



**Die Dysregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs
während der Chondro- und Osteogenese ist mit der Entwicklung
einer Arthrose und der parallelen Ausprägung einer Hyperostose
beim STR/ort-Mausstamm assoziiert**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2012

Vorgelegt von:

Pasold, Juliane

geb. am 16.06.1982 in Berlin

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke

Institut für Immunologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Dieter G. Weiss

Institut für Tierphysiologie, Universität Rostock

Eingereicht am: 7. Mai 2012

Verteidigt am: 3. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Enchondrale Ossifikation	1
1.2 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	4
1.2.1 Inhibierung und Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs	5
1.3 Arthrose.....	7
1.3.1 Enchondrale Ossifikation im artikulären Knorpel induziert Arthrose	9
1.4 Hyperostose	11
1.4.1 Osteoklastendefekt (Osteopetrose).....	12
1.4.2 Osteoblastendefekt (Osteosklerose)	12
1.5 Der STR/ort-Mausstamm.....	13
1.5.1 Der STR/ort-Mausstamm - ein etabliertes Mausmodell für Arthrose.....	13
1.5.2 Der STR/ort-Mausstamm - ein Hyperostose-Mausmodell	15
1.6 Motivation und Zielstellung der Arbeit	16
2 Material & Methoden	18
2.1 Mäuse.....	18
2.2 DNA-Isolierung aus Milzgewebe	18
2.3 RNA-Isolierung	19
2.3.1 Isolierung von RNA aus primären Zellen und Milzgewebe	19
2.3.2 RNA-Qualitätsanalyse mittels Pico- und Nanochip.....	20
2.4 Sequenzierung nach Sanger (Didesoxymethode).....	20
2.4.1 cDNA-Synthese	21
2.4.2 Amplifizierung der cDNA und gDNA.....	22
2.4.3 Sequenzierung der PCR- und RT-PCR-Produkte.....	23

2.4.3.1	Ethanolpräzipitation	23
2.4.3.2	Sequenzierung mittels kapillarer Gelelektrophorese	24
2.5	Genexpressionsanalyse (GeXP).....	24
2.5.1	Generierung von Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten <i>in vitro</i> ...	24
2.5.2	GeXP-Analyse im Multiplex.....	26
2.6	Immunohistochemie am Kniegelenksknorpel und an chondrogenen <i>in vitro</i> Pelletkulturen.....	30
2.7	Histologie.....	31
2.7.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	31
2.7.2	Toluidinblau-Färbung zum Nachweis von Chondrozyten.....	32
2.7.3	Öl-Rot-Färbung zum Nachweis von Adipozyten	32
2.7.4	Alizarin-Rot-Färbung zum Nachweis von Osteoblasten.....	33
2.8	Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität dient der Quantifizierung von <i>in vitro</i> generierten Osteoblasten.....	33
2.9	Mikro-Computertomographie (μCT)	34
2.10	Histomorphometrie	37
2.11	Biomechanischer Test	37
2.12	ELISA	38
2.13	SDS-PAGE und Western Blot.....	38
2.13.1	Isolierung von Zytoplasma- und Kern-Proteinen.....	38
2.13.2	Quantitative Fällung von Proteinen mit Methanol/Chloroform.....	39
2.13.3	SDS-PAGE	40
2.13.4	Western Blot	41
2.13.5	Immundetektion	42
2.14	Statistik.....	42
3	Ergebnisse	43
	<i>Abschnitt 1 - Analyse potentieller Arthrose-Kandidatengene im STR/ort-Stamm</i>	43

3.1	Der Sequenzvergleich des <i>Sfrp1</i> -Gens zwischen dem C57BL/6- und dem STR/ort-Mausstamm impliziert regulatorische Unterschiede	43
3.2	Verringerte <i>in vitro</i> -Expression der Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, <i>Dkk4</i> und <i>Sfrp1</i> , im STR/ort-Stamm.....	45
3.2.1	<i>In vitro</i> -Differenzierung mesenchymaler Stromazellen	45
3.2.2	Differentielle Expression der Kandidatengene bei <i>in vitro</i> generierten Chondrozyten des STR/ort-Stamms.....	48
3.3	Differentielle Expression des Sfrp1-Proteins im artikulären Knorpel.....	49
<i>Abschnitt 2 - Charakterisierung des Knochendefekts im STR/ort-Stamm.....</i>		51
3.4	STR/ort-Mäuse haben eine erhöhte kortikale Knochenmenge, ein Knochenmarksverlust und eine extramedulläre Hämatopoese	51
3.4.1	Das vermehrte Wachstum des kortikalen Knochens beim STR/ort-Stamm korreliert mit der Verdrängung des Knochenmarks	51
3.4.2	Die Verdrängung des Knochenmarks führt zu Hepatosplenomegalie und extramedullärer Hämatopoese	54
3.5	STR/ort-Mäuse verfügen über stabilere Knochen	55
3.6	Die Knochendichte von Kalotte und <i>Dens Incisivus</i> ist bei STR/ort-Mäusen nicht erhöht.....	56
3.7	STR/ort-Mäuse, insbesondere die Weibchen, verfügen über eine erhöhte trabekuläre Knochenmenge	57
3.8	Der gesteigerte Knochenzuwachs im STR/ort-Stamm ist assoziiert mit einer reduzierten TRAcP-Produktion der Osteoklasten und mit einem verringerten Kollagen Typ I-Abbau	61
3.9	Der gesteigerte Knochenzuwachs im STR/ort-Stamm basiert auf einer übermäßigen Knochenbildung bzw. erhöhten Osteoblasten-anzahl	62
<i>Zusammenhang zwischen einer Arthrose und Hyperostose beim STR/ort-Stamm aufgrund einer Dysregulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs</i>		64
3.10	Differentielle Expression der potentiellen Arthrose-Kandidatengene <i>Gas6</i> , <i>Dkk4</i> und <i>Sfrp1</i> in STR/ort-Osteoblasten	65

3.11	Erhöhte β -Catenin-Proteinexpression in den mesenchymalen Vorläuferzellen von STR/ort-Mäusen.....	66
3.12	Differentielle Expression des Sfrp1-Proteins in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge.....	68
4	Diskussion.....	69
4.1	Die differentielle Expression der Kandidatengene <i>Gas6</i> und <i>Fgfr1</i> in Chondrozyten ist mit der Arthrose in STR/ort-Mäusen assoziiert.....	69
4.2	Die verringerte Expression der Kandidatengene <i>Dkk4</i> und <i>Sfrp1</i> bewirkt eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und ist mit Arthrose im STR/ort-Stamm assoziiert.....	71
4.3	Das Arthrose-Mausmodell STR/ort entwickelt zusätzlich eine altersabhängige und geschlechtsspezifische Hyperostose.....	74
4.4	Der STR/ort-Stamm stellt ein neues Hyperostose-Mausmodell dar.....	75
4.5	Die erhöhte trabekuläre Knochenmenge könnte die STR/ort-Weibchen vor der Entwicklung einer Arthrose schützen.....	77
4.6	Die verringerte <i>Gas6</i> -Expression im STR/ort-Stamm könnte mit der Arthrose und der erhöhten Knochenmenge assoziiert sein.....	79
4.7	Der fehlregulierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg könnte mit der Arthrose und der Hyperostose im STR/ort-Stamm assoziiert sein.....	80
4.8	Zusammenfassende Schlussbetrachtung der Ergebnisse.....	86
	Literaturverzeichnis.....	89
	Selbständigkeitserklärung.....	100
	Danksagung.....	101
	Publikationen.....	103
	Posterpräsentationen.....	103
	Anhang.....	105

Abkürzungsverzeichnis

APC	A denomatous p olyposis c oli
ALP	A lkalische P hosphatase
BMD	B one m ineral d ensity
BMP	B one m orphogenetic p rotein
BV/TV	B one v olume/ T issue v olume
cM	C entimorgan
Ct.Ar	C ortical a rea
Ct.Th	C ortical t hickness
Dkk4	D ickkopf 4
DMEM	D ulbecco's m odified e agle m edium
dNTP	D esoxy- N ukleotid- T riphosphat
ddNTP	D idesoxy- N ukleotid- T riphosphat
Dsh	D ishevelled
EDTA	E thylenediaminetetraacetic a cid
FBS	F etal b ovine s erum
FGF	F ibroblast G rowth F actor
Fgfr1	F ibroblast g rowth f actor r eceptor 1
Gapdh	G lyceraldehyde-3- p hosphate d ehydrogenase
Gas6	G rowth a rrest s pecific 6
GSK3	G lycogen S ynthase K inase 3
HE	H ämatoxylin/ E osin
HPLC	H igh- p erformance l iquid c hromatography
LRP5/6	L ow-density lipoprotein- r eceptor related p rotein 5/6
μCT	M ikro- C omputertomographie
MMP-13	M atrix- M etalloprotease 13
MSC	M esenchymal s troma c ell
PBS	P hosphate b uffered s aline
PCR	P olymerase c hain r eaction
PFA	P araformaldehyde
Runx2	R unt-related transcription f actor 2
ROI	R egion o f i nterest
RT	R everse T ranskriptase

SDS	S odium d odecyl s ulfate
Sfrp1	S ecreted f rizzled-related p rotein 1
SNP	S ingle n ucleotide p olymorphism
SOST	S clerostin
Tb.N	T rabecular n umber
TBS	T ris-buffered s aline
Tb.Sp	T rabecular s eparation
Tb.Th	T rabecular t hickness
TCF/LEF	T -cell f actor/ L ymphoid e nhancer binding protein f amily
TGF- β	T ransforming g rowth f actor b eta
TRAcP	T artrate-resistant a cid p hosphatase
Tt.Ar	T rabecular a rea
VEGF	V ascular e ndothelial g rowth f actor
Wnt	W ingless-related mouse mammary tumor virus (MMTV) i ntegration site
OcN/Bpm	O steoclast n umber/ B one p erimeter
OcS/BS	O steoclast s urface/ B one s urface
ObN/Bpm	O steoblast n umber/ B one p erimeter
ObS/BS	O steoblast s urface/ B one s urface

Zusammenfassung

Der STR/ort-Mausstamm entwickelt spontan eine Arthrose, deren genetische Ursachen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten. Hierzu wurden die potentiellen Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1* im STR/ort- und dem Referenzstamm C57BL/6 sequenziert, um mögliche Arthrose relevante Sequenzabweichungen aufzudecken. Das *Sfrp1*-Gen als Antagonist des Wnt-Signalwegs stellte sich als besonders interessanter Kandidat heraus. Hier wurden insgesamt 23 Polymorphismen, die sich sowohl auf die Sekretion des Proteins als auch auf die Stabilität des Transkripts auswirken könnten, identifiziert. Tatsächlich war die Transkription von *Sfrp1* sowohl in den mesenchymalen Vorläuferzellen als auch in den *in vitro* generierten Chondrozyten und Osteoblasten der STR/ort-Maus statistisch signifikant reduziert und auf Proteinebene war im artikulären Knorpel eine differentielle, altersabhängige *Sfrp1*-Expression nachweisbar. Die reduzierte Expression von *Sfrp1* in der STR/ort-Maus korreliert sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus mit einer erhöhten Expression des Effektorproteins des kanonischen Wnt-Signalwegs - β -Catenin. Unsere Ergebnisse deuten also auf eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im STR/ort-Stamm, die im artikulären Knorpel zu einer Steigerung kataboler Prozesse, die für den frühzeitigen und Arthrose-typischen Knorpelverlust verantwortlich sein könnte, führt.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der auffällig erhöhten Knochenproduktion (Hyperostose), die beim STR/ort-Stamm bisher nur unzureichend untersucht wurde. Hier wurde eine altersabhängige Überproduktion von kortikaler und trabekulärer Knochensubstanz in den Wirbelkörpern und Röhrenknochen festgestellt, von der die Weibchen ganz besonders betroffen sind. Die Hyperostose betrifft ausschließlich die aus enchondraler Ossifikation hervorgegangenen Knochen und korreliert nicht nur mit einer erhöhten Osteoblastenanzahl und -Aktivität, sondern auch mit einer reduzierten Osteoklastenaktivität. Da beide Zelltypen betroffen sind, kann eine monogene Ursache für die Hyperostose ausgeschlossen werden. Allerdings unterstützt ein verstärkt ablaufender Wnt-Signalweg die enchondrale Ossifikation, so dass in der STR/ort-Maus die Entwicklung beider Erkrankungen – der Arthrose und der Hyperostose – möglicherweise über die Dysregulation dieses Signalwegs im Zusammenhang steht.

1 Einleitung

1.1 Enchondrale Ossifikation

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das im Verlauf eines menschlichen Lebens permanent dem Umbau unterzogen ist. So werden bei einem ausgewachsenen Skelett jährlich 10% der Knochenmasse umgebaut. Dadurch kann unter anderem der Knochenverschleiß verhindert und der Knochen an neue Belastungen angepasst werden. Außerdem können Mikrotraumata repariert und Calcium schnell mobilisiert werden. Bei der Knochenentwicklung (Ossifikation) lassen sich zwei grundlegende Prozesse unterscheiden: Die desmale und die enchondrale Ossifikation.

Die desmale Ossifikation führt zur Entstehung der sogenannten Deckknochen des Skeletts, wie Schädeldach, Gesichtsschädel oder auch Schlüsselbein. Die Knochen entstehen hierbei direkt aus dem embryonalen Mesoderm.

Bei der enchondralen Ossifikation hingegen entstehen die Knochen aus Knorpelanlagen (Abb. 1). Hierbei wird das Knorpelgewebe von Blutgefäßen infiltriert, die wiederum mesenchymale Vorläuferzellen (mesenchymale Stromazellen, MSC) mitführen. Aus den MSCs differenzieren schließlich die Knochensubstanz bildenden Zellen (Osteoblasten).

Im Detail laufen die folgenden Schritte während der enchondralen Ossifikation ab: Zunächst kondensieren die embryonalen MSCs und differenzieren zu Knorpelzellen (Chondrozyten). Diese synthetisieren Knorpelmatrix, insbesondere Kollagen Typ II und Proteoglykane, und bilden so die Knorpelanlage (Abb. 1A). Im mittleren Bereich der Knorpelanlage beginnen die Chondrozyten zu proliferieren und heranzureifen (Hypertrophie). Die hypertrophen Chondrozyten sezernieren dann die alkalische Phosphatase, ein Enzym, das den Mineralisierungsprozess einleitet. Die Knorpelmatrix wird kalzifiziert, während die hypertrophen Chondrozyten in Apoptose übergehen. Über das Knochenmark und die Blutgefäße gelangen die MSCs bzw. die Knorpel und Knochen resorbierenden Zellen (Osteoklasten) in das primäre Ossifikationszentrum (Abb. 1B). Das primäre Zentrum expandiert dann von der Mitte des Knochens ausgehend in Richtung der Knochenenden, indem die Osteoklasten Knorpelmatrix abbauen, während die Osteoblasten Knochensubstanz deponieren (Abb. 1C). In den Endbereichen der Röhrenknochen formieren sich anschließend sekundäre Ossifika-

tionszentren, die zu dem primären Zentrum hin durch die Wachstumsfugen abgegrenzt werden (Abb. 1D). Die Wachstumsfugen sind für das Längenwachstum, das so lange fortgesetzt wird, bis alles an Knorpel durch Knochen ersetzt wurde, von entscheidender Bedeutung, (Abb. 1E).

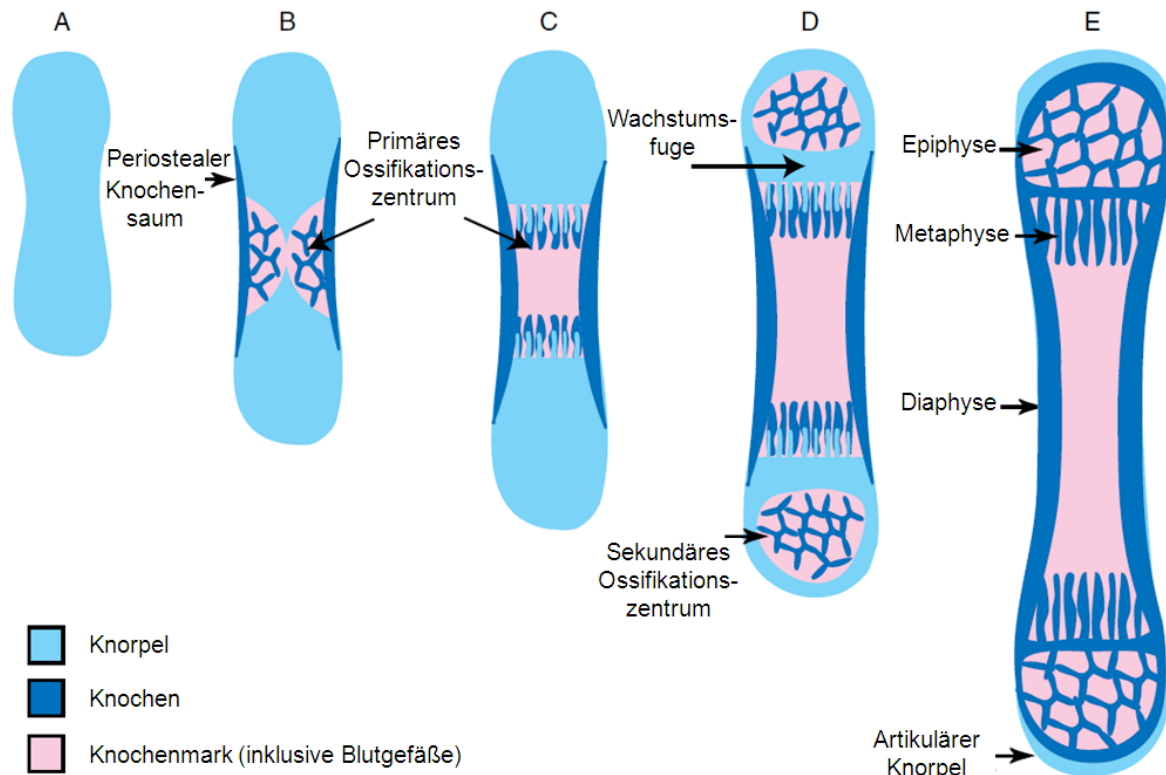


Abb. 1: Schematische Übersicht zur enchondralen Ossifikation. (A) Knorpelanlage des zukünftigen Knochens. (B) Ausbildung eines Knochen-saums entlang der äußeren Knochenhaut (Periost) und beginnende Formierung eines primären Ossifikations-zentrums. (C) Beidseitige Expandierung des primären Ossifikations-zentrums. (D) Ausbildung der sekundären Ossifikations-zentren in beiden Enden des Knochens. Diese sekundären Zentren sind zu dem primären Zentrum jeweils durch eine Wachstums-fuge abgegrenzt. (E) Reifer Knochen bestehend aus Epi-, Meta- und Diaphyse, bei dem die Knorpelstruktur der Wachstumsfugen komplett durch Knochen ersetzt wurde. Die einzige verbleibende Knorpelstruktur befindet sich an den Enden des Knochens und wird als artikulärer Knorpel bezeichnet. Quelle: (Mackie et al., 2011)

Es gibt zwei Arten von Knochenstrukturen in den Röhrenknochen. Der kortikale Knochen bildet die äußere stabile Hülle und besteht aus konzentrisch angeordneten und mineralisierten Kollagenfasern. Der trabekuläre Knochen hingegen ist durch eine starre, stabile Schwammstruktur charakterisiert und in den Bereichen der Epiphyse und Metaphyse der Röhrenknochen anzutreffen (Abb. 1E) (Zaidi, 2007).

Die Chondrozyten der Wachstumsfuge durchlaufen während des Längenwachstums der Knochen fünf Reifestadien: 1. Reserve, 2. Proliferation, 3. Prähypertrophie, 4. Hypertrophie und 5. Apoptose (Burdan et al., 2009; Dreier, 2010). Entsprechend der jeweils unterschiedlichen Morphologie und Strukturierung der Chondrozyten lassen sich fünf verschiedene Zonen differenzieren (Abb. 2). Die Chondrozyten vollziehen also eine zeitlich und räumlich gesteuerte Kaskade von Differenzierungsprozessen, die mit der Hypertrophie bzw. Apoptose endet.

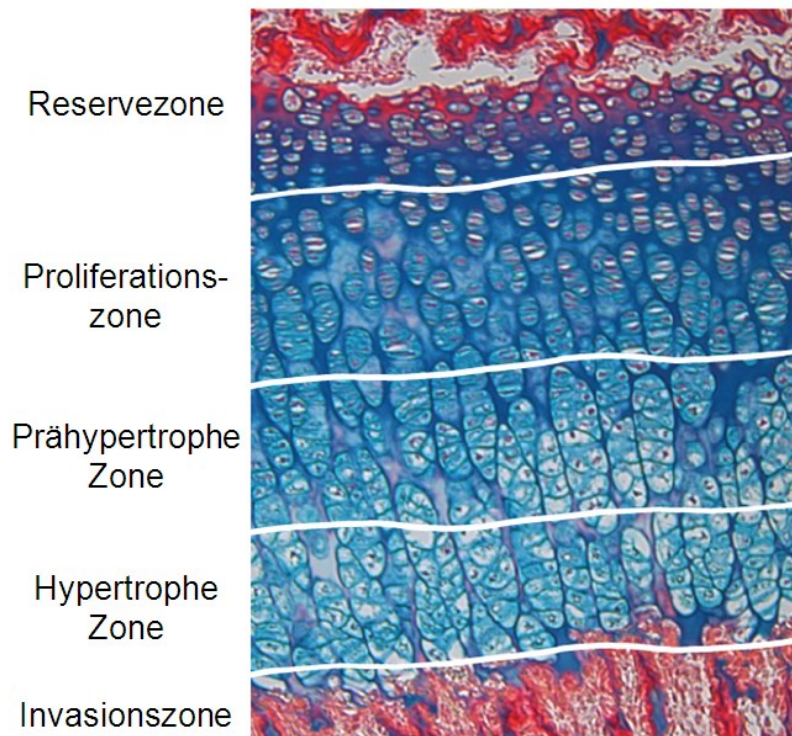


Abb. 2: Unterteilung der Wachstumsfuge in fünf Zonen entsprechend der Entwicklungsstufe der Chondrozyten. Dargestellt ist die Wachstumsfuge der Tibia von einer 15 Tage alten Maus. Quelle: (Dreier, 2010)

Die einzelnen Phasen lassen sich unter anderem anhand der von den Chondrozyten produzierten Kollagen-Typen charakterisieren. Während anfangs vor allem die Kollagene des Typs II, IX und XI dominieren, ist in der hypertrophen Phase vor allem Kollagen Typ X vorzufinden. Neben den Kollagenen sind in dem frühen Reifestadium auch Proteoglykane, insbesondere Aggrecane, anzutreffen. Hypertrophe Chondrozyten hingegen produzieren die Matrix-Metalloprotease 13 (MMP-13), alkalische Phosphatase, „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), Osteopontin und den Transkriptionsfaktor „runt-related transcription factor 2“ (Runx2) – Faktoren, die die Knochenbildung induzieren (Goldring et al., 2006; Tamamura et al., 2005). Nachdem die Blutgefäße ausgehend von dem subchondralen Knochen in die Ossifikationszentren vorgedrungen sind, gehen die hypertrophen Chondrozyten in Apoptose und die Remodellierung zu trabekulärem Knochen beginnt (Cancedda et al., 1995).

1.2 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Abb. 3), auch bekannt als kanonischer Wnt-Signalweg, zählt zu den am besten untersuchten Signaltransduktionswegen, die durch die Bindung von „wingless-related mouse mammary tumor virus (MMTV) intergration site“ (Wnt)-Proteinen aktiviert werden. Er ist für das zelluläre Wachstum, die Differenzierung und Funktionalität verschiedener Zelltypen zuständig und somit maßgeblich an der Regulierung von embryonalen Entwicklungsprozessen und einer Vielzahl zellulärer Abläufe im adulten Organismus beteiligt (Cadigan and Nusse, 1997). Von entscheidender Wichtigkeit für unsere Arbeit ist der Fakt, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Skelettentwicklung steuert und die Entwicklung in Richtung Knorpel oder Knochen lenkt sowie spätere Remodellierungsprozesse im Knochen kontrolliert (Baron and Rawadi, 2007; Cadigan and Nusse, 1997; Krishnan et al., 2006). Der Signalweg reguliert außerdem auch die Reifung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge (Enomoto-Iwamoto et al., 2002). Es gibt eine Reihe von Studien zur Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs während der enchondralen Ossifikation, die zeigen konnten, dass eine strikte Regulierung des Signalwegs in den einzelnen Reifestadien der Chondrozyten für die normale Entwicklung essentiell ist. So ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in den heranreifenden Chondrozyten verstärkt aktiviert, um die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten zu induzieren (Akiyama et al., 2004;

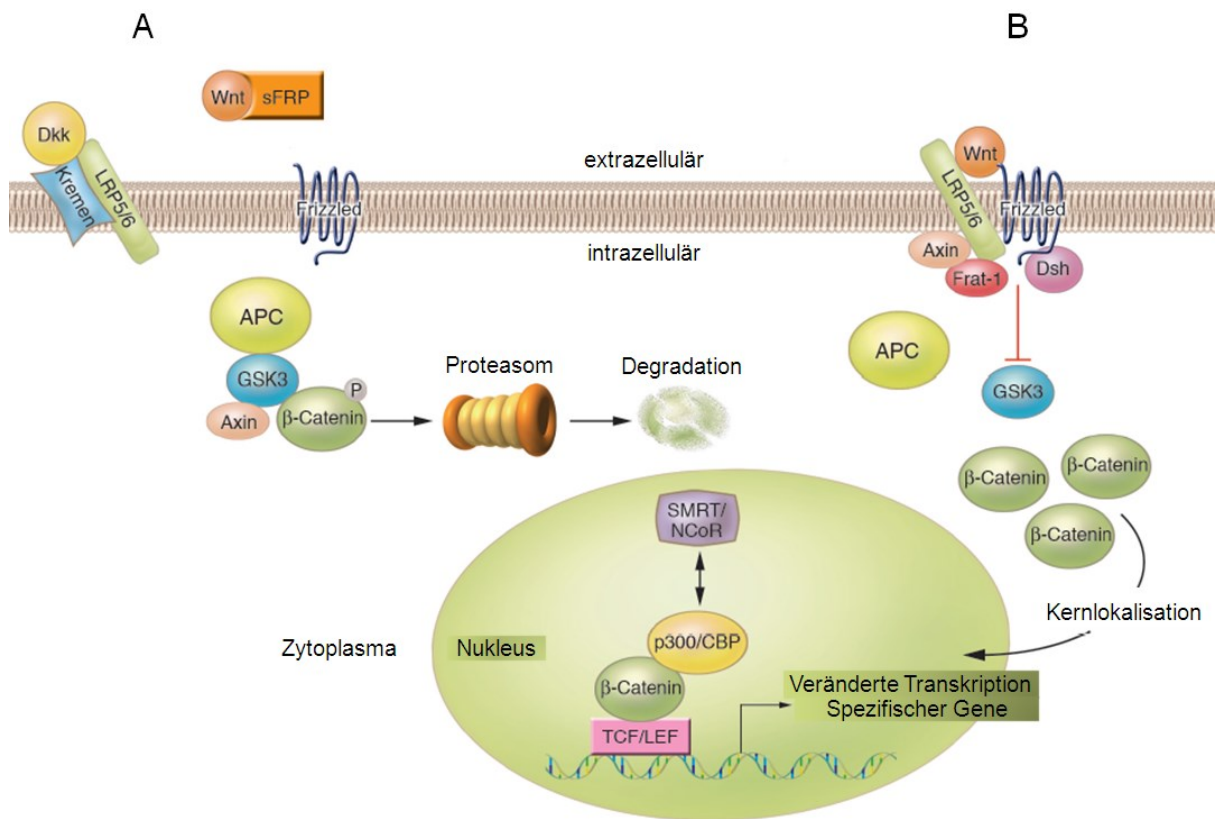
Guo et al., 2004). Jedoch bewirkt eine übermäßige Aktivierung des Signalwegs eine verstärkte hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten und damit eine erhöhte Matrixmineralisierung (Tamamura et al., 2005).

1.2.1 Inhibierung und Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Die Antagonisten des kanonischen Wnt-Signalwegs, insbesondere „secreted frizzled-related protein“ (Sfrp) und „dickkopf“ (Dkk), inhibieren die Bindung sezernierter Wnt-Proteine (Liganden) an den Frizzled-Rezeptor bzw. die Interaktion des Frizzled-Rezeptors mit dem Rezeptorkomplex bestehend aus den beiden Untereinheiten „low-density lipoprotein-receptor related protein 5“ (LRP5/6) und Kremen (Abb. 3A). Die insgesamt fünf Mitglieder der Sfrp-Familie verfügen jeweils über eine terminale Cystein-reiche Domäne, die homolog zur Ligand bindenden Domäne des Frizzled-Rezeptors ist (Wodarz and Nusse, 1998). Die Sfrps können deshalb direkt an die Wnt-Proteine andocken und eine Bindung dieser an den Rezeptor verhindern, so dass der Signalweg nicht aktiviert wird. Die Sfrp-Proteine spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Selbstregulierung des Wnt-Signalwegs, d.h. eine Aktivierung des Signalwegs führt unter anderem zur Freisetzung von Sfrps, welche die Wnt-Proteine binden und inaktivieren (negative Rückkopplung). Die *Dkk*-Genfamilie umfasst vier Mitglieder und gehört zu einer anderen Klasse von Inhibitoren, da sie an den LRP5/6-Kremen-Rezeptorkomplex binden (Kawano and Kypka, 2003) und somit die für die Aktivierung des Signalwegs notwendige Interaktion des Rezeptorkomplexes mit dem Frizzled-Rezeptor verhindern. Bei der Hemmung des Signalwegs (Abb. 3A) wird freies, zytoplasmatisches β -Catenin durch den sogenannten Destruktionskomplex bestehend aus „adenomatous polyposis coli“ (APC), Axin und „glycogen synthase kinase 3“ (GSK3) konstitutiv phosphoryliert und anschließend proteasomal abgebaut.

Während der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs (Abb. 3B) kommt es infolge der Bindung der Wnt-Proteine an den Frizzled-LRP5/6-Rezeptorkomplex zur Aktivierung des „Dishevelled“ (Dsh)-Proteins, das wiederum die Auflösung des Destruktionskomplexes induziert und die GSK3-Aktivität hemmt. Infolgedessen kann das Effektorprotein β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Kern transloziert werden (Willert and Nusse, 1998). Im Nukleus wird β -Catenin an die Transkriptions-

faktoren „T-cell factor/lymphoid enhancer binding protein family“ (TCF/LEF) gebunden und die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert.



Verändert nach Krishnan et al. (2006)

Abb. 3: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg. Im inhibierten Zustand (**A**) verhindern die Antagonisten, insbesondere „secreted frizzled-related protein“ (sFRP) und „dickkopf“ (Dkk), die Bindung aktiver Wnt-Proteine an den Frizzled-Rezeptor bzw. die Interaktion des „low-density lipoprotein-receptor related protein 5“ (LRP5/6)-Kreuzrezeptorkomplexes mit dem Frizzled-Rezeptor. Dies führt zur Phosphorylierung des freien, zytoplasmatischen β-Catenins durch den Destruktionskomplex bestehend aus „adenomatous polyposis coli“ (APC), Axin und „glycogen synthase kinase 3“ (GSK3) und zum anschließenden proteasomalen Abbau des β-Catenins. Bei der Aktivierung des Signalwegs (**B**) binden Wnt-Proteine an den LRP5/6-Frizzled-Rezeptorkomplex. Infolgedessen wird das Protein „Dishevelled“ (Dsh) aktiviert, was zur Auflösung des Destruktionskomplexes und zur Hemmung der GSK3-Aktivität führt. β-Catenin wird im Zytoplasma akkumuliert und in den Kern transloziert. Dort bindet β-Catenin die Transkriptionsfaktoren „T-cell factor/lymphoid enhancer binding protein family“ (TCF/LEF). Transkriptions-Corepressoren, wie z.B. „silencing mediator of retinoid and thyroid receptors/nuclear receptor corepressor“ (SMRT/NCOR), werden durch Transkriptions-Coaktivatoren, wie z.B. „p300 and cAMP response element-binding protein“ (p300/CBP), ersetzt. Letztendlich wird die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert.

Eine Fehlregulation des Wnt- β -Catenin-Signalwegs während der Embryogenese oder während zellulärer Abläufe im adulten Organismus kann zu massiven Knorpel- und Knochenschäden führen. Hierbei kann es zur Ausprägung der Erkrankungen Arthrose (siehe 1.3) und Hyperostose (siehe 1.4) kommen.

1.3 Arthrose

Arthrose ist die beim Menschen am häufigsten verbreitete degenerative Gelenkerkrankung und stellt weltweit einen der Hauptgründe für physische Einschränkungen bis hin zu Berufsunfähigkeit dar. Allein in Deutschland sind etwa fünf Millionen Frauen und Männer betroffen, mit steigender Tendenz. Es handelt sich bei der Arthrose um eine multifaktorielle Funktionsstörung, bei der sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Faktoren eine Rolle spielen (Moskowitz et al., 1992). Das Alter gilt bisher als Hauptrisikofaktor. Denn bei 80% der über 65-Jährigen liegt bereits eine radiologisch nachweisbare Arthrose vor, die in vielen Fällen allerdings noch asymptomatisch ist (Oliveria et al., 1995). Weiterhin sind auch Geschlecht, Knochendichte, Gewicht sowie die genetische Veranlagung bei der Initiierung und Entwicklung der humanen Arthrose entscheidend (Sowers, 2001).

Grundsätzlich unterscheidet man die primäre und die sekundäre Arthrose (Altman et al., 1986). Bei der sekundären Arthrose gibt es einen Auslöser der Erkrankung, wie beispielsweise ein Trauma, eine angeborene Fehlstellung (z.B. Hüftdysplasie) oder auch eine Fehlbelastung (z.B. in Berufen, bei denen die Knie stark belastet werden). Die primäre oder idiopathische Arthrose zeichnet sich durch den typisch schleichen- den Beginn und dem langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf aus. Erste Symptome, wie Gelenkschmerzen und eingeschränkte Beweglichkeit, treten also erst im fortgeschrittenen Stadium auf und lassen somit bei der humanen Arthrose keine eindeutigen Rückschlüsse auf den auslösenden Faktor der Erkrankung zu (Loughlin, 2005; Nuki, 1999).

Die Pathogenese der Arthrose beruht nach dem heutigen Verständnis auf einer Reihe biochemischer und molekularer Prozesse, die zu strukturellen Veränderungen in der Knorpelmatrix führen (Aigner and McKenna, 2002). Die von den Chondrozyten produzierte Matrix besteht aus elastischen Fasern, den Kollagenen (vor allem Kollagen Typ II), aus Proteoglykanen (hauptsächlich Aggrecan) und aus ca. 70% Was-

ser. Der beschleunigte Knorpelverlust bei der Arthrose wird auf die verstärkte Reifung und erhöhte Apoptoserate der Chondrozyten zurückgeführt (Hashimoto et al., 1998b). Es treten zunehmend Störungen in den Remodellierungsprozessen zur Aufrechterhaltung des hyalinen Knorpels auf, sodass sich das Gleichgewicht in Richtung Matrixabbau verschiebt (Nuki, 1999).

Im Zusammenhang mit der Arthrosepathogenese werden desweiteren fehlgesteuerte, biochemische Prozesse im subchondralen Knochen (Epiphyse) diskutiert (Anderson-MacKenzie et al., 2005; Logar et al., 2007; Westacott, 2002). Diese könnten die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen und somit den frühzeitigen Knorpelverlust begünstigen. Arthrotische Gelenke weisen entsprechend Verdickungen des subchondralen Knochens, subchondrale Zysten und zusätzliche Verknöcherungen, die sogenannten Osteophyten, auf (Buckland-Wright, 2004; Burr, 2004; Hill et al., 2001). Bis heute ist nicht geklärt, ob zuerst der Knorpel abgebaut wird und in Folge dessen Veränderungen am subchondralen Knochen auftreten oder ob zuerst Änderungen im subchondralen Knochen entstehen und diese den Knorpelabbau induzieren (Felson and Neogi, 2004). Die Pathogenese der Arthrose beruht letztlich sowohl auf den aktiven biochemischen Prozessen im Knorpel als auch im subchondralen Knochen. So wird zum Beispiel fehlendes Knorpelmaterial durch die Bildung von Osteophyten und subchondralen Verhärtungen (Sklerose) kompensiert (Creamer and Hochberg, 1997). Die zunehmende Bewegungseinschränkung der Gelenke führt jedoch zu einer Unterversorgung des Knorpels mit Nährstoffen und erschwert damit die Aufrechterhaltung der Knorpelmatrix. Hingegen wird die Synthese von MMPs, die den Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen katalysieren, angeregt (Haq et al., 2003; Wang et al., 2004).

Aufgrund der genetischen Heterogenität und der multiplen Einflussfaktoren sind für die Erforschung der primären Arthrose Tiermodelle unabkömmlich. Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe von genetischen (transgene, knock-in und knock-out) und induzierten (chirurgisch, mechanisch, chemisch und enzymatisch) Tiermodellen zur Arthrose. Außerdem gibt es auch einige Tiermodelle, die Arthrose spontan entwickeln und sich somit besonders gut für die Erforschung genetischer Ursachen eignen (Ameye and Young, 2006). Die aktuelle Arthroseforschung beschäftigt sich mit einer Vielzahl von Genen, die die Differenzierung und Funktion von Chondrozyten stören und eine erhöhte Apoptoserate der Chondrozyten sowie Veränderungen in den strukturellen Eigenschaften der Knorpelmatrix bewirken könnten (Aigner et al., 2001;

Okazaki and Sandell, 2004; Sandell and Aigner, 2001). Eine genetische Prädisposition würde bei einer normalen, alltäglichen Belastung des Gelenks die Degradation der Knorpelmatrix sowie Verhärtungen der Knochenstruktur begünstigen und so die altersbedingte Abnutzung verstärken und Arthrose induzieren (Goldring and Goldring, 2007).

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde bereits häufig in Zusammenhang mit der Entstehung der Arthrose diskutiert. So konnte zum Beispiel SFRP3 (Synonym: FRZB), ein Antagonist des Signalwegs, mit der humanen Arthrose in Verbindung gebracht werden. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen („single nucleotide polymorphism“, SNPs) im *FRZB*-Gen bei Patienten mit Hüftgelenksarthrose identifiziert (Lane et al., 2006; Loughlin et al., 2004; Min et al., 2005) sowie bei Patienten mit Kniegelenksarthrose (Valdes et al., 2007). Die beschriebenen SNPs bewirken dabei eine eingeschränkte Funktionalität des Proteins, wodurch der Wnt-Signalweg verstärkt aktiviert werden kann. Das Effektorprotein des Wnt-Signalwegs, β -Catenin, sowie weitere Wnt/Frizzled assoziierte Gene wurden in einem experimentellen Arthrose-Mausmodell im Knorpel und Synovium verstärkt exprimiert vorgefunden (Blom et al., 2009). In einem weiteren transgenen Arthrose-Mausmodell wurde das *β -Catenin*-Gen in gesunden, artikulären Chondrozyten konditional überexprimiert. Dies bewirkte eine beschleunigte Reifung, die für arthrotische Chondrozyten charakteristisch ist (Zhu et al., 2009). Die verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs im artikulären Knorpel begünstigt demnach die Apoptoserate der Chondrozyten und den Abbau der Knorpelmatrix (Wu et al., 2010).

1.3.1 Enchondrale Ossifikation im artikulären Knorpel induziert Arthrose

Die Gesamtheit der Reifungsprozesse während der enchondralen Osteogenese ist im gesunden Organismus auf den Knorpel der Wachstumsfuge, der deshalb auch als transient bezeichnet wird, beschränkt. Der artikuläre Knorpel besteht normalerweise nur aus Chondrozyten der frühen Reifephase und der von ihnen sezernierten Knorpelmatrix. Demnach spricht man hierbei vom permanenten Knorpel. Doch im Krankheitsfall, speziell bei der Arthrose, durchlaufen die artikulären Knorpelzellen ebenfalls die späteren Reifestadien der enchondralen Ossifikation (Hypertrophie bis hin zur Apoptose), womit letztendlich der frühzeitige Knorpelverlust einhergeht (Tallheden et

al., 2005). Die Induktion der chondrogenen, hypertrophen Differenzierung im artikulären Knorpel trägt erheblich zu der Progression der Erkrankung bei, da die vorschreitende Reifung die katabole Aktivität der Chondrozyten verstärkt und letztendlich die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Knorpelaufbau und -abbau in Richtung Abbau lenkt (Dreier, 2010). Im arthrotischen Gelenkknorpel konnten die gleichen Botenstoffe wie im Knorpel der Wachstumsfuge während der enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden, zu denen unter anderem „transforming growth factor beta“ (TGF- β), „bone morphogenetic proteins“ (BMPs), „fibroblast growth factors“ (FGFs) und Wnts zählen.

Eine Überexpression von TGF- β im artikulären Knorpel bewirkt beispielsweise die Proliferation der Chondrozyten, initiiert jedoch auch die hypertrophe Differenzierung und anschließende Mineralisierung (Narcisi et al., 2011; Serra et al., 1997). Bei einem Mangel an TGF- β 1 im Gelenkknorpel wurde ein Arthrose ähnliches Krankheitsbild nachgewiesen (Blaney Davidson et al., 2007). Demnach ist TGF- β wichtig für die Aufrechterhaltung der Knorpelintegrität, kann aber bei erhöhter Expression die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten auslösen.

BMPs in der Wachstumsfuge begünstigen die frühe chondrogene Differenzierung sowie die Proliferation und hypertrophe Differenzierung im fortgeschrittenen Stadium der enchondralen Ossifikation, während die FGF-Proteine dem entgegenwirken. Sie inhibieren also die Proliferation der Chondrozyten, die Knorpelmatrix-Synthese sowie die hypertrophe Differenzierung und begünstigen hingegen die Apoptose der Chondrozyten und die Induktion der Mineralisierung (Yoon and Lyons, 2004). Im artikulären Knorpel wurde entsprechend eine auffallend hohe Expression von Antagonisten und Inhibitoren des BMP- und auch des Wnt-Signalwegs nachgewiesen, die möglicherweise dafür sorgen, dass der permanente Knorpelphänotyp aufrechterhalten und die terminale Differenzierung verhindert wird (Gelse et al., 2012).

Für die Mitglieder der Wnt-Proteinfamilie wurde ebenfalls gezeigt, dass sie in die verschiedenen Differenzierungsstadien der enchondralen Ossifikation eingreifen. Während der Kondensierung der MSCs favorisieren die Wnts die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Osteoblasten, während sie die Differenzierung zu Chondrozyten inhibieren. Im späteren Stadium hingegen ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg für die Reifung der Chondrozyten essentiell, da er hierbei als positiver Regulator der Hypertrophie und anschließenden Ossifikation fungiert (Kronenberg, 2003).

1.4 Hyperostose

Wie zuvor anhand der enchondralen Ossifikation gezeigt, stehen das Knorpel- und Knochengewebe in einem engen Zusammenhang zueinander. Demnach führen nicht nur pathologische Veränderungen im Knorpel sondern auch im Knochen zu massiven Beeinträchtigungen des Bewegungsapparats.

Um die physiologische Knochenmenge aufrecht zu erhalten, bedarf es eines Gleichgewichts zwischen den Osteoblasten, die die Knochenmatrix aufbauen und den Osteoklasten, die sie resorbieren. Verschiebt sich das dynamische Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau zu Gunsten des Abbaus, entsteht eine Osteoporose mit verminderter Knochenmasse. Bei einer Verschiebung in Richtung der pathologischen Zunahme an Knochensubstanz entsteht eine Hyperostose, auch bezeichnet als Knochenhypertrophie oder Knochenhyperplasie (de Vernejoul and Kornak, 2010; Zaidi, 2007). Hyperostosen können nach innen (Endostose) oder nach außen (Exostose) gerichtet auftreten. Sie sind periostalen, enchondralen oder endostalen Ursprungs und betreffen einzelne Knochenbereiche oder treten systemisch im gesamten Skelett auf. Es gibt eine Vielzahl an Hyperostosen, die nach dem primär betroffenen Zelltyp, zellulären Mechanismus und klinischen Symptomen unterschieden werden können (de Vernejoul and Kornak, 2010). Gemeinsam ist ihnen allen, dass es zu einer Funktionsstörung der Osteoklasten und/oder der Osteoblasten kommt, die zu einer vermehrten Knochenbildung und -verdichtung führt. Liegt ein Defekt in den Osteoblasten vor, spricht man häufig von einer Osteosklerose, sind hingegen Osteoklasten für die Zunahme der Knochendichte verantwortlich von einer Osteopetrose.

Die Mehrheit der humanen Knochenstörungen konnte bisher auf einen Defekt in den Osteoklasten zurückgeführt werden. Der Grund hierfür ist möglicherweise, dass die meisten Osteopetrosen auf einem monogenen Defekt beruhen, der häufig sehr schwere und damit auffälligere Veränderungen des Knochen- und Immunphänotyps hervorruft. Während Osteosklerosen aufgrund milderer Krankheitsverläufe oftmals unerkannt bleiben.

1.4.1 Osteoklastendefekt (Osteopetrose)

Bei Osteopetrosen kann die Anzahl der reifen, resorbierenden Osteoklasten reduziert oder deren Funktionalität beeinträchtigt sein (Boyle et al., 2003). Bezüglich der Funktionalität sind Defekte bei der Haftung der Osteoklasten an der Knochensubstanz (Teti et al., 1999), bei der Ansäuerung der Resorptionslakune (Kornak and Mundlos, 2003), bei der Bereitstellung des neutralen pH-Werts in der Zelle (Josephsen et al., 2009) oder bei der proteolytischen Auflösung der kollagenen Knochenmatrix (Gelb et al., 1996) beschrieben.

1.4.2 Osteoblastendefekt (Osteosklerose)

Die humanen Hyperostosen, die auf Defekte in der Osteoblastendifferenzierung zurückgehen, sind mit dem TGF- β -Signalweg, dem Eicosanoid-Signalweg oder dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg verknüpft (de Vernejoul and Kornak, 2010; Janssens et al., 2000). Für die menschliche Osteosklerose sind intensiv erforscht worden: Einerseits die genetisch bedingte milde Form, die auf einer Mutation im *LRP5*-Gen beruht, und andererseits die Sklerosteose, bei der Mutationen im Sclerostin (*SOST*)-Gen vorliegen (Little et al., 2002a; Vanhoenacker et al., 2000). Sowohl *LRP5* als auch Sclerostin spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Osteogenese und sind im Wnt/ β -Catenin-Signalweg integriert.

Die bei der endostealen Hyperostose (Worth Syndrom) zugrunde liegende Mutation im *LRP5*-Gen beeinträchtigt die Bindungskapazität des Antagonisten Dkk1 an den *LRP5/6*-Rezeptor. Dies wiederum führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs und somit zu einer gesteigerten Knochenbildung (Bodine et al., 2004). Sclerostin ist ein Antagonist der BMPs, die vor allem in der Skelettentwicklung involviert sind. Zu den radiologischen Symptomen der Sklerosteose gehören die endosteale Verdickung des kortikalen Knochens und die damit einhergehende Verdrängung des Knochenmarks.

1.5 Der STR/ort-Mausstamm

1.5.1 Der STR/ort-Mausstamm - ein etabliertes Mausmodell für Arthrose

Der STR/ort-Mausstamm geht auf den Elternstamm STR/1N zurück, bei dem 1951 zunächst eine weiß-braun gescheckte Mutante in der Nachkommengeneration F29 auftrat (Sokoloff and Barile, 1962), die dann weitergezüchtet wurde (Walton, 1975). Das Charakteristische an dem resultierenden Inzuchtstamm STR/ort ist, dass 85 Prozent der STR/ort-Männchen spontan eine Arthrose im Kniegelenk (*Gonarthrose*) entwickeln. Bereits bei 10 Wochen alten Männchen treten leichte Läsionen des Knorpelgewebes auf, die sich dann im Alter von 20 Wochen zu massiven Knorpeldegenerationen manifestieren. Die medialen Gelenkflächen sind generell in einem deutlich höheren Ausmaß von den degenerativen Veränderungen betroffen als die lateralen (Sokoloff, 1956). Die arthrotischen Gewebeläsionen im Gelenk von STR/ort-Mäusen sind mit dem Krankheitsbild der humanen Arthrose vergleichbar und reichen von milden Erosionen an der Knorpeloberfläche bis hin zum vollständigen Verlust des hyalinen Knorpels und damit zur Freilegung des subchondralen Knochens (Walton, 1977). Für die murine als auch für die humane Arthrose-Pathogenese ist die Degradation der Knorpelmatrix durch MMPs und Aggrecan abbauende Enzyme (Aggrecanasen) charakteristisch (Lark et al., 1997). Der STR/ort-Stamm eignet sich somit hervorragend zur Erforschung der biochemischen Prozesse, die zur Initiierung und Progression der Arthrose führen. Außerdem können genetische Hintergründe aufgeklärt werden, die dann Rückschlüsse auf die genetischen Ursachen der humanen Arthrose ermöglichen.

Die STR/ort-Mäuse neigen generell zu Übergewicht, doch eine Korrelation zwischen Gewicht und Arthrose konnte nicht bestätigt werden (Jaeger et al., 2008; Watters et al., 2007). Die Arthrose beim STR/ort-Stamm wird als eine polygenetische Erkrankung beschrieben, die rezessiv weitervererbt wird. Die STR/ort-Weibchen weisen im Vergleich zu den Männchen arthrotische Veränderungen erst später und in einem geringeren Ausmaß auf (Walton, 1977). Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Erkrankung geschlechtsspezifisch vererbt wird (Sokoloff et al., 1962). Allerdings wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von Zytokinen im artikulären Knorpel bei zwei Monate alten STR/ort-Mäusen aufgezeigt. Hierbei wurde

in den Chondrozyten der STR/ort-Weibchen mehr TGF β 1 und Interleukin 4 freigesetzt als in den Chondrozyten der STR/ort-Männchen, wodurch die Weibchen möglicherweise vor dem verfrühten Knorpelabbau geschützt sind (Mahr et al., 2003). Dieser chondroprotektive Effekt könnte auf eine verstärkte Hormonfreisetzung in jungen STR/ort-Weibchen deuten. Eine andere Studie mit ovariectomierten STR/ort-Weibchen konnte jedoch nur einen geringfügigen protektiven Einfluss des Östrogens auf die Entwicklung von Arthrose aufzeigen (Chamber et al., 1999).

Interessanterweise sind bei der humanen Arthrose vor dem 50. Lebensjahr vermehrt die Männer betroffen. Nach dem 50. Lebensjahr hingegen steigt die Inzidenzrate bei den postmenopausalen Frauen deutlich an. Demnach führt der verringerte Östrogenhaushalt zu einem vermehrten Knorpelverlust, was die Entwicklung von Arthrose begünstigt (Felson and Nevitt, 1998; Wluka et al., 2001). Es wurden eine Reihe weiterer Studien bezüglich dem Einfluss von Östrogen auf die Entstehung von Arthrose durchgeführt. Diese lieferten jedoch insgesamt widersprüchliche Ergebnisse (Richmond et al., 2000; Silberberg and Silberberg, 1963; Tsai and Liu, 1993). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Abnahme der Östrogenproduktion mit einer verringerten Knochenmenge und mit Strukturveränderungen im subchondralen Knochen korreliert und auf diesem Weg zu einer erhöhten Arthrose-Inzidenz führen könnte (Sniekers et al., 2010).

1.5.2 Der STR/ort-Mausstamm - ein Hyperostose-Mausmodell

Das Besondere an dem STR/ort-Mausstamm ist weiterhin, dass er einen auffälligen Zuwachs an Knochensubstanz, also eine Hyperostose, aufweist. Bisher gibt es jedoch nur einige wenige Studien, die sich mit dem Knochenphänotyp von STR/ort-Mäusen beschäftigt haben. Es wurden die Kniegelenke von drei bis zehn Monate alten STR/ort-Männchen mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) untersucht und hierbei eine altersabhängige Strukturveränderung des subchondralen Knochens gefunden. Besonders im Bereich des Kortex und der Epiphyse wurde eine Zunahme an Knochendichte beobachtet, während es parallel dazu zum Abbau von Knorpelmatrix kam (Stok et al., 2009). In einer weiteren Studie wurden ebenfalls die STR/ort-Männchen im Alter von zwei bis zehn Monaten hinsichtlich einer gesteigerten Knochendichte untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die STR/ort-Mäuse mit Arthrose im Vergleich zu den STR/ort-Mäusen ohne Arthrose mit zunehmendem Alter mehr Knochendichte entwickeln (Sarukawa et al., 2010). Bisher wurde ausschließlich der Knochenphänotyp der Männchen und hierbei speziell der subchondrale Knochen im Bereich der Epiphyse untersucht, um den Zusammenhang zwischen Knochen- und Knorpelmetabolismus in Bezug auf die Arthrose zu erforschen.

Eine kürzlich erschienene Studie von Uchida et al. (2012) befasste sich erstmals mit dem Vergleich der Knochendichte zwischen den Männchen und Weibchen des STR/ort-Stamms. Hierbei konnten die Autoren eine frühere Abnahme des trabekulären Knochenvolumens und der Knochendichte bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen feststellen. Außerdem beobachteten sie eine altersabhängige Reduktion des Knochenmarkkanals in den Femora beider Geschlechter, die allerdings bei den Weibchen deutlich stärker ausgeprägt war. Desweiteren führten sie eine Ovariectomie an den STR/ort-Weibchen durch, um den bereits bekannten verstärkenden Einfluss der fehlenden Östrogenproduktion auf die Knochenresorption (Weitzmann and Pacifici, 2006) zu untersuchen. Hierbei konnten sie erwartungsgemäß eine signifikante Abnahme der Knochendichte aufzeigen. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Knochenstruktur könnten also beim STR/ort-Mausstamm mit der unterschiedlichen Inzidenz gegenüber Arthrose assoziiert sein (Uchida et al., 2012).

1.6 Motivation und Zielstellung der Arbeit

Der STR/ort-Mausstamm ist ein gut etabliertes Modell für die spontane Entwicklung einer Arthrose. Das Krankheitsbild ist bereits intensiv charakterisiert, die Ursachen für die Initiierung der Erkrankung sind jedoch bis heute ungeklärt. Der STR/ort-Stamm weist desweiteren eine auffällige Knochenüberproduktion (Hyperostose) auf. Allerdings wurde dieser interessante Phänotyp bisher kaum untersucht.

Diese Arbeit untergliedert sich demnach in zwei Abschnitte:

Abschnitt 1 (Arthrose):

In der Arbeit von Jäger et al. 2008 wurde erstmals, mittels einer auf Mikrosatelliten basierenden Kopplungsanalyse, nach den genetischen Ursachen gesucht. Hierbei konnte ein mit Arthrose assoziierter Genbereich auf dem STR/ort-Chromosom 8 bei 21,3 cM identifiziert werden. Dieser wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit (Pasold, 2008) unter Verwendung zusätzlicher Mikrosatellitenmarker feinkartiert, um Hinweise auf potentielle Kandidatengene zu erhalten. Hierbei konnten einige Gene, die in der Chondro- und Osteogenese involviert sind, gefunden werden. Wir konzentrierten uns im Folgenden auf „dickkopf 4“ (*Dkk4*) und „secreted frizzled-related protein 1“ (*Sfrp1*) als Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, sowie auf „fibroblast growth factor receptor 1“ (*Fgfr1*) und „growth arrest specific 6“ (*Gas6*).

Das Ziel war es nun, diese Kandidatengene mittels Sequenz- und Genexpressionsanalysen zu untersuchen, um folgende Fragen beantworten zu können:

1. Weisen die Kandidatengene strukturelle und/oder regulatorische Polymorphismen auf, die mit der Arthrose des STR/ort-Stamms assoziiert sein könnten?
2. Sind die Kandidatengene während der chondrogenen Differenzierung differentiell exprimiert und tragen möglicherweise mehrere Gendefekte zur Entstehung der Arthrose im STR/ort-Stamm bei?

Abschnitt 2 (Hyperostose):

Die wenigen Studien zum Knochendefekt des STR/ort-Stamms konzentrierten sich bisher vor allem auf die Analyse des subchondralen Knochens, um einen Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Knochen und der Initiierung bzw. Entwicklung von Arthrose herzustellen. Wir wurden während der Isolierung von Knochenmarkszellen aus Femora und Tibiae auf die altersabhängige, vermehrte Knochenbildung in den Röhrenknochen der STR/ort-Mäuse aufmerksam.

Unser Interesse galt nun der genauen Charakterisierung des Knochenphänotyps. Hierbei stellten wir uns folgende Fragen:

3. Treten Veränderungen am trabekulären und kortikalen Knochen auf?
4. Welche Skelettknochen und welche Knochenbildungsprozesse (desmale und/oder enchondrale Ossifikation) sind betroffen?
5. Bei welcher Altersstufe tritt die erhöhte Knochenmenge erstmalig auf und wie verändert sich das Knochenvolumen mit zunehmendem Alter?
6. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede?
7. Liegt ein Defekt in den Osteoblasten und/oder Osteoklasten vor?
8. Handelt es sich beim STR/ort-Stamm um ein neues Hyperostose-Modell?

Abschließend stellten wir uns die Frage:

9. Könnte die Entwicklung der beiden Erkrankungen (Arthrose und Hyperostose) im STR/ort-Stamm über eine Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Zusammenhang stehen?

2 Material & Methoden

2.1 Mäuse

Der STR/ort-Mausstamm wurde ursprünglich von Harlan Winkelmann (Borchen, Germany) und der C57BL/6-Mausstamm von Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen. Seit dem werden beide Stämme in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock unter spezifischen keimfreien Bedingungen gezüchtet.

2.2 DNA-Isolierung aus Milzgewebe

Die Aufreinigung der genomischen DNA aus 30-100 mg gefrorenem Milzgewebe von C57BL/6- und STR/ort-Mäusen wurde mit dem Invisorb® Spin Tissue Midi Kit der Firma Invitex GmbH (Berlin, Germany) durchgeführt. Das Milzgewebe wurde mit Lysepuffer und Protein spaltender Proteinase K versetzt und über Nacht unter ständigem Schütteln in einem Thermomixer bei 52 °C inkubiert. Die so aus den Zellen freigesetzte genomische DNA wurde dann mittels Bindepuffer, unter Ausnutzung der negativen Ladung der Nukleinsäure, an die Zentrifugations-Filtereinheit gebunden. Es folgten zwei Waschschriffe mit ethanolhaltigem Puffer, um mögliche Verunreinigungen wie Proteinreste zu entfernen. Im Filter verbleibende Ethanolrückstände wurden anschließend durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 1.279 x g entfernt. Zum Schluss wurde die aufgereinigte genomische DNA in HPLC-Wasser (LiChrosolv®, Wasser für die Chromatographie, MERCK, Darmstadt, Germany) eluiert und für weiterführende Experimente bei 4 °C gelagert.

Die Konzentrationen der DNA-Proben konnten mit dem NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) direkt bestimmt werden. Für die Messung wurde nur 1 µl der DNA-Probe benötigt. Die Absorption (A) wurde bei den Wellenlängen 260 nm (für Nukleinsäuren) sowie 280 nm (für Proteine) und 230 nm (für Phenole und Polysaccharide) gemessen. Das Verhältnisse $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ geben die Reinheit der DNA an. Der Quotient $A_{260/280}$ von 1.7 bis 1.9 gilt als optimal. Werte kleiner 1.7 zeigen Proteinkontaminationen, Werte größer 1.9 RNA- und Ethanolreste an. Der Quotient $A_{260/230}$ sollte 2.0 bis 2.2 betragen.

2.3 RNA-Isolierung

2.3.1 Isolierung von RNA aus primären Zellen und Milzgewebe

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Germany) und wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers durchgeführt.

Der Zellaufschluss erfolgte in Abhängigkeit des Probenmaterials auf drei verschiedenen Wegen:

Primäre Knochenmarkszellen aus C57BL/6- und STR/ort-Mäusen wurden für 14 bis 21 Tage im Monolayer kultiviert, um mesenchymale Stromazellen zu generieren (Abschnitt 2.5.1). Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (TPP 30 cm, MIDSCI™, St. Louis, Missouri, USA) vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach dem Überführen der Zellen in 15 ml-Falcon-Röhrchen (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) wurde bei 310 x g für 5 min zentrifugiert (Heraeus® Sepatech Megafuge 1.0 R). Das PBS wurde dann komplett abgenommen, das Pellet in 600 µl RLT⁺-Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und die so lysierten Zellen bei -20 °C gelagert.

Für die chondrogenen 3D-Pelletkulturen (Abschnitt 2.5.1) wurden 5 bis 10 Pellets pro Maus mittels einer 1000er-Pipette in ein steriles 40 µm Nylon-Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg, Germany), das sich in einer mit 1x PBS gefüllten Petrischale befand, übertragen und gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 600 µl RLT⁺-Puffer resuspendiert und in FAST PREP®-24 Lysis Matrix D Tubes (MP Biomedicals, OH USA) überführt und bei 6 m/s für 40 sec homogenisiert (FastPrep®-24 Homogenisierer von MP Biomedicals). Nach dem sofortigen Abkühlen der Proben wurden sie 13.000 x g für 1 min zentrifugiert (MIKRO 22R Typ 1110 von Hettich, Bäch, Switzerland). Das Lysat wurde in ein neues 1.5 ml-Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Das Milzgewebe wurde, wie zuvor für die Pelletkulturen beschrieben, homogenisiert. Um dann Proteine und DNA von der RNA zu trennen, wurde eine Phenol-Chloroform-Fällung angeschlossen. Hierbei werden Proteine in der unteren, organischen Phase (Chloroform) gesammelt, während die RNA in der oberen (wässrigen) Phase gelöst vorliegt. Die DNA ist größtenteils an der Phasengrenze zu finden. Es wurden

700 µl Phenol-Chloroform zu 600 µl Gewebesuspension gegeben und für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1.5 ml-Gefäß überführt (Lagerung bei -20 °C).

Alle nun folgenden Schritte der RNA-Isolierung waren für Milzgewebe, Pellet- und Monolayerkulturen gleich. Das homogenisierte Gewebe- oder Zellysat wurde auf eine gDNA-Eliminierungssäule gegeben und bei 8000 x g für 30 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem gleichen Volumen an 70 %-igem Ethanol versetzt und gut vermischt. Dieses Gemisch wurde auf eine RNeasy®-RNA-Säule pipettiert und bei 8000 x g für 15 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Die RNA haftete an der Säulenmembran und wurde mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern RW1 und RPE gewaschen und zum Schluß mit RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde, wie zuvor auch die DNA, mit dem NanoDrop® bestimmt. Für eine ideale RNA-Reinheit sollten die Quotienten $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ um den Wert 2.0 liegen.

2.3.2 RNA-Qualitätsanalyse mittels Pico- und Nanochip

Die Bestimmung der RNA-Qualität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der Agilent RNA 6000 Pico oder Nano Kit verwendet. Mindestens 50 pg/µl bzw. 25 ng/µl pro RNA-Probe wurden auf einen Pico- bzw. Nanochip nach beiliegendem Standardprotokoll aufgetragen und mittels Agilent 2100 Expert Software analysiert. Es resultierte eine RNA Integritäts-Nummer (RIN) von 1-10 (1 = geringste; 10 = höchste), die als Indikator der RNA-Qualität fungierte. Nur RNA-Proben mit einer RIN größer 7.5 wurden für weitere Experimente verwendet.

2.4 Sequenzierung nach Sanger (Didesoxymethode)

In dem von Sanger 1977 entwickelten Kettenabbruchverfahren wird das zu sequenzierende DNA-Amplifikat in einer enzymatischen Reaktion mit einem Vorwärtsprimer bzw. Rückwärtsprimer, Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) und fluoreszierenden Didesoxy-Nukleotid-Triphosphaten (ddNTPs) versetzt. Das Hauptprinzip der Sanger-Methode beruht auf der Verwendung der ddNTPs, denen die 3'-

Hydroxyl(-OH)-Gruppe an der Desoxyribose fehlt. Sobald eines der vier ddNTPs in das neu synthetisierte DNA-Fragment eingebaut wird, kommt es zum sofortigen Kettenabbruch, da keine weitere Phosphodiesterbindung zu einem folgenden Nukleotid ausgebildet werden kann. In der Sequenzreaktion liegen die Standardnukleotide (dNTPs) 10-fach höher konzentriert vor als die ddNTPs. Nur so kann gewährleistet werden, dass neben kurzen auch ausreichend lange DNA-Fragmente synthetisiert werden. Die ddNTPs sind entsprechend ihrer jeweiligen Base (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, so dass die unterschiedlich langen DNA-Fragmente je nach eingebautem ddNTP bei einer jeweils anderen Wellenlänge fluoreszieren. Die Analyse der Sequenzprodukte erfolgte mittels kapillarer Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.4.1.1). In dieser Arbeit wurde sowohl genomische DNA als auch cDNA mittels der Sanger-Methode sequenziert.

2.4.1 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde ein zur RNA komplementärer DNA-Strang (cDNA), hergestellt. Die cDNA-Synthese (Tab. 1) wurde nach dem Standardprotokoll von Promega (WI, USA; <http://www.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/mmlv-reverse-transcriptase-protocol/>) mit je 1 µg RNA-Probe durchgeführt.

Tab. 1: Chemikalien für den Ansatz der cDNA-Synthese – Teil 1.

Komponente	Konzentration Stocklösung	Konzentration im 25 µl-Ansatz
Oligo (dT) ₁₅ Primer (Promega)	500 µg/ml	0.07 µg/µl
RNA	100-500 ng/µl	0.07 µg/µl
DNase/RNase freies Wasser	-	Ad. 25 µl

Das Gemisch aus RNA, Primer und HPLC-H₂O wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt (Primerhybridisierung) und danach sofort auf Eis gestellt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Erst dann wurden dNTPs und die Reverse Transkriptase hinzugegeben (Tab. 2) und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion abzuhalten wurde die Reverse Transkriptase für 1 min bei 95 °C denaturiert.

Tab. 2: Chemikalien für den Ansatz der cDNA-Synthese – Teil 2.

Komponente	Konzentration Stocklösung	Konzentration im 25 µl-Ansatz
M-MLV Reaktionspuffer	5x	1x
dNTPs (PeqLab)	je 2,5 mM	je 0,5 mM
M-MLV Rev. Transkriptase	200 U/µl	8 U/µl
DNase/RNase freies Wasser	-	Ad. 25 µl

2.4.2 Amplifizierung der cDNA und gDNA

An die Synthese der cDNA schloss sich die Gen spezifische Amplifikation zur Herstellung einer ausreichenden Menge an „Template-DNA“ (Tab. 3).

Tab. 3: Chemikalien für die Amplifizierung der cDNA.

Komponente	Firma	Konzentration Stocklösung	Konz. im 20 µl-Ansatz
PCR-Puffer	PeqLab	10 x	1 x
MgCl ₂	PeqLab	25 mM	1,5 mM
dNTP	PeqLab	je 2,5 mM	je 800 µM
Primer (5´/3´-Mix)	Sigma Aldrich	je 20 µM	je 0,1-1 µM
Taq-Polymerase	PeqLab	5 U/µl	0,025 U/µl
cDNA	-	2 µg/µl	100 ng/µl
HPLC-H ₂ O	Merck	-	Ad. 20 µl

Desweiteren wurde auch das genomische PCR-Produkt amplifiziert (Tab. 4). Hierbei wurden die in Tabelle S1 (siehe Anhang) aufgelisteten Primer verwendet.

Tab. 4: Chemikalien für die Amplifizierung der genomischen DNA.

Komponente	Firma	Konzentration Stocklösung	Konz. im 30 µl-Ansatz
PCR-Puffer	PeqLab	10 x	1 x
MgCl ₂	PeqLab	25 mM	1 mM
dNTP	PeqLab	je 2,5 mM	je 0.2 mM
Primer (5´/3´-Mix)	Sigma Aldrich	je 1 µM	je 0,1 µM
Taq-Polymerase	PeqLab	5 U/µl	0,25 U/µl
gDNA	-	20 ng/µl	4 ng/µl
HPLC-H ₂ O	Merck	-	Ad. 30 µl

Die PCR-Zyklen für cDNA und gDNA (Mastercycler® gradient, Eppendorf) umfassten: Die initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min.

Es folgten insgesamt 35 Zyklen mit 1. Denaturierung bei 94 °C (30 sec), 2. Primerhybridisierung bei 58 °C (30 sec) und 3. Strangverlängerung bei 72 °C (45 sec).

Am Ende wurde eine zusätzliche Synthetisierungsphase bei 72 °C (5 min) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden bei 4 °C gehalten.

2.4.3 Sequenzierung der PCR- und RT-PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN (Hilden, Germany) nach dem Standardprotokoll des Herstellers aufgereinigt.

Für die Sequenzierung wurde dann der GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) verwendet. In der Sequenz-Reaktion wurden 13-26 ng/µl des PCR-Produkts zu 4 µl DTCS Quick Start Master Mix und 1 µl Vorwärts- oder Rückwärtsprimer pipettiert. Mit HPLC-H₂O wurde dann auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Die Sequenzierung von cDNA und gDNA umfasste 35 Zyklen:

1. Denaturierung bei 96 °C (20 sec), 2. Primerhybridisierung bei 50 °C (20 sec) und
3. Strangverlängerung bei 60 °C (3 min). Abschließend wurden die PCR-Produkte bei 4 °C gehalten.

2.4.3.1 Ethanolpräzipitation

Auf 10 µl PCR-Produkt wurden 5 µl Stopp-Lösung (2 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2), 2 µl 100 mM Na₂-EDTA (pH 8.0) und 1 µl 20 mg/ml Glykogen) gegeben und gemischt. Dazu kamen 60 µl eiskaltes 95 % (v/v) Ethanol/H₂O. Es wurde dann sofort bei 21.250 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert (MIKRO 22R Typ 1110 von Hettich). Anschließend konnte der Überstand vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen werden. Das Pellet wurde dann mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol/H₂O gewaschen und bei 21.250 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette entfernt und die Proben für 15 min bei RT offen stehen gelassen, damit der restliche Ethanol

verdunsten konnte. Das Pellet wurde in 30 µl Sample Loading Solution (SLS, GenomeLab™) resuspendiert.

2.4.3.2 Sequenzierung mittels kapillarer Gelelektrophorese

Die Sequenzierung erfolgte im CEQ 8800 Genetic Analysis System von Beckman Coulter (Krefeld, Germany) mittels kapillarer Gelelektrophorese.

Die zuvor in SLS gelösten PCR-Proben wurden auf eine 96-Well-Platte verteilt und jeweils mit einem Tropfen Mineralöl (GenomeLab™) abgedeckt. In die entsprechenden Wells einer zweiten Platte wurde Separationspuffer (GenomeLab™) gefüllt. Die Proben- und Pufferplatte wurden dann in das automatisierte Sequenziergerät geladen und das Programm „LFR-1“ verwendet. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden in den mit Gel beladenen Kapillaren elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt und über einen Fluoreszenzdetektor erfasst.

2.5 Genexpressionsanalyse (GeXP)

2.5.1 Generierung von Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten *in vitro*

4-8 Wochen alte STR/ort- und C57BL/6-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Gliedmaßen (Femur, Tibia und Humerus) entnommen. Das die Knochen umgebende Muskelgewebe wurde vorsichtig mit der Schere entfernt. Dann wurden die Knochen, ohne dabei die Knochenmarkskanäle freizulegen, in steriles Medium DMEM (Life Technologies, Darmstadt, Germany) mit 10 % FBS und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin überführt und auf Eis gelagert. Die Isolierung der Knochenmarkszellen erfolgte unter der Sterilbank. Hierfür wurden Petrischalen, 50 ml-Falcon-Röhrchen, 10 ml-Spritzen, Zellsiebe (40 µm Nylon), Schere, Pinzette und Ethanol (70 %) benötigt. Die Enden der Knochen wurden abgetrennt und der Knochenmarkskanal freigelegt. Eine Kanüle wurde in den Kanal eingeführt und die Zellen mit warmem Medium in ein steriles Falcon-Röhrchen gespült. Anschließend wurde bei 270 x g für 7 min zentrifugiert (Heraeus® Sepatech Megafuge 1.0 R), der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem, warmem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und ca. 1

$\times 10^6$ Zellen/cm² ausgesät. Nach dem Protokoll von Taipaleenmaki et al., 2008 wurden die Zellen zunächst 2 h auf Plastik bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle bis dahin nicht angehafteten Zellen wurden abgenommen und erneut mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/cm² ausplattiert. Somit wurde die Kultur von schnell anhaftenden Fibroblasten befreit. Nach weiteren 48 h in Kultur wurden nun alle nicht-adhären Zellen verworfen, während die adhären Zellen (inklusive der mesenchymalen Stromazellen, MSCs) mit 1x PBS gewaschen und weiter kultiviert wurden. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Nach 2-3 Wochen Kultivierung waren die Zellen konfluent gewachsen und standen für die weitere Differenzierung in Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten zur Verfügung. Hierfür wurden die Zellen mittels Inkubation in 0.25 % Trypsin/1 mM EDTA für 5 min bei 37 °C von der Plastik abgelöst, bei 270 x g für 7 min zentrifugiert und in chondrogenem, osteogenem bzw. adipogenem Medium resuspendiert. Bei allen Ansätzen wurde DMEM mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

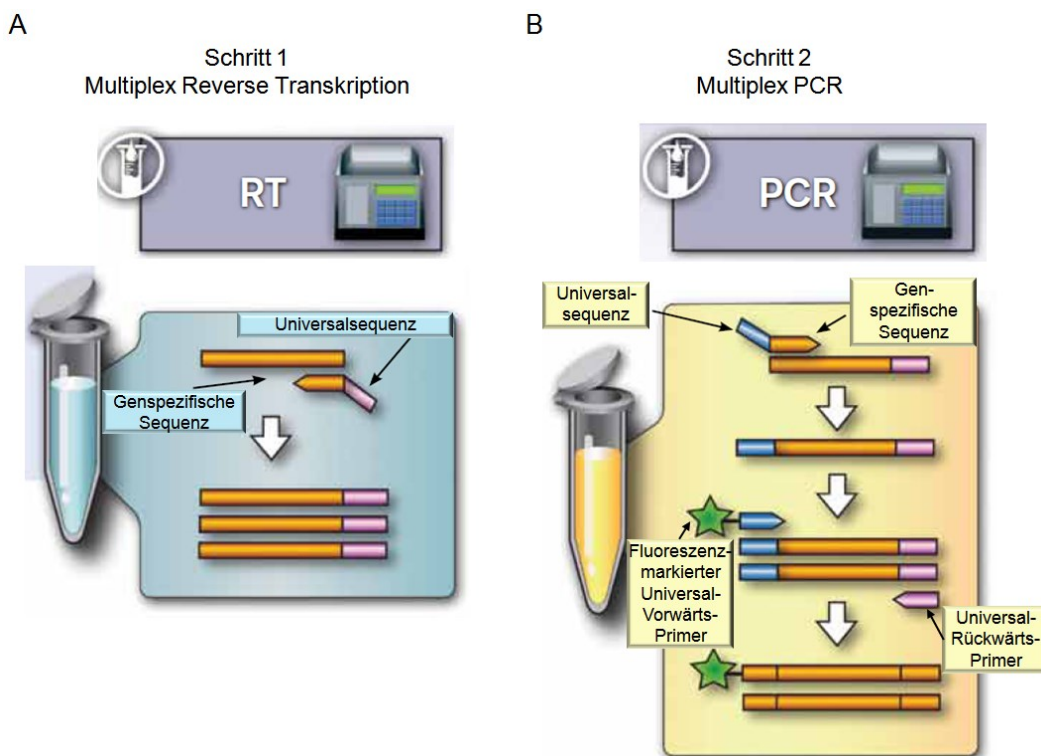
Die Differenzierung zu Chondrozyten erfolgte in einer 3D-Pelletkultur. Hierfür wurden 3×10^5 Zellen (in 500 µl Medium) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde angereichert mit 50 µg/ml L-Ascorbinsäure 2-Phosphat, 40 µg /ml L-Prolin, 100 µg/ml Na-Pyruvat und 100 nM Dexamethason (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) sowie 50 mg/ml ITS+Premix (BD Bioscience, Heidelberg, Germany), 10 ng/ml TGF-β3 und 500 ng/ml BMP2/7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Zellen wurden dann 7, 14 und 21 Tage kultiviert (pro Maus 5 bis 10 Pellets parallel). Anschließend wurden 1 bis 2 Pellets für immunhistologische Analysen in Paraformaldehyd (4 %) fixiert Die restlichen Pellets wurden vereint und für die RNA-Isolierung (Abschnitt 2.3.1) verwendet.

Für die Differenzierung zu Osteoblasten wurden 2×10^4 Zellen/cm² in Monolayer ausgesät. Dem Medium wurde nach 2 Tagen 10 mM Na-β-Glycerophosphat, 50 µg/ml L-Ascorbinsäure 2-Phosphat und 10 nM Dexamethason (Sigma-Aldrich) zugegeben. Die Zellen wurden für 21, 28 oder 35 Tage kultiviert.

Für die Differenzierung zu Adipozyten wurden 1×10^5 Zellen/cm² in Monolayer ausgesät. Dem Medium wurde nach 2 Tagen 1 µM Dexamethason, 5 µg/mL Insulin und 50 µM Indomethacin (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Kultivierung dauerte 14 d.

2.5.2 GeXP-Analyse im Multiplex

Das GenomeLab Genexpressionsanalyse (GeXP) -System von Beckman Coulter ist ein Multiplex-PCR-Ansatz, der die Lücke zwischen der sog. Real-Time-PCR und den Hybridisierungstechniken mittels DNA-Chips („Microarrays“) schließt. Das GeXP-System ermöglicht es mehrere Gene (<10 bis >100) und gleichzeitig mehr als 10.000 Proben parallel zu analysieren. Die GeXP-Methode ist eine modifizierte Endpunkt-Reverse-Transkriptase (RT)-PCR, bei der die Peakhöhe der einzelnen genspezifischen Fragmente am Ende der Reaktion dem jeweiligen Expressionslevel des Gens entspricht. Um dies zu erreichen, werden im ersten Schritt in der RT-Reaktion chimäre Rückwärtsprimer eingesetzt und im 2. Schritt chimäre Vorwärtsprimer sowie Universalprimer für die Amplifikation der cDNA-Fragmente hinzugefügt (Abb.4).



(verändert nach Beckman Coulter®)

Abb. 4: Das GeXP-System - eine vereinfachte 2-Schritt-Multiplex-Analyse. (A) Im ersten Schritt, der reversen Transkription, werden genspezifische chimäre Rückwärtsprimer verwendet, die die cDNA mit einer Universalsequenz flankieren. (B) In der Multiplex-PCR werden chimäre Vorwärtsprimer und universale Primer eingesetzt. In den ersten beiden Zyklen werden mittels genspezifischer Sequenzen der chimären Primer Amplifikate hergestellt. Die Universalprimer übernehmen die Amplifizierung während des dritten Zyklus. Die universalen Vorwärtsprimer sind fluoreszenzmarkiert (grüner Stern).

Die chimären Primer besitzen einen spezifischen mRNA- bzw. cDNA-bindenden Bereich und einen terminalen Abschnitt, der bei Rückwärts- und Vorwärtsprimern identisch ist. Die Universalprimer hybridisieren mit dem terminalen Abschnitt der chimären Primer. Die universalen Vorwärtsprimer sind hierbei fluoreszenzmarkiert. Die Universalprimer liegen in der PCR-Reaktion in einem deutlichen Überschuss vor, so dass die Amplifikation der Gen-Fragmente bereits nach 3 Zyklen allein mit diesen Primern abläuft.

Mittels kapillarer Gelelektrophorese wird die Größe und Intensität der resultierenden Fragmente detektiert und mit der eXpress Profiler Software ausgewertet. Die Höhe der genspezifischen Signale wird auf ein im PCR-Ansatz enthaltenes Referenzgen (in diesem Fall *Gapdh*) normiert, so dass eine quantitative Auswertung bezüglich der relativen Expressionsraten erfolgen kann. Der Vorteil der Methode ist, dass jedes genspezifische Fragment durch die Größenangabe in Basenpaaren eindeutig identifiziert werden kann und pro Ansatz weniger als 5 ng RNA-Probe benötigt werden. Ideal ist es 1 bis 30 Gene in einem Ansatz parallel zu analysieren. Desweiteren ist die Methode sehr sensitiv, weil bereits 0.5-fache Veränderungen in der Genexpression detektierbar sind.

Für die RT-Reaktion und die sich anschließende Genexpressions-PCR wurde der GenomeLab GeXP Start Kit (Beckman Coulter, A21019) verwendet. Zuvor musste der RT-„Primerplex“ sowie der PCR-„Primerplex“ hergestellt werden. Für den RT-„Plex“ wurden die chimären Rückwärts-Primer (je 500 nM) der zu analysierenden Gene (Tab. 6) und im PCR-„Plex“ entsprechend die Vorwärts-Primer (je 200 nM) angesetzt (Tab. 7).

Tab. 6: Liste der Rückwärts-Primer für den RT-„Primerplex“ der OA-Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1*, des chondrogenen Markers *Acan* und des Referenzgens *Gapdh*.

Gen	Sequenz inklusive Universalsequenz(5' - 3')
<i>Gas6</i>	GTACGACTCACTATAGGGAAAGTGTGTCCAGTCGCTCCT
<i>Fgfr1</i>	GTACGACTCACTATAGGGAGAAGTCGCTCTTCTTGGTGC
<i>Dkk4</i>	GTACGACTCACTATAGGGAACTTCGGCACGTTAGTCCAG
<i>Sfrp1</i>	GTACGACTCACTATAGGGACCGGAGGAATGCAAAAAGTAA
<i>Acan</i>	GTACGACTCACTATAGGGATGTCTCTGTAGGGTACCGGG
<i>Gapdh</i>	GTACGACTCACTATAGGGACCCATTTGATGTTAGTGGGG

Tab. 7: Liste der Vorwärts-Primer für den PCR-„Primerplex“ der OA-Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1*, des chondrogenen Markers *Acan* und des Referenzgens *Gapdh*.

Gen	Sequenz inklusive Universalsequenz(5' - 3')
<i>Gas6</i>	AGGTGACACTATAGAATAGATGTCGTCCTCCCATCTCTGT
<i>Fgfr1</i>	AGGTGACACTATAGAATAATGGTTGACCGTTCTGGAAG
<i>Dkk4</i>	AGGTGACACTATAGAATAAGAGGGACAAGTCTGCTCCA
<i>Sfrp1</i>	AGGTGACACTATAGAATAAAGGCAACTCTGTGCATGTG
<i>Acan</i>	AGGTGACACTATAGAATAAGGACTGAAATCAGCGGAGA
<i>Gapdh</i>	AGGTGACACTATAGAATAGCAGTGGCAAAGTGGAGATT

Die einzelnen Komponenten wurden entsprechend dem Protokoll von Beckman Coulter für die RT-PCR zusammengegeben (Tab. 8).

Die RT-Reaktion umfasste 1. die Primerhybridisierung bei 48 °C (1 min), 2. die Strangverlängerung durch das Enzym Reverse Transkriptase bei 42 °C (60 min) und 3. die Hitzedenaturierung der Doppelstränge bei 95 °C (5 min). Abschließend wurden die RT-PCR-Produkte bei 4 °C gehalten.

Tab. 8: Komponenten und deren Konzentrationen im RT-Reaktionsansatz.

Komponente	Firma	Konz. Stocklösung	Konz. im 10 µl-Ansatz
RT Puffer	Beckman Coulter	5 x	1 x
Reverse Transkriptase	Beckman Coulter	20 U / µl	10 U / µl
KANr-RNA	Beckman Coulter	1 : 5	1 : 20
Rev.-Primer Plex LOW	Sigma Aldrich	Je 800 nM	Je 80 nM
Rev.-Primer Plex HIGH	Sigma Aldrich	Je 500 nM	Je 50 nM
RNA-Probe	-	5 ng / µl	0,25 U/µl
Nuklease freies Wasser	USB Corporation	-	Ad. 10 µl

Die RT-Reaktionsprodukte (cDNA-Proben) wurden mit den notwendigen Komponenten für die anschließende Genexpressions-PCR versetzt. Zu je 4,65 µl der cDNA-Probe wurde 5,35 µl PCR-Mix (Tab. 9) hinzugefügt.

Tab. 9: Komponenten und deren Konzentrationen im PCR-Ansatz.

Komponente	Firma	Konz. Stocklösung	Konz. im 10 µl-Ansatz
MgCl ₂	PeqLab	25 mM	5 mM
PCR-Puffer	Beckman Coulter	5 x	1 x
PCR Fwd-Primer Plex	Sigma Aldrich	Je 200 nM	Je 20 nM
Taq-Polymerase	PeqLab	5 U/µl	0,175 U/µl

Zunächst wurde der PCR-Ansatz bei 95 °C für 10 min erhitzt. Daran schlossen sich 35 weitere Zyklen an. Diese umfassten 1. Hitzedenaturierung bei 94 °C (30 sec) 2. Primerhybridisierung bei 55 °C (30 sec) und 3. Strangverlängerung durch die Taq-Polymerase bei 70 °C (1 min). Abschließend wurden die PCR-Produkte bei 4 °C gehalten. Die PCR-Produkte wurden dann mittels kapillarer Gelelektrophorese, wie für die Sequenzierung bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.3.2), analysiert. Hierbei wurden 1 bis 5 µl des Produkts mit je 0.5 µl des 400 bp-Größenmarkers (Beckman Coulter) in SLS gegeben (Gesamtvolumen pro Kavität 30 µl). Der Größenmarker beinhaltete rot fluoreszierende DNA-Fragmente bekannter Länge, die sich deutlich von den blau fluoreszierenden Gen-Produkten abgrenzen ließen. Somit war eine exakte Größenbestimmung möglich (Abb. 5).

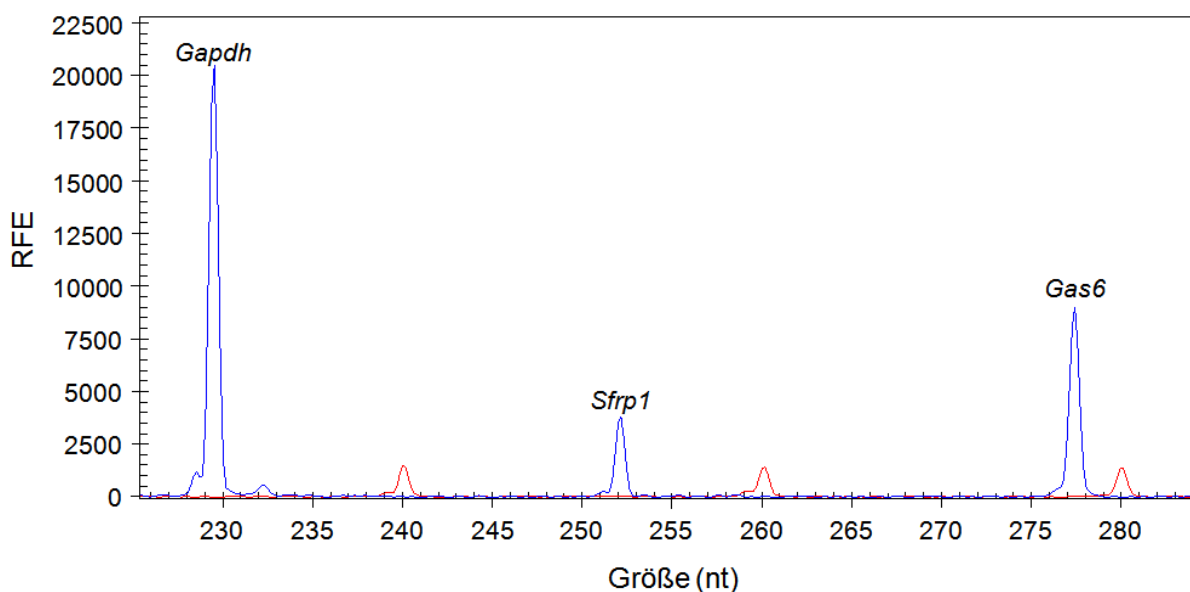


Abb. 5: Multiplex-Elektropherogramm. Hier wurden drei Gen-Fragmente (blaue Peaks) hinsichtlich ihrer Expression parallel analysiert. Höhe der Peaks = Expressionsstärke; Rote Peaks = Größenmarker; Farbsignal RFE (Relative Fluoreszenz-Einheiten); nt = Nukleotide.

Die Proben- und Pufferplatte wurden in das CEQ 8800 Genetic Analysis System von Beckman Coulter (Krefeld, Germany) geladen und mit dem Program „Frag-3“ analysiert.

2.6 Immunohistochemie am Kniegelenksknorpel und an chondrogenen *in vitro* Pelletkulturen

Für die Untersuchungen am Kniegelenksknorpel wurden insgesamt 25 C57BL/6- und STR/ort-Mäuse (beide Geschlechter) im Alter von 2, 4, 6, 8 und 11 Wochen durch zervikale Dislokation getötet und die Femora und Tibiae entnommen. Die freipräparierten Beine wurden in 4 % Paraformaldehyd fixiert, unter Verwendung einer Kalziumionen bindenden Lösung (USEDECALC®, MEDITE GmbH, Burgdorf, Germany) entkalkt und anschließend entwässert. Die Knie wurden in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom (RM2145, Leica, Wetzlar, Germany) wurden 4 µm dünne Sagittalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit Proteinase K (Stratec Molecular GmbH, Berlin, Germany) gefolgt von einer Protein blockierenden Lösung (DakoCytomation, Denmark) behandelt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit dem primären polyklonalen Sfrp1-Kaninchen-Antikörper (H-90, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) und einem sekundären polyklonalen Ziege anti-Kaninchen Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (D0487, DakoCytomation, Denmark), inkubiert. Die Reaktion wurde mit „Permanent Red Chromogen“ (DakoCytomation, Denmark) visualisiert und mit Hämatoxylin/Eosin (Abschnitt 2.7.1) gegengefärbt. Die Mauseknie wurden in vier nacheinander folgenden Serien gefärbt, wobei sichergestellt wurde, dass C57BL/6- und STR/ort-Mäuse gleichen Alters und Geschlechts zusammen in einer Serie analysiert wurden. Die gefärbten Schnitte wurden verblindet mittels Lichtmikroskopie von zwei Beobachtern ausgewertet. Hierbei wurden vier Färbintensitäten definiert, von sehr schwach (1) bis hin zu stark (4). Die Prozente der positiven Zellen pro Gesichtsfeld wurden bestimmt und anschließend mit dem Faktor für die Intensität multipliziert. Somit konnte maximal ein Wert von 400 pro Maus erreicht werden. Um die differentielle Expression aufzuzeigen wurde innerhalb einer Färbeserie der Wert einer C57BL/6-Maus durch den Wert einer STR/ort-Maus gleichen Alters und Geschlechts dividiert.

Chondrogene *in vitro* Pelletkulturen (Generierung siehe Abschnitt 2.5.1) wurden stichprobenartig immunhistochemisch auf die Proteinexpression von Kollagen Typ II und Typ X untersucht. Die Pellets wurden ebenfalls in PFA fixiert, in Paraffin eingebettet und 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem monoklonalen Kollagen Typ II-Antikörper (Millipore, Billerica, MA, USA) in einer 1:100 Verdünnung bzw. mit dem monoklonalen Kollagen Typ X-Antikörper (Quartett, Berlin, Germany) in einer 1:200 Verdünnung inkubiert. Die Visualisierung der Proteinexpression erfolgte mittels alkalische Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörper und „Permanent Red Chromogen“ (DakoCytomation, Denmark), wie zuvor für Sfrp1 beschrieben.

2.7 Histologie

Die Milz und Leber von 8 bis 10 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Männchen wurde nach zervikaler Dislokation entnommen. Das Gewicht der Mäuse und der Organe wurde bestimmt und die Milzen anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert, um sie später in Paraffin einzubetten. Dann wurden 4 µm-Dünnschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt.

2.7.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung wird standardmäßig verwendet, um Gewebe- und Zellstrukturen übersichtlich darzustellen. Hierbei färbt Hämatoxylin die basophilen Zellkerne blau, während Eosin die azidophilen zytoplasmatischen Proteine rot färbt.

Kollagene Faser erscheinen rosa bis rot. Die Paraffinschnitte von den Milzen und chondrogenen Pelletkulturen wurden mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, rehydratisiert und mit Aqua dest. für 1 min gespült. Die Schnitte wurden zunächst 20 min in Hämalaulösung nach Mayer (1:5) (Roth, Karlsruhe) inkubiert, dann 10 min in Leitungswasser gebläut und 10 min in Eosinlösung gefärbt. Schließlich wurden sie mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit X-TRA-Kitt® - Eindeckmedium (MEDITE, GmbH, Burgdorf, Germany) eingedeckelt.

Absteigende Alkoholreihe

X-TRA (2 x 10 min) → x-TRA (5 min) → 100 % EtOH (2 x 5 min) → 96 % EtOH (3 min) → 80 % EtOH (3 min) → 70 % EtOH (3 min) → Leitungswasser

Aufsteigende Alkoholreihe

70 % EtOH → 80 % EtOH → 96 % EtOH → 100 % EtOH (2x) → x-TRA (2x) (Schnitte jeweils 5 x pro Lösung eintauchen)

2.7.2 Toluidinblau-Färbung zum Nachweis von Chondrozyten

Toluidinblau ist ein Thiazinfarbstoff, mit dem sich Metachromasie in Geweben darstellen lässt. Hierbei werden dicht beieinander liegende, negativ-geladene bzw. saure Substratgruppen metachromatisch gefärbt. Dies führt dazu, dass Toluidinblau Knorpel rosa bis violett färbt und somit sehr gut für den Nachweis von Knorpelsubstanz, insbesondere von Proteoglykanen, geeignet ist. Kerne und Zytoplasma färben sich hingegen dunkelblau (also orthochromatisch).

In vitro generierte Chondrozyten in der 3D-Pelletkultur (siehe Abschnitt 2.5.1) wurden zunächst in Paraffin eingebettet. Nach dem Anfertigen von 4 µm Dünnschnitten wurden 2 bis 3 dieser Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht und bei 67 °C für ca. eine Stunde getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe (s.o.) entparaffiniert, rehydratisiert und mit Aqua dest. für 1 min gespült. Die Pelletschnitte wurden dann 1 - 2 min mit 1 % Toluidinblau O (C.I. 52040; Certistain® Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) gefärbt. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. wurden sie in Glyzerin eingedeckelt.

2.7.3 Öl-Rot-Färbung zum Nachweis von Adipozyten

Öl-Rot („Oil Red O“, Sigma-Aldrich) eignet sich hervorragend um Fetttröpfchen in Zellen anzufärben und somit für den Nachweis von *in vitro* generierten Adipozyten (siehe Abschnitt 2.5.1). Die Zellen wurden zunächst mit 1 x PBS gewaschen, dann 10 min in 4 % PFA fixiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit 60 %-igem Isopropanol, um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend konnten die Zellen mit 0.5 %-iger Öl-Rot-Lösung (in 60 %-igem

Isopropanol) für 5 - 10 min inkubiert werden. Danach wurden die Zellen erneut kurz mit Isopropanol bedeckt und damit differenziert. Abschließend wurde noch mit Aqua dest. gespült, um überschüssige Farbe zu beseitigen.

2.7.4 Alizarin-Rot-Färbung zum Nachweis von Osteoblasten

In vitro generierte Osteoblasten (siehe Abschnitt 2.5.1) wurden zunächst mit 1 x PBS gewaschen, dann 10 min in 4 % PFA fixiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann wurde 2 %-ige Alizarin-Rot-Lösung (Alizarin Red S, C.I. 58005, Sigma-Aldrich) auf die Zellen gegeben und für 2 min inkubiert. Abschließend wurde wieder mit Aqua dest. gespült, um überschüssige Farbe zu entfernen.

2.8 Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität dient der Quantifizierung von *in vitro* generierten Osteoblasten

Alkalische Phosphatase (ALP) ist eine Hydrolase, die unter anderem Phosphatgruppen von Nukleotiden und Proteinen entfernt (Dephosphorylierung). Das Enzym ist in Osteoblasten maßgeblich an der Matrixmineralisierung beteiligt und eignet sich daher für den Nachweis von Osteoblasten.

Die alkalische Phosphatase-Aktivität lässt sich anhand der Umsetzung des Substrats P-Nitrophenyl-Phosphat messen. Die Enzymaktivität wird ausgedrückt in $\mu\text{mol p-Nitrophenol}$, welches pro mg Protein pro Stunde freigesetzt wird.

Die *in vitro* Osteoblasten wurden in 24er-Kavitäten für 28 bis 35 Tage kultiviert und zunächst in 1x TBS-Puffer gewaschen und dann mit 300 μl ALP-Lysepuffer für 10 min überschichtet. Dann wurden 1200 μl ALP-Messpuffer hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurden 510 μl Stopplösung (2 N NaOH) pro Kavität hinzugefügt. Es wurden je 6 x 100 μl des Gemisches in eine 96er-Kavität übertragen und im Spektralphotometer (Milenia Kinetic Analyser DPC[®], CA USA) bei 405 nm gemessen.

Für die Normierung auf die Zellzahl, wurden die Osteoblasten mit Kristallviolett gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 10 min in Isopropanol (100 %) fixiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS/Tween (0.05 %), wurde 0.1 %-ige Kristallviolett-Lösung (in Aqua dest.) (Kat-Nr. 61135 Fluka, Sigma-Aldrich) zu-

gegeben und 20 min inkubiert. Danach wurde mit Aqua dest. gespült bis der Überstand klar war und 33%-ige Essigsäure auf die Zellen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf dem Schüttler (Heidolph Polymax 1040) wurden 70 µl des Zellüberstand bei 600 nm im Spektralphotometer (Milenia Kinetic Analyser DPC®, CA USA) gemessen.

10x TBS-Puffer

- 0.5 M TRIS-HCL (pH 7.4)
- 1.5 M NaCl

ALP-Lysepuffer:

- Aqua dest. + 1 % Tween
- Frisch hinzugeben am Tag der Färbung: PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride, A0999,0025 AppliChem)
- PMSF Stock 100 mM (in 100 % Isopropanol)

ALP-Messpuffer (pH 10):

- 4-Nitrophenyl-Phosphat (pNpp; Stock 10 mM; A1442,0025 AppliChem)

Für 50 ml:

- 0.185 g pNpp
- 5 ml AMPED (2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol; Stock: 1 M; A9754-100G Sigma Aldrich)
- 5 ml MgCl₂ (Stock 50 mM; A4425,0250 AppliChem)
- Ad. 50 ml Aqua dest.

2.9 Mikro-Computertomographie (µCT)

Die Femura von 1, 2, 7 und 9 Monate alten C57BL/6 und STR/ort Männchen und Weibchen (Mindestanzahl n = 3 pro Geschlecht, Alter und Stamm), die durch zervikale Dislokation getötet wurden, wurden in 4 % Paraformaldehyd fixiert und *ex vivo* in 2 ml Kochsalzlösung (0.9% NaCl) im µCT (SkyScan model 1076, Skyscan, Antwerpen, Belgium, SN = 09H02066, Software Version 4. 2) gescannt. Zusätzlich wurden 2 und 6 Monate alte Mäuse (n = 3, pro Geschlecht und Stamm) anästhesiert (50 mg/kg Ketamin und 15 mg/kg Xylazin), um den Schädel *in vivo* zu scannen. Alle Scans

wurden mit einer isotropischen Voxelgröße von 9 μm bei 49 kV und 200 μA durchgeführt. Eine Expositionszeit von 1.5 s, ein Rotationsschritt von 0.5 Grad und eine Bildfeld-Mittelwertberechnung von 3 wurden eingestellt. Rekonstruktionen der gescannten Knochenproben wurden mit NRecon Version 1.6.3.3 erstellt.

Die Femurlänge wurde zwischen dem Oberschenkelkopf und der Wachstumsfuge der Metaphyse abgelesen (Abb. 6).

Um das Referenzlevel der Wachstumsfuge festzulegen, wurden die nach der Rekonstruktion einzeln vorliegenden Querschnitte des Knochens schrittweise durchgerastert und in der primären Spongiosa nach dem ersten Auftreten der Knorpelstruktur mit geringer Dichte gesucht. Im mittleren Teil der Diaphyse wurden 10 % von der Gesamtlänge des Femurs hinsichtlich der kortikalen Knochenmorphologie analysiert. Die trabekuläre Knochenstruktur wurde im Bereich der Metaphyse 5 % über dem Referenzlevel in Richtung Diaphyse (insgesamt 10 % der Gesamtlänge des Femurs) ermittelt (Abb. 6).

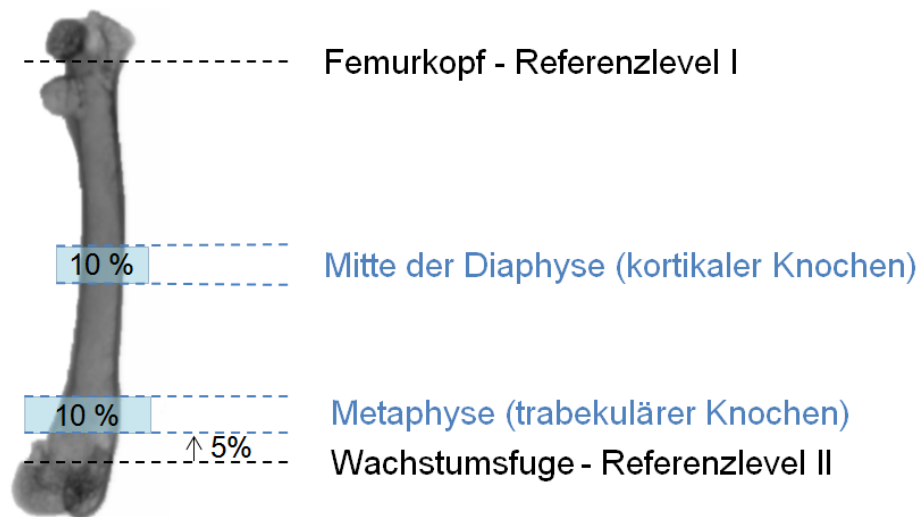


Abb. 6: Schematische Übersicht zur μCT -Analyse des Femurs. Die Gesamtlänge wurde zwischen Femurkopf und Wachstumsfuge bestimmt. Der kortikale Knochen wurde im mittleren Bereich der Diaphyse, der trabekuläre Knochen in der Metaphyse 5 % oberhalb der Wachstumsfuge analysiert.

Die beiden Bereiche umfassen jeweils 10 % der Gesamtlänge des Femurs.

Folgende Kortikale Knochenparameter wurden ermittelt: Durchschnittliche Gesamtquerschnittsfläche innerhalb des Periosts (Tt.Ar), kortikale Knochenfläche (Ct.Ar) und durchschnittliche kortikale Schichtdicke (Ct.Th). Die für uns interessante Region (ROI) wurde manuell entlang der Periostoberfläche gezeichnet.

Die trabekulären Knochenparameter umfassten das Verhältnis des segmentierten Knochenvolumens zum Gesamtvolumen des Gewebes (BV/TV), Anzahl der Trabekel (Tb.N), trabekuläre Schichtdicke (Tb.Th) und Abstände zwischen den Trabekeln (Tb.Sp) und wurden mittels Skyscan™ CT-Analyser (Version 1.12.4.0) ermittelt.

Um trabekuläre von kortikalen Knochenstrukturen abzugrenzen, wurde eine Kreisfläche (50% des äußeren Femurdurchmessers) im Zentrum der einzelnen Querschnitte platziert. Für die Bestimmung der Knochendichte („Bone mineral density“, BMD) der Kalotte und des Schneidezahns (*Dens Incisivus*) wurden jeweils 100 bzw. 50 Schnitte gescannt und analysiert (Abb. 7). Die Berechnung der Knochendichte erfolgte mit Hilfe von zwei Skyscan-Hydroxyapatit-Phantomen bekannter Dichte (0.25 bzw. 0.75 g cm²).

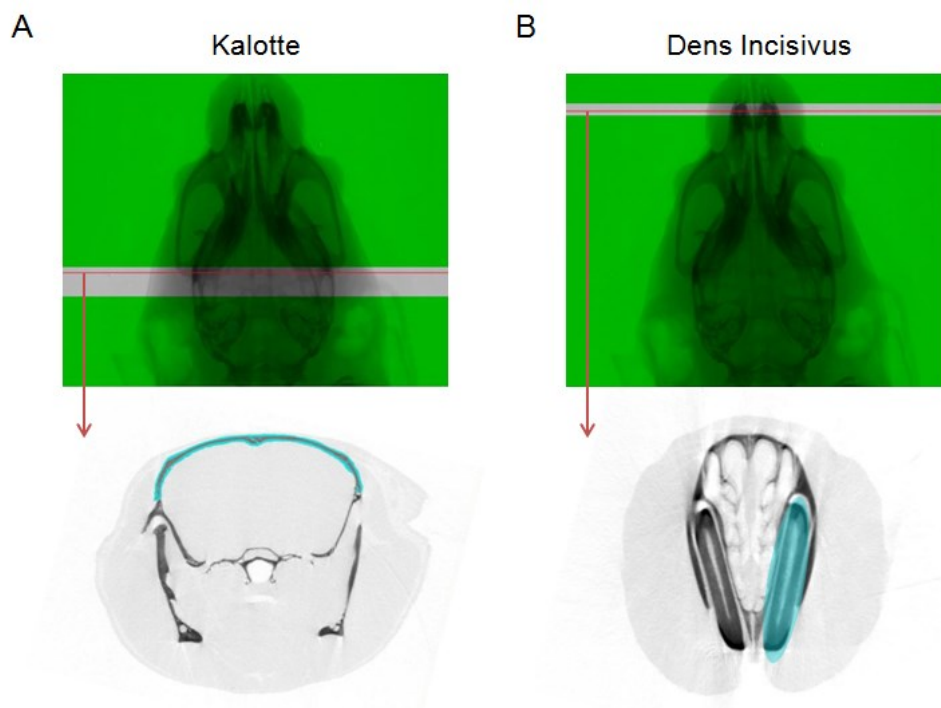


Abb. 7: Übersicht zur μ CT-Analyse der Kalotte und des Schneidezahns (*Dens Incisivus*). Die grau unterlegten Bereiche im oberen Bild repräsentieren den Bereich in dem die Kalotte (**A**) bzw. der Zahn (**B**) analysiert wurden. Unten sind jeweils die Querschnitte im Bereich der roten Linie (im oberen Bild eingezeichnet) mit der blau unterlegten „Region of interest“ (ROI) zu sehen.

Für die Bildbearbeitung und -segmentierung wurde ein Gauss-Filter (Glättung = 2) und eine globale Schwellwertbildung angewendet. Der Schwellwert wurde auf 25.1 % des maximalen Graustufewerts gesetzt. Für jeden Zeitpunkt wurde ein repräsentatives Bild mit der CTvox Software Version 2.0 angefertigt.

2.10 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie wurde in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf am Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM) (www.iobm.de) durchgeführt.

Die Lendenwirbelkörper L1 bis L4 und die rechte Tibia von 3 Monate alten Mäusen (3 pro Stamm und Geschlecht, insgesamt 12) wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und dann zum Schneiden unentkalkt in Methylmetacrylat eingebettet. Knochenschnitte von 4 μm Dicke wurden am "Microtec Rotation-Mikrotom" (Techno-Med GmbH, Bielefeld, Germany) angefertigt und entweder mit von Kossa/van Gieson oder mit Toluidinblau gefärbt.

Für die Bestimmung der Knochenbildungsrate wurden den Mäusen zuvor jeweils zweimal 30 mg pro kg Körpergewicht Calcein (C-0875, Sigma-Aldrich) (1 %-ig in isotonischer Kochsalzlösung mit 2 % Natriumbicarbonat) im Abstand von 7 Tagen (9 und 2 Tage vor dem Tod) intraperitoneal injiziert. Die dynamische Histomorphometrie wurde anschließend an ungefärbten 12 μm -Schnitten von je zwei Wirbelkörpern (L3 und L4) pro Tier untersucht sowie statische und zelluläre Parameter bestimmt. Die statische, zelluläre und dynamische Histomorphometrie wurde nach den Richtlinien der „American Society for Bone and Mineral Research“ unter Verwendung des „OsteoMeasure“-Systems (Osteometrics Inc., USA) durchgeführt.

2.11 Biomechanischer Test

Die biomechanische Stabilität wurde in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf am Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM) (www.iobm.de) gemessen. Hierfür wurden die Femora von 3 Monate alten Tieren mittels drei-Punkt-Biege-Messung unter Verwendung des Z2.5/TN1S-Apparats (Zwick GmbH and Co., Ulm, Germany) untersucht. Die Enden der Femora wurden von zwei Stützvorrichtungen im Abstand von 7 mm gehalten. Ein Gewicht wurde, bis der Knochen brach, mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 mm/min gegen den anterioren Mittelschaft (innerhalb der beiden Stützen) gedrückt. Mittels Diagrammschreiber wurde eine Kraft-Deformationskurve erstellt. Anhand der Maximalkraft (F_{max}) sowie der Energieabsorption (W_{m}) bei Erreichen der Maximalkraft wurde die

biomechanische Kompetenz des Knochens mit der TestExpert Software (Zwick, version 10.1) kalkuliert.

2.12 ELISA

Von 2 bis 3 Monate alten C57BL/6- and STR/ort- Mäusen wurden Blut- und 24 h-Urin-Proben gesammelt. Die Proben wurden nach Standardprotokoll mittels ELISA auf Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAcP, Osteoklastenmarker) im Serum und auf das knochenspezifische Kollagendegradationsprodukt CTX-1 (Marker für Knochenresorption) im Serum und Urin (MouseTRAP™ Assay, SB-TR103, and RatLaps™ EIA, AC-06F1, Immunodiagnostic Systems, UK) untersucht.

2.13 SDS-PAGE und Western Blot

2.13.1 Isolierung von Zytoplasma- und Kern-Proteinen

Für die Gewinnung von Zytoplasma- und Kernextrakten wurden pro Stamm und Geschlecht die Zellen von zwei Mäusen gepoolt. Bei den Zellen handelte es sich um primäre, aus dem Knochenmark isolierte, mesenchymale Stromazellen, die 14 Tage in Monolayerkultur (37 °C / 5 % CO₂) gezogen wurden. Die Zellen wurden mittels 0.25 % Trypsin / 1 mM EDTA vom Flaschenboden abgelöst und nach Abstoppen der Reaktion mit serumhaltigem Medium im Hämozytometer gezählt. Es standen 1.4 bis 2.5 x 10⁶ Zellen pro Ansatz zur Verfügung. Die Zellen wurden jeweils in 15 ml-Falcon-Röhrchen bei 4 °C für 10 min bei 310 x g zentrifugiert (Heraeus® Sepatech Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpellet in 1 x PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß übertragen. Es wurde bei 4 °C für 5 min bei 430 x g zentrifugiert (MIKRO 22R Typ 1110 von Hettich). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl hypotonischen Puffer (Tab. 10) aufgenommen. Nach 7-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut bei 4 °C zentrifugiert (16.400 x g, 2 min). Im Überstand befanden sich dann die Zytoplasmaproteine (Lagerung à 100 µl bei -80 °C).

Tab. 10: Zusammensetzung der Puffer für die Proteinisolierung

Puffer	Komponenten pro 10 ml	
Hypotonischer Puffer	20 mM Hepes (pH 7,9)	47,66 mg
	10 % Glycerin	1 ml
	0,2 % NP-40	20 µl
	10 mM KCl	7,46 mg
	1 mM EDTA	3,72 mg
Kernextraktionspuffer	420 mM NaCl	245,45 mg
	20 mM Hepes (pH 7,9)	47,66 mg
	10 mM KCl	7,46 mg
	1 mM EDTA	3,72 mg
Verdünnungspuffer	20 mM Hepes (pH 7,9)	47,66 mg
	10 mM KCl	7,46 mg
	1 mM EDTA	3,72 mg

Die verbleibenden Pellets wurden mit je 150 µl Kernextraktionspuffer versetzt und 30 Minuten bei 4 °C unter Drehen inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Wechsel 3 x in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Hand aufgetaut. Dann wurde bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (21.250 x g). Zu dem Überstand wurden 300 µl Verdünnungspuffer zugegeben (Lagerung à 50 µl bei -80 °C).

2.13.2 Quantitative Fällung von Proteinen mit Methanol/Chloroform

Mit Hilfe der Fällung wurden die isolierten Proteine aufkonzentriert. Es sollten am Ende 60 µg Protein in 30 µl Gesamtvolumen (SDS-Puffer) vorliegen.

Die unterschiedlichen Ausgangsvolumina der Proben (mit je 60 µg Protein) wurden zunächst auf je 100 µl Gesamtvolumen mit dem in der Probe bereits enthaltenen Puffer aufgefüllt. Dazu wurde dann das 4-fache Volumen an Methanol (MeOH) gegeben (400 µl) und gemischt. Dann wurde ein Probenvolumen Chloroform (100 µl) hinzugefügt. Nach Zugabe des 3-fachen Probenvolumens an H₂O wurde wieder gemischt und bei 18.300 x g für 2 min zentrifugiert (MIKRO 22R Typ 1110 von Hettich). Danach befanden sich die Proteine in der Interphase. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Danach wurde noch einmal das 3-fache Volumen an Methanol zur Probe gegeben und diese 2 x geschwenkt. Anschließend wurde bei

18.300 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Methanol-Rückstände wurden mit der Vakuumpumpe RZ 6 (Vacuubrand GmbH, Wertheim, Germany) abgedampft. Die Pellets wurden abschließend in 30 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

5x SDS (Sodium dodecyl sulfate)-Probenpuffer

- 312.5 mM TRIS-HCL (pH 6.8)
- 10 % SDS
- 325 mM DTT (Dichlorodiphenyltrichloroethane)
- Frisch hinzugeben am Tag der Färbung: PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride, A0999,0025 AppliChem)
- PMSF Stock 100 mM (in 100 % Isopropanol)

2.13.3 SDS-PAGE

(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Zunächst wurde ein 12 %-iges Trenngel in eine Glaskammer gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um einen glatten Abschluss zu erhalten. Das Gel war nach ca. 15 min ausgehärtet und wurde mit einem 4.5 %-iges Sammelgel überschichtet (Tab. 11). Ein Kamm wurde positioniert und nach weiteren 15 min Aushärtung wurde die Glaskammer in eine mit 1x Laufpuffer (0.25 M TRIS-Base, 1 % SDS, 1.92 M Glycin) befüllte Elektrophoresekammer gestellt. Erst jetzt wurde der Kamm entfernt und störende Luftblasen unter dem Gel beseitigt.

Die zuvor durch Methanol/Chloroform-Fällung gewonnenen Proteinproben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen zu beseitigen, und anschließend in die Geltaschen geladen. Als Größenmarker wurde der vorgefärbte Protein-Marker von Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) verwendet. Das Gel lief dann bei 200 V (30 mA) für ca. 1.5 h (Hoefer-Elektrophorese-Gelsystem).

Tab. 11: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Lösungen	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4,5 %)
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bis-Acrylamid	8 ml	1,5 ml
1 M Tris / HCL pH 6,8	-	1,25 ml
1 M Tris / HCL pH 8,9	8 ml	-
Aq. dest.	4 ml	7 ml
10 % SDS	216 µl	100 µl
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	160 µl	100 µl
TEMED(Tetramethylethylendiamin)	20 µl	10 µl
Gesamtvolumen	20,4 ml	10 ml

2.13.4 Western Blot

18 Filterpapiere (9 x 9 cm) wurden zugeschnitten und die Membran (Immobilon-P, PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA) zuerst kurz in Isopropanol aktiviert und danach in H₂O gewaschen. Das Gel wurde in ϵ -Puffer (pH 9.4) bereitgelegt. Auf die Anode wurden zunächst 6 Filterpapiere, getränkt in HT-Puffer (pH 10.4), platziert. Dann folgten 3 Filterpapiere mit LT-Puffer (pH 10.4). Darauf wurde dann die Membran und anschließend das Gel gelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden mit einem Glasstab vorsichtig herausgedrückt. Den Abschluss bildeten dann 9 Filterpapiere, getränkt in ϵ -Puffer und die Kathode. Der Blott lief bei 25 V für 2h (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad (München, Germany))

ϵ -Puffer:

- 0.25 M TRIS-Base
- 1 % SDS
- 1.92 M Glycin

HT (High TRIS)-Puffer:

- 0.3 M TRIS-Base
- 20 % Methanol

LT (Low TRIS)-Puffer:

- 0.025 M TRIS-Base
- 20 % Methanol

Zum Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran wenige Minuten mit Ponceau Rot (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) gefärbt, getrocknet und eingescannt. Anschließend wurde die Membran wieder mit Isopropanol benetzt und mit H₂O gewaschen.

2.13.5 Immundetektion

Der Blot wurde über Nacht in Blocklösung (Odyssey LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) bei 4 °C gelegt. Die primären monoklonalen Maus-Antikörper (Anti- β -Catenin von BD Transduction Laboratories 610154; Anti-Actin von Santa Cruz sc-81760) wurden jeweils 1:500 in Blocklösung + 0,1 % Tween angesetzt. Der Blot wurde dann 2 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. Es folgten 3 x 5 min-Waschschritte mit dem Waschpuffer (1x PBS + 0,1 % Tween) und dann eine 1-stündige Inkubation mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (Ziege-anti-Maus 680, IRD-System, 926-32220 von LI-COR Odyssey). Dann wurde noch einmal 3 x 5 min gewaschen und der Blot anschließend in 1 x PBS gelegt. Zum Schluss wurde der Blot mittels LI-COR Odyssey Infrared Imaging System eingescannt und der entsprechenden Software (Odyssey V3.0) quantitativ ausgewertet.

2.14 Statistik

Für die Berechnung statistischer Signifikanzen wurden entweder die Mediane oder Mittelwerte verglichen und entsprechend der Mann-Whitney Test bzw. der Zweistichproben-t-Test angewendet. Desweiteren kam der Jonckheere Terpsta (JT)-Test zum Einsatz, um die zeitliche Abnahme bzw. Zunahme zwischen zwei Datensätzen vergleichen zu können. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Abschnitt 1 - Analyse potentieller Arthrose-Kandidatengene im STR/ort-Stamm

Es wurde zuvor am STR/ort-Mausstamm gezeigt, dass auf Chromosom 8 bei 21,3 cM ein Arthrose assoziierter Genbereich vorliegt (Jäger et al. 2008). Während meiner Diplomarbeit (Pasold 2008) habe ich diesen Genbereich mittels Mikrosatelliten-Analyse weiter eingegrenzt und bessere Hinweise auf potentielle Kandidatengene erhalten. Im Rahmen meiner Dissertation konzentrierte ich mich auf die identifizierten Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1*, die nun auf Arthrose relevante Sequenzunterschiede zwischen dem Referenzstamm C57BL/6 und dem Arthrose entwickelnden Stamm STR/ort untersucht werden sollten.

3.1 Der Sequenzvergleich des *Sfrp1*-Gens zwischen dem C57BL/6- und dem STR/ort-Mausstamm impliziert regulatorische Unterschiede

Bei dem Kandidatengen *Gas6* ("growth arrest specific 6") analysierten wir zwei bei der Maus, Ratte und dem Menschen konservierte Regionen innerhalb des Promotors (BoxA und BoxB) sowie die kodierenden Genabschnitte, um Hinweise auf regulatorische und strukturelle Polymorphismen zu erhalten. *Gas6* umfasst 15 Exons, von denen Exon 5, 6, 7 und 8 unter Verwendung der genomischen DNA (gDNA) direkt sequenziert werden konnten. Es lagen weder Sequenzabweichungen innerhalb des Promotors noch bei Exon 5 bis 8 im STR/ort-Stamm vor. Etwas schwieriger gestaltete sich die Analyse der verbleibenden 11 Exons. Hierzu war es erforderlich, die RNA in cDNA umzuschreiben und diese zu sequenzieren. Doch auch hier konnten keine Unterschiede in der Nukleotidabfolge zwischen den beiden Stämmen gefunden werden. Für die Sequenzierung von *Fgfr1* („fibroblast growth factor receptor 1“) und *Dkk4* („dickkopf 4“) wurden Primer verwendet, die die Exons und die jeweils angrenzenden Intronbereiche abdeckten. Es gelang uns 25 der 27 Exons des *Fgfr1*-Gens zu sequenzieren. Hierbei konnte innerhalb von Exon 5 ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin festgestellt werden, der jedoch keine Ände-

rung in der resultierenden Aminosäure zur Folge hat. In dem anschließenden Intron wurde ein weiterer Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. „Single Nucleotide Polymorphism“), ein Wechsel von Guanin zu Thymin, gefunden. Beim *Dkk4*-Gen, bestehend aus 4 Exons, konnten keine Polymorphismen aufzeigt werden.

Als besonders interessant stellte sich letztlich das *Sfrp1*-Gen („secreted frizzled-related protein 1“) heraus, das aus nur 3 Exons besteht. Wir analysierten den Promotorbereich und die Exons mit den angrenzenden Intronbereichen sowie den 3' untranslatierten Bereich. Der Sequenzvergleich zwischen dem C57BL/6- und dem STR/ort-Stamm anhand der gDNA sowie anhand der cDNA (4389 bp), deckte insgesamt 19 SNPs, ein 1-bp-Einschub und zwei 4-bp-Einschübe sowie eine 1-bp-Deletion im STR/ort-Mausstamm auf (Abb. 8).

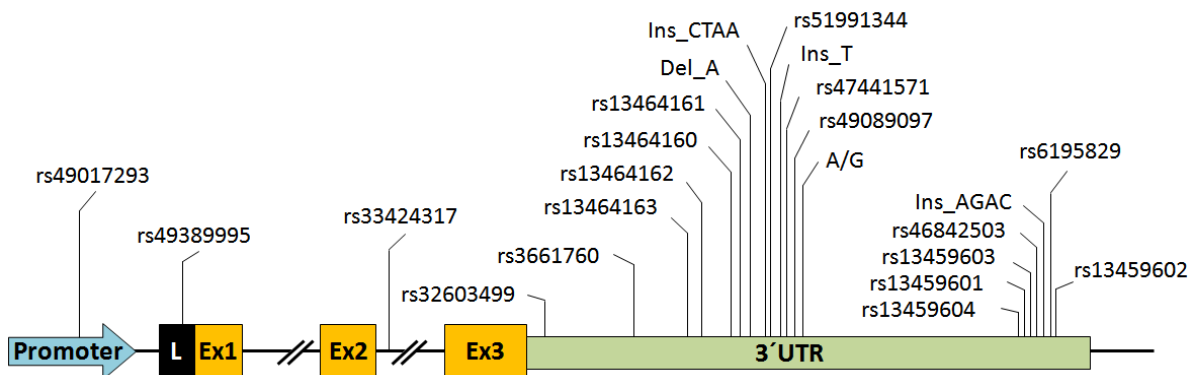


Abb. 8: Die *Sfrp1*-Gensequenz des STR/ort-Stamms beinhaltet SNPs mit regulatorischem Potential. Genomische und cDNA wurden mittels Sanger-Methode sequenziert. Alle hierbei gefundenen Sequenzunterschiede sind entsprechend ihrer Position im *Sfrp1*-Gen schematisch eingezeichnet. Insgesamt konnten 23 Polymorphismen beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm identifiziert werden. L: „Leader“ (schwarze Box), Ex1-Ex3: Exon 1-3 (gelbe Boxen); 3'UTR: 3'untranslatierte Region (grüne Box). Die rs-Nummern zeigen bereits in der ENSEMBL-Datenbank publizierte Polymorphismen an (www.ENSEMBL.org). Del_A, A/G, Ins_CTAA, Ins_T, und Ins_AGAC bezeichnen von uns neu entdeckte Polymorphismen beim STR/ort-Stamm und liegen im 3'UTR: Deletion bei 24558285 bp, ein SNP bei 24558555 bp, und drei Einschübe zwischen 24558417-18 bp, zwischen 24558492-93 bp sowie zwischen 24559850-51 bp.

Einer der SNPs (rs49017293, C/G) ist in der Promotorregion anzutreffen. Ein weiterer SNP (rs49389995, G/T) liegt in der sogenannten „Leader“-Sequenz des Exon 1 und bewirkt beim STR/ort-Stamm in der translatierten Sequenz des Signalpeptids einen

Aminosäureaustausch an Position 28 (Ala28Ser) – Alanin (unpolar/hydrophob) wird durch Serin (polar/neutral) ersetzt. Ein dritter SNP (rs33424317, C/G) befindet sich 6 bp entfernt von der 3′-„Splice-Site“ innerhalb des zweiten Introns. Alle weiteren Polymorphismen, 16 SNPs sowie eine Deletion und drei Einschübe von Nukleotiden, verteilen sich über den 3′ untranslatierten Bereich.

3.2 Verringerte *in vitro*-Expression der Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, *Dkk4* und *Sfrp1*, im STR/ort-Stamm

3.2.1 *In vitro*-Differenzierung mesenchymaler Stromazellen

Die Sequenzanalysen von *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1* konnten keine bzw. keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich einer möglichen differentiellen Expression der Gene zwischen dem STR/ort- und dem C57BL/6-Mausstamm liefern. Im nächsten Schritt wollten wir deshalb gezielt die Expression der einzelnen Arthrose-Kandidatengene untersuchen. Da bereits beschrieben ist, dass alle 4 Kandidatengene in verschiedene Stadien der Knorpel- und Knochenentwicklung involviert sind, etablierten wir ein entsprechendes *in vitro*-System, mit dessen Hilfe wir die Expression der Gene während der Chondro- und Osteogenese untersuchen konnten. Hierfür wurden mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus dem Knochenmark der Mäuse gewonnen. Die MSCs sind Vorläuferzellen mit Stammzellcharakter und differenzieren unter anderem zu Chondrozyten und Osteoblasten sowie zu Fettzellen (Adipozyten). Wir haben die MSCs zunächst über Adhärenz an Plastik aus dem murinen Knochenmark selektiert und dann 21 Tage im Monolayer kultiviert. Anschließend wurden die MSCs chondro- und osteogen stimuliert. Parallel dazu wurden die Zellen auch adipogen stimuliert, um den Nachweis des für die MSCs typischen Stammzellcharakters vervollständigen zu können. Es gelang uns letztlich alle drei Zelllinien zu generieren und somit zu bestätigen, dass es sich bei den Ausgangszellen unseres *in vitro*-Systems tatsächlich um MSCs handelt (Abb. 9).

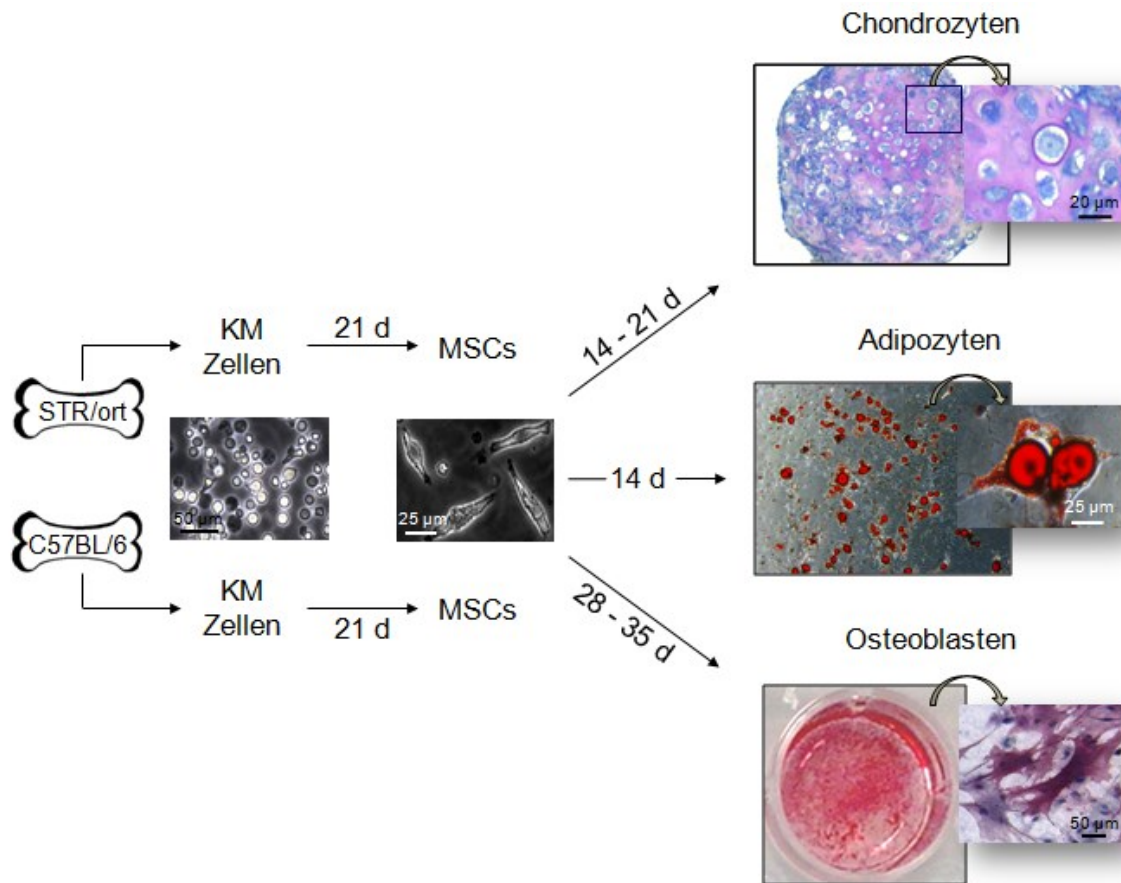


Abb. 9: In vitro-Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Aus Femora, Tibiae und Humeri von 4 bis 8 Wochen alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen wurden Knochenmarkszellen (KM-Zellen) isoliert und 21 d in Monolayer kultiviert, um mesenchymale Stromazellen (MSCs) zu generieren. Die chondrogen stimulierten 3D-Pelletkulturen wurden nach 14 bis 21 d fixiert, geschnitten und mit Toluidinblau gefärbt. Die Adipozyten wurden nach 14 d mit Ölrot und die Osteoblasten nach 28 bis 35 d mit Alizarinrot nachgewiesen.

Die Differenzierung von Chondrozyten aus MSCs erfolgte in 3D-Pelletkulturen, um eine räumliche Anordnung der Zellen ähnlich der *in vivo*-Situation im artikulären Knorpel zu schaffen. Nach 14 und 21 Tagen in Kultur wurde je ein Pellet pro Maus für repräsentative immunhistochemische Untersuchungen genutzt. Zusätzlich wurden Proteoglykane, neben den Kollagenen wichtige Bestandteile der Knorpelmatrix, mit Toluidinblau gefärbt. Die Färbung zeigt eine gleichmäßige Verteilung innerhalb des Pellets sowie die typischen metachromatischen Ringe direkt um die Chondrozyten (Abb 9, oben rechts). Kollagen Typ II, ein früher chondrogener Marker, ist in 14 und 21 Tage alten Pellets ebenfalls homogen verteilt, während Kollagen Typ X, ein wichtiger Marker für eine fortgeschrittene chondrogene Differenzierung (Hypertrophie), nur in wenigen Zellen der 21 Tage alten Kulturen exprimiert ist (Abb. 10A, rechts).

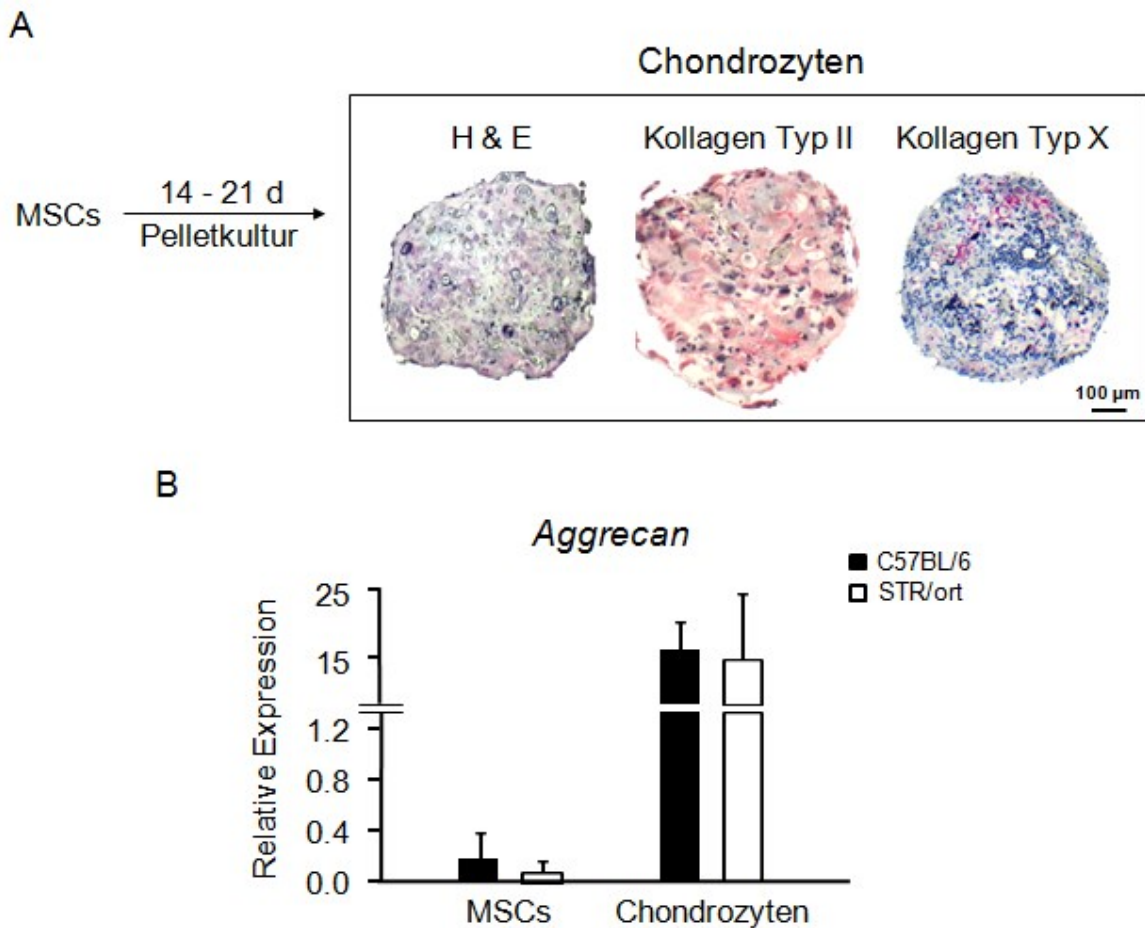


Abb. 10: *In vitro*-Differenzierung von Chondrozyten. (A) Mesenchymale Stromazellen (MSCs) wurden in 3D-Pelletkulturen für 14 bis 21d chondrogen stimuliert. Die Pellets wurden fixiert, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt oder immunhistochemisch mit Anti-Kollagen Typ II und Typ X (Indikator für Hypertrophie) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von 21 d alten Pellets des C57BL/6-Stamms. (B) Mittels GeXP-Analyse wurde die relative mRNA-Expression von *Aggrecan* bestimmt (Normierung auf *Gapdh*), die bei C57BL/6- und auch bei STR/ort- Chondrozyten (n = 6 pro Stamm) im Vergleich zu den jeweiligen MSCs (n = 8-9 pro Stamm) um ein Vielfaches erhöht ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Weiterhin wurde aus insgesamt vier bis acht Pellets pro Maus RNA isoliert. Die mRNA-Expression von *Aggrecan*, einem weiteren wichtigen Marker für Knorpel, ist in den *in vitro* generierten Chondrozyten beider Stämme gegenüber den jeweiligen Vorläuferzellen um ein Vielfaches erhöht und bestätigt somit eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung (Abb. 10B).

3.2.2 Differentielle Expression der Kandidatengene bei *in vitro* generierten Chondrozyten des STR/ort-Stamms

Nachdem wir das *in vitro*-System erfolgreich etablieren konnten, verglichen wir nun die Expression der Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4* und *Sfrp1* während der chondrogenen Differenzierung (Abb. 11). Denn eine differentielle Genexpression während der Chondrogenese könnte auf Unterschiede in der Entwicklung des artikulären Knorpels (*in vivo*) zwischen dem C57BL/6- und dem STR/ort-Stamm deuten, wodurch wiederum ein Zusammenhang mit der Entstehung der Arthrose in STR/ort-Mäusen hergestellt werden könnte.

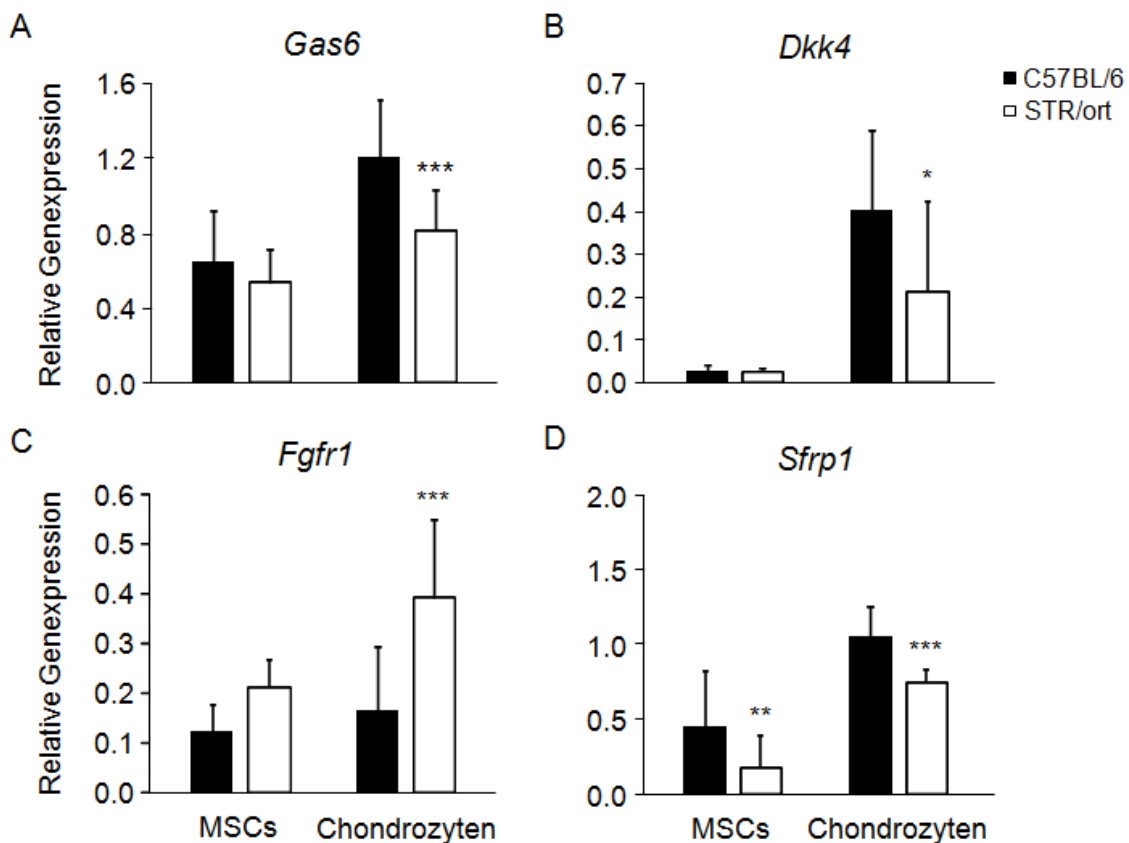


Abb. 11: *Sfrp1* ist beim STR/ort-Stamm in den MSCs und Chondrozyten signifikant reduziert. Mittels GeXP-Analyse wurde die Genexpression von *Gas6* (A), *Dkk4* (B), *Fgfr1* (C) und *Sfrp1* (D) in den MSCs (n = 8-9 pro Stamm) und den sich daraus entwickelnden Chondrozyten (n = 6 pro Stamm) bestimmt. *Gas6* und *Dkk4* sind in STR/ort-Chondrozyten signifikant reduziert, *Fgfr1* signifikant erhöht. *Sfrp1* ist in beiden Zelltypen des STR/ort-Stamms im Vergleich zum C57BL/6-Stamm signifikant reduziert. Normierung auf *Gapdh*; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; Zweistichproben-t-Test (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001); MSCs = mesenchymale Stromazellen.

Hierbei wurde die Genexpression in den *in vitro* generierten MSCs und den daraus resultierenden Chondrozyten von STR/ort- und C57BL/6-Mäusen jeweils miteinander verglichen. Abbildung 11A zeigt, dass *Gas6* in MSCs nicht differentiell exprimiert wird, dafür aber in STR/ort-Chondrozyten signifikant reduziert ist ($P < 0.001$). *Dkk4* ist in mesenchymalen Stromazellen von STR/ort- und C57BL/6-Mäusen gleichermaßen schwach exprimiert und nimmt in Folge der Differenzierung zu Chondrozyten in beiden Stämmen, bei C57BL/6 um das 15,4-fache und bei STR/ort um das 8,3-fache, zu (Abb. 11B). Demnach ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied bezüglich der *Dkk4*-Expression in den Chondrozyten, die beim STR/ort-Stamm im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer ausfällt ($P = 0,03$). *Fgfr1* ist wie bereits *Gas6* und *Dkk4* in MSCs beider Stämme gleich exprimiert, weist allerdings in den Chondrozyten von STR/ort eine signifikante Zunahme der Expression ($P < 0.001$) gegenüber C57BL/6 auf (Abb. 11C).

Bezüglich des *Sfrp1*-Gens (Abb. 11D) zeichnet sich bereits bei den Vorläuferzellen (MSCs) ein signifikanter Unterschied in der Expression dahingehend ab, dass der STR/ort-Stamm eine deutlich geringere Expression im Vergleich zum C57BL/6-Stamm ($P = 0,004$) aufweist. Außerdem ist, vergleichbar mit *Gas6* und *Dkk4*, die *Sfrp1*-Expression in den STR/ort-Chondrozyten gegenüber der in den C57BL/6-Chondrozyten signifikant reduziert. Dieser signifikante Unterschied zwischen den Chondrozyten beider Stämme bleibt bestehen bzw. wird aufgrund der geringeren Standardabweichungen sogar hochsignifikant ($P < 0,001$), obwohl beim STR/ort-Stamm während der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten eine stärkere Zunahme (4,0-fach) im Vergleich zu C57BL/6 (2,4-fach) stattfindet.

3.3 Differentielle Expression des Sfrp1-Proteins im artikulären Knorpel

Als Nächstes galt es zu testen, ob diese Expressionsdifferenzen beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm nicht nur auf RNA- sondern auch auf Proteinebene vorhanden sind. Hierzu wurden die Kniegelenke, insbesondere der artikuläre Knorpel, von C57BL/6- und STR/ort-Mäusen im Alter von 2 bis 11 Wochen immunhistochemisch untersucht (Abb. 12).

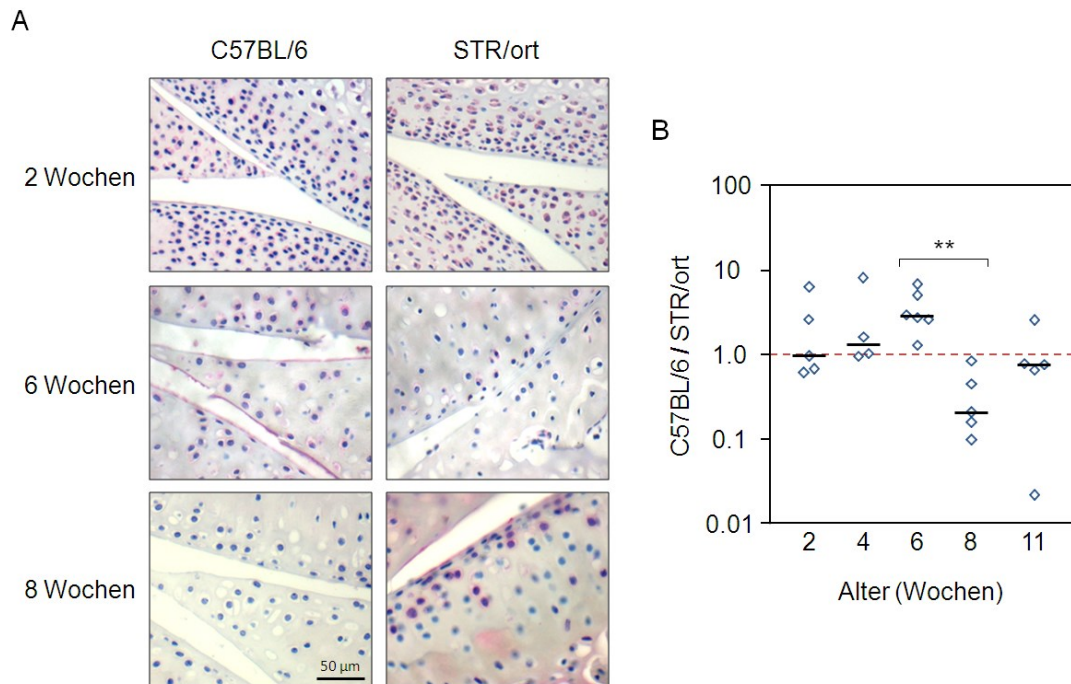


Abb. 12: Sfrp1 ist im artikulären Knorpel des STR/ort-Stamms differentiell exprimiert. Paraffindünnschnitte der Kniegelenke unterschiedlicher Alterstufen (2, 4, 6, 8 und 11 Wochen) von C57BL/6- und STR/ort-Mäusen wurden mit einem Sfrp1-Antikörper immunhistochemisch analysiert. **(A)** Repräsentative Mikroskopieaufnahmen der artikulären Chondrozyten von 2, 6 und 8 Wochen alten Mäusen. Sfrp1-Protein ist rot gefärbt. **(B)** Quantitative Auswertung der Sfrp1-Expression. Jede Raute repräsentiert das relative Expressionsverhältnis C57BL/6 zu STR/ort. Hierbei wurde der Wert einer C57BL/6-Maus durch den Wert einer STR/ort-Maus gleichen Alters und Geschlechts innerhalb einer Färbeserie dividiert (in Triplikaten); Rote gestrichelte Linie = Expressionsverhältnis von 1:1; Schwarze kurze Linien = Mediane; Mann-Whitney U Test (** $P < 0.01$).

Bei 2 und 4 Wochen alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen gibt es keinen Unterschied in der Sfrp1-Proteinexpression. In beiden Stämmen ist Sfrp1 gleichermaßen vorhanden. Doch zum Zeitpunkt von 6 Wochen findet man nur noch vereinzelt positive Chondrozyten beim STR/ort-Stamm, während beim C57BL/6-Stamm noch deutlich mehr Zellen Sfrp1 exprimieren (Abb. 12A, Mitte). Dies spiegelt sich auch im dazugehörigen Quotienten wieder, der bei 6 Wochen im Mittel 2.76 beträgt (Abb. 12B). Von 6 zu 8 Wochen gibt es jedoch einen signifikanten Wechsel ($P = 0.004$) dahingehend, dass die STR/ort-Mäuse zum 8 Wochen-Zeitpunkt deutlich mehr Sfrp1-Protein in den artikulären Chondrozyten aufweisen (Abb. 12A, unten), beim C57BL/6-Stamm hingegen Sfrp1 fast vollständig fehlt. Der Quotient ergibt bei 8 Wochen im Mittel 0.21. Insgesamt fällt auf, dass sich die Sfrp1-Expression bei den C57BL/6-Mäusen über die Zeit stetig reduziert, während sie beim STR/ort-Stamm fluktuiert.

Abschnitt 2 - Charakterisierung des Knochendefekts im STR/ort-Stamm

Bei der Durchführung der *in vitro*-Experimente in Abschnitt 1, speziell bei der Isolierung von Knochenmarkszellen aus dem Femur und der Tibia, fiel es beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm immer schwerer, mit zunehmenden Alter der Mäuse ausreichend Zellen zu gewinnen. Bei den STR/ort-Mäusen, die älter als 11 Wochen alt waren, war es sogar unmöglich. Man konnte bei der äußerlichen Betrachtung der freigelegten Knochen deutlich erkennen, dass die STR/ort- im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen mehr Knochengewebe aufwiesen, welches das Knochenmark zunehmend verdrängte.

3.4 STR/ort-Mäuse haben eine erhöhte kortikale Knochenmenge, ein Knochenmarksverlust und eine extramedulläre Hämatopoese

Es gibt bisher kaum Untersuchungen zu diesem auffälligen Knochenphänotyp bzw. detaillierte Beschreibungen zum Verlauf der Knochenüberproduktion beim STR/ort-Mausstamm. Es gibt nur einige wenige Publikationen hinsichtlich einer vermehrten Bildung von trabekulärer Knochensubstanz. Doch wie sich der kortikale Knochen während der Wachstumsphase bzw. Entwicklung der Mäuse verhält, wurde nur unzureichend untersucht.

3.4.1 Das vermehrte Wachstum des kortikalen Knochens beim STR/ort-Stamm korreliert mit der Verdrängung des Knochenmarks

Um einen umfangreichen Einblick in die Knochenveränderungen bei STR/ort zu erhalten und verschiedenste Knochenparameter analysieren zu können, wurden die Untersuchungen mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) durchgeführt. Bereits im Alter von 1 Monat konnte ein erhöhtes kortikales Knochenvolumen beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm festgestellt werden. Im Alter von 2 Monaten ist eine noch drastischere Zunahme an Knochen bei den STR/ort-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen erkennbar, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung (bis 3 Mo-

nate) weiter steigert und bei 9 Monate alten STR/ort-Mäusen zum kompletten Verlust des Knochenmarks führt (Abb. 13).

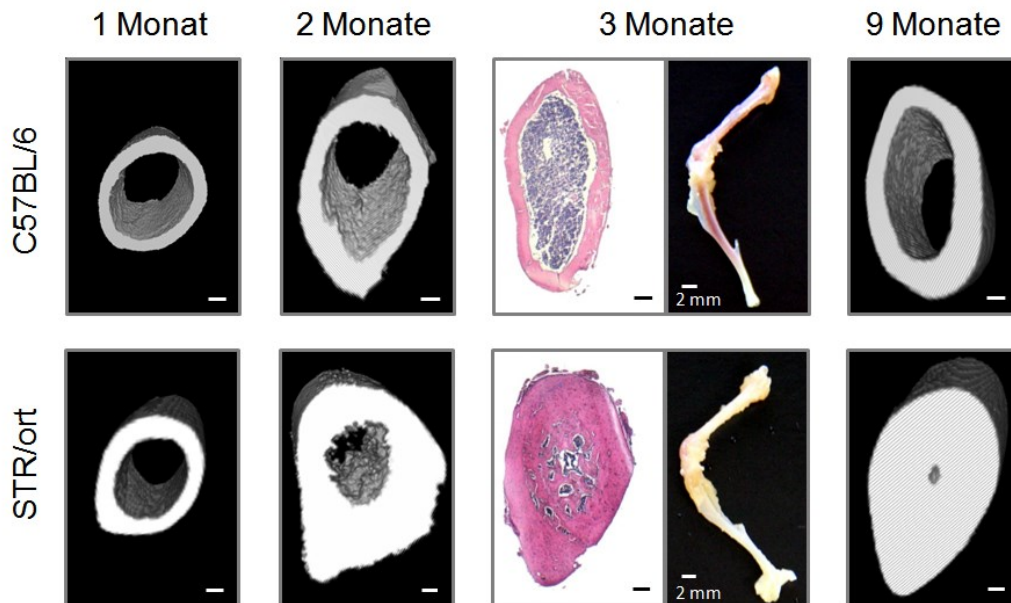


Abb. 13: Anstieg der kortikalen Knochenmenge beim STR/ort-Stamm mit zunehmendem Alter.

Femora von 1, 2 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen ($n = 3$ pro Stamm und Geschlecht) wurden *ex vivo* in 2 ml Kochsalzlösung (0.9% NaCl) im μ CT gescannt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Weibchen. Ein stetiger Zuwachs des kortikalen Knochens nach innen (Endost) ist deutlich erkennbar. Femora und Tibiae von 3 Monate alten Mäusen wurden in der Aufsicht komplett fotografiert und die Femora-Dünnschnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die unbeschrifteten Balken entsprechen 200 μ m.

Der Knochenzuwachs findet hierbei nur in Richtung Endost statt, denn der gesamte Querschnitt nimmt im Gegensatz zu der kortikalen Knochenfläche bzw. kortikalen Flächenfraktion beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm nicht weiter zu (Abb. 14A und B, C). Bei 2 Monate alten STR/ort-Männchen und -Weibchen ist die Querschnittsfläche sogar signifikant kleiner als bei den C57BL/6-Mäusen ($P < 0.01$). Bis zum Alter von 9 Monaten hebt sich dieser Unterschied jedoch wieder auf. Weiterhin fällt bei der Betrachtung der kortikalen Dicke auf, dass 7 und 9 Monate alte STR/ort-Weibchen gegenüber den STR/ort-Männchen gleichen Alters signifikant mehr Knochensubstanz aufweisen (Abb. 14D, Tabelle S2 im Anhang). Es treten also innerhalb des STR/ort-Stamms zusätzliche geschlechtsspezifische Differenzen auf, die beim C57BL/6-Stamm nicht vorhanden sind.

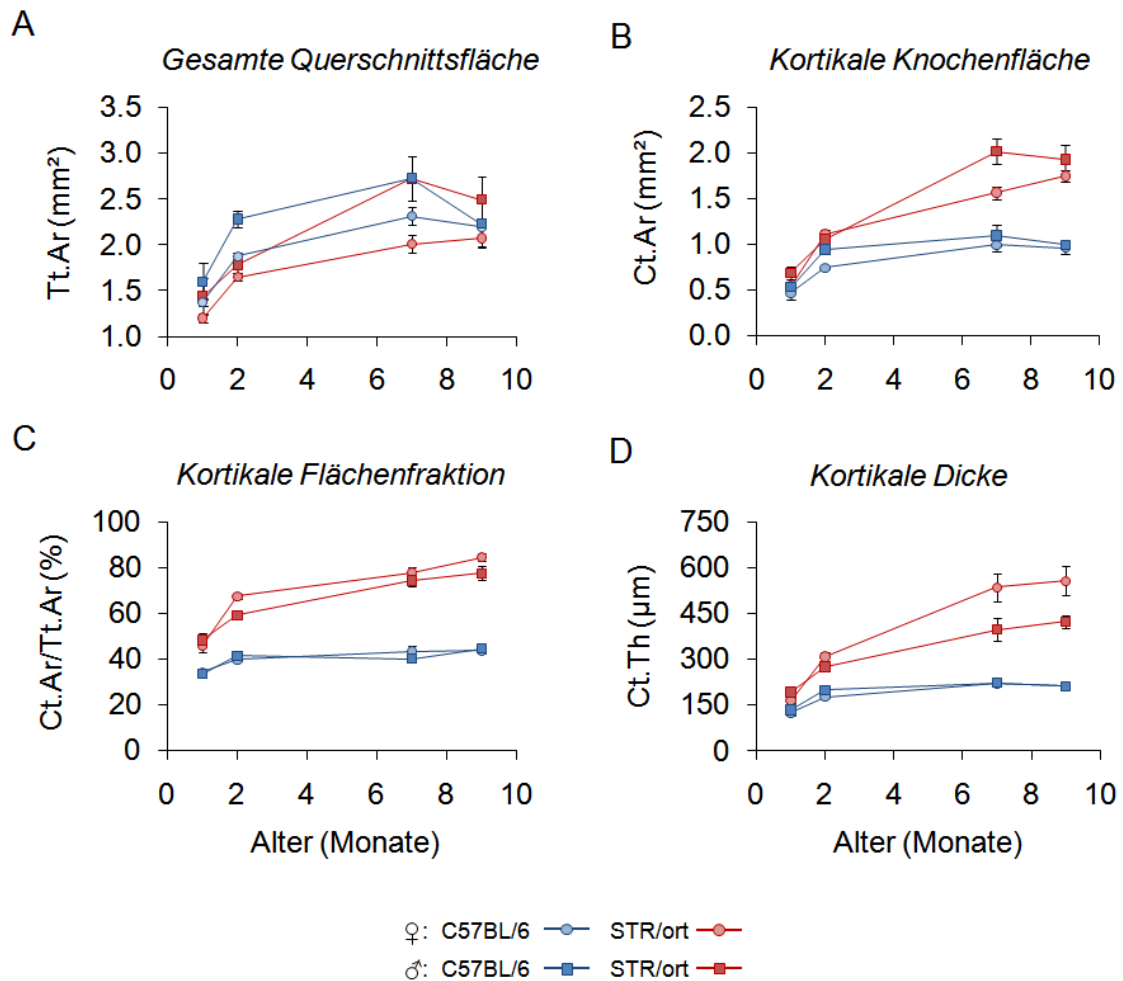


Abb. 14: Erhöhter kortikaler Knochenzuwachs in Richtung Endost beim STR/ort-Stamm. Femora von 1, 2, 7 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen ($n = 3$ pro Stamm und Geschlecht) wurden *ex vivo* in 2 ml Kochsalzlösung (0.9% NaCl) im μ CT gescannt und mittels Skyscan-Software vermessen und analysiert. **(A)** Tt.Ar: „total area“ = gesamte Querschnittsfläche; **(B)** Ct.Ar: „cortical area“ = durchschnittliche kortikale Fläche; **(C)** Ct.Ar/Tt.Ar: „cortical area/total area“ = kortikale Flächenfraktion; **(D)** Ct.Th: „cortical thickness“ = durchschnittliche kortikale Dicke. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Zweistichproben-t-Test; P-Werte sind der Tabelle S2 (Anhang) zu entnehmen.

Parallel zu den μ CT-Analysen wurden Knochenmarkszellen aus den Femora, Tibiae und Humeri isoliert und gezählt. Bereits bei 4 Wochen alten STR/ort-Mäusen beider Geschlechter ist die Ausbeute an KM-Zellen im Vergleich zu der bei den C57BL/6-Mäusen bereits deutlich geringer (61,5 %) und fällt weiter bis auf 6% bei 13 Wochen alten STR/ort-Mäusen (Abb. 15). Die vermehrte kortikale Knochenmenge korreliert also mit einer altersabhängigen Abnahme der KM-Zellzahl beim STR/ort-Stamm, während die KM-Zellen des C57BL/6-Stamms auf einem hohen Niveau verbleiben.

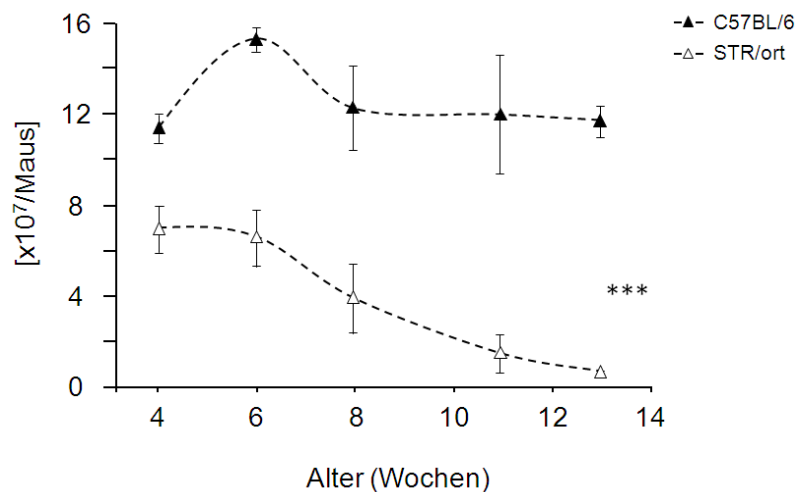


Abb. 15: Die Ausbeute an Knochenmarkszellen sinkt bei STR/ort-Mäusen mit zunehmendem Alter. Aus Femora, Tibiae und Humeri von 4, 6, 8, 11 und 13 Wochen alten C57BL/6 und STR/ort-Mäusen (n = 3 bis 9 pro Altersstufe) wurden die Knochenmarkszellen isoliert und mittels Hämozytometer die Zellzahlen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; Jonckheere Trend Test (***) P < 0.001).

3.4.2 Die Verdrängung des Knochenmarks führt zu Hepatosplenomegalie und extramedullärer Hämatopoese

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass es bei den STR/ort-Mäusen mit zunehmendem Alter zu einer vermehrten kortikalen Knochenbildung kommt, die zu einer Kompression des Knochenmarks führt. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Blutbildung (Hämatopoese) von Organen außerhalb des Knochenmarks, also extramedullär, übernommen wird. Um dem nachzugehen, analysierten wir Milz und Leber hinsichtlich ihrer Gewichts- und Größenänderung. Abbildung 16A zeigt deutlich, dass bei 3 Monate alten STR/ort-Mäusen beider Geschlechter die Milzen (P < 0.001) und auch Lebern (P = 0.009) signifikant mehr Gewicht aufweisen. Der Unterschied in der Milzgröße zwischen dem STR/ort- und C57BL/6-Stamm nahm von 1 Monat über 3, 4 bis 9 Monate stetig zu. Die Differenz beträgt jeweils im Mittel 1.86, 3.88, 6.86 bzw. 7.10 (Abb. S1 im Anhang). Die extramedulläre Hämatopoese wiesen wir anhand von Hämatoxylin/Eosin gefärbten Milz-Dünnschnitten nach. Die STR/ort-Milzen enthielten deutlich mehr Megakaryozyten als die C57BL/6-Milzen (Abb.16B). Megakaryozyten gehören zu den blutbildenden Zellen und sind normalerweise vor allem im Knochenmark zu finden.

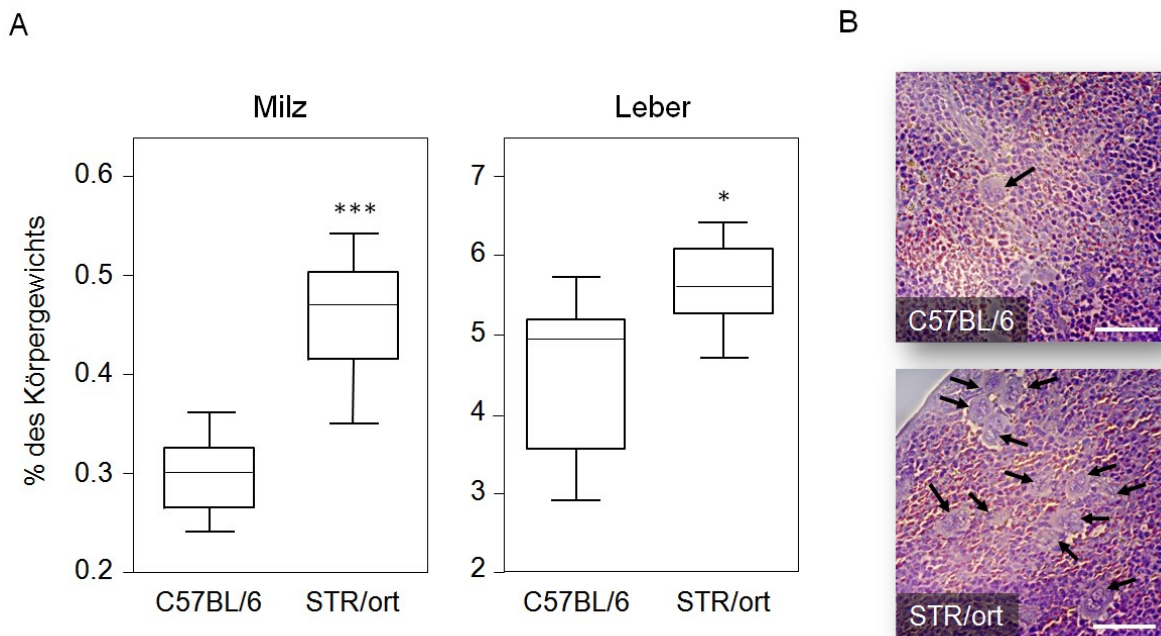


Abb. 16: Der Verlust an Knochenmark bewirkt eine Hepatosplenomegalie und extramedulläre Hämatopoese. Das Gewicht der Milzen und Lebern von 3 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen (jeweils $n = 8$) wurde relativ zum Gesamtkörpergewicht der Mäuse bestimmt. **(A)** Vergleich des Gewichts von Milz und Leber in Form von Boxplots (Minimum-/Maximumwerte, erste/dritte Quartile und Mediane); Mann-Whitney Test (* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$). **(B)** Milzen von STR/ort- und C57BL/6-Weibchen wurden nach Entnahme in Paraffin eingebettet. Dünnschnitte wurden angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Schwarze Pfeile deuten auf Megakaryozyten; Balken = 50 µm.

3.5 STR/ort-Mäuse verfügen über stabilere Knochen

Die erhöhte Knochenmenge legt die Vermutung nahe, dass der Knochen stabiler sein müsste. Um die Stabilität der Knochen zu untersuchen wurde ein biomechanischer Bruchtest durchgeführt (Abb. 17). Die maximale Kraft, die der Knochen bis zum Bruch erträgt, ist bei den Weibchen und Männchen des STR/ort-Stamms gegenüber den C57BL/6-Mäusen beider Geschlechter signifikant erhöht (Abb. 17A). Entsprechend ist die Energie, die der Knochen bis zum Bruch absorbieren kann, aufgrund der inversen Korrelation zwischen Energieabsorption und erhöhter Mineralisierung in den STR/ort- im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen signifikant reduziert (Abb. 17B).

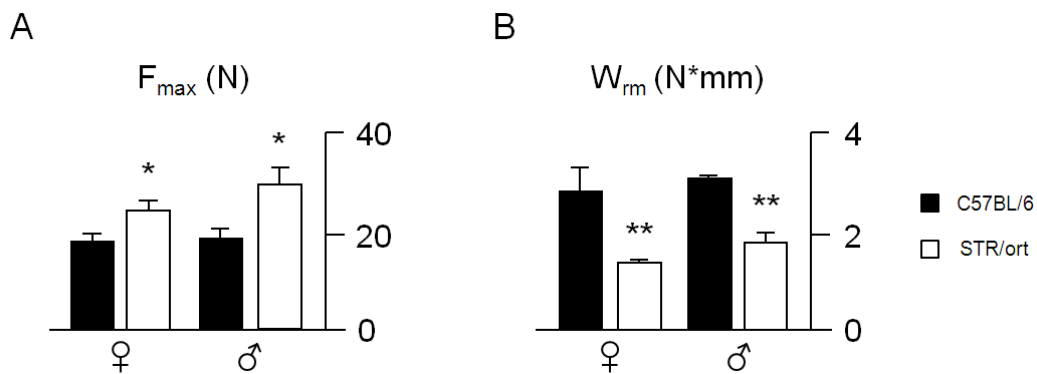


Abb. 17: Die STR/ort-Mäuse weisen eine erhöhte Stabilität der kortikalen Knochen auf. Die Femora von 3 Monaten alten STR/ort- und C57BL/6-Mäusen wurden mittels Bruchtest auf ihre Stabilität getestet. **(A)** F_{max} beschreibt die maximale Kraft, die der Knochen bis zum Bruch aushält. **(B)** W_{rm} beschreibt die Energie, die der Knochen bis zum Bruch bzw. Erreichen der Maximalkraft aufnehmen kann. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; Zweistichproben-t-Test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Die Abbildung ist in Kooperation mit Hamburg entstanden.

3.6 Die Knochendichte von Kalotte und *Dens Incisivus* ist bei STR/ort-Mäusen nicht erhöht

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob neben der chondralen auch die desmale Ossifikation von einem erhöhten Zuwachs an Knochen beim STR/ort-Stamm betroffen ist. Hierfür wurden die Schädel von 2 und 6 Monate alten Mäusen mit Hilfe des μ CT vermessen und jeweils die Knochendichte vom Schädeldach (Kalotte) und einem Schneidezahn (lat. *Dens incisivus*) bestimmt (Abb. 18). Die Schädelgröße und -breite sind bei 2 Monate alten STR/ort-Mäusen gegenüber der von C57BL/6-Mäusen erhöht, doch nur die Schädelbreite erreicht einen signifikanten Unterschied ($P = 0.004$), der bei 6 Monate alten Mäusen jedoch nicht mehr vorhanden ist (Abb. 18 A und B). Die Knochendichte von Kalotte und Schneidezahn ist ebenfalls tendenziell beim STR/ort-Stamm höher, erreicht aber weder nach 2 noch nach 6 Monaten einen signifikanten Unterschied (Abb. 18 C und D). Die Bildung desmaler Knochenstrukturen scheint demnach in STR/ort-Mäusen nicht verändert zu sein.

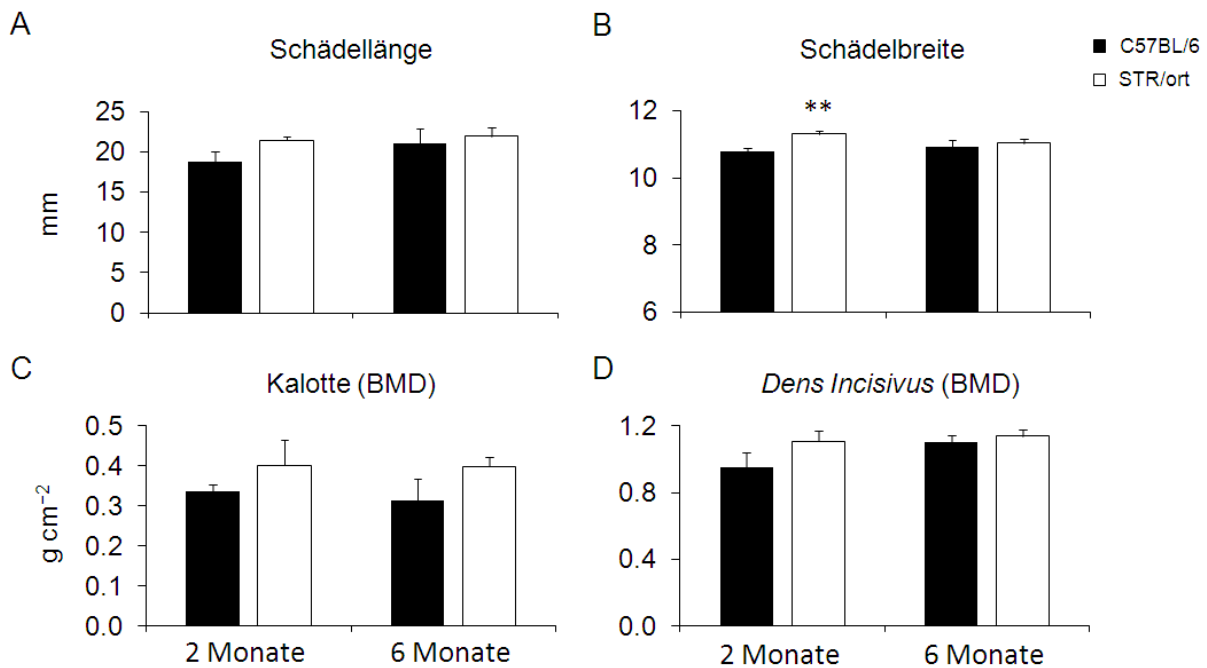


Abb. 18: Die desmale Ossifikation ist beim STR/ort-Stamm unverändert. 2 und 6 Monate alte Mäuse ($n = 3$, pro Geschlecht und Stamm) wurden anästhesiert (50 mg/kg Ketamin und 15 mg/kg of Xylazin) und *in vivo* gescannt. Mittels der Skyscan-Software wurde die Schädel­länge (A) und -breite (B) bestimmt und die Knochendichte (BMD engl. für „bone mineral density“) von Kalotte (C) und *Dens Incisivus* (D) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung; Zweistichproben-t-Test (** $P < 0.01$).

3.7 STR/ort-Mäuse, insbesondere die Weibchen, verfügen über eine erhöhte trabekuläre Knochenmenge

Um die Charakterisierung des Knochenphänotyps des STR/ort-Stamms zu vervollständigen, folgte die Analyse des trabekulären Knochens, der bisher nur sehr unzureichend untersucht wurde. Auch hierbei wurden C57BL/6- und STR/ort-Mäuse im Alter von einem Monat sowie zwei, sieben und neun Monaten mittels μ CT gescannt und verglichen. Zum Zeitpunkt von einem Monat liegen, im Gegensatz zum kortikalen Knochen, noch keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen vor. Doch im weiteren zeitlichen Verlauf zeichnen sich drastische Veränderungen, besonders bei den STR/ort-Weibchen ab. Die normale zeitliche Entwicklung des trabekulären Knochens ist bei C57BL/6-Mäusen durch einen stetigen Verlust an Knochensubstanz charakterisiert (Abb. 19, obere Reihe). Die C57BL/6-Männchen verfügen desweiteren

generell über eine höhere trabekuläre Knochenmenge als die Weibchen (Abb. 20A-C).

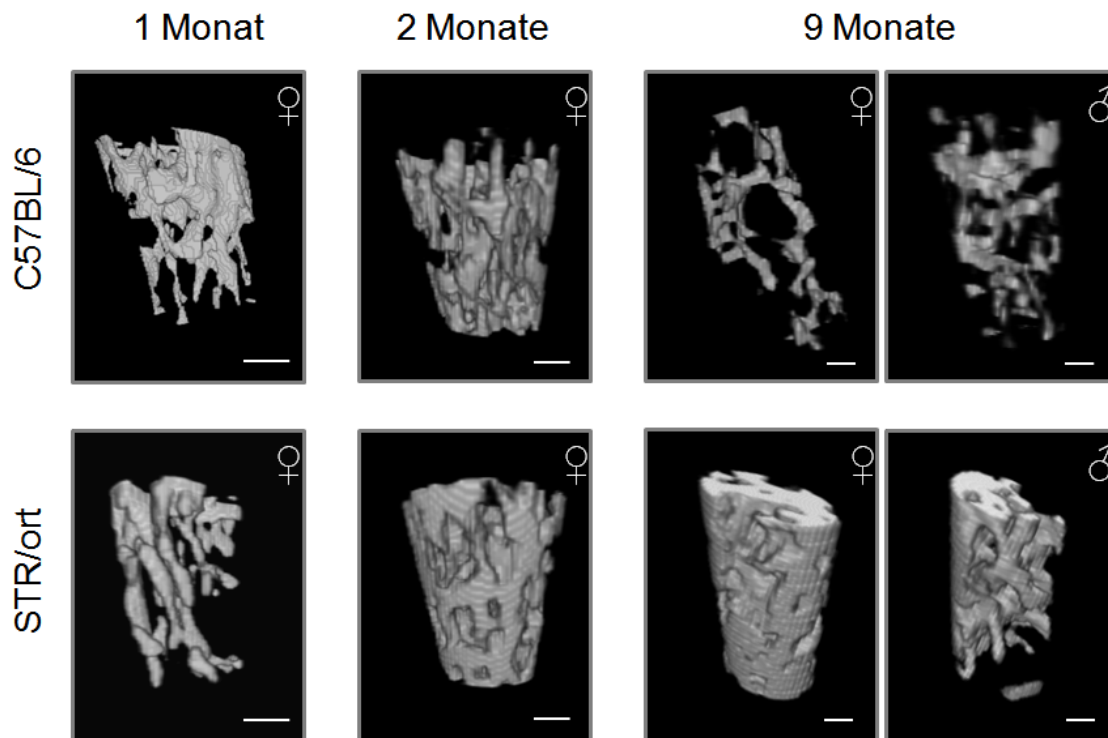


Abb. 19: Anstieg der trabekulären Knochenmenge mit zunehmendem Alter bei den STR/ort-Weibchen. Femora von 1, 2 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen wurden *ex vivo* im μ CT gescannt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 1 Monat und 2 Monate alten Weibchen sowie von 9 Monate alten Weibchen und Männchen. Bei den STR/ort-Weibchen zeigt sich ein stetiger Zuwachs an trabekulärer Knochensubstanz. Balken = 200 μ m.

Die STR/ort-Männchen zeigen auch einen abnehmenden Trend der Knochenmenge über die Zeit. Doch zum Zeitpunkt von einem Monat haben die STR/ort-Männchen bereits mehr Knochensubstanz als die C57BL/6-Männchen und diese wird mit zunehmendem Alter nur sehr langsam reduziert (Tabelle S3 im Anhang). Deshalb weisen die STR/ort-Männchen nach neun Monaten signifikant mehr Knochenvolumen auf als die C57BL/6-Männchen (Abb 19, unten rechts; Abb. 20A). Bei den STR/ort-Weibchen hingegen steigt das trabekuläre Knochenvolumen mit zunehmendem Alter dramatisch an (Abb 19, untere Reihe, Abb. 20A). Das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gewebenvolumen (BV/TV) ist bei einem Monat alten STR/ort-Weibchen noch gleich dem BV/TV-Verhältnis von C57BL/6-Weibchen. Nach zwei Monaten ist es bei

STR/ort-Weibchen 5-fach erhöht, nach sieben Monaten 30-fach und nach neun Monaten 40-fach (Abb. 20A, Tabelle S3 im Anhang).

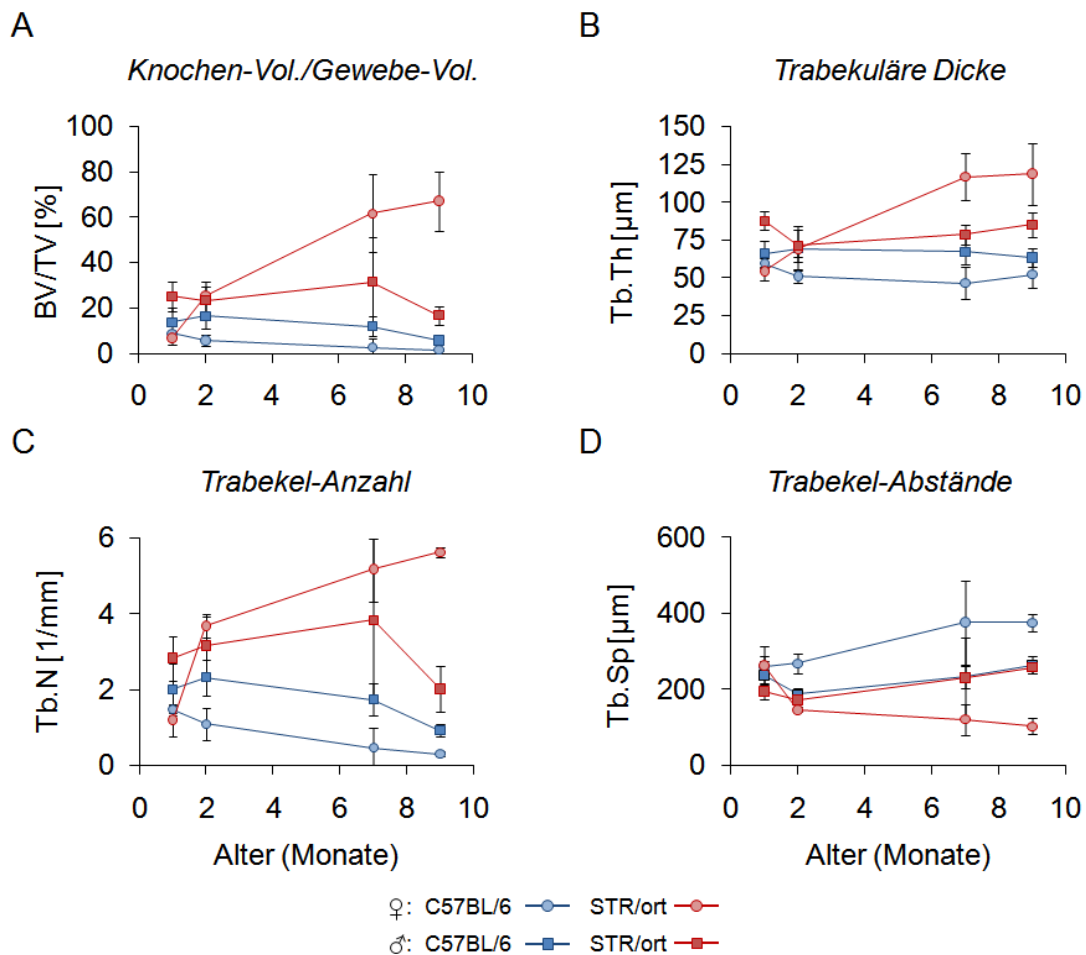


Abb. 20: Trabekuläre Parameter bestätigen den erhöhten Knochenzuwachs beim STR/ort-Stamm. Femora von 1, 2, 7 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen (n = 3 pro Stamm und Geschlecht) wurden *ex vivo* in 2 ml Kochsalzlösung (0.9% NaCl) im μ CT gescannt und mittels Skyscan-Software vermessen und analysiert. **(A)** BV/TV: „bone volume/tissue volume“ = Knochen-Vol./Gewebe-Vol.; **(B)** Tb.Th: „trabecular thickness“ = trabekuläre Dicke; **(C)** Tb.N: „trabecular number“ = Trabekel-Anzahl; **(D)** Tb.Sp: „trabecular separation“ = Trabekel-Abstände. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Zweistichproben-t-Test; P-Werte sind der Tabelle S3 (Anhang) zu entnehmen.

Diese deutliche Zunahme an trabekulären Knochen spiegelt sich auch in weiteren Parametern, wie der trabekulären Dicke und der Trabekel-Anzahl, wieder (Abb. 20B und C). Die Trabekel-Abstände weisen entsprechend einen gegenläufigen Trend auf und sind bei den STR/ort-Weibchen am geringsten (Abb. 20D).

Zusammenfassend ergeben die Daten, dass die STR/ort-Mäuse insgesamt vermehrt trabekulären Knochen bilden. Bei den STR/ort-Männchen zeigt sich dennoch ein vergleichbarer Verlauf wie bei den C57BL/6-Mäusen, weil die trabekuläre Knochen- substanz mit steigendem Alter reduziert wird. Die STR/ort-Weibchen hingegen produzieren immer mehr Knochen mit zunehmendem Alter. Die Knochenmenge ist bei 2 Monate alten STR/ort-Männchen und -Weibchen noch gleich, doch bei 7 Monate alten Weibchen bereits doppelt und bei 9 Monate alten STR/ort-Weibchen im Vergleich zu den -Männchen sogar vierfach höher (Tabelle S3 im Anhang).

Als Nächstes wurde die trabekuläre Knochenmenge in der Tibia und in Wirbelkörpern untersucht, um zu zeigen, dass nicht nur der Femur betroffen ist. Hierzu wurden drei Monate alte STR/ort-Weibchen und -Männchen mit C57BL/6-Mäusen, gleichen Alters und Geschlecht, mittels von Kossa-Färbung verglichen. Bei den STR/ort-Weibchen und -Männchen erkennt man vermehrt schwarz gefärbte Knochenstrukturen in der Tibia und den Wirbelkörpern im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen (Abb. 21).

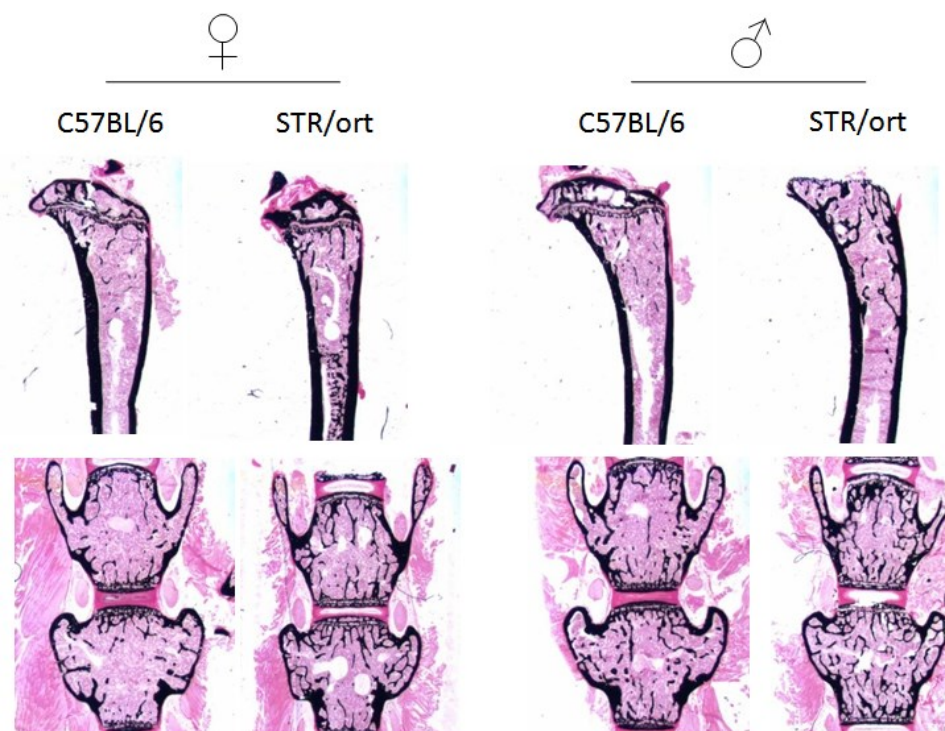


Abb. 21: STR/ort-Mäuse bilden vermehrt trabekulären Knochen in Tibia und Vertebra. Von Kossa-Färbung von unentkalkten Dünnschnitten der Tibiae und Lendenwirbelkörper (L3 und L4) von 3 Monate alten STR/ort- und C57BL/6-Mäusen (n = 3 pro Stamm und Geschlecht). Die Abbildung ist in Kooperation mit Hamburg entstanden.

3.8 Der gesteigerte Knochenzuwachs im STR/ort-Stamm ist assoziiert mit einer reduzierten TRAcP-Produktion der Osteoklasten und mit einem verringerten Kollagen Typ I-Abbau

Als Nächstes wurde untersucht, ob die vermehrte Knochenproduktion auf einen Defekt in den Osteoklasten zurückzuführen ist. Hierzu wurde der Osteoklasten spezifische Marker TRAcP („Tartrate-resistent acid phosphatase“) und das Kollagen Typ I-Abbauprodukt CTX-I (Telozeptid des Kollagen Typ I) als Indikator für Knochenresorption mittels ELISA im Serum von STR/ort- und C57BL/6-Mäusen nachgewiesen und verglichen (Abb. 22).

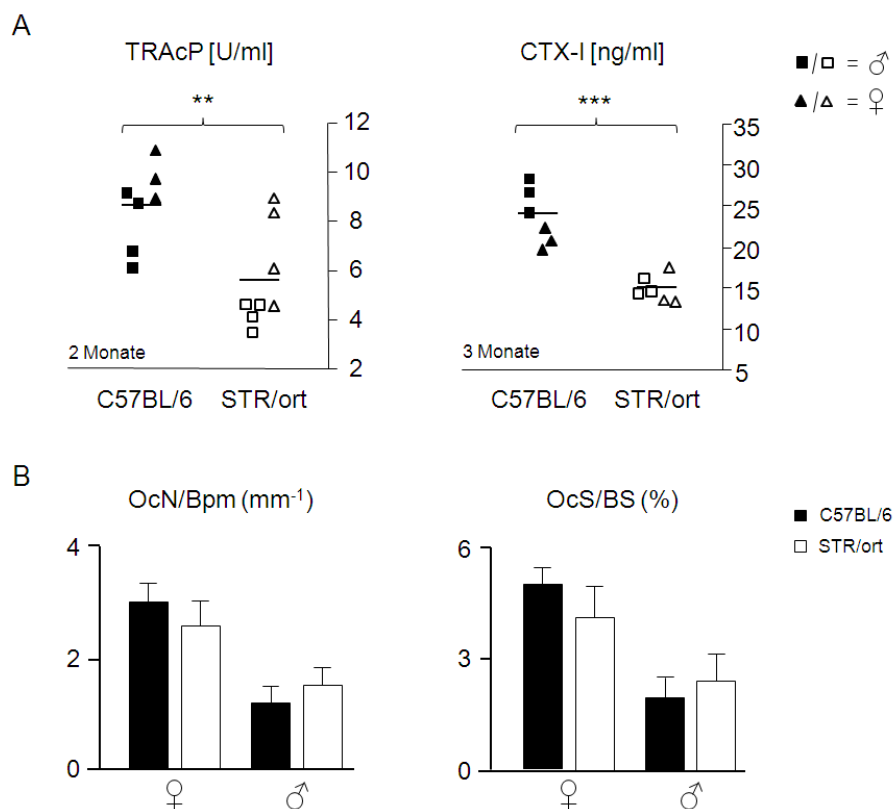


Abb. 22: Die erhöhte Knochenmenge im STR/ort-Stamm korreliert mit einer reduzierten TRAcP-Produktion und einem verringerten Kollagen Typ I-Abbau. (A) Im Serum von 2 bzw. 3 Monate alten STR/ort- und C57BL/6-Mäusen wurde mittels ELISA der Osteoklastenmarker TRAcP („tartrate-resistent acid phosphatase“) und das Kollagen Typ I-Abbauprodukt CTX-I nachgewiesen. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus; Zweistichproben-t-Test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). **(B)** Histomorphometrische Quantifizierung der Osteoklasten an Dünnschnitten der Lendenwirbel L3 und L4. OcN/Bpm = „osteoclast number/bone perimeter“ und OcS/BS = „osteoclast surface/bone surface“. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 Monate alten Tieren (je $n = 3$). Abb. 22B ist in Kooperation mit Hamburg entstanden.

Bei 2 Monate alten STR/ort-Mäusen ist signifikant weniger TRAcP nachweisbar ($P = 0.008$) als bei C57BL/6-Mäusen gleichen Alters (Abb. 22A, links). Auch der Kollagen Typ I-Abbau ist bei 3 Monate alten STR/ort- gegenüber C57BL/6-Mäusen signifikant ($P < 0.001$) reduziert (Abb. 22A, rechts). TRAcP ist bei beiden Stämmen im Serum der Weibchen generell in höheren Mengen vorzufinden als im Serum der Männchen. Beim STR/ort-Stamm ergibt sich sogar ein signifikanter Unterschied ($P = 0.04$). Weiterhin wurde mittels Histomorphometrie die Anzahl der Osteoklasten pro Knochenumfang sowie das Osteoklasten- zu Knochenoberflächeverhältnis bestimmt. Hierbei gibt es jedoch keine Unterschiede zwischen dem STR/ort- und dem C57BL/6-Mausstamm (Abb. 22B).

3.9 Der gesteigerte Knochenzuwachs im STR/ort-Stamm basiert auf einer übermäßigen Knochenbildung bzw. erhöhten Osteoblastenanzahl

Weiterhin wurde die Anzahl der Osteoblasten pro Knochenumfang bzw. das Osteoblasten- zu Knochenoberflächeverhältnis mittels Histomorphometrie bestimmt. Der Vergleich zwischen beiden Stämmen zeigt, dass STR/ort-Weibchen und -Männchen signifikant mehr Osteoblasten aufweisen als die C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter (Abb. 23A). Den lebenden Mäusen beider Stämme wurde zuvor zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Calcein verabreicht. Das Calcein wird während des Wachstum der Mäuse in neu synthetisierten Knochen eingebaut und ermöglicht später die Bestimmung der Knochenbildungsrate. Die STR/ort-Mäuse weisen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen eine tendenziell erhöhte Knochenbildungsrate auf (Abb. 23B).

Desweiteren wurde untersucht, ob auch *in vitro* generierte STR/ort-Osteoblasten im Vergleich zu den Osteoblasten des C57BL/6-Stamms eine erhöhte Aktivität aufzeigen. Hierzu haben wir mesenchymale Stromazellen 28-35 Tage osteogen stimuliert und anschließend im Zellüberstand die alkalische Phosphatase-Aktivität als Marker für Osteoblasten photometrisch nachgewiesen (Abb. 24B).

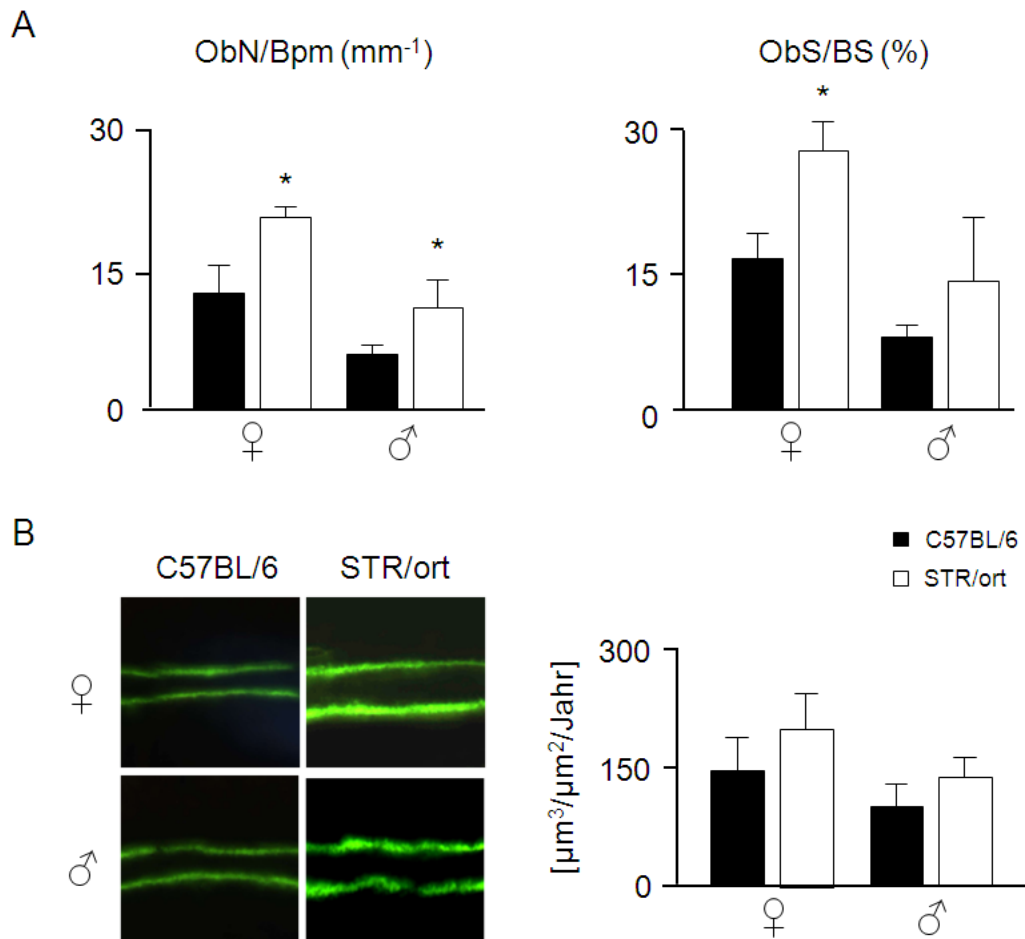


Abb. 23: Die erhöhte Knochenmenge im STR/ort-Stamm ist auf eine gesteigerte Osteoblastenanzahl und Knochenbildungsrate zurückzuführen. **(A)** Histomorphometrische Quantifizierung der Osteoblasten-Parameter an Dünnschnitten der Wirbel L3 und L4. ObN/Bpm = „osteoblast number/bone perimeter“; ObS/BS = „osteoblast surface/bone surface“; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 Tieren pro Geschlecht und Stamm im Alter von 3 Monaten; Zweistichproben-t-Test (* $P < 0.05$). **(B)** STR/ort- und C57BL/6-Mäusen wurden intraperitoneal je zwei Calcein-Injektionen 9 und 2 Tage prä mortal verabreicht. (links) Nachweis der beiden Calcein-Fronten mittels Fluoreszenzmikroskop; (rechts) quantitativer Vergleich der Knochenbildungsrate für beide Geschlechter; $n = 3$ (pro Geschlecht und Stamm). Die Abbildung ist in Kooperation mit Hamburg entstanden.

In Abbildung 24A wird mittels Alizarin-Rot-Färbung die Generierung von Osteoblasten bestätigt. Es sind keine Unterschiede bezüglich der Intensitäten zwischen beiden Stämmen erkennbar. Auch der quantitative Vergleich der alkalischen Phosphatase-Aktivität ergibt keinen signifikanten Unterschied (Abb. 24B).

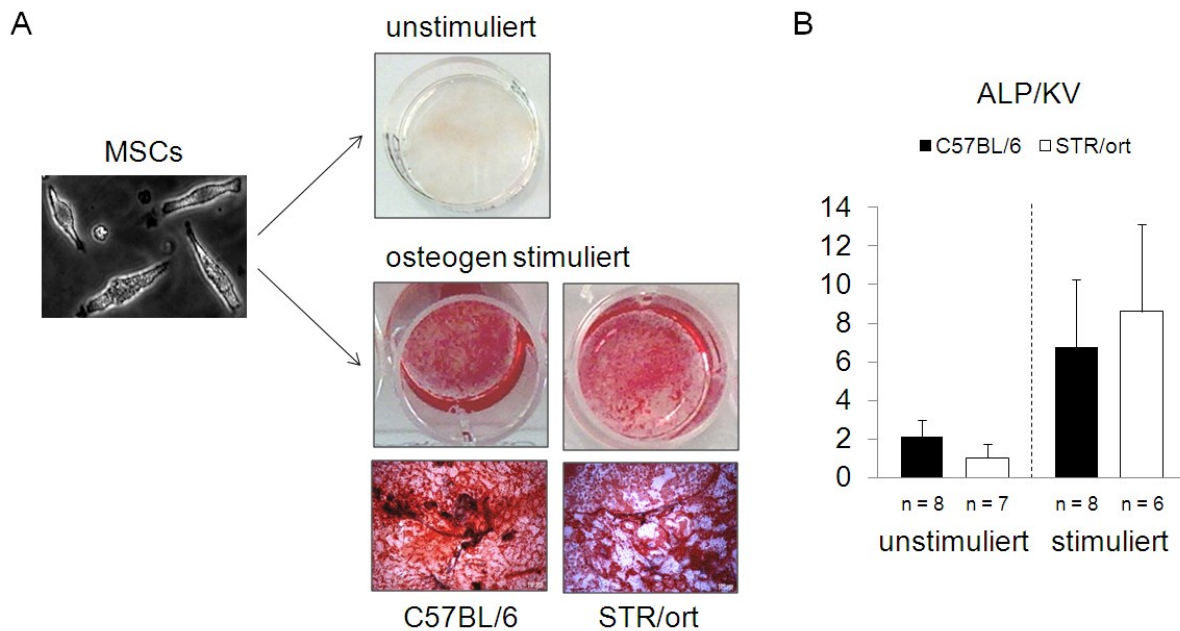


Abb. 24: *In vitro* gezogene STR/ort-Osteoblasten weisen keine erhöhte Aktivität auf. **(A)** Mesenchymale Stromazellen wurden für 28 bis 35 Tage osteogen stimuliert. Die positive Alizarin-Rot-Färbung bestätigt die Differenzierung zu Osteoblasten. **(B)** Quantitativer Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP)-Aktivität im Zellüberstand mittels photometrischer Messung bei 405 nm. Normierung auf den Zellzahlmarker Kristallviolett (KV); dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Zusammenhang zwischen einer Arthrose und Hyperostose beim STR/ort-Stamm aufgrund einer Dysregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Es ist bereits häufig ein Zusammenhang zwischen fortschreitendem Knorpelabbau und zunehmender Sklerotisierung des subchondralen Knochens im Verlauf der Arthrose beschrieben worden. Hierbei wurde immer wieder kontrovers diskutiert, ob die Veränderungen im subchondralen Knochen beginnen und den Abbau des Knorpels beschleunigen oder ob der Abbau des artikulären Knorpels strukturelle Änderungen im subchondralen Knochen begünstigt. Auf jeden Fall ist klar, dass es aufgrund gleicher Signalwege ein enges Zusammenspiel zwischen Knorpel- und Knochenmetabolismus geben muss. Hinsichtlich des STR/ort-Mausstamms wurde bisher eine Verdichtung des subchondralen Knochens der Tibia im Bereich der Epiphyse mit einem erhöhten Abbau von artikulärem Knorpel in Zusammenhang gebracht (Stok et al. 2009).

In diesem Abschnitt ging es nun darum, eine mögliche Störung in einem Signalweg, der für die Entwicklung des Knorpels und Knochens gleichermaßen wichtig ist, aufzudecken, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Arthrose- und dem Hyperostosephänotyp beim STR/ort-Stamm erklären zu können.

Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Arthrose-Kandidatengene, insbesondere die Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs *Dkk4* und *Sfrp1*, in *in vitro* generierten STR/ort-Chondrozyten im Vergleich zu C57BL/6-Chondrozyten signifikant schwächer exprimiert sind. Auch konnte bestätigt werden, dass das Sfrp1-Protein während der Wachstumsphase bei STR/ort-Mäusen eine differentielle Expression aufweist und einer deutlichen altersabhängigen Fluktuation unterliegt, während bei C57BL/6-Mäusen die Expression mit zunehmendem Alter stetig sinkt.

Die Expression des *Sfrp1*-Gens war nicht nur in Chondrozyten reduziert, sondern auch in den mesenchymalen Vorläuferzellen. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf eine mögliche Störung im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, wodurch eine veränderte Knorpel- und Knochenentwicklung im STR/ort-Mausstamm resultieren könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, sollte als Nächstes die *Sfrp1*-Expression in den Osteoblasten, die aus den gleichen Progenitorzellen hervorgehen wie die Chondrozyten, analysiert werden.

3.10 Differentielle Expression der potentiellen Arthrose-Kandidatengene *Gas6*, *Dkk4* und *Sfrp1* in STR/ort-Osteoblasten

Die Arthrose relevanten Gene, deren differentielle Expression zuvor in *in vitro* generierte Chondrozyten aufgezeigt wurde, sollten nun auf mögliche Differenzen in STR/ort- und C57BL/6-Osteoblasten untersucht werden. *Gas6* und *Dkk4* sind in den *in vitro* generierten STR/ort-Osteoblasten signifikant reduziert (Abb. 25A, B). Auch *Sfrp1* ist wie erwartet nicht nur in den MSCs sondern auch in den Osteoblasten bei STR/ort im Vergleich zu C57BL/6 signifikant verringert (Abb. 25D). *Fgfr1* hingegen weist keinen Unterschied zwischen den Stämmen auf und ist generell nur sehr schwach in Osteoblasten exprimiert (Abb. 25C). Bei den STR/ort-Chondrozyten (Abb. 11C) hingegen war die *Fgfr1*-Expression gegenüber der in den MSCs deutlich erhöht.

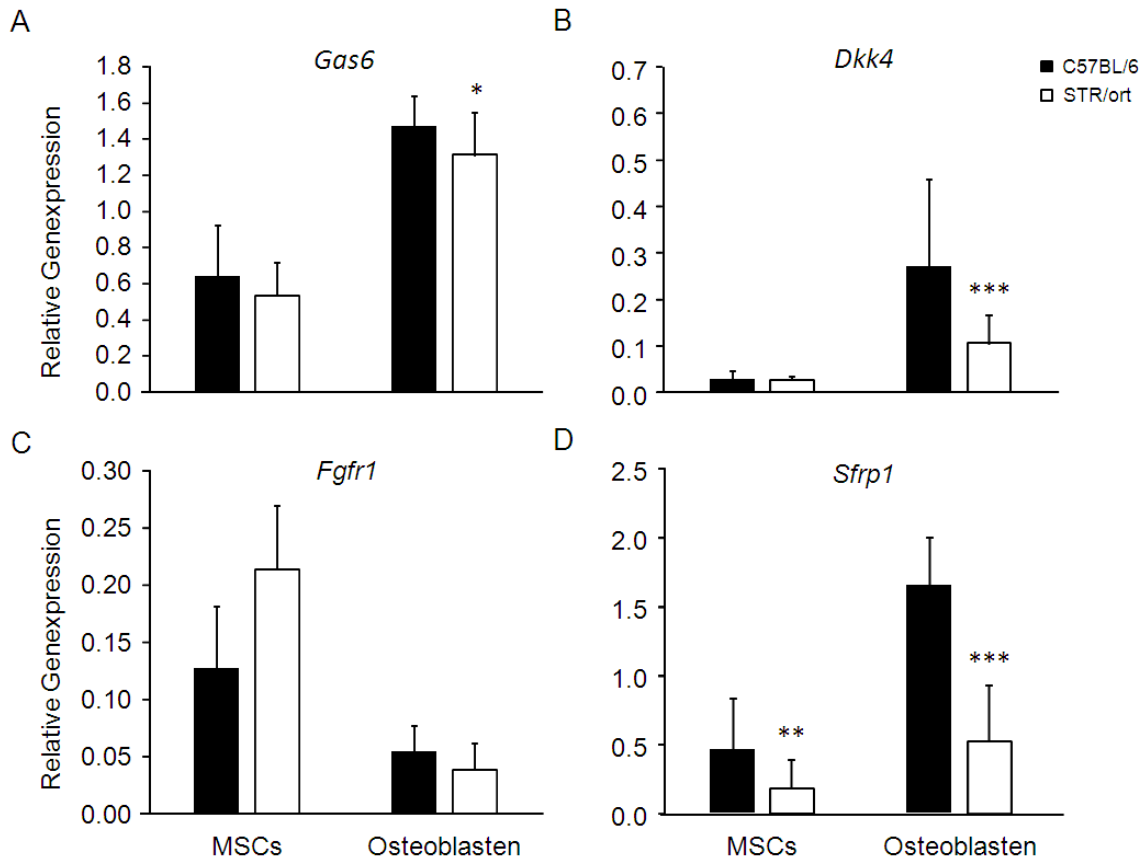


Abb. 25: *In vitro* gezogene STR/ort-Osteoblasten weisen eine verringerte *Gas6*-, *Dkk4*-, und *Sfrp1*-Expression auf. (A) Mittels GeXP-Analyse wurde die Genexpression von *Gas6* (A), *Dkk4* (B), *Fgfr1* (C) und *Sfrp1* (D) in den MSCs (n = 8-9 pro Stamm) und den sich daraus entwickelnden Osteoblasten (C57BL/6 n = 9; STR/ort n = 7) bestimmt. Normierung der Expression auf *Gapdh*; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; Zweistichproben-t-Test (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

3.11 Erhöhte β -Catenin-Proteinexpression in den mesenchymalen Vorläuferzellen von STR/ort-Mäusen

Da *Sfrp1* in den mesenchymalen Vorläuferzellen von STR/ort-Mäusen signifikant reduziert ist, lag die Vermutung nahe, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in den MSCs stärker aktiviert ist. Dieser Annahme kann man anhand der Bestimmung des β -Catenin-Gehalts im Zytoplasma und im Nukleus nachgehen. Bei einer Aktivierung des Signalwegs wird β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und kann somit vermehrt in den Kern eingeschleust werden. Es wurden also Proteine aus den MSCs isoliert und der β -Catenin-Gehalt im Zytoplasma und im Kern mittels Western Blot bestimmt.

Das Ergebnis bestätigt die Hypothese, denn der STR/ort-Stamm weist signifikant mehr β -Catenin im Zytoplasma auf ($P = 0.005$) und auch im Nukleus ist eine tendenzielle Zunahme zu verzeichnen (Abb. 26A und B).

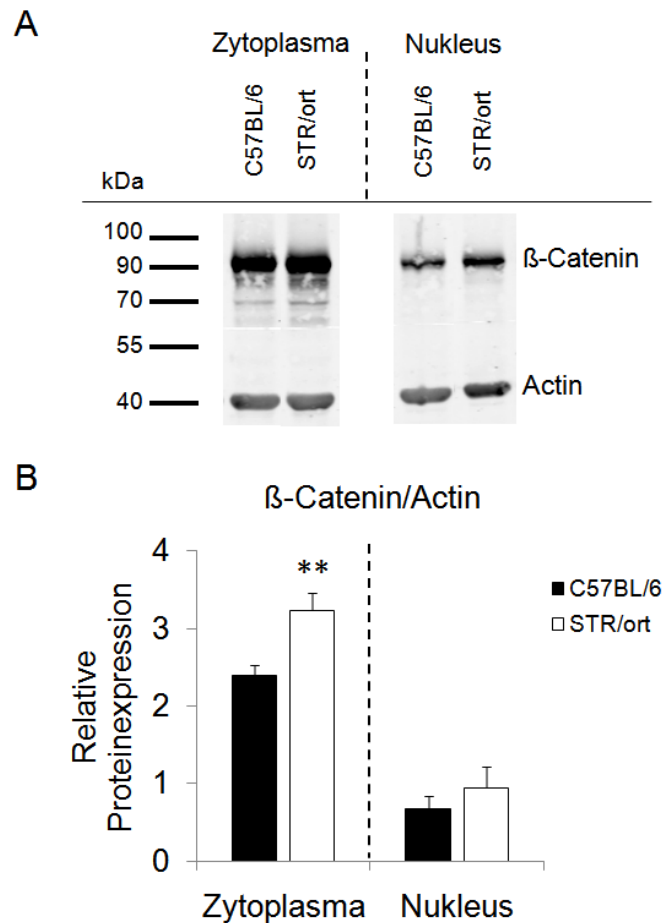


Abb. 26: Der Wnt/ β -Catenin Signalweg ist in den MSCs von STR/ort-Mäusen stärker aktiviert. Mesenchymale Vorläuferzellen von C57BL/6- ($n = 3$) und STR/ort-Mäusen ($n = 4$) wurden 21d kultiviert. **(A)** MSC-Proteinproben wurden mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper im Western Blot auf den β -Catenin-Gehalt getestet. Repräsentative Proben; Kontrolle = Actin; **(B)** Quantifizierung mit LICOR Odyssey Software V3.0; Normierung von β -Catein auf Actin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; Zweistichproben-t-Test (** $P < 0.01$). MSC = mesenchymale Stromazellen.

Wir können hiermit schlussfolgern, dass der Wnt/ β -Catenin-Signlaweg in den STR/ort-MSCs hochreguliert wird. Da wir auch in den Chondrozyten und Osteoblasten, die aus den MSCs differenziert wurden, eine signifikant reduzierte *Sfrp1*-Expression vorfanden (Abb 11D und 25D), lässt sich auch bei diesen beiden Zelltypen eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermuten.

3.12 Differentielle Expression des Sfrp1-Proteins in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge

Zuletzt interessierte uns die Sfrp1-Proteinexpression in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge. Denn diese Zellen befinden sich unmittelbar im Grenzbereich zwischen Knorpel und Knochen und regulieren über die Freisetzung von Zytokinen die enchondrale Knochenentwicklung. Wir analysierten C57BL/6- und STR/ort-Mäuse im Alter von 2 bis 11 Wochen. In der anfänglichen Wachstumsphase (2 bis 6 Wochen) ist eine reduzierte Expression des Sfrp1-Proteins beim STR/ort-Stamm vorhanden, die bei 6 Wochen signifikant geringer ist ($P = 0.047$), sich dann aber auf ein gleiches Niveau zwischen den Stämmen einpendelt (Abb. 27).

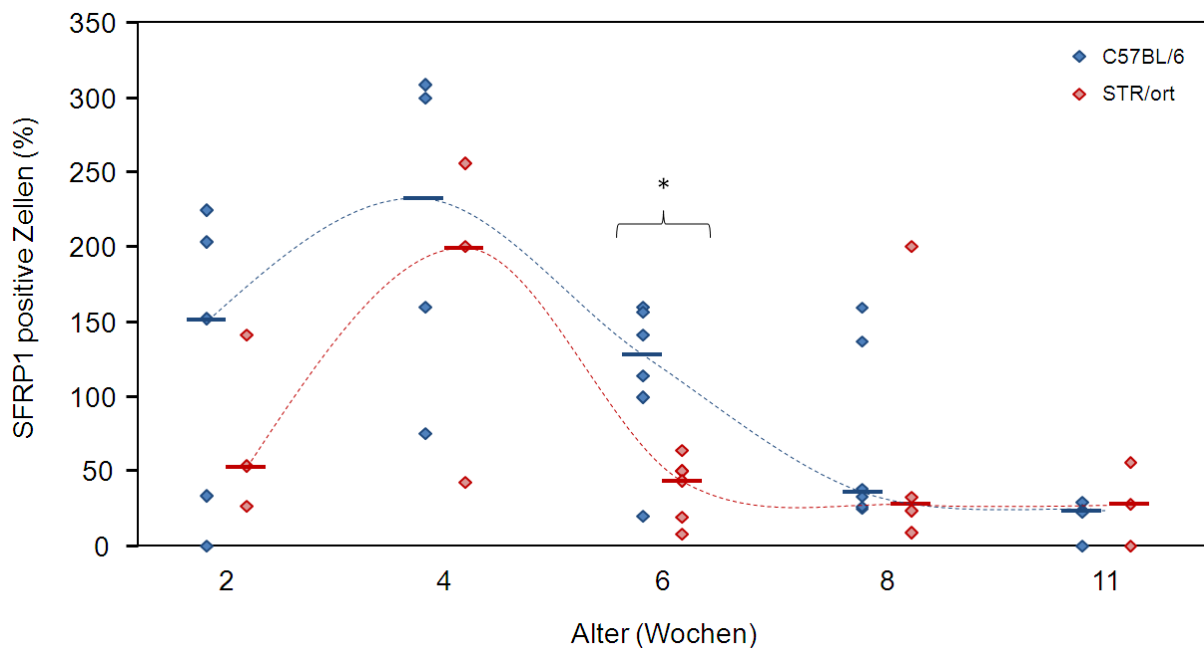


Abb. 27: Sfrp1 ist in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge beim STR/ort-Stamm differentiell exprimiert. Paraffindünnschnitte der Kniegelenke von C57BL/6- und STR/ort-Mäusen im Alter von 2, 4, 6, 8 und 11 Wochen wurden mittels Sfrp1-Antikörper immunhistochemisch analysiert. Jede Raute repräsentiert eine Maus (in Triplikaten gemessen). Es wurden vier Färbeintensitäten definiert: sehr schwach = 1 bis stark = 4. Die positiven Zellen pro Gesichtsfeld im Lichtmikroskop wurden prozentual bestimmt und mit dem Faktor für die Intensität multipliziert. Maximalwert pro Maus = 400; Blaue und rote kurze Linien = Mediane. Mann-Whitney U Test (** $P < 0.01$).

4 Diskussion

4.1 Die differentielle Expression der Kandidatengene *Gas6* und *Fgfr1* in Chondrozyten ist mit der Arthrose in STR/ort-Mäusen assoziiert

Die Sequenzierung des Arthrose-Kandidatengens *Gas6* konnte keine Polymorphismen beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm aufdecken. Für das *Fgfr1*-Gen konnten wir beim STR/ort-Stamm einen Intron-SNP, der einen Effekt auf das Splicen der mRNA und damit auf das Proteinprodukt haben könnte, identifizieren. Mittels der Sequenzanalyse konnten demnach für beide Gene keine Hinweise auf strukturelle Veränderungen und für das *Fgfr1*-Gen nur unzureichende Hinweise auf regulatorische Veränderungen der jeweils resultierenden Proteine beim STR/ort-Mausstamm gewonnen werden. Als Nächstes sollte die Genexpression von *Gas6* und *Fgfr1* gezielt an *in vitro* generierten STR/ort-Chondrozyten untersucht werden, da für beide Gene eine regulierende Funktion in der Chondrogenese beschrieben ist (Motomura et al., 2007, Richman & Crosby, 1990). Die Chondrozyten wurden in Pellets kultiviert, um eine dreidimensionale Anordnung der Zellen ähnlich der *in vivo*-Situation im artikulären Knorpel zu gewährleisten. Unterschiede in der Expression der Arthrose-Kandidatengene in den Pelletkulturen zwischen dem STR/ort- und dem C57BL/6-Stamm würden auf Störungen in der chondrogenen Differenzierung hindeuten, die die Initiierung und Entwicklung der Arthrose erklären könnten.

Gas6 ("Growth arrest specific 6") wurde bisher nicht im Zusammenhang mit Arthrose untersucht. Außerdem ist das *Gas6*-Gen hinsichtlich einer regulierenden Funktion im Knorpelmetabolismus nur unzureichend untersucht. Es konnte allerdings *in vitro* gezeigt werden, dass eine erhöhte *Gas6*-Expression die mRNA-Expression der chondrogenen Marker-Gene *Kollagen Typ II* und *Aggrecan* supprimiert und somit die chondrogene Differenzierung der murinen mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T1/2 hemmt (Motomura et al., 2007). Bei einer erhöhten *Gas6*-Expression würde also die frühe chondrogene Differenzierung inhibiert werden, während eine verringerte *Gas6*-Expression die Differenzierung begünstigen würde. Die von uns *in vitro* generierten Chondrozytenkulturen wiesen eine signifikant reduzierte *Gas6*-Expression beim STR/ort- im Vergleich zum C57BL/6-Stamm auf. Dies könnte bedeu-

ten, dass im STR/ort-Stamm Knorpelmatrix generell vermehrt aufgebaut wird. Dies wiederum würde für eine verstärkte Reifung bzw. Alterung des artikulären Knorpels von STR/ort-Mäusen sprechen. Möglicherweise unterliegt der Gelenkknorpel der STR/ort-Mäuse demnach früher den altersbedingten Abnutzungserscheinungen. Die artikulären STR/ort-Chondrozyten würden entsprechend früher in Apoptose gehen. Daraus würde eine verringerte Dichte an Chondrozyten im Knorpel resultieren, wodurch die Entwicklung einer Arthrose begünstigt wird (Hashimoto et al., 1998a).

Der beschleunigte Knorpelabbau im arthrotischen Gelenk wird durch katabole Stimuli bewirkt. Hierzu zählt unter anderem „fibroblast growth factor 2“ (Fgf-2), das eine erhöhte Expression der Matrix-Metalloprotease-13 (MMP-13) hervorruft und dadurch den Netto-Gehalt an Proteoglykanen reduziert (Wang et al., 2004). Gesteuert wird die katabole Wirkungsweise des Fgf-2 über den Rezeptor Fgfr1. Er gilt demzufolge als wichtiger Mediator für die Induktion kataboler Prozesse in humanen artikulären Chondrozyten und begünstigt die Arthrosepathogenese (Yan et al., 2011). Wir konnten in den von uns *in vitro* generierten chondrogenen Pelletkulturen des STR/ort-Mausstamms eine signifikant erhöhte Expression von *Fgfr1* im Vergleich zum C57BL/6-Stamm aufzeigen. Möglicherweise verfügen die Chondrozyten des STR/ort-Stamms deshalb über eine erhöhte katabole Aktivität und produzieren gleichzeitig weniger Proteoglykane, insbesondere Aggrecan. Wir konnten allerdings *in vitro* keinen Unterschied in der *Aggrecan*-Expression zwischen den STR/ort- und C57BL/6-Pelletkulturen feststellen.

Über die *Fgfr1*-Expression während der *in vitro*-Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) zu Chondrozyten ist bisher bekannt, dass die Fgfr1-Expression auf Proteinebene in expandierenden MSCs erhöht, in kondensierten MSCs hingegen reduziert ist. Demnach begünstigt Fgfr1 vor allem die Proliferation von MSCs (Hellingman et al., 2010). Die Fgf's können über die Bindung an die Fgf-Rezeptoren, inklusive Fgfr1, die Entwicklung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten induzieren (Richman and Crosby, 1990). Weiterhin wurde Fgfr1 in hypertrophen Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation nachgewiesen und reguliert hier die Zelldifferenzierung, die Produktion von extrazellulärer Matrix und die Apoptose (Peters et al., 1992).

4.2 Die verringerte Expression der Kandidatengene *Dkk4* und *Sfrp1* bewirkt eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und ist mit Arthrose im STR/ort-Stamm assoziiert

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist maßgeblich an embryonalen Entwicklungsprozessen beteiligt und steuert ebenfalls wichtige Abläufe während der Chondrogenese und Osteogenese im adulten Organismus (Cadigan and Nusse, 1997). Die Balance zwischen Aktivierung und Hemmung des Signalwegs ist letztendlich entscheidend für das Wachstum der Gliedmaßen sowie die Knorpel- und Knochendifferenzierung bzw. die Regulierung des Auf- und Abbaus von Knorpel und Knochen im adulten Organismus (Witte et al., 2009). Eine Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt somit zu einem Ungleichgewicht im Knorpel- und Knochenmetabolismus und trägt zur Initiierung der Arthrose bei. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden beim STR/ort-Stamm *Dkk4* und *Sfrp1* als potentielle Arthrose-Kandidatengene identifiziert (Pasold, 2008). In dieser Arbeit stellte sich deshalb die Frage, ob eine differentielle Expression der beiden Gene und eine daraus resultierende Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu der Entwicklung der Arthrose im STR/ort-Mausmodell beitragen könnte.

Bei Patienten mit Kniegelenksarthrose konnte bisher eine reduzierte Expression des Wnt-Signalweg-Antagonisten *Dkk1* im Plasma und in der Gelenkflüssigkeit im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Demnach ist zirkulierendes *Dkk1* invers mit Arthrose assoziiert (Honsawek et al., 2010). Desweiteren wurde in einer aktuellen Studie an transgenen Mäusen gezeigt, dass die Überexpression von *Dkk1* im artikulären Knorpelgewebe das Voranschreiten der arthrotischen Knorpel-degradation inhibiert (Oh et al., 2012). *Dkk1* könnte somit eine kritische Rolle in der Progression der Arthrose einnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kandidatengen *Dkk4*, das mit *Dkk1* eng verwandt ist, untersucht. Es konnte ebenfalls eine signifikant reduzierte *Dkk4*-Expression in den *in vitro*-Knorpelkulturen von STR/ort-Mäusen im Vergleich zu denen von C57BL/6-Mäusen aufgezeigt werden. Jedoch konnten keine Sequenzunterschiede im kodierenden Bereich zwischen den beiden Stämmen gefunden und somit keine Hinweise auf strukturelle Veränderungen des *Dkk4*-Proteins gewonnen werden.

Auch der Wnt/ β -Catenin-Antagonist *Sfrp1* ist für die Gewährleistung einer normalen Chondrozytendifferenzierung essentiell (Gaur et al., 2006). *Sfrp1* ist eng verwandt mit *FRZB* (*SFRP3*), das bereits häufiger, wenn auch nicht konsistent, mit der humanen Arthrose in Verbindung gebracht werden konnte. Es wurden krankheitsassoziierte SNPs im *FRZB*-Gen bei Patienten mit Hüftgelenksarthrose nachgewiesen (Loughlin et al., 2004; Lane et al., 2006; Min et al., 2005) sowie bei Patienten mit Kniegelenksarthrose (Valdes et al., 2007). Der Austausch des Arginins durch Glycin (Arg324Gly) am Carboxylende des *SFRP3*-Gens führte *in vitro* zu einer defizienten Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

Tatsächlich wurden auch im Rahmen dieser Arbeit mehrere Hinweise dafür gefunden, dass das Kandidatengen *Sfrp1* mit der Ausprägung der Arthrose im STR/ort-Stamm assoziiert sein könnte. Die Analyse der *Sfrp1*-Gensequenz deckte insgesamt 23 Polymorphismen innerhalb des kodierenden Bereichs und 1400 bp vor dem Transkriptionstart beim STR/ort-Stamm im Vergleich zum C57BL/6-Stamm auf. Ein SNP ist innerhalb der sogenannten "Leader"-Sequenz positioniert und bewirkt beim STR/ort-Stamm einen Aminosäureaustausch im resultierenden Signalpeptid, wodurch die Sekretion des Proteins beeinflusst sein könnte. Hierbei ist die unpolare und hydrophobe Aminosäure (AS) Alanin durch die polare und neutrale AS Serin ersetzt. Vergleicht man die Nukleotidposition mit der "Leader"-Sequenz anderer Spezies (Mensch, Schimpanse, Maus, Ratte und Meerschweinchen) findet man bei allen ausschließlich Alanin vor. Es ist demnach wahrscheinlich, dass der Austausch dieser konservierten AS eine Störung der Proteinfreisetzung hervorruft. Wir konnten außerdem 20 Polymorphismen innerhalb der 3' untranslatierten Region (UTR) und einen weiteren SNP innerhalb der Promoterregion aufzeigen. Diese Sequenzvarianten könnten die Transkription und die Stabilität des Transkripts beeinflussen und somit eine differentielle Expression des *Sfrp1*-Gens bewirken. Desweiteren befindet sich ein SNP 7 bp hinter der Spleißstelle (in 3'-Richtung) innerhalb des zweiten Introns. Mutationen, die bis zu 10 bp von der Spleißstelle entfernt in Introns vorliegen, können das Spleißen beeinflussen und zu einer Modifizierung des Proteins führen (Faber et al., 2011). Mit Hilfe des SNP-Analyseprogramms „AASsites“ von Faber et al. kann man ermitteln, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Veränderung des Spleißmusters durch einen SNP ist. Die Kapazität des hier identifizierten SNPs, das

Spleißmuster des *Sfrp1*-Gens beim STR/ort-Stamm zu verändern, wurde jedoch nur als unwahrscheinlich eingestuft.

Allerdings, gelang es uns im weiteren Verlauf der Arbeit eine differentielle Expression von *Sfrp1* im STR/ort-Mausstamm auf RNA- und Proteinebene aufzuzeigen. Sowohl die *in vitro* generierten MSCs als auch die Chondrozyten exprimierten signifikant weniger *Sfrp1* als die C57BL/6-MSCs und -Chondrozyten. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg könnte somit in den STR/ort-Mäusen verstärkt ablaufen und die chondrogene Differenzierung beeinflussen.

Im artikulären Knorpel der STR/ort-Mäuse beobachteten wir eine im Vergleich zum C57BL/6-Stamm unregelmäßige bzw. fluktuierende Expression des *Sfrp1*-Proteins. Während die Proteinmenge beim C57BL/6-Stamm mit zunehmendem Alter immer weiter absank, schwankte die *Sfrp1*-Proteinexpression beim STR/ort-Stamm – besonders bei den sechs und acht Wochen alten Mäusen. Während zum Zeitpunkt von sechs Wochen die *Sfrp1*-Expression bei C57BL/6-Mäusen 2.7-fach gegenüber der bei STR/ort-Mäusen erhöht war, drehte sich das Verhältnis zum Zeitpunkt von acht Wochen komplett um. Die *Sfrp1*-Expression in den artikulären Chondrozyten ist bei dem STR/ort-Stamm zu diesem Zeitpunkt 2.9-fach höher als in den C57BL/6-Chondrozyten. Bei sechs Wochen alten STR/ort-Mäusen scheint also der Wnt/ β -Catenin-Signalweg im artikulären Knorpel verstärkt aktiviert zu sein, während bei den acht Wochen alten STR/ort-Mäusen der Signalweg gehemmt wird. Studien, die sich mit dem Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Differenzierung und Homöostase des artikulären Knorpels befassten, konnten zeigen, dass eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs in artikulären Chondrozyten eine frühzeitige chondrogene Differenzierung begünstigt. Die Chondrozyten reifen also schneller heran und tragen zur Ausbildung eines Arthrose ähnlichen Krankheitsbildes bei (Zhu et al., 2009). Im *Frzb*-Knockout-Mausmodell bewirkte die verringerte *Frzb*-Expression entsprechend die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Dies wiederum hatte eine verringerte Expression der Knorpel spezifischen Proteine Aggrecan und Kollagen Typ II zur Folge. Die strikte Regulierung des Signalwegs ist also unbedingt notwendig, um eine normale Entwicklung des artikulären Knorpels zu gewährleisten (Lodewyckx et al., 2012).

4.3 Das Arthrose-Mausmodell STR/ort entwickelt zusätzlich eine altersabhängige und geschlechtsspezifische Hyperostose

Im zweiten Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der STR/ort-Stamm im Vergleich zum C57BL/6-Stamm vermehrt Knochensubstanz produziert, also einen Hyperostosephänotyp aufweist. Es ist sowohl der kortikale als auch der trabekuläre Knochen in den Wirbelkörpern und Röhrenknochen betroffen. Der Knochenbruchtest konnte zusätzlich zeigen, dass die Knochen der STR/ort-Mäuse aufgrund des vermehrten Knochenvolumens stabiler sind. Die Schädelknochen hingegen sind nicht verändert, so dass man annehmen kann, dass der Defekt in der enchondralen und nicht in der desmalen Ossifikation liegt. Interessanterweise zeigen die STR/ort-Mäuse trotz ihres rasanten Knochenzuwachs sowie der damit einhergehenden Verdrängung des Knochenmarks und Hepatosplenomegalie keine Wachstumsdefizite. Auch die Lebenserwartung unter keimfreien Haltungsbedingungen ist nicht beeinträchtigt.

Es zeigten sich deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Knochenmenge. Das kortikale Knochenvolumen ist bei den STR/ort-Weibchen und -Männchen bereits im Alter von einem Monat signifikant höher als bei den C57BL/6-Mäusen beider Geschlechter. Nach sieben und neun Monaten verfügen die STR/ort-Weibchen allerdings über signifikant mehr Knochensubstanz als die STR/ort-Männchen. Bezüglich des trabekulären Knochens sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede noch deutlicher ausgeprägt. In den STR/ort-Männchen wird im Zeitraum von einem Monat bis neun Monaten die Menge an trabekulärem Knochen vergleichbar mit den C57BL/6-Männchen und -Weibchen reduziert. Bei den STR/ort-Weibchen hingegen nimmt die trabekuläre Knochensubstanz im Vergleich zu den STR/ort-Männchen und auch im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen beider Geschlechter mit zunehmendem Alter signifikant zu. Unsere Ergebnisse, dass die STR/ort-Weibchen generell mehr kortikalen und trabekulären Knochen produzieren als die Männchen, konnte in einer erst kürzlich erschienen Studie ebenfalls gezeigt werden (Uchida et al., 2012). Hierbei wurde eine geringere Knochenresorption durch die Osteoklasten bei den Weibchen als Ursache vermutet. Wir konnten zeigen, dass das erhöhte Knochenvolumen bei den Weibchen und Männchen des STR/ort-Stamms mit einer reduzierten TRAcP-Produktion und einem verringerten Kollagen Typ I-Abbau assoziiert

ist. Dies deutet auf einen Defekt in den Osteoklasten hin. Da die Histomorphometrie jedoch keine Unterschiede in der Osteoklastenzahl aufzeigen konnte, vermuten wir Defizite in der Osteoklastenaktivität beim STR/ort-Stamm. Uchida et al. zeigten ebenfalls, dass die Osteoklasten einen Effekt auf den Hyperostosephänotyp von STR/ort-Mäusen haben könnten. Sie führten hierzu eine Ovariectomie an STR/ort-Weibchen durch und konnten eine signifikante Abnahme der Knochendichte feststellen. Es ist bekannt, dass durch die Ovariectomie und der damit einhergehenden fehlenden Östrogenproduktion eine verstärkte Osteoklastogenese und somit eine erhöhte Knochenresorption induziert wird (Weitzmann and Pacifici, 2006).

Desweiteren konnten wir zeigen, dass sowohl die Anzahl der Osteoblasten als auch die Knochenbildungsrate bei drei Monate alten STR/ort-Mäusen beider Geschlechter erhöht ist. Es sind also möglicherweise Defekte in beiden Zelltypen, Osteoblasten und Osteoklasten, für die erhöhte Knochenproduktion verantwortlich.

4.4 Der STR/ort-Stamm stellt ein neues Hyperostose-Mausmodell dar

Es gibt eine Reihe von bereits beschriebenen Hyperostose-Mausmodellen, die jedoch in der Ausprägung des Phänotyps nur vereinzelt Übereinstimmungen mit dem Phänotyp des in dieser Arbeit untersuchten STR/ort-Mausmodells aufzeigen. So gibt es beispielsweise Mutanten mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit von „transforming growth factor beta“ (TGF- β) oder mit einer gestörten TGF- β Signalgebung, die eine Osteosklerose in den Röhrenknochen und in der Wirbelsäule in Kombination mit Arthrose-ähnlichen Symptomen entwickeln (Filvaroff et al., 1999; Serra et al., 1997). TGF- β ist wichtig für die Skelettentwicklung. Ein Mangel an TGF- β in Knochen und Knorpel führt zu einer verringerten Osteoklastenaktivität und damit zu einer reduzierten Knochenresorption (Dabovic et al., 2005). Diese Mäuse zeigen allerdings Wachstumsschäden inklusive eines erhöhten Schädelknochenvolumens, das bei den STR/ort-Mäusen nicht vorhanden ist.

Eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs aufgrund von Veränderungen im „low density lipoprotein receptor-related protein 5“ (LRP5)-Gen oder in den Wnt-Antagonisten, Sost (Sclerostin) und Sfrp1, führen ebenfalls zu Hyperostose (Bodine et al., 2004; Niziolek et al., 2011). Wie hier für die STR/ort-Mäuse gezeigt,

findet man auch bei den Weibchen des *Sfrp1*-Knockout-Mausmodells einen ausgeprägteren Hyperostosephänotyp als bei den Männchen. Jedoch scheint ausschließlich der trabekuläre Knochen betroffen zu sein (Bodine et al., 2004). Knock-in Mäuse mit der *Lrp5*G171V-Mutation und damit einer gestörten *Sost*-*Lrp5*-Interaktion zeigen eine vermehrte Knochenablagerung entlang der inneren Knochenhaut (Endost) und ebenfalls eine Überproduktion von trabekulärer Knochensubstanz. Doch im Gegensatz zum STR/ort-Stamm, weisen die *Lrp5*G171V-Mäuse wieder ein erhöhtes Schädelknochenvolumen auf (Niziolek et al., 2011). Bei den *Lrp5*-, *Sost*- und *Sfrp1*-Mutanten ist eine Dysfunktion der Osteoblasten für die vermehrte Knochenproduktion am wahrscheinlichsten (Little et al., 2002b). Es gibt desweiteren eine Reihe von Mausmodellen, bei denen die erhöhte Knochenmenge auf Defekte in den Osteoklasten zurückgeht. Hierzu zählen z.B. Cathepsin K defiziente Mäuse. Cathepsin K kodiert für eine saure Protease, die vor allem in Osteoklasten exprimiert wird und beim Abbau von Knochenmatrix involviert ist (Saftig et al., 2000). Andere Osteopetrose-Mausmodelle weisen Mutationen in Genen auf, die unter anderem für die Resorptionstätigkeit der Osteoklasten, insbesondere der Erzeugung und Ansäuerung der Resorptionslakunen verantwortlich sind. Hierzu zählt u.a. das *oc/oc*-Mausmodell mit einem Defekt im *Tcirg1* (T-cell immune regulator 1)-Gen, α -Carboanhydrasen II defiziente Mäuse und „gray-lethal“ (*gl/gl*)-Mäuse mit einer Mutation im *Ostm1* (osteopetrosis associated transmembrane protein 1)-Gen (Blin-Wakkach et al., 2004; Margolis et al., 2008; Pata et al., 2008). Doch auch diese Mausmodelle für Hyperostose weisen im Gegensatz zu STR/ort-Mäusen deutliche Wachstumsdefizite auf.

Wir vermuten, dass bei den STR/ort-Mäusen Defizite in den Osteoblasten und Osteoklasten vorliegen. Denn einerseits konnten wir *in vivo* eine erhöhte Osteoblastenanzahl und eine damit assoziierte Steigerung der Knochenbildungsrate aufzeigen. Andererseits fanden wir aber auch Anzeichen einer verminderten Osteoklastenaktivität. Desweiteren ergab der Knochenbruchtest, dass die STR/ort-Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen stabilere Knochen haben, was mit dem erhöhten Knochenvolumen zusammenhängen könnte. Interessanterweise wurde zuvor beobachtet, dass bei den Hyperostosephänotypen, die auf eine erhöhte Knochenbildung infolge einer verstärkten Aktivierung des Wnt-Signalwegs oder einer Mutation im *TGF*-Gen zurückgehen, stabilere und damit gegenüber Frakturen resistenterere

Knochen vorzufinden sind. Bei den Hyperostosen, die auf eine verringerte Osteoklastenaktivität zurückzuführen sind, treten hingegen häufiger Frakturen auf (de Vernejoul and Kornak, 2010).

Zusammenfassend gleicht keines der bisher beschriebenen Hyperostose-Mausmodelle dem STR/ort-Knochenphänotyp. Unsere Ergebnisse konnten Hinweise auf Defekte in den Osteoblasten und auch in den Osteoklasten liefern, sodass es sich um einen neuen, multigen initiierten Hyperostosephänotypen handeln könnte.

4.5 Die erhöhte trabekuläre Knochenmenge könnte die STR/ort-Weibchen vor der Entwicklung einer Arthrose schützen

Bei dem STR/ort-Mausstamm sind es in erster Linie die STR/ort-Männchen, die frühzeitig arthroseähnliche Symptome entwickeln (Mahr et al., 2003; Walton, 1977). Allerdings sind es die STR/ort-Weibchen, die mit zunehmendem Alter deutlich mehr Knochensubstanz im Vergleich zu den Männchen aufweisen. Dieser Unterschied ist beim trabekulären Knochen besonders stark ausgeprägt. Während bei den STR/ort-Weibchen mit zunehmendem Alter immer mehr trabekuläre Knochensubstanz produziert wird, wird bei den Männchen die Knochenmenge mit zunehmendem Alter reduziert. Demnach könnte die erhöhte trabekuläre Knochenproduktion bei den STR/ort-Weibchen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von Arthrose haben. Der Einfluss eines veränderten Knochenmetabolismus im subchondralen Knochen auf die Pathophysiologie der Arthrose ist bis heute kontrovers diskutiert (Baker-Lepain and Lane, 2012; Weinans et al., 2012). So soll zum Beispiel härterer subchondraler Knochen das Fortschreiten der Arthrose begünstigen (Hunter and Spector, 2003). Bei Patienten mit fortgeschrittener Arthrose wurde tatsächlich ein erhöhtes Knochenvolumen festgestellt, das jedoch mit einer verringerten Mineralisierung einherging (Fazzalari and Parkinson, 1997; Grynepas et al., 1991). Mäuse mit Kollagenase Typ VII-induzierter Arthrose weisen hingegen in der frühen Phase der Erkrankung einen Verlust an subchondralem Knochen auf. Erst später treten die für die Progression der Arthrose typischen Symptome wie die Verdickung des subchondralen Knochens, die Bildung subchondraler Zysten und die Entwicklung von zusätzlichen Verknöcherungen (Osteophyten) auf (Botter et al., 2006; Botter et al., 2008; Botter et al., 2011). Die

sklerotischen Veränderungen bilden sich erst in einem späteren Krankheitsstadium der Arthrose aus (Bailey et al., 2004; Lavigne et al., 2005; Mansell and Bailey, 1998) und stellen Reparaturprozesse dar (Hayami et al., 2004).

Während der Progression der Arthrose geht der Knorpelverlust mit den Veränderungen am subchondralen Knochen einher. Demnach betrachtet man heute den Gelenkknorpel zusammen mit dem subchondralen Knochen als eine funktionelle Einheit (Goldring and Goldring, 2010; Lories and Luyten, 2011). In Arthrose-Tiermodellen und auch bei Arthrose-Patienten konnte eine gesteigerte Umsatzrate des subchondralen Knochens festgestellt werden. Die im Knochen freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren können somit den artikulären Knorpel besser bzw. schneller erreichen und die sogenannten Reparaturprozesse in Gang setzen, die letztendlich zu Arthrose führen (Kwan et al., 2010). Der drastische Anstieg des trabekulären Knochen volumens bei den STR/ort-Weibchen könnte demnach die Kommunikation zwischen dem subchondralen Knochen und dem artikulären Knorpel beeinträchtigen und die Signalübertragung für die Initiierung des Knorpelabbaus inhibieren. In Unterstützung dieser Annahme gibt es eine Studie an Mäusen mit chirurgisch induzierter Arthrose, bei denen die Zugabe von Osteoprotegerin (ein Inhibitor der Osteoklastogenese) nicht nur die Resorption des trabekulären Knochens, sondern auch den Knorpelabbau verhinderte (Kadri et al., 2008).

Seit mehr als 40 Jahren wird über einen inversen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der humanen Arthrose und der postmenopausalen Osteoporose bei Frauen diskutiert (Dequeker et al., 2003). In der Framingham-Studie wurde der Einfluss einer erhöhten Knochendichte auf die Inzidenz und Progression von Arthrose untersucht. Hierbei ergab sich, dass eine erhöhte Knochendichte das Risiko an Arthrose zu erkranken, steigern soll, doch die Progression des Knorpelschadens aufgrund einer erhöhten subchondralen Knochenmenge im Kniegelenk gemindert wird (Zhang et al., 2000). Eine andere Studie beschäftigte sich mit dem protektiven Einfluss von Alendronat auf den Knorpelverlust. Alendronat gehört zu den Bisphosphonaten und bewirkt eine Zunahme der Knochendichte, so dass es in der Therapie von Osteoporose-Patienten eingesetzt wird. Es konnte am Kaninchen-Modell für Arthrose gezeigt werden, dass die Behandlung mit Alendronat mit einer erhöhten BMP-2 (bone morphogenetic protein 2)-Produktion bei gleichzeitiger Hemmung der MMP-13-Synthese einhergeht (Zhang et al., 2011). Die Knochenresorption im subchondralen Kno-

chen wurde unterdrückt, während deutlich mehr trabekuläre Knochensubstanz gebildet wurde. Alendronat könnte also die fortschreitende Knorpeldegradation bei Arthrose hemmen, indem es die Resorption des subchondralen Knochens reduziert. Bei den STR/ort-Weibchen könnte demnach die verstärkte Produktion von trabekulärem Knochen die Arthrosepathogenese verlangsamen.

4.6 Die verringerte Gas6-Expression im STR/ort-Stamm könnte mit der Arthrose und der erhöhten Knochenmenge assoziiert sein

Die Ergebnisse der GeXP-Analyse zeigten eine signifikant reduzierte Expression des Arthrose-Kandidatengens *Gas6* in den *in vitro* generierten STR/ort-Chondrozyten und auch in den *in vitro* generierten STR/ort-Osteoblasten im Vergleich zum C57BL/6-Stamm. Wie bereits zuvor beschrieben, könnte eine reduzierte *Gas6*-Expression in den Chondrozyten zu einer verstärkten Reifung bzw. Alterung des artikulären Knorpels von STR/ort-Mäusen führen und somit die frühzeitige Entwicklung der Arthrose begünstigen.

Desweiteren konnte bereits nachgewiesen werden, dass das *Gas6*-Protein auch von Osteoblasten freigesetzt wird, die eine wichtige Rolle in der Osteoklastogenese einnehmen. Eine Studie zeigte, dass *Gas6* keinen direkten Einfluss auf die Differenzierung der Osteoklasten hat, jedoch die Resorptionsaktivität reifer Osteoklasten über den Rezeptor Tyrosinkinase 3 stimuliert. Eine *Gas6*-Überexpression bewirkte beispielsweise einen drastischen Knochenverlust in Östrogen defizienten Mäusen (Katagiri et al., 2001; Nakamura et al., 1998). Die histomorphometrischen Analysen unserer STR/ort-Mäuse konnten keine verringerte Osteoklastenzahl im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen aufzeigen. Jedoch fanden wir Anzeichen einer verringerten Osteoklastenaktivität aufgrund signifikant reduzierter TRAcP- und CTX-I-Level im Serum von drei Monate alten STR/ort- gegenüber C57BL/6-Mäusen. Die in den STR/ort-Osteoblasten nachgewiesene, reduzierte *Gas6*-Expression könnte die verringerten Aktivität der STR/ort-Osteoklasten erklären.

Desweiteren wurde in bovinen Chondrozyten der Wachstumsfuge eine differentielle *Gas6*-Aktivität nachgewiesen, die die Differenzierungsgeschwindigkeit der Chondrozyten in den einzelnen Phasen (Proliferation bis Hypertrophie) steuert (Hutchison et

al., 2010). Das Heranreifen hypertropher Chondrozyten in der Wachstumsfuge ist ein essentieller Schritt in der enchondralen Ossifikation. Hutchison et al. zeigten einen stimulierenden Effekt von Gas6 auf die späte Differenzierungsphase der Chondrozyten. Die Vermutung liegt nahe, dass die *Gas6*-Expression wie zuvor in den *in vitro* generierten STR/ort-Chondrozyten auch in der Wachstumsfuge von STR/ort-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen reduziert sein könnte. Möglicherweise beeinflusst die reduzierte *Gas6*-Expression hier jedoch nur frühe Differenzierungsprozesse. Denn wir konnten mittels histologischem Vergleich der Wachstumsfuge hinsichtlich einer vergrößerten hypertrophen Zone bei STR/ort- im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen keine Unterschiede feststellen (Daten nicht gezeigt).

4.7 Der fehlregulierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg könnte mit der Arthrose und der Hyperostose im STR/ort-Stamm assoziiert sein

Für die Wnt-Antagonisten *Dkk4* und *Sfrp1* konnte zuvor eine signifikant reduzierte Genexpression in den *in vitro* generierten STR/ort-Chondrozyten aufgezeigt werden. Somit könnte es zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und einer damit einhergehenden gesteigerten Akkumulation und Kernlokalisierung des für die Signalgebung verantwortlichen β -Catenins kommen. Dies wiederum würde eine frühzeitige chondrogene Differenzierung und Reifung der artikulären Chondrozyten einleiten und somit die Initiierung und Entwicklung der Arthrose begünstigen. Die Überexpression von β -Catenin konnte tatsächlich in Kniegelenken von Arthrose-Patienten nachgewiesen werden (Zhu et al., 2009) und bestätigt somit die Annahme eines Zusammenhangs zwischen verstärkter Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und der Ausbildung von Arthrose.

Weiterhin konnten wir eine signifikant verringerte Expression von *Dkk4* und *Sfrp1* in den von uns *in vitro* generierten STR/ort-Osteoblasten im Vergleich zu C57BL/6-Osteoblasten nachweisen. In einem Knockout-Mausmodell für *Dkk1* wurde gezeigt, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg verstärkt abläuft und zu einer erhöhten Sklerotisierung im Gelenk führt. Zusätzlich wurden aufgrund des Fehlens von *Dkk1* kaum noch Osteoklasten gebildet, so dass eine inhibierte Knochenresorption die verstärkte Sklerotisierung erklären könnte (Diarra et al., 2007).

Unsere GeXP-Analysen ergaben, dass die *Dkk4*-Expression in den C57BL/6-Osteoblasten gegenüber der in den mesenchymalen C57BL/6-Vorläuferzellen um das 10-fache erhöht war. Bei den STR/ort-Mäusen hingegen ist das *Dkk4*-Expressionslevel nur um das 4-fache angestiegen. Dieses Ergebnis könnte somit auf eine verringerte Resorptionsaktivität der STR/ort-Osteoklasten hinweisen, da hinsichtlich der Osteoklastenzahl *in vivo* keine Unterschiede zwischen dem STR/ort- und dem C57BL/6-Stamm gefunden wurden.

Es gibt desweiteren Studien, die den Einfluss einer defizienten *Sfrp1*-Expression auf die Regulierung des Knochenmetabolismus untersucht haben. So wurde bei *Sfrp1*-Knockout-Mäusen eine vermehrte Knochenbildung bzw. erhöhte Knochendichte aufgrund einer verringerten Osteoblasten- und Osteozyten-Apoptoserate festgestellt (Bodine et al., 2004). Die Überexpression von *Sfrp1* in humanen Osteoblasten führte dann erwartungsgemäß zu einer erhöhten Apoptoserate (Bodine et al., 2005). Unsere GeXP-Analysen zeigten, dass die *Sfrp1*-Expression in den C57BL/6-Osteoblasten gegenüber der in den mesenchymalen C57BL/6-Vorläuferzellen um das 3.7-fache anstieg. Bei den STR/ort-Mäusen hingegen nahm das *Sfrp1*-Expressionslevel nur um das 2.7-fache zu. Dieses Ergebnis deutet demzufolge auf eine verminderte Apoptoserate der Osteoblasten im STR/ort-Mausstamm und somit auf eine gesteigerte Syntheserate der Knochensubstanz hin. *In vivo* gelang es uns diese Annahme zu bestätigen, da wir bei drei Monate alten STR/ort-Mäusen eine erhöhte Anzahl an Osteoblasten sowie eine tendenzielle Zunahme der Knochenbildungsrate, also eine erhöhte Osteoblastenaktivität, feststellen konnten.

Interessanterweise konnten wir nicht nur in den STR/ort-Chondrozyten und -Osteoblasten eine verringerte *Sfrp1*-Expression aufzeigen, sondern bereits in den mesenchymalen STR/ort-Vorläuferzellen dieser beiden Zelltypen im Vergleich zum C57BL/6-Stamm. Wir stellten demnach die Hypothese auf, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg bereits in den STR/ort-MSCs stärker aktiviert ist als in den MSCs des C57BL/6-Stamms. In der Tat gelang es uns, eine erhöhte β -Catenin-Proteinexpression im Zytoplasma und auch im Nukleus von STR/ort-MSCs aufzuzeigen. Bisher wurde publiziert, dass die Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs *Dkk1* und *Sfrp1* die *in vitro*-Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten begünstigen. Die Stimulierung von chondrogenen Kulturen mit *Dkk1* und *Sfrp1*, also die Inaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, führte auf RNA- und

Proteinebene zu einer erhöhten Expression des Knorpel spezifischen Markers Kollagen Typ II, bei gleichzeitiger Abnahme des Knochen spezifischen Markers Kollagen Typ I (Im et al., 2011). Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist also entscheidend für die Regulierung der Knorpel- und Knochenentwicklung. Im Vergleich zu der Studie von Im et al. tritt bei unseren STR/ort-Mäusen der umgekehrte Fall ein. Bei den STR/ort-MSCs ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufgrund der verringerten Expression des Antagonisten Sfrp1 verstärkt aktiviert. Dies hat eine verstärkte Differenzierung von MSCs in Richtung der Osteoblasten bei gleichzeitiger Unterdrückung der Chondrogenese zur Folge (Day et al., 2005; Hill et al., 2005). Betrachtet man jedoch histologische Aufnahmen des artikulären Knorpels vom STR/ort-Stamm, scheint die embryonale Entwicklung normal abzulaufen, da sich die Morphologie und strukturelle Anordnung der STR/ort-Knorpelzellen nicht von der der C57BL/6-Knorpelzellen unterscheidet. Dennoch konnten wir im artikulären Knorpel von adulten STR/ort-Mäusen eine differentielle Sfrp1-Proteinexpression im Vergleich zum C57BL/6-Stamm aufzeigen. Demnach scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg beim STR/ort-Stamm während der Embryogenese normal abzulaufen und erst im adulten Tier fehlreguliert zu sein, was die spätere Reifung bzw. Alterung der STR/ort-Knorpelzellen begünstigen könnte.

Abschließend untersuchten wir noch die Expression des Sfrp1-Proteins in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge bei STR/ort-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen verschiedener Altersstufen, denn es ist bekannt, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in den verschiedenen Reifungsstadien von Chondrozyten der Wachstumsfuge involviert ist (Enomoto-Iwamoto et al., 2002). Hier zeichnete sich ein ähnlicher Verlauf der Sfrp1-Expression von zwei bis elf Wochen alten Mäusen beider Stämme ab. Anfangs nahm die Expression von zwei auf vier Wochen zu. Danach verringerte sich die Proteinmenge in beiden Stämmen und pendelte sich bei den acht bis elf Wochen alten Mäusen auf ein vergleichbares Niveau ein. Auffällig war jedoch, dass die Sfrp1-Expression in den zwei bis vier Wochen alten STR/ort-Mäusen tendenziell niedriger als beim C57BL/6-Stamm war und zum Zeitpunkt von sechs Wochen sogar ein signifikant geringeres Sfrp1-Expressionlevel im STR/ort-Stamm vorlag. Die Sfrp1-Expression ist also während der Wachstumsphase beim STR/ort im Vergleich zum C57BL/6-Mausstamm verringert und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg somit möglicherweise verstärkt aktiviert, was wiederum die enchondrale Ossifikation begünstigen würde. Die embryonale Entwicklung der Wachstumsfuge scheint bei den

STR/ort-Mäusen allerdings – wie zuvor auch für den artikulären Knorpel festgestellt wurde – völlig normal abzulaufen. Demnach kommt die Fehlregulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs möglicherweise erst während der Remodellierung des Knochens im adulten Tier zum Tragen und begünstigt hier die Osteoblastogenese und führt damit zu einer verstärkten Knochenproduktion.

Es gibt eine Reihe von Studien, die sich mit der Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Wachstumsfuge und während der enchondralen Ossifikation befassen und aufzeigen konnten, dass die kontrollierte Regulierung des Signalwegs in den einzelnen Reifungsstadien der Chondrozyten enorm wichtig ist. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in den heranreifenden Chondrozyten der hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge führte zu einer beschleunigten Hypertrophie sowie zu einer sich anschließenden vermehrten Matrixmineralisierung. Die Chondrozyten exprimierten außerdem vermehrt Metalloproteasen, die den Matrixabbau verstärkten (Tamamura et al., 2005). Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert also nicht nur den Chondrozytenphänotyp, sondern auch die Reifung und Funktionalität sowie die Organisation der Wachstumsfuge und den Beginn der enchondralen Ossifikation. An Hühnerembryonen, speziell an den Beinen (*in vivo*) und an heranreifenden *in vitro*-Chondrozytenkulturen, wurde der Einfluss einer verstärkten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf spätere Reifungsstadien der Chondrozyten untersucht. Die Aktivierung resultierte auch hier in der Stimulierung der hypertrophen Entwicklung (Enomoto-Iwamoto et al., 2002; Kitagaki et al., 2003). Die strikte Regulierung des Signalwegs ist entscheidend für eine normale Chondrogenese und Skelettentwicklung. Hierbei muss der Signalweg während der Differenzierung von kondensierten, mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und auch für die Bildung der Skelettanlagen und der Formierung der Wachstumsfuge durch Chondrozyten relativ inaktiv gehalten werden. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg muss hingegen in heranreifenden Chondrozyten aktiviert werden, um die hypertrophe Differenzierung und anschließende Mineralisierung einzuleiten (Akiyama et al., 2004; Guo et al., 2004).

Interessanterweise korreliert der Beginn der *Sfrp3*-Expression mit dem Beginn der Chondrogenese während der Embryonalentwicklung (Hoang et al., 1998; Wada et al., 1999), doch in den späteren Differenzierungsphasen in der hypertrophen Zone der Wachstumszone wird die Expression wieder herunterreguliert, so dass die Hemmung der Chondrogenese aufgehoben wird (Enomoto-Iwamoto et al., 2002). Daraus

lässt sich schlussfolgern, dass eine kontinuierliche Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs hinderlich für die normale Entwicklung funktionaler Chondrozyten in der Wachstumsfuge wäre sowie für die sich anschließende enchondrale Ossifikation. Unsere Hypothese ist, dass die verringerte Expression des Sfrp1 in den heranreifenden Chondrozyten der adulten STR/ort-Mäuse zu der verstärkten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt und die Reifung und Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge begünstigt. Dies könnte dann im adulten Tier zu der verstärkten Sklerotisierung bzw. erhöhten Knochenproduktion führen (Abb. 28).

Doch wie sieht es mit dem Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Entwicklung der artikulären Chondrozyten aus. Mittels Untersuchungen an *in vitro*-Kulturen von Chondrozyten aus der Wachstumsfuge von Hühnerembryonen wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Genexpression von Metalloproteasen und anderen Proteasen erhöht und den Abbau der Knorpelmatrix induziert (Yuasa et al., 2008). Auch für artikuläre Chondrozyten von Kaninchen und Meerschweinen konnten Yuasa et al. zeigen, dass durch die Aktivierung des Signalwegs das Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau der Knorpelmatrix in Richtung Abbau verschoben wird. Dies deutet darauf hin, dass der Signalweg direkt auf die artikulären Chondrozyten einwirkt und die katabolen Prozesse einleitet (Enomoto-Iwamoto et al., 2002). Die Vermutung liegt nahe, dass ein verstärkter Wnt/ β -Catenin-Signalweg mit degenerativen Gelenkerkrankungen, wie der Arthrose, assoziiert sein könnte. Yuasa et al. konnten dies anhand eines spontan Arthrose entwickelnden Meerschweinchen-Modells bestätigen, denn die Aktivierung des Signalwegs begleitete die altersabhängige Degradation des artikulären Knorpels. Die kontrollierte Regulierung des Signalwegs ist also auch für die Aufrechterhaltung der Homöostase der artikulären Knorpelmatrix essentiell.

In den artikulären Chondrozyten des STR/ort-Stamms fanden wir eine differentielle Expression des Sfrp1-Proteins und vermuteten deshalb einen fehlregulierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der die beschleunigte Reifung der Chondrozyten und somit den verfrühten Knorpelabbau bewirken könnte. Der artikuläre Knorpel unterscheidet sich von dem Knorpel der Wachstumsfuge dahingehend, dass er permanent und nicht transient ist. Die artikulären Chondrozyten verbleiben in dem Reifungsstadium vor der Hypertrophie, während die Chondrozyten der Wachstumsfuge hypertroph werden und anschließend in Apoptose gehen.

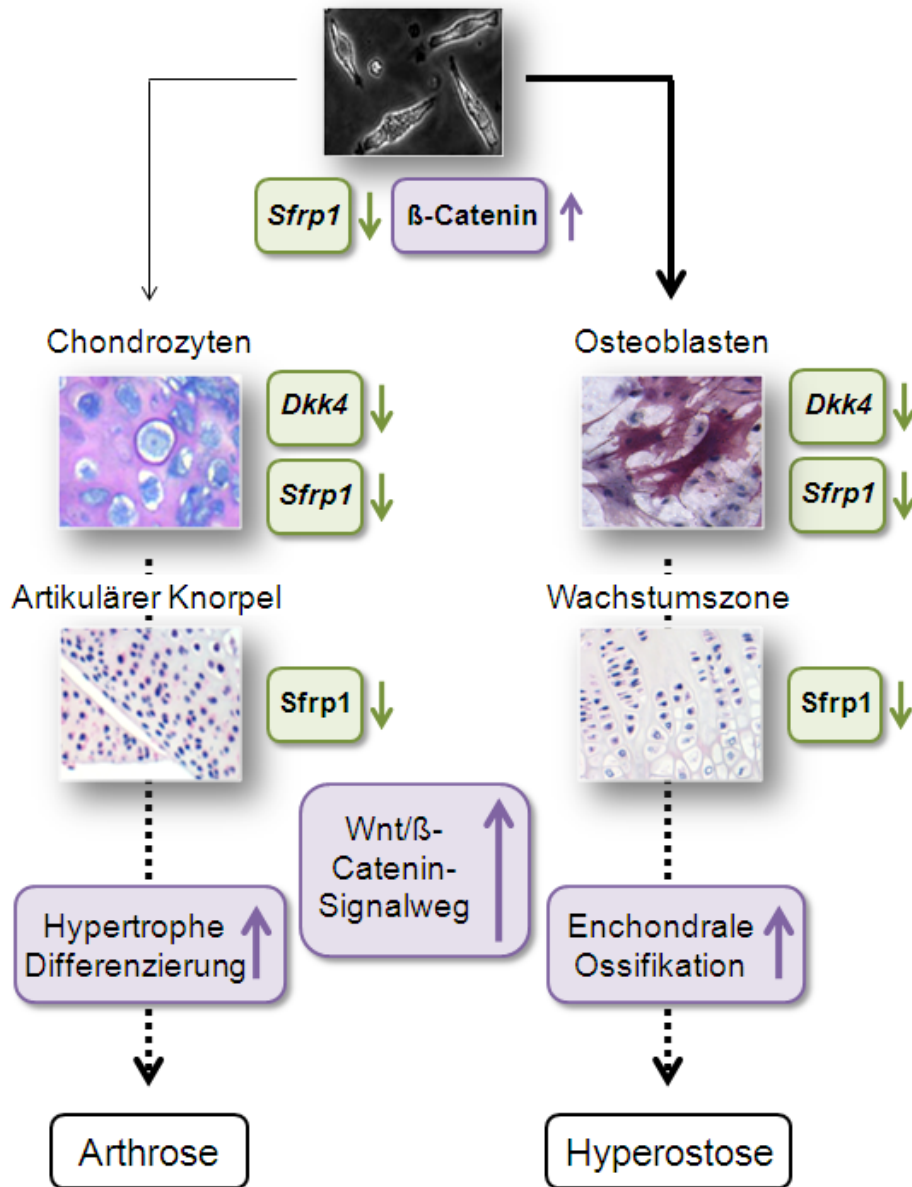


Abb. 28: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg ist beim STR/ort-Mausstamm im Knorpel und Knochen verstärkt aktiviert und trägt so zur Entstehung der Arthrose und der Hyperostose bei. Die Expression des *Sfrp1*-Gens ist in den *in vitro* generierten MSCs, Chondrozyten und Osteoblasten des STR/ort-Stamms im Vergleich zum C57BL/6-Stamm reduziert. Außerdem ist beim STR/ort-Stamm das Sfrp1-Protein im artikulären Knorpel differentiell und in den Chondrozyten der Wachstumsfuge verringert exprimiert. In den *in vitro* generierten Chondrozyten und Osteoblasten ist zusätzlich auch der Wnt-Antagonist *Dkk4* verringert exprimiert. Dies spricht für eine verstärkte Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs. Die erhöhte Proteinmenge an β-Catenin im Zytoplasma und im Nucleus der STR/ort-MSCs unterstützt diese Annahme. Die Dysregulierung bzw. erhöhte Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweg könnte somit die hypertrophe Differenzierung bzw. die enchondrale Ossifikation begünstigen, woraus eine verstärkte Reifung und Apoptose der Chondrozyten sowie eine gesteigerte Knochenbildung resultieren würde. Violetter Pfeil = verstärkte Expression; Grüner Pfeil = verringerte Expression.

In der Wachstumsfuge sind generell mehr Wnt-Gene aktiv, während im artikulären Knorpel die Antagonisten, wie *Sfrp3* und *Dkk1*, verstärkt exprimiert werden (Wang et al., 2007). Die differentielle bzw. verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Gelenkknorpel der STR/ort-Mäuse könnte somit die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten begünstigen. Daraus würde ein verstärkter Knorpelverlust resultieren, weil die Chondrozyten frühzeitig altern und schneller in Apoptose gehen (Abb. 28).

4.8 Zusammenfassende Schlussbetrachtung der Ergebnisse

Im Folgenden sollen die im Rahmen meiner Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der anfangs gestellten Fragestellungen zusammengefasst werden.

Weisen die Kandidatengene strukturelle und/oder regulatorische Polymorphismen auf, die mit der Arthrose des STR/ort-Stamms assoziiert sein könnten?

Die Sequenzanalysen der Arthrose-Kandidatengene *Gas6* und *Dkk4* konnten keine Polymorphismen beim STR/ort-Stamm aufzeigen. Für das *Fgfr1*-Gen konnten wir einen Intron-SNP, der einen Effekt auf das Splicen der mRNA und damit auf das Proteinprodukt haben könnte, identifizieren. Als besonders interessant stellte sich das *Sfrp1*-Gen heraus. Hier konnten eine Reihe potentiell regulatorischer Polymorphismen aufgezeigt werden. Ein SNP wurde innerhalb der "Leader"-Sequenz identifiziert und bewirkt beim STR/ort-Stamm einen Aminosäureaustausch im resultierenden Signalpeptid, wodurch die Sekretion des Proteins beeinflusst sein könnte. Der SNP im Promotor sowie die 21 SNPs in der UTR könnten die Transkription bzw. die Stabilität des Transkripts beeinflussen und somit eine differentielle Expression des *Sfrp1*-Gens bewirken.

Sind die Kandidatengene während der chondrogenen Differenzierung differentiell exprimiert und tragen möglicherweise mehrere Gendefekte zur Entstehung der Arthrose im STR/ort-Stamm bei?

Die Genexpression von *Gas6*, *Dkk4* und *Sfrp1* zeigte sich in den *in vitro* generierten Chondrozyten der STR/ort- im Vergleich zur C57BL/6-Maus signifikant reduziert,

während die *Fgfr1*-Genexpression signifikant erhöht war. Auf Proteinebene fanden wir in den artikulären Chondrozyten der STR/ort Maus eine altersabhängige und in den Chondrozyten der Wachstumsfuge eine verringerte *Sfrp1*-Expression. Alle hier untersuchten Arthrose-Kandidatengene sind also tatsächlich differentiell exprimiert und könnten somit mit der Arthrosepathogenese des STR/ort-Stamms assoziiert sein.

Treten Veränderungen am trabekulären und kortikalen Knochen auf? Welche Skelettknochen und welche Knochenbildungsprozesse (desmale und/oder enchondrale Ossifikation) sind betroffen?

Der Hyperostosephänotyp des STR/ort-Stamms ist durch die Überproduktion von kortikalem und auch trabekulärem Knochen in den Wirbelkörpern und Röhrenknochen charakterisiert. Die Schädelknochen weisen hingegen keine erhöhte Knochendichte auf. Demnach scheint der Knochendefekt in der enchondralen, nicht jedoch in der desmalen Ossifikation vorzuliegen.

Bei welcher Altersstufe tritt die erhöhte Knochenmenge erstmalig auf und wie verändert sich das Knochenvolumen mit zunehmendem Alter? Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede?

Das kortikale Knochenvolumen ist bereits bei einem Monat alten STR/ort-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen gleichen Alters signifikant erhöht und nimmt bei den STR/ort-Mäusen mit zunehmendem Alter weiter stark zu. Dadurch kommt es zu einer fast vollständigen Verdrängung des femoralen Knochenmarks. Demzufolge wird die Hämatopoese extramedullär verlagert und bewirkt eine auffällige Hepatosplenomegalie. Die STR/ort-Weibchen weisen zusätzlich signifikant mehr kortikale Knochenmenge im Vergleich zu den STR/ort-Männchen auf.

Bei den trabekulären Knochen zeichnen sich erst nach zwei Monaten Unterschiede im Knochenvolumen ab. Allerdings sind die geschlechtsspezifischen Differenzen innerhalb des STR/ort-Stamms hier noch deutlicher ausgeprägt. Bei den STR/ort-Männchen wird mit zunehmendem Alter stetig Knochensubstanz reduziert. Demnach folgen sie dem gleichen Entwicklungstrend wie die C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter. Bei den STR/ort-Weibchen wird im Gegensatz dazu altersabhängig zunehmend mehr trabekulärer Knochen produziert. Möglicherweise könnten die STR/ort-Weibchen im Vergleich zu den -Männchen dadurch weniger anfällig für die Entwicklung von Arthrose sein.

Liegt ein Defekt in den Osteoblasten und/oder Osteoklasten vor? Handelt es sich beim STR/ort-Stamm um ein neues Hyperostose-Modell?

Einerseits wurde *in vivo* eine signifikant erhöhte Osteoblastenzahl und eine damit korrelierende, gesteigerte Knochenbildungsrate aufgezeigt. Andererseits wurde eine reduzierte TRAcP-Produktion und ein verringerter Kollagen Typ I-Abbau als Anzeichen für eine defekte Osteoklastenaktivität nachgewiesen. Demnach sind sowohl ein Osteoblasten- als auch ein Osteoklastendefekt für die Hyperostose des STR/ort-Stamms verantwortlich und damit kann eine monogene Ursache für diesen Phänotyp ziemlich sicher ausgeschlossen werden. Desweiteren gibt es nach meinem Kenntnisstand bisher noch kein beschriebenes Hyperostose-Mausmodell, das vollständig mit dem Knochenphänotyp der STR/ort Maus übereinstimmt.

Könnte die Entwicklung der beiden Erkrankungen (Arthrose und Hyperostose) im STR/ort-Stamm über eine Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Zusammenhang stehen?

Für den Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs *Sfrp1* konnten wir sowohl bei den mesenchymalen Vorläuferzellen (MSCs) als auch bei den *in vitro* generierten Chondrozyten und Osteoblasten des STR/ort Stamms eine verringerte Transkription im Vergleich zum C57BL/6-Stamm aufzeigen. In den MSCs der STR/ort Maus haben wir zusätzlich auf Proteinebene belegt, dass die Abnahme an *Sfrp1* mit einer erhöhten Expression von β -Catenin - dem Effektorprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs – sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus einhergeht. Folglich ist in den STR/ort Mäusen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg verstärkt aktiviert. Dies könnte im artikulären Knorpel zu einer Steigerung kataboler Prozesse und damit zum frühzeitigen und für eine Arthrose typischen Knorpelverlust führen. Andererseits unterstützt der verstärkt ablaufende Wnt-Signalweg die enchondrale Ossifikation und bewirkt eine verminderte Apoptoserate der Osteoblasten, so dass ein vermehrter Knochenzuwachs resultiert.

Die Entwicklung beider Erkrankungen – der Arthrose und der Hyperostose - im STR/ort-Stamm steht also möglicherweise über eine Dysregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Zusammenhang.

Literaturverzeichnis

- Aigner, T. and McKenna, L.** (2002). Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 5-18.
- Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P. M. and McKenna, L.** (2001). Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum.* 44, 2777-2789.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R. et al.** (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18, 1072-1087.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T. D., Greenwald, R., Hochberg, M. et al.** (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 29, 1039-1049.
- Ameye, L. G. and Young, M. F.** (2006). Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". *Curr. Opin. Rheumatol.* 18, 537-547.
- Anderson-MacKenzie, J. M., Quasnicka, H. L., Starr, R. L., Lewis, E. J., Billingham, M. E. and Bailey, A. J.** (2005). Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 224-236.
- Bailey, A. J., Mansell, J. P., Sims, T. J. and Banse, X.** (2004). Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology* 41, 349-358.
- Baker-Lepain, J. C. and Lane, N. E.** (2012). Role of bone architecture and anatomy in osteoarthritis. *Bone.*
- Baron, R. and Rawadi, G.** (2007). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 148, 2635-2643.
- Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B.** (2007). TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage.* 15, 597-604.
- Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Sexton, P. M., Rochet, N. and Carle, G. F.** (2004). Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* 18, 1505-1511.
- Blom, A. B., Brockbank, S. M., van Lent, P. L., van Beuningen, H. M., Geurts, J., Takahashi, N., van der Kraan, P. M., van de Loo, F. A., Schreurs, B. W.,**

- Clements, K. et al.** (2009). Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum.* 60, 501-512.
- Bodine, P. V., Billiard, J., Moran, R. A., Ponce-de-Leon, H., McLarney, S., Mangine, A., Scrimo, M. J., Bhat, R. A., Stauffer, B., Green, J. et al.** (2005). The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J. Cell Biochem.* 96, 1212-1230.
- Bodine, P. V., Zhao, W., Kharode, Y. P., Bex, F. J., Lambert, A. J., Goad, M. B., Gaur, T., Stein, G. S., Lian, J. B. and Komm, B. S.** (2004). The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol. Endocrinol.* 18, 1222-1237.
- Botter, S. M., van Osch, G. J., Clockaerts, S., Waarsing, J. H., Weinans, H. and van Leeuwen, J. P.** (2011). Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: an in vivo microfocal computed tomography study. *Arthritis Rheum.* 63, 2690-2699.
- Botter, S. M., van Osch, G. J., Waarsing, J. H., Day, J. S., Verhaar, J. A., Pols, H. A., van Leeuwen, J. P. and Weinans, H.** (2006). Quantification of subchondral bone changes in a murine osteoarthritis model using micro-CT. *Biorheology* 43, 379-388.
- Botter, S. M., van Osch, G. J., Waarsing, J. H., van der Linden, J. C., Verhaar, J. A., Pols, H. A., van Leeuwen, J. P. and Weinans, H.** (2008). Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage.* 16, 506-514.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L.** (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Buckland-Wright, C.** (2004). Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis. Cartilage.* 12 Suppl A, S10-S19.
- Burdan, F., Szumilo, J., Korobowicz, A., Farooquee, R., Patel, S., Patel, A., Dave, A., Szumilo, M., Solecki, M., Klepacz, R. et al.** (2009). Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47, 5-16.
- Burr, D. B.** (2004). Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis. Cartilage.* 12 Suppl A, S20-S30.
- Cadigan, K. M. and Nusse, R.** (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305.
- Cancedda, R., Descalzi, C. F. and Castagnola, P.** (1995). Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 159, 265-358.

- Chambers, M.G., Suri N., Cover P., Buckingham J., Visco D., Mason R.M.** (1999). Aggrecan degradation and osteoarthritis in STR/ort mice occur independently of sex and sex hormone status. 45th Annual Meeting, Orthopedic Society. Anaheim, CA, 447.
- Creamer, P. and Hochberg, M. C.** (1997). Osteoarthritis. *Lancet* 350, 503-508.
- Dabovic, B., Levasseur, R., Zambuto, L., Chen, Y., Karsenty, G. and Rifkin, D. B.** (2005). Osteopetrosis-like phenotype in latent TGF-beta binding protein 3 deficient mice. *Bone* 37, 25-31.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y.** (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739-750.
- de Vernejoul, M. C. and Kornak, U.** (2010). Heritable sclerosing bone disorders: presentation and new molecular mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 269-277.
- Dequeker, J., Aerssens, J. and Luyten, F. P.** (2003). Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin. Exp. Res.* 15, 426-439.
- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M. S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C. et al.** (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 13, 156-163.
- Dreier, R.** (2010). Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res. Ther.* 12, 216.
- Enomoto-Iwamoto, M., Kitagaki, J., Koyama, E., Tamamura, Y., Wu, C., Kanatani, N., Koike, T., Okada, H., Komori, T., Yoneda, T. et al.** (2002). The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev. Biol.* 251, 142-156.
- Faber, K., Glatting, K. H., Mueller, P. J., Risch, A. and Hotz-Wagenblatt, A.** (2011). Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASsites. *BMC. Bioinformatics.* 12 Suppl 4, S2.
- Fazzalari, N. L. and Parkinson, I. H.** (1997). Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J. Bone Miner. Res.* 12, 632-640.
- Felson, D. T. and Neogi, T.** (2004). Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum.* 50, 341-344.
- Felson, D. T. and Nevitt, M. C.** (1998). The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10, 269-272.

- Filvaroff, E., Erlebacher, A., Ye, J., Gitelman, S. E., Lotz, J., Heilman, M. and Derynck, R.** (1999). Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 126, 4267-4279.
- Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A. and Desnick, R. J.** (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-1238.
- Gelse, K., Ekici, A. B., Cipa, F., Swoboda, B., Carl, H. D., Olk, A., Hennig, F. F. and Klinger, P.** (2012). Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage--clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis. Cartilage*. 20, 162-171.
- Goldring, M. B. and Goldring, S. R.** (2007). Osteoarthritis. *J. Cell Physiol* 213, 626-634.
- Goldring, M. B. and Goldring, S. R.** (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 230-237.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. and Ijiri, K.** (2006). The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* 97, 33-44.
- Grynpas, M. D., Alpert, B., Katz, I., Lieberman, I. and Pritzker, K. P.** (1991). Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif. Tissue Int.* 49, 20-26.
- Guo, X., Day, T. F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L. and Yang, Y.** (2004). Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18, 2404-2417.
- Haq, I., Murphy, E. and Dacre, J.** (2003). Osteoarthritis. *Postgrad. Med. J.* 79, 377-383.
- Hashimoto, S., Ochs, R. L., Komiya, S. and Lotz, M.** (1998a). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1632-1638.
- Hashimoto, S., Ochs, R. L., Komiya, S. and Lotz, M.** (1998b). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1632-1638.
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G. A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., Rodan, G. A. and Duong, I. T.** (2004). The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum.* 50, 1193-1206.
- Hellingman, C. A., Koevoet, W., Kops, N., Farrell, E., Jahr, H., Liu, W., Baatenburg de Jong, R. J., Frenz, D. A. and van Osch, G. J.** (2010). Fibroblast growth factor receptors in in vitro and in vivo chondrogenesis:

- relating tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development. *Tissue Eng Part A* 16, 545-556.
- Hill, C. L., Gale, D. G., Chaisson, C. E., Skinner, K., Kazis, L., Gale, M. E. and Felson, D. T.** (2001). Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 28, 1330-1337.
- Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C.** (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* 8, 727-738.
- Hoang, B. H., Thomas, J. T., Abdul-Karim, F. W., Correia, K. M., Conlon, R. A., Luyten, F. P. and Ballock, R. T.** (1998). Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev. Dyn.* 212, 364-372.
- Honsawek, S., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Ngarmukos, S., Saetan, N. and Tantavisut, S.** (2010). Dickkopf-1 (Dkk-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients. *BMC. Musculoskelet. Disord.* 11, 257.
- Hunter, D. J. and Spector, T. D.** (2003). The role of bone metabolism in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 5, 15-19.
- Hutchison, M. R., Bassett, M. H. and White, P. C.** (2010). SCF, BDNF, and Gas6 are regulators of growth plate chondrocyte proliferation and differentiation. *Mol. Endocrinol.* 24, 193-203.
- Im, G. I., Lee, J. M. and Kim, H. J.** (2011). Wnt inhibitors enhance chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in a long-term pellet culture. *Biotechnol. Lett.* 33, 1061-1068.
- Jaeger, K., Selent, C., Jaehme, W., Mahr, S., Goebel, U., Ibrahim, S., Vollmar, B. and Mueller-Hilke, B.** (2008). The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice. *Osteoarthritis. Cartilage.* 16, 607-614.
- Janssens, K., Gershoni-Baruch, R., Guanabens, N., Migone, N., Ralston, S., Bonduelle, M., Lissens, W., Van, M. L., Vanhoenacker, F., Verbruggen, L. et al.** (2000). Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet.* 26, 273-275.
- Josephsen, K., Praetorius, J., Frische, S., Gawenis, L. R., Kwon, T. H., Agre, P., Nielsen, S. and Fejerskov, O.** (2009). Targeted disruption of the *Cl-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 1638-1641.
- Kadri, A., Ea, H. K., Bazille, C., Hannouche, D., Liote, F. and Cohen-Solal, M. E.** (2008). Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 2379-2386.
- Katagiri, M., Hakeda, Y., Chikazu, D., Ogasawara, T., Takato, T., Kumegawa, M., Nakamura, K. and Kawaguchi, H.** (2001). Mechanism of stimulation of

- osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 276, 7376-7382.
- Kawano, Y. and Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 116, 2627-2634.
- Kitagaki, J., Iwamoto, M., Liu, J. G., Tamamura, Y., Pacifici, M. and Enomoto-Iwamoto, M.** (2003). Activation of beta-catenin-LEF/TCF signal pathway in chondrocytes stimulates ectopic endochondral ossification. *Osteoarthritis Cartilage.* 11, 36-43.
- Kornak, U. and Mundlos, S.** (2003). Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 447-474.
- Krishnan, V., Bryant, H. U. and Macdougald, O. A.** (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest* 116, 1202-1209.
- Kronenberg, H. M.** (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336.
- Kwan, T. S., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P. and Martel-Pelletier, J.** (2010). Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 24, 51-70.
- Lane, N. E., Lian, K., Nevitt, M. C., Zmuda, J. M., Lui, L., Li, J., Wang, J., Fontecha, M., Umblas, N., Rosenbach, M. et al.** (2006). Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 1246-1254.
- Lark, M. W., Bayne, E. K., Flanagan, J., Harper, C. F., Hoerner, L. A., Hutchinson, N. I., Singer, I. I., Donatelli, S. A., Weidner, J. R., Williams, H. R. et al.** (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.
- Lavigne, P., Benderdour, M., Lajeunesse, D., Reboul, P., Shi, Q., Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J. and Fernandes, J. C.** (2005). Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 13, 310-317.
- Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S. P., Swain, P. M., Zhao, S. C., Eustace, B. et al.** (2002a). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 11-19.
- Little, R. D., Recker, R. R. and Johnson, M. L.** (2002b). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* 347, 943-944.
- Lodewyckx, L., Cailotto, F., Thyssen, S., Luyten, F. P. and Lories, R. J.** (2012). Tight regulation of wingless-type signaling in the articular cartilage - subchondral bone biomechanical unit: transcriptomics in Frzb-knockout mice. *Arthritis Res. Ther.* 14, R16.

- Logar, D. B., Komadina, R., Prezelj, J., Ostanek, B., Trost, Z. and Marc, J.** (2007). Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab* 25, 219-225.
- Lories, R. J. and Luyten, F. P.** (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 7, 43-49.
- Loughlin, J.** (2005). The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert. Rev. Mol. Med.* 7, 1-12.
- Loughlin, J., Dowling, B., Chapman, K., Marcelline, L., Mustafa, Z., Southam, L., Ferreira, A., Ciesielski, C., Carson, D. A. and Corr, M.** (2004). Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9757-9762.
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L. and Mirams, M.** (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J. Endocrinol.* 211, 109-121.
- Mahr, S., Menard, J., Krenn, V. and Muller, B.** (2003). Sexual dimorphism in the osteoarthritis of STR/ort mice may be linked to articular cytokines. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1234-1237.
- Mansell, J. P. and Bailey, A. J.** (1998). Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J. Clin. Invest* 101, 1596-1603.
- Margolis, D. S., Szivek, J. A., Lai, L. W. and Lien, Y. H.** (2008). Phenotypic characteristics of bone in carbonic anhydrase II-deficient mice. *Calcif. Tissue Int.* 82, 66-76.
- Min, J. L., Meulenbelt, I., Riyazi, N., Kloppenburg, M., Houwing-Duistermaat, J. J., Seymour, A. B., Pols, H. A., van Duijn, C. M. and Slagboom, P. E.** (2005). Association of the Frizzled-related protein gene with symptomatic osteoarthritis at multiple sites. *Arthritis Rheum.* 52, 1077-1080.
- Moskowitz, R. W., Pun, Y. and Haqqi, T. M.** (1992). Genetics and osteoarthritis. *Bull. Rheum. Dis.* 41, 4-6.
- Motomura, H., Niimi, H., Sugimori, K., Ohtsuka, T., Kimura, T. and Kitajima, I.** (2007). Gas6, a new regulator of chondrogenic differentiation from mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 997-1003.
- Nakamura, Y. S., Hakeda, Y., Takakura, N., Kameda, T., Hamaguchi, I., Miyamoto, T., Kakudo, S., Nakano, T., Kumegawa, M. and Suda, T.** (1998). Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells* 16, 229-238.
- Narcisi, R., Quarto, R., Ulivi, V., Muraglia, A., Molfetta, L. and Giannoni, P.** (2011). TGF beta-1 administration during ex-vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy. *J. Cell Physiol.*

- Niziolek, P. J., Farmer, T. L., Cui, Y., Turner, C. H., Warman, M. L. and Robling, A. G.** (2011). High-bone-mass-producing mutations in the Wnt signaling pathway result in distinct skeletal phenotypes. *Bone* 49, 1010-1019.
- Nuki, G.** (1999). Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Z. Rheumatol.* 58, 142-147.
- Oh, H., Chun, C. H. and Chun, J. S.** (2012). Dickkopf-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum.*
- Okazaki, K. and Sandell, L. J.** (2004). Extracellular matrix gene regulation. *Clin. Orthop. Relat Res.*, S123-S128.
- Oliveria, S. A., Felson, D. T., Reed, J. I., Cirillo, P. A. and Walker, A. M.** (1995). Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 38, 1134-1141.
- Pata, M., Heraud, C. and Vacher, J.** (2008). OSTM1 bone defect reveals an intercellular hematopoietic crosstalk. *J. Biol. Chem.* 283, 30522-30530.
- Pasold J.** (2008), Feinkartierung eines Arthrose assoziierten Genlocus bei der STR/ort-Maus. Diplomarbeit
- Richman, J. M. and Crosby, Z.** (1990). Differential growth of facial primordia in chick embryos: responses of facial mesenchyme to basic fibroblast growth factor (bFGF) and serum in micromass culture. *Development* 109, 341-348.
- Richmond, R. S., Carlson, C. S., Register, T. C., Shanker, G. and Loeser, R. F.** (2000). Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum.* 43, 2081-2090.
- Saftig, P., Hunziker, E., Everts, V., Jones, S., Boyde, A., Wehmeyer, O., Suter, A. and von, F. K.** (2000). Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 293-303.
- Sandell, L. J. and Aigner, T.** (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3, 107-113.
- Sarukawa, J., Takahashi, M., Doi, M., Suzuki, D. and Nagano, A.** (2010). A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 463-471.
- Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E. H., LaBorde, J., Sheehan, D. M., Derynck, R. and Moses, H. L.** (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.* 139, 541-552.
- Silberberg, M. and Silberberg, R.** (1963). Modifying action of estrogen on the evolution of osteoarthrosis in mice of different ages. *Endocrinology* 72, 449-451.

- Sniekers, Y. H., Weinans, H., van Osch, G. J. and van Leeuwen, J. P.** (2010). Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R182.
- Sokoloff, L.** (1956). Some aspects of the pathology of collagen diseases. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 32, 760-767.
- Sokoloff, L. and Barile, M. F.** (1962). Obstructive genitourinary disease in male STR/IN mice. *Am. J. Pathol.* 41, 233-246.
- Sokoloff, L., Crittenden, L. B., Yamamoto, R. S. and Jay, G. E., Jr.** (1962). The genetics of degenerative joint disease in mice. *Arthritis Rheum.* 5, 531-546.
- Sowers, M.** (2001). Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 447-451.
- Stok, K. S., Pelled, G., Zilberman, Y., Kallai, I., Goldhahn, J., Gazit, D. and Muller, R.** (2009). Revealing the interplay of bone and cartilage in osteoarthritis through multimodal imaging of murine joints. *Bone* 45, 414-422.
- Taipaleenmaki, H., Suomi, S., Hentunen, T., Laitala-Leinonen, T. and Saamanen, A. M.** (2008). Impact of stromal cell composition on BMP-induced chondrogenic differentiation of mouse bone marrow derived mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* 314, 2400-2410.
- Tallheden, T., Bengtsson, C., Brantsing, C., Sjogren-Jansson, E., Carlsson, L., Peterson, L., Brittberg, M. and Lindahl, A.** (2005). Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res. Ther.* 7, R560-R568.
- Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., Kitagaki, J., Komori, T., Yamada, Y., Costantini, F., Wakisaka, S., Pacifici, M. et al.** (2005). Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 280, 19185-19195.
- Teti, A., Migliaccio, S., Taranta, A., Bernardini, S., De, R. G., Luciani, M., Iacobini, M., De, F. L., Boldrini, R., Bosman, C. et al.** (1999). Mechanisms of osteoclast dysfunction in human osteopetrosis: abnormal osteoclastogenesis and lack of osteoclast-specific adhesion structures. *J. Bone Miner. Res.* 14, 2107-2117.
- Tsai, C. L. and Liu, T. K.** (1993). Estradiol-induced knee osteoarthrosis in ovariectomized rabbits. *Clin. Orthop. Relat Res.*, 295-302.
- Uchida, K., Urabe, K., Naruse, K., Kozai, Y., Onuma, K., Mikuni-Takagaki, Y., Kashima, I., Ueno, M., Sakai, R., Itoman, M. et al.** (2012). Differential age-related bone architecture changes between female and male STR/Ort mice. *Exp. Anim* 61, 59-66.
- Valdes, A. M., Loughlin, J., Oene, M. V., Chapman, K., Surdulescu, G. L., Doherty, M. and Spector, T. D.** (2007). Sex and ethnic differences in the

- association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 56, 137-146.
- Vanhoenacker, F. M., De Beuckeleer, L. H., Van, H. W., Balemans, W., Tan, G. J., Hill, S. C. and De Schepper, A. M.** (2000). Sclerosing bone dysplasias: genetic and radioclinical features. *Eur. Radiol.* 10, 1423-1433.
- Wada, N., Kawakami, Y., Ladher, R., Francis-West, P. H. and Nohno, T.** (1999). Involvement of Frzb-1 in mesenchymal condensation and cartilage differentiation in the chick limb bud. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 495-500.
- Walton, M.** (1977). Degenerative joint disease in the mouse knee; histological observations. *J. Pathol.* 123, 109-122.
- Walton, M.H.** (1975). Studies of degenerative joint disease in an inbred strain of mouse. *PhD Thesis, University of London.*
- Wang, L., Shao, Y. Y. and Ballock, R. T.** (2007). Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1988-1995.
- Wang, X., Manner, P. A., Horner, A., Shum, L., Tuan, R. S. and Nuckolls, G. H.** (2004). Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis. Cartilage.* 12, 963-973.
- Watters, J. W., Cheng, C., Pickarski, M., Wesolowski, G. A., Zhuo, Y., Hayami, T., Wang, W., Szumiloski, J., Phillips, R. L. and Duong, I. T.** (2007). Inverse relationship between matrix remodeling and lipid metabolism during osteoarthritis progression in the STR/Ort mouse. *Arthritis Rheum.* 56, 2999-3009.
- Weinans, H., Siebelt, M., Agricola, R., Botter, S. M., Piscoer, T. M. and Waarsing, J. H.** (2012). Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone.*
- Weitzmann, M. N. and Pacifici, R.** (2006). Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J. Clin. Invest* 116, 1186-1194.
- Westacott, C.** (2002). Interactions between subchondral bone and cartilage in OA. Cells from osteoarthritic bone can alter cartilage metabolism. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 2, 507-509.
- Willert, K. and Nusse, R.** (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95-102.
- Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S. and Stricker, S.** (2009). Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr. Patterns.* 9, 215-223.

- Wluka, A. E., Davis, S. R., Bailey, M., Stuckey, S. L. and Cicuttini, F. M.** (2001). Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 332-336.
- Wodarz, A. and Nusse, R.** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88.
- Wu, Q., Zhu, M., Rosier, R. N., Zuscik, M. J., O'Keefe, R. J. and Chen, D.** (2010). Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 344-350.
- Yan, D., Chen, D., Cool, S. M., van Wijnen, A. J., Mikecz, K., Murphy, G. and 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.
- Yoon, B. S. and Lyons, K. M.** (2004). Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* 93, 93-103.
- Yuasa, T., Otani, T., Koike, T., Iwamoto, M. and Enomoto-Iwamoto, M.** (2008). Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest* 88, 264-274.
- Zaidi, M.** (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med.* 13, 791-801.
- Zhang, L., Hu, H., Tian, F., Song, H. and Zhang, Y.** (2011). Enhancement of subchondral bone quality by alendronate administration for the reduction of cartilage degeneration in the early phase of experimental osteoarthritis. *Clin. Exp. Med.* 11, 235-243.
- Zhang, Y., Hannan, M. T., Chaisson, C. E., McAlindon, T. E., Evans, S. R., Aliabadi, P., Levy, D. and Felson, D. T.** (2000). Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women: the Framingham Study. *J. Rheumatol.* 27, 1032-1037.
- Zhu, M., Tang, D., Wu, Q., Hao, S., Chen, M., Xie, C., Rosier, R. N., O'Keefe, R. J., Zuscik, M. and Chen, D.** (2009). Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J. Bone Miner. Res.* 24, 12-21.

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Es wurden keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Rostock, Mai 2012

Juliane Pasold

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich beim Anfertigen meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke bedanken, die mir bei aufkommenden Fragen und Problemen immer schnell mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Tipps und kritischen Anmerkungen.

Special thanks go to Hanna Taipaleenmäki and Anna-Marja Säämänen who gave me the opportunity to visit them in their lab in Turku (Finland). I learned a lot about growing chondrogenic pellet cultures and I also enjoyed our picnic and our afternoon trips to beautiful places around Turku.

Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. med Michael Amling, Dr. med Johannes Keller und Thorsten Schinke vom Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf am Institut für Osteologie und Biomechanik für die erfolgreiche Zusammenarbeit und besonders für die schnelle Durchführung der Histomorphometrie-Analysen und biomechanischen Tests bedanken.

Ein lieber Dank geht an meine gesamte Arbeitsgruppe, besonders an Dr. Robby Engelmann, der die ersten Rohfassungen meiner Arbeit lesen durfte. Vielen Dank für die kritischen Anmerkungen und die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Ich danke Herrn Kreutzer für die Hilfe bei kleinen und großen Computerproblemen und Dr. Michael Hecker für die Hilfestellungen bei Fragen zur statistischen Auswertung. Ich danke Dorothea Frenz für die Einführung in die bunte Welt der Immunhistologie, Eva Lorbeer-Rehfeld für ihr Know-how bei Zellkultur- und Western Blot-Fragen, Marlies Dettmer für die tatkräftige Unterstützung beim Sequenzieren und Stefanie Adam für die Beantwortung der Fragen rund um die Osteoblastenkulturen. Herrn Dr. Lorenz und Herrn Dr. Koczan möchte ich für die Beantwortung von Fragen zu Protein- und RNA-Analysen danken. Björn Ziems danke ich sehr für die Zeit und Mühe, mich in die Kunst der automatisierten, quantitativen Auswertung von Proteinfärbungen einzuweihen. Herrn Dr. Phillip Herlyn danke ich für die aufschlussreichen Gespräche die fabelhafte Welt der μ CT-Analyse betreffend.

Herrn Prof. Dr. Dieter Weiss möchte ich sehr für die Begutachtung meiner Arbeit danken. Ich habe Ihre unterhaltsamen Vorlesungen während meines Studiums immer sehr genossen und fand Ihre Anekdoten bei kurzen Zusammentreffen im Labor immer sehr erfrischend.

Dir, Benjamin, danke ich für die vielen tiefgründigen Gespräche, Tipps und Tricks.

Dir, Nadine, danke ich für die vielen entspannten Gespräche zum Mittag oder Kaffee, die so gar nichts mit der Forschungsarbeit zu tun hatten. Vielen Dank generell an all meine Freunde, die das Leben in Rostock erst so richtig lebenswert machen.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern und meine liebe Schwester, die ich mit dieser vollbrachten Arbeit sicherlich sehr stolz mache. Danke, dass ihr immer für mich da ward und seid.

Lieber Alexander, vielen Dank für deine Liebe und Kraft während der letzten 10 Jahre. Du bist für mich der tollste Mann auf dieser Welt! Auch möchte ich euch, liebe Familie Spohn, insbesondere Kordula und Detlef, für die Herzlichkeit, die tatkräftige Unterstützung und die Hilfe bei einfach allem danken. Ihr seid das beste, was mir je passiert ist!!!

Publikationen

Jonitz A., Lochner K., Peters K., Salamon A., Pasold J., Müller-Hilke B., Hansmann D. and Bader R. (2011). Differentiation capacity of human chondrocytes embedded in alginate matrix. *Connect Tissue Res.* 52, 503-11.

Pasold J., Engelmann R., Keller J., Joost S., Marshall R.P., Frerich B., Müller-Hilke B. (2013). High bone mass in the STR/ort mouse results from increased bone formation and impaired bone resorption and is associated with extramedullary hematopoiesis. *J Bone Miner Metab.* 31, 71-81.

Pasold J., Osterberg A., Peters K., Taipaleenmäki H., Säämänen A.M., Vollmar B. and Müller-Hilke B. (2013). Reduced expression of *Sfrp1* during chondrogenesis and in articular chondrocytes correlates with osteoarthritis in STR/ort mice. *Exp Cell Res.* 319, 649-59.

Posterpräsentationen

Müller-Hilke B., Pasold J., Bader R., Peters K. (IIMMUN, OUK, Zellbiologie) (2010). Regenerative Therapie von Knorpelschäden: Aufklärung der Pathogenese und chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen. Forschungsförderung: Fakultätsinterne Projekt-Präsentationen, Juni 2010 Universität Rostock

Pasold J., Vollmar B. and Müller-Hilke B. (2010). Osteoarthritis in STR/ort mice is associated with differential expression of *Sfrp1*. Conference: September 23-26, 2010 *World Congress on Osteoarthritis*; Osteoarthritis: Start of a new decade. Square-Brussels Meeting Center, Brussels, Belgium. Abstract 382 in *Osteoarthritis Cartilage*. 18 (Supplement 2), S168-69.

Pasold J., Pohle D., Engelmann R. and Müller-Hilke B. (2011) Osteopetrosis in the STR/ort mouse is associated with hepatosplenomegaly, an increased CD4/CD8 ratio and IgG subclass deficiency. Conference and Seminar: *Gordon Research Conference (GRC)* and *Gordon Research Seminar (GRS)* on Bones & Teeth, Evolutionary and

Developmental Mechanisms of Skeletal and Tooth Biology and Disease. June 18-24, 2011 Les Diablerets, Conference Center Les Diablerets, Switzerland.

Anhang

Tab. S1: Primerliste für die Sequenzierung der OA-Kandidatengene *Gas6*, *Fgfr1*, *Dkk4*, *Sfrp1*

Gen	Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	
Gas6	PromA-Box_1F	GGAATAACATCTTGCACCGTGG	
	PromA-Box_1R	TGAGGGCGGGGCTTAGGG	
	PromB-Box_1F	TGCCTTGCCTCACCCAGC	
	PromB-Box_1R	ACTCGGAAGCCAGCAGGAG	
	Exon 5_F	CACCCCAGCTATATGAGACG	
	Exon 5_R	GCAGAGAGAGGGCAAGGTGT	
	Exon 6_F	ATTTACCATGAGGCCAGCAG	
	Exon 6_R	TAGGTTCTGTGGGTGGGAAG	
	Exon 7_F	CCGACCTGTACTGCCTTAGC	
	Exon 7_R	GCAGTGACCAACATGTGTCC	
	Exon 8_F	CGCCTTCCCGTGCCTACT	
	Exon 8_R	AGGGTCCTATTCAAAGCCAG	
	cDNA_4F	CTGGAACGGGAGTGCGT	
	cDNA_4R	GCAAGCGAGAAGCCACTA	
	cDNA_5F	CCACAACAAACCAGGAAGC	
	cDNA_5R	CGCAGAGGCAAGAGTAGGA	
	cDNA_6F	ACTTGCCAGGCTCCTACTC	
	cDNA_6R	ATGCCGTGGTTGATGGTT	
	cDNA_7F	ATGTGGCAAACCTATCTCCG	
	cDNA_7R	AGCGATGTTCCGGGTGTAG	
	cDNA_8F	TACCTACAGGCTCAACTACACC	
	cDNA_8R	CAGGGCAACATCCTCAACT	
	cDNA_9F	ACGGTCACTGTCTCCCTG	
	cDNA_9R	GTGTCCAAACCCTGCTTC	
	Fgfr1	Exon 1_ F1+M13	GGTTTTCCAGTCACGAC AGAGGACAAAAGGCCAACCT
		Exon 1_ R1+M13	AGCGGATAACAATTTACACAC TTTTGGCACCCCAAGATAA
Exon 2_ F2+M13		GGTTTTCCAGTCACGAC ACGCCCGGATTGATAGTGTA	
Exon 2_ R2+M13		AGCGGATAACAATTTACACAC GTCAGGCTCTGCCTCCAAGA	
Exon 5_ F5+M13		GGTTTTCCAGTCACGAC CCCATTTGGAAGAGAAACA	
Exon 5_ R5+M13		AGCGGATAACAATTTACACAC GCTCCTCCAAAGAGGAAGTC	
cDNA_5F+M13		GGTTTTCCAGTCACGACT CACAGCCACTCTCTGCACT	
cDNA_5R+M13		AGCGGATAACAATTTACACAC AGTGCAGAGAGTGGCTGTGA	

Gen	Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Fgfr1	Exon 10_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACGGACAGTGCAGTGACCTACG
	Exon 10_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACAGGAGTGGGATAGGGCAGAG
	Exon 12/13_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACATGCTGTTTGGATGGAGGTC
	Exon 12/13_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACCAAAGGCAACCAAAACAACA
	Exon 14_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACCCTGTGCTTTGTGTGGCTAA
	Exon 14_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACAGTTCAAAGCGGGACGTTTA
	Exon 15_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACAGGTTCAAAGGGCAGGAGTT
	Exon 15_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACGAACTCAAATCCCAGGCACT
	Exon 17_1_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACACAAAAGAAGGGGCCAGAT
	Exon 17_1_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACGAGGGGACAGAGGAGGGG
	Exon 17_2_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACCCCCTCCTCTGTCCCCTC
	Exon 17_2_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACCAGGACCCGGAAAGGACC
	Exon 18_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACGCACACCTCTCGTGAGTGAA
	Exon 18_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACCCAAAGTGGGAGATGAGGAG
	Exon 19/20_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACCTCATTGAGGCCAAAGATT
	Exon 19/20_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACGGATCCGCAATGGAAAATA
	Exon 21_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACATTCAGGAGCAGAGGCAGAG
	Exon 21_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACCAGGAGCCGCCTACCAT
	Exon 22_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACGCTCTCAGGTCTCTTTATGTC
	Exon 22_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACGTCCCACCCTGCCTCTTG
	Exon 23_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACGTAACACGGTCCCGCTGC
	Exon 23_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACCCGAGTCTAGTGGTGTGGAGCC
	Exon 24_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACTGAGTCTCTGTGTCATCCCG
	Exon 24_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACATCCCAGGCAACTGTGTATTTCC
	Exon 25_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACCCCCTCTTGTCTCCTGTGCTC
	Exon 25_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACCATCACCTGAGGAAGCTG
	Exon 26/27_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACCCCCTGGTCCTTCTCTCTCT
	Exon 26/27_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACACGAGGGAGAAGAGGGGTCTTG
	Exon 27_1_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACTCCCTCTTCTTAGCCTGCTG
	Exon 27_1_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACTCTCCCCATGGGTAAATCT
Exon 27_2_F+M13	GGTTTTCCAGTCACGACGAGGGAGACAGGGGGTAAAG	
Exon 27_2_R+M13	AGCGGATAACAATTTACACAAACCACAGCTGCCAAAAT	
Dkk4	Exon 1_F	AAGGAAGGAAACAGTGGGCT
	Exon 1_R	GTGCTATCTTTGCGGATGGT
	Exon 2_F	CATTAGAGTTTGGCCTCCCA
	Exon 2_R	CATCCAGATCCCAAACATCC
	Exon 3_F	ATGGGACAAAGAAGTGCTGC
	Exon 3_R	AGAGCTCACAGACATGGGGT

Gen	Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Dkk4	Exon 4_F1	TGGGCTAGCTGGCTTCTTTA
	Exon 4_R1	TGGAGCAGACTTGTCCCTCT
Sfrp1	Exon 1-3	Sequenziert in Kooperation mit der Firma SeqLab
	cDNA_3'UTR_F6neu+M13	GGTTTTCCCAGTCACGAC CCTTAGATAGACCATCGCCAC
	cDNA_3'UTR_R6+M13	AGCGGATAACAATTTACAG CCCACGTACCTCCTTCATA
	cDNA_3'UTR_F7+M13	GGTTTTCCCAGTCACGAC TATGAAGGAGGTACGTGGGC
	cDNA_3'UTR_R7+M13	AGCGGATAACAATTTACAC ACATGCACAGAGTTGCCTT
	cDNA_3'UTR_F8+M13	GGTTTTCCCAGTCACGACA AAGGCAACTCTGTGCATGTG
	cDNA_3'UTR_R8neu+M13	AGCGGATAACAATTTACAT CAGAACTACAGGGACAACAGG
	cDNA_3'UTR_F9+M13	GGTTTTCCCAGTCACGAC ATCCATGGGGCTACAGTGAC
	cDNA_3'UTR_R9+M13	AGCGGATAACAATTTACAT TTTCCCAAATGAGCAGACC
	cDNA_3'UTR_F11+M13	GGTTTTCCCAGTCACGAC CAGCAGCCTTTGTCCTTTTC
	cDNA_3'UTR_R11+M13	AGCGGATAACAATTTACAT GCTTCTGGAGCACATCTTG

Altersabhängige Zunahme einer Splenomegalie im STR/ort-Mausstamm

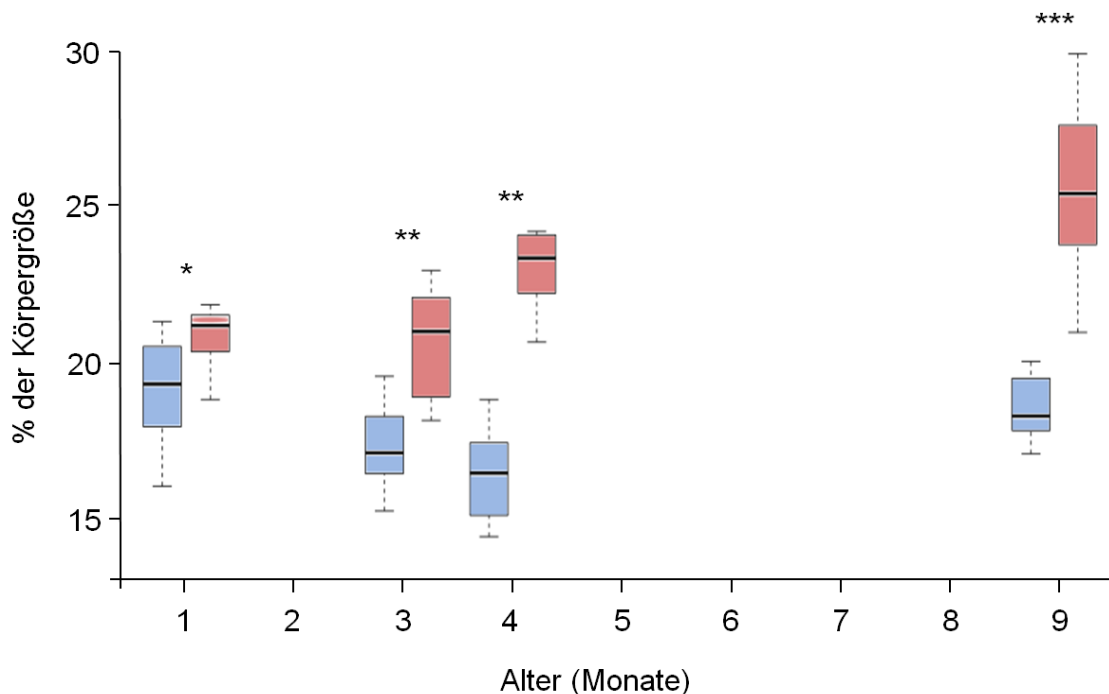


Abb. S1: Die Größe der Milzen von 1 Monat sowie 3, 4 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen (n = 5-8 pro Stamm und Zeitpunkt) wurde relativ zur Gesamtkörpergröße der Mäuse bestimmt. Vergleich der prozentualen Größe der Milz in Form von Boxplots (Minimum-/Maximumwerte, erste/dritte Quartile und Mediane); Mann-Whitney Test (* P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001).

Analyse der kortikalen und trabekulären Knochenparameter

Um den zeitlichen Verlauf der Knochenproduktion charakterisieren zu können, wurden die Femora von 1, 2, 7 und 9 Monate alten C57BL/6- und STR/ort-Mäusen (n = 3 pro Stamm und Geschlecht) *ex vivo* in 2 ml Kochsalzlösung (0.9% NaCl) im μ CT gescannt und mittels Skyscan-Software vermessen und analysiert:

Tab. S2: Analyisierte kortikale Knochenparameter. **Tt.Ar:** „total area“ = gesamte Querschnittsfläche; **Ct.Ar:** „cortical area“ = durchschnittliche kortikale Fläche; **Ct.Ar/Tt.Ar:** „cortical area/total area“ = kortikale Flächenfraktion; **Ct.Th:** „cortical thickness“ = durchschnittliche kortikale Dicke. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Zweistichproben-t-Test; Vergleich zwischen C57BL/6 und STR/ort: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; Vergleich der Geschlechter innerhalb eines Stamms: # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$.

	Alter (Monate)	Weibchen		Männchen	
		C57BL/6	STR/ort	C57BL/6	STR/ort
Tt.Ar (mm ²)	1	1.38 ± 0.20	1.20 ± 0.04	1.60 ± 0.08	1.44 ± 0.20
	2	1.88 ± 0.03	1.65 ± 0.04**	2.28 ± 0.04	1.78 ± 0.09**
	7	2.32 ± 0.27	2.01 ± 0.10*	2.73 ± 0.31	2.72 ± 0.24###
	9	2.20 ± 0.09	2.07 ± 0.10	2.23 ± 0.05	2.49 ± 0.25
Ct.Ar (mm ²)	1	0.47 ± 0.07	0.55 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.69 ± 0.07#
	2	0.75 ± 0.02	1.11 ± 0.05***	0.94 ± 0.04##	1.06 ± 0.06
	7	1.00 ± 0.07	1.57 ± 0.07***	1.10 ± 0.12	2.02 ± 0.14***###
	9	0.96 ± 0.06	1.75 ± 0.06***	0.99 ± 0	1.93 ± 0.16***
Ct.Ar/Tt.Ar (%)	1	34.12 ± 0.50	45.68 ± 2.68**	33.46 ± 1.27	48.20 ± 2.91**
	2	39.80 ± 0.69	67.43 ± 1.15***	41.36 ± 2.21	59.22 ± 0.27***###
	7	43.29 ± 2.43	77.93 ± 2.06***	40.19 ± 1.87	74.30 ± 2.40***#
	9	43.72 ± 1.29	84.53 ± 1.54***	44.51 ± 0.80	77.56 ± 3.02***#
Ct.Th (μm)	1	126.33 ± 9.70	165.17 ± 8.02**	134.29 ± 3.51	191.75 ± 1.31**
	2	177.15 ± 3.10	308.49 ± 13.27***	199.81 ± 8.90#	275.59 ± 8.92***#
	7	219.59 ± 4.98	536.03 ± 46.15***	222.53 ± 13.04	397.13 ± 37.68***##
	9	211.03 ± 9.65	557.15 ± 48.69***	212.14 ± 4.98	423.91 ± 21.02***#

Tab. S3: Analyierte trabekuläre Knochenparameter. BV/TV: „bone volume/tissue volume“ = Knochen-Vol./Gewebe-Vol.; **Tb.Th:** „trabecular thickness“ = trabekuläre Dicke; **Tb.N:** „trabecular number“ = Trabekel-Anzahl; **Tb.Sp:** „trabecular separation“ = Trabekel-Abstände. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Zweistichproben-t-Test; Vergleich zwischen C57BL/6 und STR/ort: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; Vergleich der Geschlechter innerhalb eines Stamms: # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$.

	Alter (Monate)	Weibchen		Männchen	
		C57BL/6	STR/ort	C57BL/6	STR/ort
BV/TV	1	8.763 ± 0.183	6.763 ± 3.052	13.781 ± 6.480	25.087 ± 6.403 [#]
	2	5.792 ± 2.521	25.507 ± 3.962 ^{**}	16.530 ± 5.579	23.277 ± 8.299
	7	2.688 ± 3.689	61.697 ± 17.256 ^{***}	11.951 ± 4.326 ^{###}	31.533 ± 19.608 [#]
	9	1.562 ± 0.456	67.274 ± 13.038 ^{**}	5.721 ± 0.532 ^{###}	16.756 ± 3.980 ^{* #}
Tb.N (1/mm)	1	1.477 ± 0.096	1.199 ± 0.426	2.008 ± 0.689	2.832 ± 0.587 [#]
	2	1.097 ± 0.426	3.682 ± 0.300 ^{**}	2.319 ± 0.469 [#]	3.158 ± 0.765
	7	0.463 ± 0.512	5.189 ± 0.869 ^{***}	1.735 ± 0.423 ^{##}	3.836 ± 2.158
	9	0.297 ± 0.073	5.635 ± 0.126 ^{***}	0.918 ± 0.162 ^{##}	2.017 ± 0.598 ^{###}
Tb.Th (µm)	1	59.54 ± 3.32	54.37 ± 5.72	66.10 ± 8.61	87.69 ± 5.96 ^{* ##}
	2	51.13 ± 4.28	68.89 ± 4.95 [*]	69.38 ± 14.90	71.18 ± 10.69
	7	46.61 ± 10.67	116.78 ± 15.46 ^{***}	67.12 ± 8.59 ^{##}	78.72 ± 6.66 [#]
	9	52.31 ± 9.00	118.95 ± 20.4 ^{**}	63.33 ± 6.29	85.08 ± 7.83 [*]
Tb.Sp (µm)	1	260.01 ± 28.79	262.31 ± 50.53	236.84 ± 36.51	194.17 ± 21.80
	2	268.12 ± 25.93	146.14 ± 6.71 ^{**}	186.80 ± 15.84 [#]	172.16 ± 28.81
	7	376.24 ± 110.17	120.86 ± 40.82 ^{***}	232.07 ± 28.13 [#]	229.76 ± 107.34
	9	375.74 ± 23.55	102.80 ± 21.30 ^{***}	263.99 ± 22.79 ^{##}	257.40 ± 14.84 ^{###}