehlbildungen des Gehirns (Ndst1) oder die fehlende Entstehung von Nieren (HSEpi, HS2ST), während die Defekte in der Knorpelentwicklung nur verhältnismäßig mild sind (Bullock et al., 1998; Grobe et al., 2005; Li et al., 2003, unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Dies könnte bedeuten, dass Chondrozyten generell weniger anfällig für Änderungen des Sulfatierungsmusters sind. Eventuell können Chondrozyten eine veränderte HS-Sulfatierung aber auch besser kompensieren als andere Gewebe, beispielsweise durch die vermehrte Synthese von CS, das im Knorpelgewebe besonders hoch exprimiert und ebenfalls sulfatiert ist.

Zusammengefasst wird also deutlich, dass HS-Ketten wichtige Regulatoren der Knorpelhomöostase sind. Zu einem näheren Verständnis der Auswirkungen spezifischer Modifikationen auf die Bindung und Regulation von Signalmolekülen und Proteasen ist jedoch weitere Forschung erforderlich. Insgesamt hat diese Arbeit jedoch gezeigt, dass sowohl Level als auch Sulfatierung der HS-Ketten zum Erhalt des Knorpels beitragen und den Krankheitsverlauf von OA beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Arthrose (*osteoarthritis*, OA) ist eine der häufigsten degenerative Erkrankung des Skelettsystems des Menschen. Sie bezeichnet einen über das durch normale Alterungsprozesse hervorgerufene Maß hinausgehenden Gelenkverschleiß. Auf molekularer Ebene wird OA durch eine gestörte Balance zwischen Auf- und Abbau der Knorpel-Matrix charakterisiert. Durch die Degradation des Knorpels kann die Erkrankung zu einem Verlust der Gelenkfunktion und chronischen Schmerzen führen. Neuere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass Heparansulfat Proteoglykane (HSPGs) an der Regulation von OA beteiligt sind. HSPGs bestehen aus einem *core*-Protein, das eine oder mehrere lineare Zuckerketten trägt. Die Zucker können durch verschiedene Sulfotransferasen und eine Epimerase modifiziert werden. Die gewebespezifische Expression dieser Enzyme beeinflusst sowohl Level als auch Muster der Sulfatierung. Dadurch wird die Affinität der Heparansulfat (HS)-Ketten zu zahlreichen extrazellulären Proteinen reguliert.

In dieser Arbeit wurde die Funktion verminderter HS-Level und Sulfatierung auf die Knorpelhomöostase untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mausstämme mit Mutationen in Genen, die an der HS-Synthese oder Modifikation beteiligt sind, analysiert. Ausgangspunkt war dabei die Beobachtung von Läsionen im Gelenkknorpel von Mäusen mit einer klonalen Deletion der Glycosyltransferase *Ext1* (*Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}*). Die Zellen innerhalb dieser Läsionen sind stark vergrößert und grenzen sich vom umliegenden Gewebe durch die Produktion einer Proteoglykan (PG)-reichen Matrix ab. In früheren Studien wurden diese Zellen als hypertrophe Chondrozyten und damit als Anzeichen für OA gedeutet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Läsionen aus *Ext1*-defizienten Zellen bestehen. Im Gegensatz zur früheren Hypothese exprimieren die Zellen kein Kollagen Typ X, einen Marker für hypertrophe Chondrozyten. Zudem ähneln sie auch histologisch eher tiefen Zellen der Radiärzone des Gelenkknorpels. Demnach handelt es sich nicht um typische hypertrophe Chondrozyten, wie sie in der Wachstumsfuge vorliegen. Gleichzeitig zeigte sich, dass die *Ext1*-defizienten Cluster nicht zu einer verstärkten Entwicklung von spontaner OA führen, sondern davor schützen.

Neben dem Schutz vor OA wurden zusätzliche Unterschiede zur Kontrolle festgestellt. Die Wachstumsfuge der mutanten Mäuse schloss sich und das Volumen des trabekulären Knochens war vermindert, vermutlich auf Grund einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität. In der Wachstumsfuge wurden zudem Klone *Ext1*-defizienter Zellen identifiziert, die eine gestörte Orientierung aufweisen. Dies könnte auf Änderungen im *planar cell polarity*-Signalweg hindeuten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen der HSPGs auf die OA-Pathogenese näher untersucht. Dazu wurde zuerst eine OP zur chirurgischen Induktion von OA in Mäusen etabliert. Anschließend wurden zwei Mausstämme mit einer verminderten HS-Synthese (*Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* und *Ext1^{+/-}*) und zwei Mausstämme mit einem verminderten Sulfatierungslevel (*Col2Cre;Ndst1^{fl/fl}* und *Ndst1^{+/-}*) untersucht. Es zeigte sich, dass die klonale Deletion von *Ext1* auch vor chirurgisch induzierter OA schützt, während die Verminderung der HS-Level in *Ext1^{+/-}* Mäusen zu keinem detektierbaren Unterschied führte. Dies lässt sich eventuell damit erklären, dass die HS-Level durch eine Dosis-Kompensation nicht ausreichend reduziert wurden, um einen Unterschied zur Kontrolle hervorzurufen. Die Stämme mit Mutationen im *Ndst1*-Gen waren dagegen beide vor OA geschützt.

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die zu dem Schutz vor OA führen, wurde sowohl die Synthese von Matrixproteinen als auch die Degradation von Aggrecan durch Proteasen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die *Ext1*-defizienten Cluster verschiedene strukturelle Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Aggrecan, Perlecan, Col II, Matn-3 und -4, verstärkt synthetisieren. Dies deutet darauf hin, dass in den Zellen anabolische Signalwege aktiviert sind. Gleichzeitig deuten erste Versuche an Femurkopf-Explant-Kulturen darauf hin, dass die Degradation von Aggrecan durch Proteasen der Mmp und Adams-Familien sowohl in den *Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* als auch den *Ndst1*-defizienten Mäusen vermindert ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen eines Microarrays, in dem ein Expressionsprofil von *Ndst1*-defizientem Gelenkknorpel erstellt wurde. In diesem Array waren mit *Mmp3* und *Cathepsin S* gleich zwei Proteasen unter den zehn in den Mutanten am stärksten negativ regulierten Genen. Dies könnte die Degradation von Aggrecan und Kollagenfasern vermindern.

Eine mögliche Ursache für die geänderte Balance zwischen Knorpel Auf- und Abbau liegt in einer veränderten Mechanotransduktion der mutanten Zellen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen wurden Hinweise gefunden, dass in den *Ext1*-defizienten Klonen Integrin-abhängige Signalkaskaden aktiviert sind. Ob und wie andere Signalwege in den Schutz der mutanten Mäuse vor OA involviert sind sollte in zukünftigen Studien analysiert werden.

6 Abstract

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative joint disease mostly affecting elderly patients. It is characterized by unbalanced degradation and regeneration of cartilage matrix leading to a loss of joint function accompanied by chronic pain. The pathogenesis of OA is influenced by several factors, including heparan sulfate proteoglycans (HSPGs). HSPGs consist of long, linear polysaccharide chains attached to a core protein. The sugar chains are modified by different sulfotransferases and one epimerase. These enzymes determine the tissue-specific degree and pattern of HS sulfation, thereby influencing the affinity of these chains to interacting proteins. In this study we investigated the function of heparan sulfate (HS) level and structure in articular cartilage maintenance. Towards this aim, we analyzed healthy and OA tissue of transgenic mice deficient in different HS-synthesizing or -modifying enzymes.

In a previous study, lesions in the articular cartilage of mice carrying a clonal deletion of the glycosyltransferase *Ext1* were detected. The lesions consist of enlarged cells that are separated from the surrounding tissue due to the production of a proteoglycan (PG)-rich matrix. Based on their phenotype, those cells have been interpreted as hypertrophic chondrocytes and therefore as signs of early OA. This thesis provides evidence, that in contrast to this hypothesis, the lesions consist of *Ext1*-deficient cells, resemble deep articular chondrocytes adjacent to the tidemark and are negative for the hypertrophic marker Collagen X. Analyses of ageing mice unexpectedly revealed, that in contrast to previous assumptions the clusters protect against OA. In addition to the articular cartilage phenotype, an advancing growth plate closure and trabecular bone loss was discovered. This might be explained by an increased osteoclast activity. Inside the growth plate, clones of *Ext1*-negative cells were detected. Their disorganized phenotype points to disturbances of the planar cell polarity pathway.

To investigate the influence of altered HS levels and structure on OA development a surgical model of OA in mice was established. Using this model, two mouse strains with decreased HS levels (*Col2-rtTA-Cre;Ext1^{fl/fl}* and *Ext1^{+/-}*) and two strains with decreased HS sulfation (*Ndst1^{+/-}* and *Col2Cre;Ndst1^{fl/f}*) were analyzed. While the clonal deletion of *Ext1* protected against OA development, no differences could be detected in *Ext1^{+/-}* mice. It is possible, that the reduction of HS levels induced by *Ext1*-heterozygosity is not sufficient to influence OA progression. In contrast to this, both *Ndst1*-deficient mouse strains were protected against OA.

To elucidate the molecular mechanisms underlying the protection against OA, cartilage matrix synthesis and degradation were investigated. Interestingly, the levels of specific matrix structural components like Aggrecan, Col II, Matn-3 and 4 were increased in the pericellular matrix surrounding *Ext1*-deficient clusters. This indicates an activation of anabolic pathways in those cells.

Moreover, preliminary results indicate a decreased protease activity in cartilage explant cultures of *Ext1* and *Ndst1* mutants. In those cultures, reduced levels of Mmp and Adams specific Aggrecan Neo-epitopes were detected. In addition, a microarray analysis of *Ndst1*-deficient articular cartilage identified the proteases Mmp3 and Cathepsin S among the ten most strongly-repressed genes.

Hypothetically the shifted balance between anabolic and catabolic pathways could be explained by altered mechano-transduction pathways. Immunohistochemical analysis of *Ext1*-deficient clusters showed that integrin-dependent signaling cascades might be activated in the mutant cells. Future studies should elucidate how the reduced HS levels or the altered sulfation patterns participate in regulating those pathways and how this influences OA pathogenesis.

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, P., Schulz, J.N., Blumbach, K., Andreasson, K., Heinegard, D., Paulsson, M., Mauch, C., Eming, S.A., Eckes, B., Krieg, T.**, 2013. Enhanced deposition of cartilage oligomeric matrix protein is a common feature in fibrotic skin pathologies. *Matrix Biol* 32, 325-331.
- Ahn, J., Ludecke, H.J., Lindow, S., Horton, W.A., Lee, B., Wagner, M.J., Horsthemke, B., Wells, D.E.**, 1995. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 11, 137-143.
- Alam, N., Goel, H.L., Zarif, M.J., Butterfield, J.E., Perkins, H.M., Sansoucy, B.G., Sawyer, T.K., Languino, L.R.**, 2007. The integrin-growth factor receptor duet. *J Cell Physiol* 213, 649-653.
- Archer, C.W., Dowthwaite, G.P., Francis-West, P.**, 2003. Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 144-155.
- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., Fassler, R.**, 2003. Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev* 17, 2465-2479.
- Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E.S.-B., K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzinger, L., Zilch, H.G.**, 2014. *Duale Reihe - Anatomie*, 3. Auflage. Thieme. 363-377.
- Bandari, S., Exner, S., Ortmann, C., Bachvarova, V., Vortkamp, A., Grobe, K.**, 2015. Sweet on Hedgehogs: regulatory roles of heparan sulfate proteoglycans in Hedgehog-dependent cell proliferation and differentiation. *Curr Protein Pept Sci* 16, 66-76.
- Bau, B., Gebhard, P.M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., Aigner, T.**, 2002. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 46, 2648-2657.
- Bellaiche, Y., The, I., Perrimon, N.**, 1998. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394, 85-88.
- Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H., Poole, A.R.**, 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99, 1534-1545.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D.**, 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030-1037.
- Buckwalter, J.A., Martin, J.A., Brown, T.D.**, 2006. Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology* 43, 603-609.
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S., Wilson, V.A.**, 1998. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12, 1894-1906.
- Bulow, H.E., Hobert, O.**, 2006. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 375-407.
- Caplan, A.I., Pechak, D.G.**, 1987. *The cellular and molecular embryology of bone formation*, 5. Ausgabe. Elsevier Science Publishers. 117-183.
- Carvalho, L., Munoz, R., Bustos, F., Escobedo, N., Carrasco, H., Olivares, G., Larrain, J.**, 2010. Non-canonical Wnt signaling induces ubiquitination and degradation of Syndecan4. *J Biol Chem* 285, 29546-29555.

- Chia, S.L., Sawaji, Y., Burleigh, A., McLean, C., Inglis, J., Saklatvala, J., Vincent, T.,** 2009. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 60, 2019-2027.
- Chubinskaya, S., Segalite, D., Pikovsky, D., Hakimiyan, A.A., Rueger, D.C.,** 2008. Effects induced by BMPS in cultures of human articular chondrocytes: comparative studies. *Growth Factors* 26, 275-283.
- Craig, F.M., Bentley, G., Archer, C.W.,** 1987. The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development* 99, 383-391.
- de Andrea, C.E., Wiweger, M., Prins, F., Bovee, J.V., Romeo, S., Hogendoorn, P.C.,** 2010. Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Lab Invest* 90, 1091-1101.
- Decker, R.S., Koyama, E., Enomoto-Iwamoto, M., Maye, P., Rowe, D., Zhu, S., Schultz, P.G., Pacifici, M.,** 2014. Mouse limb skeletal growth and synovial joint development are coordinately enhanced by Kartogenin. *Dev Biol* 395, 255-267.
- Dierker, T., Bachvarova, V., Krause, Y., Li, J.P., Kjellen, L., Seidler, D.G., Vortkamp, A.,** 2015. Altered heparan sulfate structure in Glce mice leads to increased Hedgehog signaling in endochondral bones. *Matrix Biol.*
- Dreier, R.,** 2010. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* 12, 216.
- Echtermeyer, F., Bertrand, J., Dreier, R., Meinecke, I., Neugebauer, K., Fuerst, M., Lee, Y.J., Song, Y.W., Herzog, C., Theilmeier, G., Pap, T.,** 2009. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med* 15, 1072-1076.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E., Derynck, R.,** 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80, 371-378.
- Esko, J.D., Lindahl, U.,** 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 108, 169-173.
- Esko, J.D., Selleck, S.B.,** 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 71, 435-471.
- Flannery, C.R., Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L.A., Chockalingam, P.S., Hebert, T., Mackie, S.A., McDonagh, T., Crawford, T.K., Tomkinson, K.N., LaVallie, E.R., Morris, E.A.,** 2002. Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *J Biol Chem* 277, 42775-42780.
- Font, B., Eichenberger, D., Rosenberg, L.M., van der Rest, M.,** 1996. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol* 15, 341-348.
- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., Kjellen, L.,** 1999. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400, 773-776.
- Gardner, E., O'Rahilly, R.,** 1968. The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 102, 289-299.
- Gendron, C., Kashiwagi, M., Lim, N.H., Enghild, J.J., Thogersen, I.B., Hughes, C., Catterson, B., Nagase, H.,** 2007. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem* 282, 18294-18306.

- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., Majumdar, M.K., Morris, E.A.**, 2005. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434, 644-648.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B.A., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Kanki, K., Wang, E., Peluso, D., Yang, Z., Majumdar, M.K., Morris, E.A.**, 2004. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 50, 2547-2558.
- Glasson, S.S., Chambers, M.G., Van Den Berg, W.B., Little, C.B.**, 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S17-23.
- Grobe, K., Inatani, M., Pallerla, S.R., Castagnola, J., Yamaguchi, Y., Esko, J.D.**, 2005. Cerebral hypoplasia and craniofacial defects in mice lacking heparan sulfate Ndst1 gene function. *Development* 132, 3777-3786.
- Groma, G., Grskovic, I., Schael, S., Ehlen, H.W., Wagener, R., Fosang, A., Aszodi, A., Paulsson, M., Brachvogel, B., Zaucke, F.**, 2011. Matrilin-4 is processed by ADAMTS-5 in late Golgi vesicles present in growth plate chondrocytes of defined differentiation state. *Matrix Biol* 30, 275-280.
- Grover, J., Roughley, P.J.**, 2006. Generation of a transgenic mouse in which Cre recombinase is expressed under control of the type II collagen promoter and doxycycline administration. *Matrix Biol* 25, 158-165.
- Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R.L., Kimata, K.**, 2007. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *J Biol Chem* 282, 15578-15588.
- Han, L., Grodzinsky, A.J., Ortiz, C.**, 2011. Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. *Annu Rev Mater Res* 41, 133-168.
- Hashimoto, G., Aoki, T., Nakamura, H., Tanzawa, K., Okada, Y.**, 2001. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett* 494, 192-195.
- Hennekam, R.C.**, 1991. Hereditary multiple exostoses. *J Med Genet* 28, 262-266.
- Hering, T.M., Kazmi, N.H., Huynh, T.D., Kollar, J., Xu, L., Hunyady, A.B., Johnstone, B.**, 2004. Characterization and chondrocyte differentiation stage-specific expression of KRAB zinc-finger protein gene ZNF470. *Exp Cell Res* 299, 137-147.
- Hill, M.A.**, 2016a. Embryology Articular cartilage.jpg, Zugriff am 20. Januar 2016, https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Articular_cartilage.jpg
- Hill, M.A.**, 2016b. Embryology Cartilage Histology 005.jpg. Zugriff am 20. Januar 2016 von https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Cartilage_histology_005.jpg.
- Holder, N.**, 1977. An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. *J Embryol Exp Morphol* 39, 115-127.
- Horton, W.A.**, 1993. In vitro chondrogenesis in human chondrodysplasias. *Am J Med Genet* 45, 179-182.
- Hou, W.S., Li, W., Keyszer, G., Weber, E., Levy, R., Klein, M.J., Gravallesse, E.M., Goldring, S.R., Bromme, D.**, 2002. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 46, 663-674.

- Huegel, J., Mundy, C., Sgariglia, F., Nygren, P., Billings, P.C., Yamaguchi, Y., Koyama, E., Pacifici, M., 2013.** Perichondrium phenotype and border function are regulated by *Ext1* and heparan sulfate in developing long bones: a mechanism likely deranged in Hereditary Multiple Exostoses. *Dev Biol* 377, 100-112.
- Hyde, G., Boot-Handford, R.P., Wallis, G.A., 2008.** *Col2a1* lineage tracing reveals that the meniscus of the knee joint has a complex cellular origin. *J Anat* 213, 531-538.
- Iozzo, R.V., Schaefer, L., 2015.** Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42, 11-55.
- Johnson, K., Reynard, L.N., Loughlin, J., 2015.** Functional characterisation of the osteoarthritis susceptibility locus at chromosome 6q14.1 marked by the polymorphism rs9350591. *BMC Med Genet* 16, 81.
- Jones, K.B., Piombo, V., Searby, C., Kurriger, G., Yang, B., Grabellus, F., Roughley, P.J., Morcuende, J.A., Buckwalter, J.A., Capecchi, M.R., Vortkamp, A., Sheffield, V.C., 2010.** A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of *Ext1* in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2054-2059.
- Kamekura, S., Kawasaki, Y., Hoshi, K., Shimoaka, T., Chikuda, H., Maruyama, Z., Komori, T., Sato, S., Takeda, S., Karsenty, G., Nakamura, K., Chung, U.I., Kawaguchi, H., 2006.** Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 54, 2462-2470.
- Kaneko, H., Ishijima, M., Futami, I., Tomikawa-Ichikawa, N., Kosaki, K., Sadatsuki, R., Yamada, Y., Kurosawa, H., Kaneko, K., Arikawa-Hirasawa, E., 2013.** Synovial perlecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis. *Matrix Biol* 32, 178-187.
- Kato, K., Nakajima, K., Ui, A., Muto-Terao, Y., Ogiwara, H., Nakada, S., 2014.** Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. *Mol Cell* 53, 617-630.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., Rinne, A., 1989.** Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* 264, 467-473.
- Klatt, A.R., Becker, A.K., Neacsu, C.D., Paulsson, M., Wagener, R., 2011.** The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 320-330.
- Koyama, E., Shibukawa, Y., Nagayama, M., Sugito, H., Young, B., Yuasa, T., Okabe, T., Ochiai, T., Kamiya, N., Rountree, R.B., Kingsley, D.M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M., 2008.** A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol* 316, 62-73.
- Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O.G., Vortkamp, A., 2004.** *Ext1*-dependent heparan sulfate regulates the range of *Ihh* signaling during endochondral ossification. *Dev Cell* 6, 801-813.
- Kronenberg, H.M., 2003.** Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336.
- Lamanna, W.C., Baldwin, R.J., Padva, M., Kalus, I., Ten Dam, G., van Kuppevelt, T.H., Gallagher, J.T., von Figura, K., Dierks, T., Merry, C.L., 2006.** Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochem J* 400, 63-73.
- Lark, M.W., Bayne, E.K., Flanagan, J., Harper, C.F., Hoerrner, L.A., Hutchinson, N.I., Singer, II, Donatelli, S.A., Weidner, J.R., Williams, H.R., Mumford, R.A.,**

- Lohmander, L.S.**, 1997. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 100, 93-106.
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J.P., Gotte, M., Selleck, S., Kjellen, L., Spillmann, D.**, 2004. Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J Biol Chem* 279, 42732-42741.
- Legate, K.R., Wickstrom, S.A., Fassler, R.**, 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 23, 397-418.
- Legeai-Mallet, L., Munnich, A., Maroteaux, P., Le Merrer, M.**, 1997. Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses. *Clin Genet* 52, 12-16.
- Li, J.P., Gong, F., Hagner-McWhirter, A., Forsberg, E., Abrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X., Lindahl, U.**, 2003. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem* 278, 28363-28366.
- Li, Y., Dudley, A.T.**, 2009. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* 136, 1083-1092.
- Lin, A.C., Seeto, B.L., Bartoszko, J.M., Khoury, M.A., Whetstone, H., Ho, L., Hsu, C., Ali, S.A., Alman, B.A.**, 2009. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med* 15, 1421-1425.
- Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.D., Wells, D.E., Matzuk, M.M.**, 2000. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224, 299-311.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., Lidholt, K.**, 1998. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273, 26265-26268.
- Linsenmayer, T.F., Chen, Q.A., Gibney, E., Gordon, M.K., Marchant, J.K., Mayne, R., Schmid, T.M.**, 1991. Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development* 111, 191-196.
- Little, C.B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S.M., Fosang, A.J., Werb, Z., Shah, M., Thompson, E.W.**, 2009. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 60, 3723-3733.
- Little, C.B., Meeker, C.T., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Farmer, P.J., Smith, S.M., Fosang, A.J.**, 2007. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest* 117, 1627-1636.
- Little, C.B., Mittaz, L., Belluoccio, D., Rogerson, F.M., Campbell, I.K., Meeker, C.T., Bateman, J.F., Pritchard, M.A., Fosang, A.J.**, 2005. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum* 52, 1461-1472.
- Loeser, R.F.**, 2014. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol* 39, 11-16.
- Lories, R.J., Daans, M., Derese, I., Matthys, P., Kasran, A., Tylzanowski, P., Ceuppens, J.L., Luyten, F.P.**, 2006. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 1736-1746.
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., Kronenberg, H.M.**, 2010. Osteoblast precursors, but not mature

- osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 19, 329-344.
- Matsumoto, K., Irie, F., Mackem, S., Yamaguchi, Y.,** 2010. A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for *Ext1* loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10932-10937.
- Matsumoto, K., Li, Y., Jakuba, C., Sugiyama, Y., Sayo, T., Okuno, M., Dealy, C.N., Toole, B.P., Takeda, J., Yamaguchi, Y., Kosher, R.A.,** 2009. Conditional inactivation of *Has2* reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development* 136, 2825-2835.
- Merry, C.L., Bullock, S.L., Swan, D.C., Backen, A.C., Lyon, M., Beddington, R.S., Wilson, V.A., Gallagher, J.T.,** 2001. The molecular phenotype of heparan sulfate in the *Hs2st*^{-/-} mutant mouse. *J Biol Chem* 276, 35429-35434.
- Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., Geoghegan, K.F., Hambor, J.E.,** 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97, 761-768.
- Mitrovic, D.R.,** 1977. Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am J Anat* 150, 333-347.
- Mundy, C., Yasuda, T., Kinumatsu, T., Yamaguchi, Y., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Koyama, E., Pacifici, M.,** 2011. Synovial joint formation requires local *Ext1* expression and heparan sulfate production in developing mouse embryo limbs and spine. *Dev Biol* 351, 70-81.
- Nagase, H.,** 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378, 151-160.
- Nakamura, E., Nguyen, M.T., Mackem, S.,** 2006. Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton. *Dev Dyn* 235, 2603-2612.
- Nalin, A.M., Greenlee, T.K., Jr., Sandell, L.J.,** 1995. Collagen gene expression during development of avian synovial joints: transient expression of types II and XI collagen genes in the joint capsule. *Dev Dyn* 203, 352-362.
- Neuhold, L.A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M.L., Warner, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billingham, C., Meijers, T., Poole, A.R., Babij, P., DeGennaro, L.J.,** 2001. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 107, 35-44.
- Niehrs, C.,** 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 767-779.
- Nishida, Y., Shinomura, T., Iwata, H., Miura, T., Kimata, K.,** 1994. Abnormal occurrence of a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2, 43-49.
- Oh, S.P., Taylor, R.W., Gerecke, D.R., Rochelle, J.M., Seldin, M.F., Olsen, B.R.,** 1992. The mouse alpha 1(XII) and human alpha 1(XII)-like collagen genes are localized on mouse chromosome 9 and human chromosome 6. *Genomics* 14, 225-231.
- Ortega, N., Behonick, D.J., Werb, Z.,** 2004. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14, 86-93.
- Otsuki, S., Hanson, S.R., Miyaki, S., Grogan, S.P., Kinoshita, M., Asahara, H., Wong, C.H., Lotz, M.K.,** 2010. Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by

- regulating BMP and FGF signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10202-10207.
- Otsuki, S., Taniguchi, N., Grogan, S.P., D'Lima, D., Kinoshita, M., Lotz, M.,** 2008. Expression of novel extracellular sulfatases Sulf-1 and Sulf-2 in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 10, R61.
- Pacifici, M., Koyama, E., Shibukawa, Y., Wu, C., Tamamura, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M.,** 2006. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 74-86.
- Pallerla, S.R., Pan, Y., Zhang, X., Esko, J.D., Grobe, K.,** 2007. Heparan sulfate Ndst1 gene function variably regulates multiple signaling pathways during mouse development. *Dev Dyn* 236, 556-563.
- Pedrini, E., Jennes, I., Tremosini, M., Milanesi, A., Mordenti, M., Parra, A., Sgariglia, F., Zuntini, M., Campanacci, L., Fabbri, N., Pignotti, E., Wuyts, W., Sangiorgi, L.,** 2011. Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *J Bone Joint Surg Am* 93, 2294-2302.
- Piombo, V.,** 2010. Analysis of Heparan Sulfate role in bone development and Multiple Osteochondromas syndrome, Doktorarbeit, Essen
- Pitsillides, A.A., Ashhurst, D.E.,** 2008. A critical evaluation of specific aspects of joint development. *Dev Dyn* 237, 2284-2294.
- Prehm, P., Schumacher, U.,** 2004. Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters. *Biochem Pharmacol* 68, 1401-1410.
- Rabenberg,** 2013. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Arthrose. Robert Koch-Institut, Berlin.
- Raducanu, A., Hunziker, E.B., Drosse, I., Aszodi, A.,** 2009. Beta1 integrin deficiency results in multiple abnormalities of the knee joint. *J Biol Chem* 284, 23780-23792.
- Randall, R.M., Shao, Y.Y., Wang, L., Ballock, R.T.,** 2012. Activation of Wnt Planar Cell Polarity (PCP) signaling promotes growth plate column formation in vitro. *J Orthop Res* 30, 1906-1914.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A., Olwin, B.B.,** 1991. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252, 1705-1708.
- Ratzka, A., Kalus, I., Moser, M., Dierks, T., Mundlos, S., Vortkamp, A.,** 2008. Redundant function of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 during skeletal development. *Dev Dyn* 237, 339-353.
- Roach, H.I., Aigner, T., Soder, S., Haag, J., Welkerling, H.,** 2007. Pathobiology of osteoarthritis: pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 8, 271-282.
- Rodgers, K.D., Sasaki, T., Aszodi, A., Jacenko, O.,** 2007. Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mol Genet* 16, 515-528.
- Rountree, R.B., Schoor, M., Chen, H., Marks, M.E., Harley, V., Mishina, Y., Kingsley, D.M.,** 2004. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol* 2, e355.
- Sakane, H., Yamamoto, H., Matsumoto, S., Sato, A., Kikuchi, A.,** 2012. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J Cell Sci* 125, 449-460.

- Sandy, J.D., Flannery, C.R., Neame, P.J., Lohmander, L.S.,** 1992. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 89, 1512-1516.
- Schmale, G.A., Conrad, E.U., 3rd, Raskind, W.H.,** 1994. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am* 76, 986-992.
- Schünke, M.,** 2000. Funktionelle Anatomie - Topografie und Funktion des Bewegungssystems, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. 48-50.
- Sgariglia, F., Candela, M.E., Huegel, J., Jacenko, O., Koyama, E., Yamaguchi, Y., Pacifici, M., Enomoto-Iwamoto, M.,** 2013. Epiphyseal abnormalities, trabecular bone loss and articular chondrocyte hypertrophy develop in the long bones of postnatal Ext1-deficient mice. *Bone* 57, 220-231.
- Shu, C.C., Jackson, M.T., Smith, M.M., Smith, S.M., Penm, S., Lord, M.S., Whitelock, J.M., Little, C.B., Melrose, J.,** 2015. Perlecan domain I heparan sulfate ablation reduces progressive cartilage degradation, synovitis, and osteophyte size in post-traumatic osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*.
- Song, R.H., Tortorella, M.D., Malfait, A.M., Alston, J.T., Yang, Z., Arner, E.C., Griggs, D.W.,** 2007. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* 56, 575-585.
- Soriano, P.,** 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.
- Spagnoli, A., O'Rear, L., Chandler, R.L., Granero-Molto, F., Mortlock, D.P., Gorska, A.E., Weis, J.A., Longobardi, L., Chytil, A., Shimer, K., Moses, H.L.,** 2007. TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol* 177, 1105-1117.
- Stanton, H., Golub, S.B., Rogerson, F.M., Last, K., Little, C.B., Fosang, A.J.,** 2011. Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc* 6, 388-404.
- Stanton, H., Rogerson, F.M., East, C.J., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Meeker, C.T., Little, C.B., Last, K., Farmer, P.J., Campbell, I.K., Fourie, A.M., Fosang, A.J.,** 2005. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 434, 648-652.
- Stickens, D., Clines, G., Burbee, D., Ramos, P., Thomas, S., Hogue, D., Hecht, J.T., Lovett, M., Evans, G.A.,** 1996. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet* 14, 25-32.
- Stickens, D., Zak, B.M., Rougier, N., Esko, J.D., Werb, Z.,** 2005. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Development* 132, 5055-5068.
- Storm, E.E., Kingsley, D.M.,** 1996. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122, 3969-3979.
- Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., Harper, J.W.,** 2009. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* 138, 63-77.
- Takada, T., Katagiri, T., Ifuku, M., Morimura, N., Kobayashi, M., Hasegawa, K., Ogamo, A., Kamijo, R.,** 2003. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 278, 43229-43235.
- Tandeter, H.B., Shvartzman, P.,** 1999. Acute knee injuries: use of decision rules for selective radiograph ordering. *Am Fam Physician* 60, 2599-2608.

- Terpstra, L., Prud'homme, J., Arabian, A., Takeda, S., Karsenty, G., Dedhar, S., St-Arnaud, R.**, 2003. Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes. *J Cell Biol* 162, 139-148.
- Tesche, F., Miosge, N.**, 2004. Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 852-862.
- Thyssen, S., Luyten, F.P., Lories, R.J.**, 2015. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech* 8, 17-30.
- Troeberg, L., Nagase, H.**, 2012. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824, 133-145.
- Tsang, K.Y., Chan, D., Cheah, K.S.**, 2015. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension? *Dev Growth Differ* 57, 179-192.
- Valverde-Franco, G., Binette, J.S., Li, W., Wang, H., Chai, S., Laflamme, F., Tran-Khanh, N., Quenneville, E., Meijers, T., Poole, A.R., Mort, J.S., Buschmann, M.D., Henderson, J.E.**, 2006. Defects in articular cartilage metabolism and early arthritis in fibroblast growth factor receptor 3 deficient mice. *Hum Mol Genet* 15, 1783-1792.
- van der Kraan, P.M., Blaney Davidson, E.N., van den Berg, W.B.**, 2010. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthritis Cartilage* 18, 735-741.
- Vanwanseele, B., Lucchinetti, E., Stussi, E.**, 2002. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 408-419.
- Vincent, T.L., McLean, C.J., Full, L.E., Peston, D., Saklatvala, J.**, 2007. FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 752-763.
- Wang, W., Zhong, B., Sun, J., Cao, J., Tian, J., Zhong, N., Zhao, W., Tian, L., Xu, P., Guo, D., Ju, X., Ma, W., Li, M., Hou, W., Lu, S.**, 2011. Down-regulated HS6ST2 in osteoarthritis and Kashin-Beck disease inhibits cell viability and influences expression of the genes relevant to aggrecan metabolism of human chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 50, 2176-2186.
- Wei, F., Zhou, J., Wei, X., Zhang, J., Fleming, B.C., Terek, R., Pei, M., Chen, Q., Liu, T., Wei, L.**, 2012. Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 755-763.
- Weng, T., Yi, L., Huang, J., Luo, F., Wen, X., Du, X., Chen, Q., Deng, C., Chen, D., Chen, L.**, 2012. Genetic inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 in knee cartilage attenuates the degeneration of articular cartilage in adult mice. *Arthritis Rheum* 64, 3982-3992.
- Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J., Rudolphi, K.A.**, 2005. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* 4, 331-344.
- Wuelling, M., Vortkamp, A.**, 2011. Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev* 21, 1-11.
- Wuyts, W., Van Hul, W.**, 2000. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Hum Mutat* 15, 220-227.
- Yamada, S., Busse, M., Ueno, M., Kelly, O.G., Skarnes, W.C., Sugahara, K., Kusche-Gullberg, M.**, 2004. Embryonic fibroblasts with a gene trap mutation in Ext1 produce short heparan sulfate chains. *J Biol Chem* 279, 32134-32141. Epub 32004 May 32125.

-
- Yan, D., Chen, D., Cool, S.M., van Wijnen, A.J., Mikecz, K., Murphy, G., Im, H.J.,** 2011. Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 13, R130.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M.,** 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841-848.
- Yu, W.H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K., Woessner, J.F., Jr.,** 2000. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275, 31226-31232.
- Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L.A., Lavallie, E.R., Morris, E.A., Flannery, C.R.,** 2006. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* 1760, 517-524.
- Zhou, J., Chen, Q., Lanske, B., Fleming, B.C., Terek, R., Wei, X., Zhang, G., Wang, S., Li, K., Wei, L.,** 2014. Disrupting the Indian hedgehog signaling pathway in vivo attenuates surgically induced osteoarthritis progression in Col2a1-CreERT2; *Ihhfl/fl* mice. *Arthritis Res Ther* 16, R11.

8 Anhang

8.1 Klonale Deletion von *Ndst1* im Gelenkknorpel

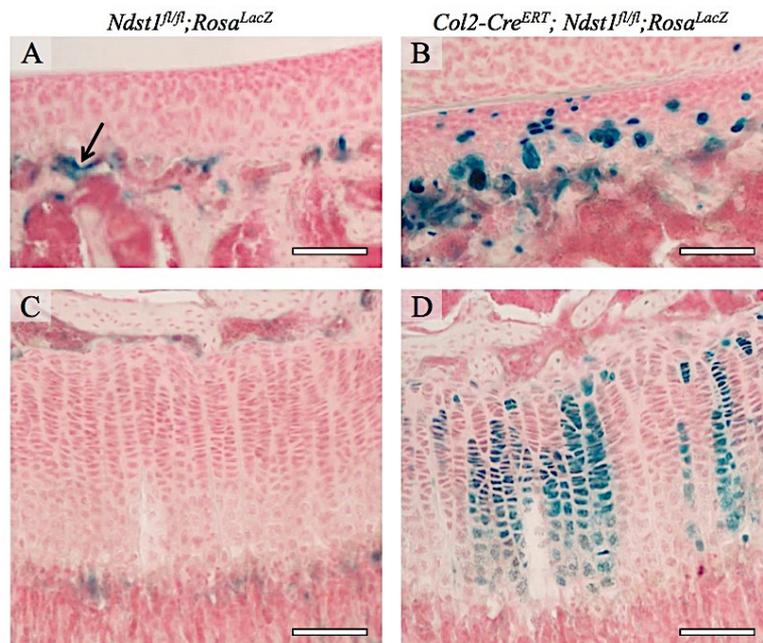


Abb. 8.1 Nachweis von *Ndst1*-defizienten Zellen in *Col2-Cre^{ERT}; Ndst1^{fl/fl}; Rosa^{LacZ}* Mäusen. Um analog zu den Mäusen des *Col2-rtTA-Cre; Ext1^{fl/fl}* Mausstammes *Ndst1* klonal in Chondrozyten des Gelenkknorpels zu deletieren, wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch die i. p. Injektion von 100 µg Tamoxifen an P7 induziert. Cryoschnitte von 4 Wochen alten Kontroll-Tieren (A,C) und *Col2-Cre^{ERT}; Ndst1^{fl/fl}; Rosa^{LacZ}* Mäusen (B,D), wurden mit X-Gal und Kernechtrot gefärbt. Sowohl im Gelenkknorpel (B) als auch in der Wachstumsfuge (D) der *Col2-Cre^{ERT}; Ndst1^{fl/fl}; Rosa^{LacZ}* Tiere sind blau gefärbte LacZ positive Zellen zu erkennen, im Gegensatz zur Kontrolle (A,C), bei der nur eine unspezifische Färbung der sichtbar ist (Pfeil). Maßstabsbalken: 100 µm, 100x Vergrößerung

8.2 Maus Genotypisierungs-PCRs

Cre Recombinase

Diese PCR wurde durchgeführt für die Stämme *Col2-Cre^{ERT}*, *Col2-rtTA-Cre* und *Col2Cre*. Bei Vorliegen des Cre-Allels ist eine Bande bei 650 bp detektierbar.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	20,9 µl	94°C	3 min
10x Puffer	2,5 µl	94°C	30 s
DMSO	1,25 µl	55°C	45 s
Cre rec for	0,1 µl	72°C	45 s
Cre rec rev	0,1 µl	72°C	5 min
dNTPs	0,2 µl	12°C	hold
Taq Polymerase	0,2 µl		
DNA	1 µl		

} 30x

Ext1^{flox}

Diese PCR wurde für die Genotypisierung von Tieren des Mausstammes *Ext1^{flox}* durchgeführt. Auswertung: die wt-Bande liegt bei 421 bp, die flox-Bande bei 542 bp.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	21,9 µl	94°C	5 min
10x Puffer	2,5 µl	94°C	45 s
Ext1flox for	0,1 µl	62°C	30 s
Ext1flox rev	0,1 µl	72°C	30 s
dNTPs	0,2 µl	72°C	7 min
Taq Polymerase	0,2 µl	12°C	hold
DNA	1 µl		

35x

Ext1^{inv}

Diese PCR wurde für die Genotypisierung von Mäusen des *Ext1^{inv}* Stammes verwendet. Bei Vorliegen des invertierten Allels ist eine Bande bei 403 bp nachweisbar.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	21,9 µl	94°C	5 min
10x Puffer	2,5 µl	94°C	45 s
Ext1flox for	0,1 µl	62°C	30 s
Ext1flox inv	0,1 µl	72°C	30 s
dNTPs	0,2 µl	72°C	7 min
Taq Polymerase	0,2 µl	12°C	hold
DNA	1 µl		

35x

Ndst1

Diese PCR wurde durchgeführt für die Mausstämme *Ndst1* und *Ndst1^{flox}*. Zur Auswertung wurden die Produkte auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Die wt-Bande liegt bei 250 bp, die flox-Bande bei 350 bp und die KO-Bande bei 500 bp.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	18,6 µl	94°C	5 min
10x Puffer	2,5 µl	94°C	25 s
DMSO	1,25 µl	60°C	40 s
Ndst1-17 for	0,2 µl	72°C	1 min
Ndst1-10 rev	0,1 µl	72°C	5 min
Ndst1-16 rev	0,1 µl	4°C	hold
dNTPs	0,2 µl		
Taq Polymerase	0,2 µl		
DNA	2 µl		

28x

Rosa^{LacZ}

Diese PCR wurde zur Genotypisierung des Rosa^{LacZ} Mausstammes verwendet. Auswertung: die wt-Bande liegt bei 625 bp, die Bande für das LacZ-Allel bei 350 bp.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	19,7 µl	94°C	5 min
10x Puffer	2,5 µl	94°C	30 s
DMSO	1 µl	60°C	1 min
Rosa rtTA A	0,2 µl	72°C	1 min
Rosa rtTA B	0,2 µl	72°C	5 min
Rosa rtTA C	0,2 µl	4°C	hold
dNTPs	0,2 µl		
Taq Polymerase	0,2 µl		
DNA	1 µl		

35x

8.3 LCM Nested PCRs

Für die nested PCR wurden zwei aufeinanderfolgende PCR Reaktionen durchgeführt (Ext1fl nested Outer und Inner). Das gesamte Lysat der LCM (20 µl) wurde für die erste Reaktion eingesetzt und beide Allele (flox und inv) in einer gemeinsamen Reaktion amplifiziert. Anschließend wurden je 5 µl der ersten Reaktion als Matritze für die zweite PCR-Runde eingesetzt. Hier wurden zwei getrennte Reaktionen für das flox- bzw. das inv-Allel angesetzt.

***ExtI^{fl}* nested Outer**

Zur ersten Amplifikation der nested PCR in einer gemeinsamen Reaktion für das flox- und das inv-Allel.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	22,2 µl	94°C	5 min
10x Puffer	5 µl	94°C	45 s
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	58°C	30 s
Nested A-Outer	0,2 µl	72°C	30 s
Nested B-Outer	0,1 µl	72°C	7 min
Nested C-Outer	0,1 µl	4°C	hold
dNTPs	0,2 µl		
Taq Polymerase	0,2 µl		
DNA	20 µl		

} 34x

***ExtI^{fl}* nested Inner B und C**

Es werden zwei voneinander getrennte PCRs angesetzt. Das Primerpaar Nested A Inner und Nested B Inner amplifiziert das flox-Allel, die Kombination der Primer Nested A Inner und Nested C Inner vervielfältigt das invertierte Allel. In beiden Fällen sind bei Vorliegen des Allels Banden bei 450 bp nachweisbar.

PCR Ansatz		Cycler Programm	
H ₂ O	37,4 µl	94°C	5 min
10x Puffer	5 µl	94°C	45 s
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	61°C	30 s
Nested A-Inner	0,1 µl	72°C	30 s
Nested B/C-Inner	0,1 µl	72°C	7 min
dNTPs	0,2 µl	4°C	hold
Taq Polymerase	0,2 µl		
DNA	5 µl		

} 34x

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Zuerst gebührt mein Dank Frau Prof. Dr. Andrea Vorkamp für die Betreuung und fachliche Unterstützung meiner Arbeit, sowie für die hilfreichen Anregungen und Kritik bei der Erstellung dieses Manuskriptes.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Manuela Wülling. Deine Hilfe bei der Planung von Versuchen und der Interpretation der Ergebnisse. Deine Korrekturen von Postern, Abstracts und dieser Arbeit und vor allem die konstruktiven und motivierenden Gespräche waren von großem Wert für mich.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen anderen (auch den ehemaligen) Mitarbeitern der AG Vorkamp bedanken, für die schöne Zeit, die ich in den letzten Jahren mit euch haben durfte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Dennis bedanken für die aufbauenden Worte, die tatkräftige Unterstützung und vor allem den emotionalen Rückhalt nicht nur während der Zeit der Doktorarbeit.

Publikationen

Jochmann, K., Bachvarova, V., Vortkamp, A., 2014. Heparan sulfate as a regulator of endochondral ossification and osteochondroma development. *Matrix Biol* 34, 55-63

Farshi, P., Ohlig, S., Pickhinke, U., Hoing, S, **Jochmann, K.**, Lawrence, R., Dreier, R., Dierker, T., Grobe, K., 2011. Dual roles of the Cardin-Weintraub motif in multimeric Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 286, 23608-23619

Poster

Jochmann, K. et al., 2015. Heparan sulfates in Osteoarthritis and articular cartilage maintenance. Gordon Research Conference Cartilage Biology and Pathology, Galveston, TX, USA.

Jochmann, K. et al., 2013. Heparan sulfates in degenerative joint diseases and growth plate maintenance. Gordon Research Conference Cartilage Biology and Pathology, Les Diablerets, Schweiz.

Jochmann, K., et al., 2011. Growth plate and articular cartilage anomalies in mice with clonal inactivation of Ext1. SFB 492 Final Symposium "Extracellular Matrix: Biogenesis, Assembly, and Cellular Interactions", Münster.

Vorträge

Jochmann, K., 2014. Heparan sulfates in articular cartilage, growth plate maintenance and osteoarthritis. DFG SPP 1468 IMMUNOBONE Annual Meeting, Münster.

Jochmann, K., 2013. Heparan sulfates in degenerative joint disease. DFG SPP 1468 IMMUNOBONE International Meeting, Garmisch-Partenkirchen.

Jochmann, K., 2013. Heparan sulfates in degenerative joint disease. Jährlicher Retreat der Graduiertenschule BIOME Cell Biology and Genetics, Essen.

Jochmann, K., 2012. Heparan sulfates in degenerative joint disease. DFG SPP 1468 IMMUNOBONE Annual Meeting, Jena.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Heparansulfate als Regulatoren der Knorpelhomöostase“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Katja Jochmann befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) und e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Katja Jochmann)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) und f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Katja Jochmann)