

Aus dem Institut für Immunologie

Arbeitsgruppe Klinische Immunologie

Zusammenhang zwischen 5-Hydroxymethylcytosin und Osteoarthritis in der STR/ort Maus

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Ralf Dege | geb. am 10.10.1992 in Rostock
aus Neubukow

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0052-5

Rostock | 2018
Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME
Institut für Immunologie, Universität Rostock
2. Gutachter:
Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Institut für Pathologie, Universität Rostock
3. Gutachter:
Univ.-Prof. Dr. Carsten Perka
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Datum der Einreichung: 25. September 2017

Datum der Verteidigung: 13. März 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	7
1.1	Arthrose	7
1.1.1	Epidemiologie	7
1.1.2	Pathophysiologie	7
1.1.3	Klinik	9
1.1.4	Diagnostik	10
1.1.5	Therapie	11
1.2	Epigenetik und Arthrose	12
1.2.1	Methylierung von DNA	12
1.2.2	Demethylierung von DNA	14
1.3	5-Hydroxymethylcytosin	15
1.4	Das STR/ort und C57BL/6 Mausmodell	16
1.4.1	Der Mausstamm STR/ort	16
1.4.2	Der Mausstamm C57BL/6	18
1.4.3	Induktion sekundärer Arthrose bei STR/ort und C57BL/6 Weibchen	18
1.5	Zielstellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Angefertigte Lösungen	23
2.1.3	Antikörper und DNA-bindende Moleküle	23
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	24
2.2	Versuchstiere und Zellreihen	25
2.2.1	Versuchstiere	25
2.2.2	Zellreihen	26
2.3	Methoden	26
2.3.1	Herstellung der histologischen Schnitte	26
2.3.2	Zellkultur	27

2.3.3	Histologische Färbung.....	29
2.4	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Zielstellung und experimentelles Design	35
3.2	Etablierung von Methoden.....	36
3.2.1	Bestimmung des OA Scores	36
3.2.2	Immunhistochemische Färbung.....	38
3.3	Untersuchung des 5hmC.....	46
3.3.1	Bei männlichen STR/ort Mäusen steigt mit dem Alter der OA Score während der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten abnimmt.....	46
3.3.2	Die Veränderung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten ist bei sekundärer Arthrose abhängig vom Mausstamm	49
3.3.3	Männliche STR/ort Mäuse haben einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als weibliche	51
3.3.4	OA Score und Geschlecht interagieren miteinander bezüglich der Beeinflussung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten.....	53
3.3.5	Zusammenfassung der quantitativen Auswertung	54
3.3.6	Der Anteil von 5hmC an der gesamten DNA pro Zellkern verändert sich mit steigendem OA Score kaum.....	54
4	Diskussion und Ausblick.....	57
4.1	Diskussion der Ergebnisse	57
4.1.1	Quantitative Auswertung	57
4.1.2	Qualitative Auswertung	61
4.2	Diskussion der Methodik	63
4.2.1	Bestimmung des Arthrose Scores	63
4.2.2	Nachweis von 5hmC	63
4.2.3	Intensität der Fluoreszenzen	64
4.3	Ausblick.....	65
5	Fazit.....	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Thesen	76

8	Danksagung.....	77
9	Eidesstattliche Versicherung	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Arthrose nach Otte.....	10
Abb. 2: Methylierung und Demethylierung von Cytosin.....	14
Abb. 3: Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes und mediale Menishektomie	19
Abb. 4: Schweregrad der Arthrose nach chirurgischer OA-Induktion	20
Abb. 5: Experimentelles Design.....	35
Abb. 6: Beispielhafte Darstellung von OA Scores.....	37
Abb. 7: Immunhistochemische Färbung von frontalen Paraffinschnitten.....	38
Abb. 8: Negativkontrolle zur Überprüfung der Bindungsaffinität des sek. Antikörpers.....	40
Abb. 9: 5hmC im Zytoplasma von Chondrozyten.....	41
Abb. 10: Nachweis von Mitochondrien in Chondrozyten mittels AMA	42
Abb. 11: Mitochondrien in 3T3 Zellen	43
Abb. 12: 5hmC in mitochondrialer DNA von humanen HeLa Zellen.....	44
Abb. 13: Zusammenhang von Alter und OA Score bei männlichen STR/ort Mäusen.....	47
Abb. 14: Zusammenhang von OA Score und Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei männlichen STR/ort Mäusen	48
Abb. 15: Zusammenhang von OA Score und Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei weiblichen C57BL/6 und STR/ort Mäusen	50
Abb. 16: Männliche STR/ort Mäuse haben einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als weibliche.....	52
Abb. 17: Programm ZEN 2011 zur Quantifizierung der verschiedenen Fluoreszenzsignale. 55	
Abb. 18: Der Anteil von 5hmC an der gesamten DNA pro Zellkern verändert sich mit steigendem OA Score kaum.....	56
Abb. 19: Demethylierung von 5mC.....	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemikalien	22
Tab. 2 Angefertigte Lösungen	23
Tab. 3 Antikörper und DNA-bindende Moleküle.....	23
Tab. 4 Verbrauchsmaterialien.....	24
Tab. 5 Versuchstiere	25
Tab. 6 Zellreihen	26
Tab. 7 Scoring System für Osteoarthrose.....	36
Tab. 8 Veränderung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten bei sekundärer Arthrose	49
Tab. 9 Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei männl. und weibl. STR/ort Mäusen.....	51
Tab. 10 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten	53

Abkürzungsverzeichnis

3T3	Murine Fibroblasten-Zelllinie
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
5mU	5-Methyluracil
ACLT	Anterior Cruciate Ligament Transection
AID	activation-induced deaminase
AMA	anti-mitochondrialer Antikörper
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA–editing enzyme catalytic polypeptide–like
BSA	Rinderserum-Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase family of DNA deaminases
FCS	Fetales Rinderserum
Garb488	Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit
HeLa	humane Epithelzellen
MM	Mediale Menispektomie
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
OA	Osteoarthrose
PBS	Phosphatgepufferte Lösung
PFA	Paraformaldehyd
PGOA	primären generalisierte Osteoarthrose
RNA	Ribonukleinsäure
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBS	Trisgepufferte Lösung
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
TET	Ten-Eleven Translocation

1 Einführung

1.1 Arthrose

Arthrose ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung. Allein in Deutschland sind über 5 Millionen Menschen betroffen (Fink und Haidinger 2007). Und dennoch ist bisher die Pathogenese weitgehend unklar. Ebenso existiert keine kausale Therapie zur Beseitigung der Erkrankung. Es ist lediglich möglich die Schmerzen zu lindern und den Fortschritt der Gelenkdestruktion zu verlangsamen. Aufgrund dieser Tatsachen ist die Arthrose Gegenstand vieler Forschungsgruppen und Studien, um den Entstehungsprozess besser zu verstehen und so ein Medikament mit dem Ziel der Heilung zu entwickeln.

1.1.1 Epidemiologie

Zwei Drittel der Betroffenen sind über 65 Jahre alt, wobei die Erkrankung bei Männern und Frauen gleich häufig auftritt (Arden und Nevitt 2006). Bei Männern manifestiert sich speziell die Gonarthrose vermehrt am rechten Knie, währenddessen bei den Frauen beide Seiten ähnlich häufig betroffen sind (Andrianakos u. a. 2006). Aufgrund der Menopause und des damit verbundenen Abfalls des Östrogenspiegels sind bei Menschen unter 65 Jahren Frauen häufiger betroffen als Männer (Lawrence u. a. 2008). In Deutschland leiden ca. 5 Millionen Menschen an der Krankheit (Fink und Haidinger 2007).

1.1.2 Pathophysiologie

Prinzipiell kann die Arthrose in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilt werden. Die primäre Form entsteht im Gegensatz zur sekundären ohne äußere Einflüsse, d.h. hier spielt die Genetik eine übergeordnete Rolle. Bei der sekundären Arthrose kommt es durch Einwirkung von externen Kräften oder unter dem Einfluss von Pharmazeutika zu einer Destruktion der Knorpelflächen.

1.1.2.1 Primäre Arthrose

Bei der primären Form der Arthrose nimmt man eine Minderwertigkeit und damit einen schnelleren Verschleiß des Knorpels aufgrund einer unbekanntes Ursache an (Bühling, Lепенies, und Witt 2004). Einerseits kann diese unbekanntes Ursache im Genom des betroffenen Individuums zu finden sein. Andererseits spielen auch eine Reihe von

Umwelteinflüssen eine Rolle. Ein Zusammenwirken all dieser verschiedenen Faktoren führt zum Ausbruch der Krankheit (Müller-Hilke 2007). Es gibt bereits zahlreiche Genanalysen, die bisher lediglich zwei Gene kenntlich gemacht haben, die mit der Arthrose in Verbindung stehen. Es handelt sich um die Gene ASPN (Asporin) und FRZB („frizzled-related protein B“; (Valdes u. a. 2007). Das Protein ASPN bindet extrazellulär den Wachstumsfaktor TGF- β (Transforming growth factor) und moduliert so dessen Wirkung. FRZB gilt als Antagonist der wnt-Signalübertragung, was zu einer veränderten embryonalen Entwicklung und damit zu einer abweichenden Stabilität von Knorpel und Knochen führt (Kizawa u. a. 2005; Loughlin u. a. 2004). Die wnt/ β -Catenin-Signalübertragung reguliert sowohl das zelluläre Wachstum als auch Differenzierung und Funktion von verschiedenen Zelltypen in der Embryonalentwicklung (Cadigan und Nusse 1997). Ebenso kann dieser Signalweg einen Einfluss auf die adulte Skelettentwicklung und auf den Knochen- und Knorpelaufbau haben (Loughlin u. a. 2004; Kizawa u. a. 2005; Baron und Rawadi 2007). Chondrozyten produzieren sowohl katabole (z.B. IL-1 β) und anabole Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β) als auch die extrazelluläre Matrix, in die der Chondrozyt eingebettet ist, selbst (Müller-Hilke 2007). In mehreren genomweiten Genanalysen wurde der IL-1-Locus mit der Pathogenese der Arthrose in Verbindung gebracht (Moos u. a. 2000; Moxley u. a. 2007). Ist die Bildung des IL-1 β auf Dauer verändert, so kommt es zu einer Destabilisierung des Knochenstoffwechsels, was zur Arthroseentstehung beitragen kann (Müller 2002). IL-1 regt die Expression von matrixabbauenden Proteinen wie Stromelysine, Kollagenasen und Gelatinasen an und begünstigt so den Knorpelabbau. Knorpelzellen verfügen nur über ein geringes Regenerationspotential, sodass ein Verlust von Chondrozyten durch Apoptose ebenfalls einen Matrixverlust bedeutet, da sie für die Bildung des sie umgebenden Knorpels selbst verantwortlich sind (Müller-Hilke 2007). Zu einer überschießenden Apoptose der Chondrozyten kann es beispielsweise kommen, wenn das für eine GTPase kodierende Gen RHOB in einer Knorpelzelllinie überexprimiert wird (Sandra Mahr u. a. 2006; Sandra Mahr und Müller-Hilke 2007). All diese Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der primären Arthrose um eine multifaktorielle Erkrankung handelt.

Desweiteren ist auch eine hereditäre Form der Arthrose bekannt. Dabei führt eine Mutationen im für Kollagen-Typ-II kodierenden *COL2A1*-Gen zur so genannten primären generalisierten Osteoarthrose (PGOA) oder auch Stickler-Syndrom. Dabei treten familiär gehäuft bereits im jungen Alter arthrotische Gelenkveränderungen auf. Der Erbgang ist autosomal dominant. Es kommt neben Gelenkbeschwerden auch zu Organfehlbildungen (Reginato und Olsen 2002).

1.1.2.2 Sekundäre Arthrose

Bei der sekundären Form der Arthrose kommt es zu Mikrotraumen im hyalinen Knorpel der Gelenkflächen. Dies kann u.a. durch Fehlstellung, Übergewicht, Trauma und berufliche oder sportliche Überbelastung bedingt sein. Daraufhin reagieren die Chondrozyten mit einer gesteigerten Produktion von Proteoglykanen, um die Defekte zu reparieren. Letztendlich dekomensieren die Knorpelzellen jedoch und werden apoptotisch (S. Hashimoto u. a. 1998). So kommt es zu Fibrillationen und tiefen Fissuren der Knorpeloberfläche und durch die untergegangenen Zellen werden Enzyme freigesetzt, die zusätzlich zum Abbau der Knorpelmatrix führen (Smith u. a. 1997; Teichtahl u. a. 2015). Dabei zeigt sich, dass im betroffenen Gelenk der Anteil an Interleukin-1 erhöht ist. Dies führt zu einer geringeren Expression von Aggrecan und Kollagen II und zu einer verstärkten Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP; Tetlow, Adlam, und Woolley 2001). Jedoch handelt es sich hierbei nicht um endogen von Chondrozyten produziertes Interleukin 1, sondern um Interleukin, das außerhalb des Gelenks produziert wird. Eine Studie untersuchte den Spiegel von Interleukin-1 in Chondrozyten aus arthrotischen und gesunden Gelenken, wobei kein Unterschied feststellbar war. Zudem war die Stimulierbarkeit der Signalwege in den oberen Knorpelschichten signifikant höher als in den tieferen, sodass man davon ausgeht, dass vorrangig das von außerhalb über die Synovialflüssigkeit in die obersten Knorpelschichten diffundierende exogene Interleukin-1 für die arthrotischen Veränderungen verantwortlich sein muss (Fan u. a. 2007).

Ebenso führen bestimmte Erkrankungen zur sekundären Arthrose. Bei Alkaptonurie wird Homogentisinsäure in die Gelenke eingelagert und bei Hyperurikämie Harnsäure. Es kommt zur Auskristallisation der Säuren und somit zu einer mechanischen Reizung des Knorpels. Ein ähnlicher Effekt liegt bei einer Gelenkblutung bei vorbestehender Hämophilie vor (Pschyrembel und Dornblüth 1977). Zudem gibt es einige Antibiotika, die zum Gelenkverschleiß führen. Hierzu zählen vor allem die Fluorchinolone. Knorpel gehört zu den bradytrophen Geweben und ist somit schlecht durchblutet (der Knorpel selbst ist nicht durchblutet, eine Versorgung erfolgt per Diffusion). Es kommt zur Komplexbildung mit Magnesium-Ionen, die das Bindegewebe schädigen und schließlich hyaliner Knorpel abgebaut wird (Menschik u. a. 1997),

1.1.3 Klinik

Ist die Arthrose noch nicht weit vorangeschritten, so kann der Patient durchaus symptomfrei sein. Im Anfangsstadium manifestiert sich Arthrose klassisch mit Belastungs- und Anlaufschmerz. Schreitet die Krankheit weiter voran, entsteht ein Erguss im Gelenk, der zu

einem dauerhaften Ruheschmerz führt. Der Patient nimmt zwecks Schmerzreduktion eine Fehlstellung ein, die zu einer zunehmenden Verformung des Gelenks bzw. von Knorpel und Knochen führt. Hierdurch entstehen weitere Unebenheiten der Knorpeloberfläche, die als Krepitationen beim Bewegen des Gelenks wahrnehmbar werden. Ist die Arthrose weit fortgeschritten, so ist das Gelenk nur noch eingeschränkt beweglich. Es kommt zu Steifigkeit und Kontrakturen (Bühling, Lepenies, und Witt 2004; Rüter u. a. 2014).

1.1.4 Diagnostik

Anamnestisch geben die Patienten fast immer Gelenkschmerzen an, meist bei Bewegung des entsprechenden Gelenks. Ein Ruheschmerz ist selten. Bei der Untersuchung des betroffenen Gelenks ist die Funktion meist schmerzbedingt eingeschränkt, wohingegen Muskeln und Bänder intakt sind. Beim Bewegen des Gelenks ist oft ein Reiben zu hören, bedingt durch die aufgeraute Knorpeloberfläche. Legt man dabei eine Hand auf das Gelenk, so kann man dieses Reiben oft auch spüren. An die klinische Untersuchung schließt sich die diagnostische Bildgebung an. Konventionelles Röntgen, Computertomografie und Magnetresonanztomografie gehören zu den Standardverfahren. Dabei ist auf die klassischen Zeichen der Arthrose zu achten: Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondrale Sklerosierung, Osteophytenbildung und Entstehung von Geröllzysten. Den letzten diagnostischen Schritt stellt die Arthroskopie dar, welche auch gleichzeitig eine Therapie ermöglicht (Niethard, Pfeil, und Biberthaler 2014).

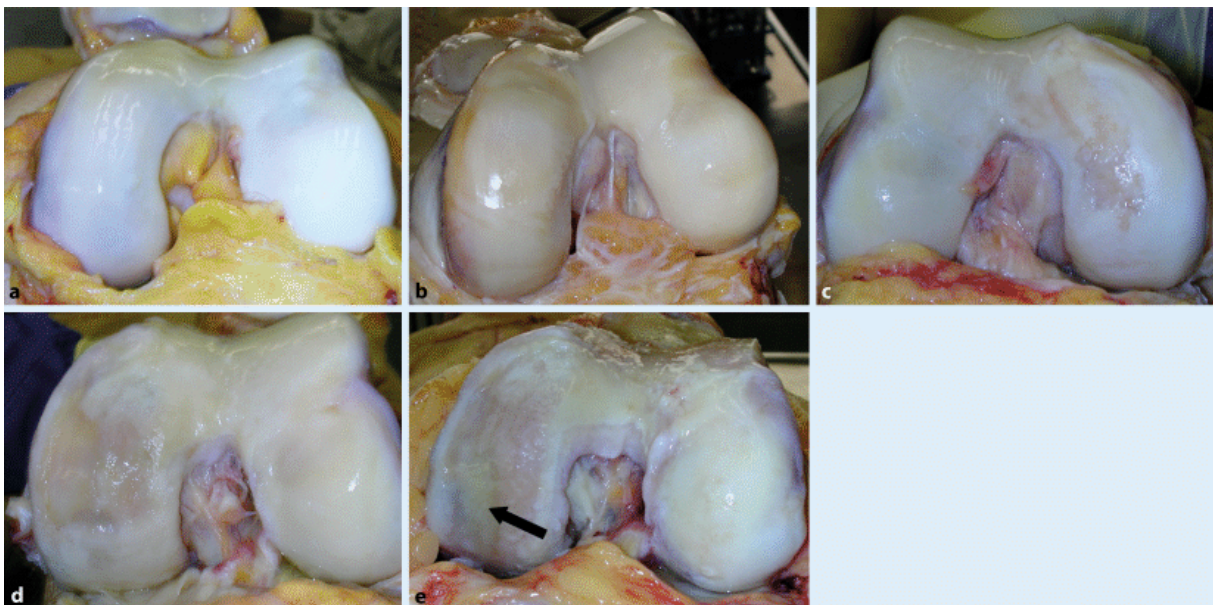


Abb. 1: Einteilung nach Otte der makroskopischen Veränderungen der Femurkondylen bei Arthrose. (A) keine Schädigung. **(B)** Grad 1 mit oberflächlicher Fibrillierung. **(C)** Grad 2 mit leichten Substanzdefekten. **(D)** Grad 3 mit schweren, tief reichenden Substanzdefekte. **(E)** Grad 4 mit z. T. vollständigem Knorpelverlust (Pfeil) und angrenzenden Substanzdefekten (Quelle: Söder 2016)

Die Arthrose wird nach Otte in vier Stadien eingeteilt (Abbildung 1; Bühling, Lепенies, und Witt 2004):

- 1) Aufrauung und Ausdünnung der Knorpelschicht, tangentielle Fissuren
- 2) Austausch von hyalinem Knorpel durch Granulationsgewebe und minderwertigen Knorpel, Bildung von Pseudozysten aus nekrotischem Knorpel- und Knochengewebe (Geröllzysten)
- 3) Ulzerationen, Proliferation von Bindegewebe und Knorpelzellen
- 4) Durch stetigen, direkten Druck auf den frei liegenden Knochen des Gelenks flacht sich dieser ab und es bilden sich Randwülste (Osteophyten)

1.1.5 Therapie

Die Therapie der Arthrose kann sowohl konservativ als auch operativ erfolgen. Dabei gilt es, sowohl eine Schmerzfreiheit als auch einen Stillstand des Gelenkverschleißes zu erreichen. Bei konservativer Therapieplanung ist der erste Schritt, zu überprüfen, ob eine Lebensstiländerung zum Therapieziel führen kann. Hierzu gehören mehr Bewegung und Sport sowie eine gesunde und ausgewogene Ernährung im Sinne einer Gewichtsreduktion. Führt dies nicht zum gewünschten Erfolg, so stehen mehrere Pharmaka zur Auswahl. Zu ihnen gehören Schmerzmittel wie Nicht-steroidale Antirheumatika, die lokale Anwendung von Glukokortikoiden bei einer möglichen Gelenkentzündung oder auch die sogenannten Symptomatic Slow Acting Drugs in OA (SYSADOA), zu denen Chondroitin oder Hyaluronsäure zählen (W. Zhang u. a. 2008; Fassel und Leeb 2006). Ergänzend kommen Physiotherapie, Wärme-, Hydro-, Balneo-, und die Elektrotherapie hinzu. Dabei geht es vor allem um die Mobilisierung des Patienten. Muskeln und Bänder sollen gedehnt und gekräftigt und die Koordination, besonders mit dem betroffenen Gelenk, verbessert werden. Desweiteren können Gehstützen, Keilkissen oder Entlastungsschienen zum Einsatz kommen (Zhang u. a. 2008). Zur Zeit befindet sich ein rekombinant produzierter humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-18 in der klinischen Erprobung. Er hat im Tierversuch bei intraartikulärer Injektion die Bildung von Knorpel angeregt (Lohmander u. a. 2014).

Die Art der operativen Therapie ist davon abhängig, welches Gelenk betroffen ist. Bei beispielsweise arthrotischer Hüfte kann man eine Korrekturosteotomie vornehmen, um die Fehllage auszugleichen und so den Knorpelverschleiß zu reduzieren. Ist bereits zu viel Knorpel zerstört, so hat man die Möglichkeit das Gelenk komplett zu ersetzen, indem eine Endoprothese eingesetzt wird. Auch kann versucht werden per Arthroskopie eine Abrasion vorzunehmen, bei der die aufgeraute Knorpeloberfläche geglättet und so der Bewegungsschmerz durch ein nun wieder verbessertes Gleiten der Gelenkflächen vermindert wird. Bei kleineren Gelenken, wie z.B. denen zwischen den Fußwurzelknochen,

deren Funktion weniger wichtig ist als die der Hüfte oder des Knies, besteht auch die Möglichkeit einer Arthrodesen. Dabei wird das Gelenk versteift, sodass keine Bewegung mehr ausführbar ist und so kein Schmerz entstehen kann (Niethard, Pfeil, und Biberthaler 2014). Desweiteren gibt es die Behandlung per autologer Knorpelzelltransplantation. Dabei werden Knorpelzellen aus einem unberührten Randbereich der Gelenkfläche entnommen, vier bis sechs Wochen in vitro kultiviert und anschließend an die beschädigte Stelle replantiert. Dort sollen die Knorpelzellen proliferieren und so die defekte Stelle erneuern, sodass wieder eine uneingeschränkte und schmerzfreie Gelenkbewegung ermöglicht wird (Saris u. a. 2008).

1.2 Epigenetik und Arthrose

1.2.1 Methylierung von DNA

Methylierung und Demethylierung sind Prozesse, die der Epigenetik zuzuordnen sind, die wiederum ein Teilgebiet der Genetik darstellt. Genetik wird auch als Vererbungslehre bezeichnet und charakterisiert die Gesetzmäßigkeiten der Ausbildung von erblichen Merkmalen und deren Weitergabe an die Nachkommen. Ein Großteil der Genetik beschäftigt sich mit der abweichenden Merkmalsausprägung aufgrund einer Änderung der DNA-Sequenz (Janning und Knust 2008). Die Epigenetik hingegen bezeichnet Veränderungen, die nicht in einer Abweichung der Basenfolge begründet liegen, sodass sie zwar phänotypisch sichtbar sind, aber nicht im Genotyp (Graw 2010). Epigenetische Modulationen regulieren die Aktivität von Genen und können damit die Entwicklung einer Zelle beeinflussen. Neben Histon-Modifikationen, Telomer-Abbau und der Chromatin-Struktur ist die DNA-Methylierung der wichtigste Teil der Epigenetik (Shen und Waterland 2007). Epigenetische Veränderungen sind vererbbar. Der als Imprinting oder auch genomische Prägung bezeichnete Vorgang wird durch die DNA-Methylierung reguliert. Bei der Methylierung von DNA werden Methylgruppen als S-Adenosylmethionin auf Nukleobasen übertragen. Dabei sind sowohl Adenin als auch Cytosin mögliche Bindungspartner. Die Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert (DNMT; Scharf, Gessler, und von Eckardstein 2013). Dabei handelt es sich um keine genetische Mutation, da die DNA-Sequenz erhalten bleibt. Die verschiedenen Methylierungsmuster in weiblichen und männlichen Keimzellen lassen Rückschlüsse darauf zu, welches Allel von der Mutter oder vom Vater stammt. Es werden die Methylierungsmuster nicht direkt von den Eltern vererbt, sondern sie werden teilweise gelöscht und neu geschaffen (Adalsteinsson und Ferguson-Smith 2014).

Als methylierte Basen sind N⁶-Methyladenin, 5-Methylcytosin (5mC) und N⁴-Methylcytosin möglich (Braaten u. a. 1994; Dunn und Smith 1958). Alle drei Varianten kommen sowohl bei

Pro- als auch bei Eukaryonten vor (Vanyushin, Tkacheva, und Belozersky 1970; Blow u. a. 2016). Dabei ist das 5mC bei den Eukaryonten am häufigsten vorhanden (Ehrlich u. a. 1985) und stellt auch die wichtigste DNA-Methylierung dar. Es werden jedoch nicht alle Cytidine methyliert, sondern nur jene, die in so genannten Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CG-Stellen) vorkommen (Jeltsch 2006). Bei der Zellteilung ist der neue Strang noch nicht methyliert. Die Methylgruppen am Cytosin an den CG-Stellen werden durch die Unterart 3 der DNMTs hinzugefügt. Diese Methylierung führt dazu, dass Methyl-CG-erkennende Proteine an solche methylierten CG-Stellen binden, was zur Folge hat, dass sich weitere Proteine anlagern und es zur Verdichtung der Nukleosomen kommt. Dadurch ist die DNA an diesen Stellen für die RNA-Polymerase nicht ablesbar und das betroffene Gen ist inaktiv. CG-Dinukleotide treten gehäuft in Promotorregionen auf, welche meist eine hohe Dichte an CG-Dinucleotiden besitzen. Man nennt dies CpG-Insel (Cytosinphosphat-Guanin-Insel). Ist ein Promoter methyliert, so ist das regulierte Gen meist inaktiv. Man spricht von Gen-Silencing. Dies ist beispielsweise bei der Entwicklung des Embryos von großer Bedeutung. Totipotente Zellen differenzieren sich aus und können nur noch eine bestimmte Zellreihe bilden. Dies kann nur durch Mitwirken der Methylierung von Genen und damit deren Deaktivierung erfolgen (Kumar u. a. 1994; Jabbari und Bernardi 2004; Seisenberger u. a. 2013). Ein Beispiel für eine solche Aktivitätsregulierung von Genen stellen die Matrixmetalloproteinasen dar. Sind die Promotoren der MMPs nur gering methyliert, sind sie aktiv, sodass die MMPs verstärkt gebildet werden. MMPs sind zellmatrixabbauende Proteine. Durch sie wird die Knorpelmatrix verringert, woraus eine Arthrose resultieren kann (Roach u. a. 2005, K. Hashimoto u. a. 2009).

Bisher sind drei menschliche DNA-Methyltransferasen bekannt: DNMT1, 3a und 3b. Die DNMT1 ist für die so genannte Erhaltungsmethylierung (Maintenance-Methylierung) des replizierten DNA-Stranges bei der Zellteilung zuständig. DNMT3a und b methylieren im Rahmen der Zelldifferenzierung CG-Stellen neu (de-novo-Methylierung; Timinkas, Butkus, und Janulaitis 1995).

Neben der Hauptaufgabe, der Regulierung von Genen, hat die DNA-Methylierung noch einen weiteren Zweck. Er besteht darin, fremde DNA, die z.B. über die Nahrung aufgenommen wird, zu erkennen. Dieses Auffinden von Fremd-DNA erfolgt über das abweichende Methylierungsmuster von der körpereigenen DNA gesunder Zellen. Anschließend wird die fremde DNA von Restriktionsenzymen und Nukleasen verdaut (Hirsch-Kauffmann und Schweiger 2006).

1.2.2 Demethylierung von DNA

Die Demethylierung von methyliertem Cytosin (5mC) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht. Gemeinsamer Beginn ist das Hinzufügen einer Hydroxylgruppe an das 5mC mittels eines Ten-Eleven Translocation Enzyms (TET), sodass 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) entsteht. Dieses stellt auch in den weiteren Abschnitten den Kern dieser Arbeit dar. In einem folgenden Schritt wird wieder durch ein TET Enzym die Reaktion von 5hmC zu 5-Formylcytosin (5fC) katalysiert. Ab hier gibt es verschiedene Varianten, wieder das ursprüngliche Cytosin herzustellen. Bleibt man bei den TET Enzymen,

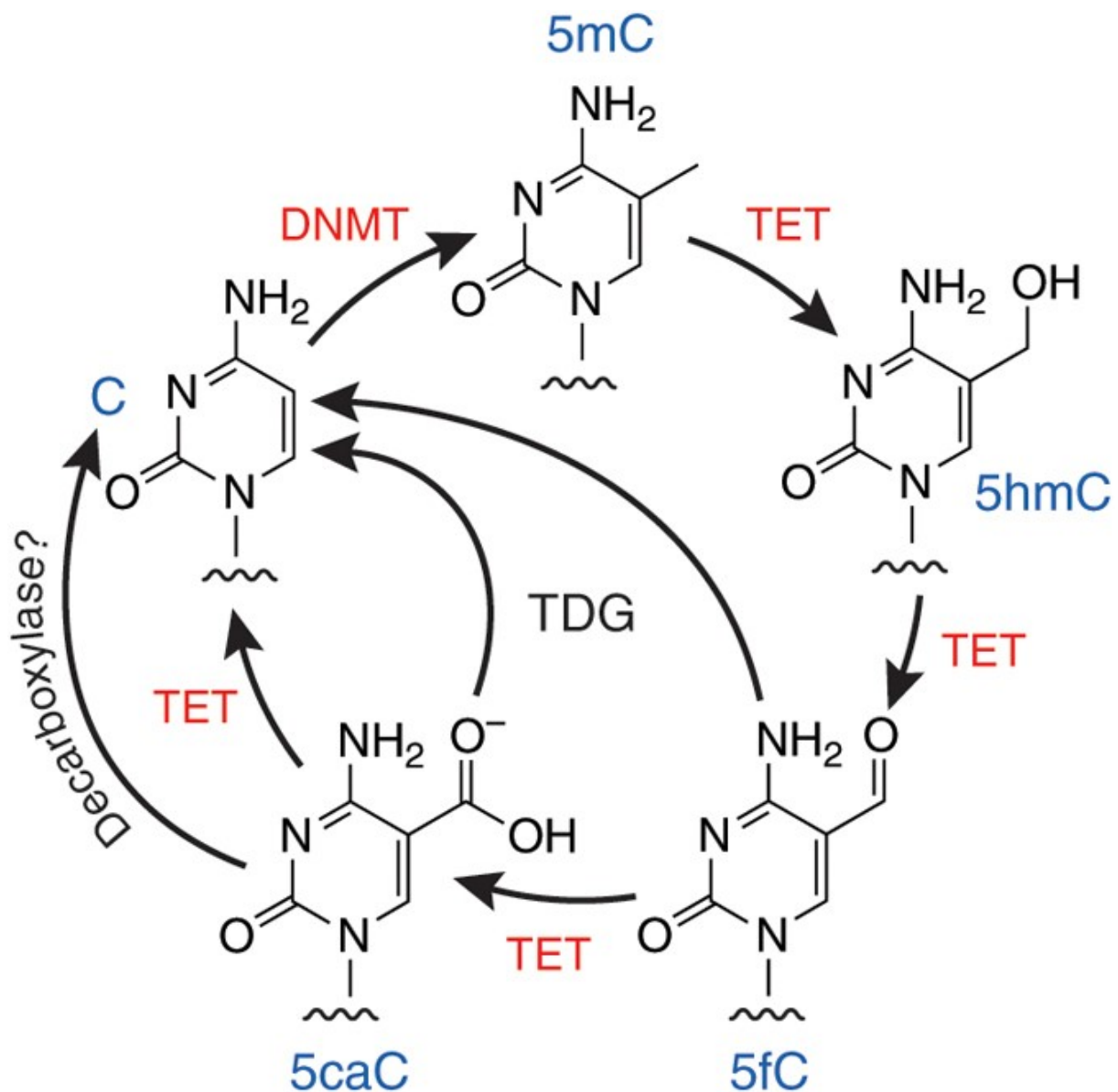


Abb. 2: Methylierung und Demethylierung von Cytosin. Die Methylierung besteht nur aus dem Schritt, in dem Cytosin (C) mittels der DNMT in 5mC überführt wird. Der erste Schritt der Demythylierung besteht darin, dass die TETs 5mC in 5hmC umwandeln und dieses weiter in 5fC. Dieses kann weiter mithilfe der TETs zu 5caC und schließlich zu Cytosin reagieren. In einem alternativen Weg wird 5fC oder 5caC direkt zu Cytosin mittels TDG umgewandelt. Eine Reaktion von 5caC zu Cytosin über eine Decarboxylase ist noch nicht eindeutig erwiesen. (Quelle: Huang und Rao 2012)

so treiben sie die Reaktion von 5fC zu 5-Carboxylcytosin (5caC) voran, welches in einem letzten Schritt wieder von einer Ten-Eleven Translokase zu einfachem Cytosin (C) verarbeitet wird. Aus 5fC oder 5caC kann auch direkt mittels einer Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) Cytosin hergestellt werden. Ein Reaktionsschritt von 5caC zu Cytosin via einer nicht näher bezeichneten Decarboxylase ist in Diskussion, wurde aber bisher noch nicht eindeutig definiert (Huang und Rao 2012).

DNA-Demethylierung kann sowohl global im gesamten Genom als auch an nur bestimmten Genen stattfinden. Eine globale Demethylierung findet beim Menschen im männlichen Pronukleus der Zygote direkt nach der Befruchtung statt. Bei Mäusen hingegen gibt es eine zusätzliche Demethylierung in den Gonozyten (Urkeimzellen) des 8,5 – 11,5 Tage alten Embryos. Diese globalen Demethylierungen haben den Zweck, das gesamte Genom der Zellen des durch Befruchtung neu entstandenen Individuums zurückzusetzen, deaktivierte Gene zu aktivieren und somit eine Totipotenz der Zellen zu erschaffen. Ein Beispiel für eine Locus-spezifische Demethylierung stellt das Imprinting dar (Hackett u. a. 2013).

Fehler in der Methylierung oder Demethylierung von DNA kann zu Krankheiten, wie Tumoren, führen. Durch Hypo- oder Hypermethylierung werden bestimmte Zellzyklus-regulierende Gene aktiviert oder supprimiert (z.B. p53, Retinoblastom-Protein), sodass die betroffene Zelle entartet. Ihr Methylierungsmuster weicht von dem gesunder Zellen ab. Dieses veränderte Methylierungsmuster wird wiederum konstant an Tochterzellen vererbt, sodass diese ebenfalls entarten und so ein Tumorwachstum stattfinden kann (Daura-Oller u. a. 2009). Z.B. bei Leukämie wurde eine Mutation des TET 2 Enzyms beobachtet, was einen niedrigen Anteil an 5hmC zur Folge hat. 5hmC scheint von großer Bedeutung für die Myelopoese zu sein und so kommt es zu Fehlern und überschießenden Reaktionen bei der Ausbildung der betroffenen Blutzellreihen (Ko u. a. 2010).

1.3 5-Hydroxymethylcytosin

Wie bereits beschrieben, stellt das 5hmC ein Intermediat im Prozess der aktiven Demethylierung dar. Es entsteht durch das Hinzufügen einer Hydroxylgruppe an 5mC mit Hilfe eines TET Enzyms als erster Schritt der Demethylierung. Im Gegensatz zu 5mC ist der Spiegel an 5hmC in den Zellen unterschiedlichen Gewebes nicht konstant, sondern variiert. Der größte Anteil an 5hmC an der gesamten DNA einer Zelle ist im zentralen Nervensystem zu finden (Münzel, Globisch, und Carell 2011). Hydroxymethyliertes Cytosin wurde schon vor 40 Jahren entdeckt, geriet in der Zeit danach jedoch erst einmal wieder in den Hintergrund, da man sich dessen eventueller Bedeutung nicht bewusst war und auch keinen großen Wert in dieser modifizierten Nukleobase sah (Penn u. a. 1972).

5hmC unterliegt vor allem in den Stammzellen sowie während der Entwicklung eines Individuums einer dynamischen Regulierung. Hauptaufgabe ist dabei die Generierung von Pluripotenz sowie die anschließende Differenzierung von somatischen Zellen und Keimzellen (Ficz u. a. 2011). Münzel, Globisch, und Carell konnten 2011 zeigen, dass in Zellen von Mäusen vor der Geburt der Gehalt an 5hmC noch niedrig ist, es sich jedoch nach der Geburt verfünffacht und anschließend konstant bleibt. Ob das 5hmC selbst auch Reaktionen auslöst oder doch nur ein Zwischenprodukt der Demethylierung ist, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

1.4 Das STR/ort und C57BL/6 Mausmodell

Bei der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Tiermodelle angewandt, wozu die Mausstämme STR/ort und C57BL/6 genutzt wurden. Tiermodelle sind oftmals unverzichtbar. Sie stellen ein lebendiges Werkzeug zur Untersuchung von grundlegenden physiologischen Zusammenhängen sowie Krankheiten dar. Sie bieten die Möglichkeit auch die frühen ätiologischen Vorgänge der Entstehung von Krankheiten zu erforschen, für die es oft keine Möglichkeit der Untersuchung beim Menschen gibt. Desweiteren sind Tiermodelle unverzichtbar, wenn es darum geht, neue Medikamente sowie Behandlungsmethoden zu etablieren (Hunter und Little 2016). So wurden in dieser Arbeit die beiden oben genannten Mausstämme verwendet, um der Pathogenese von Arthrose nachzugehen.

1.4.1 Der Mausstamm STR/ort

STR/ort Mäuse sind ein gut erforschtes Modell zur Untersuchung von Arthrose, was bis heute in über 80 Studien demonstriert wurde. Der erste Stamm, genannt STR/1N, wurde 1951 im Rahmen eines Zuchtprogrammes zur Identifizierung von Resistenzen bei durch Karzinogeninjektion entstandenen Tumoren entwickelt (Strong 1944). Mäuse dieses Stammes haben eine gesteigerte kortikale und trabekuläre Knochenmasse im Vergleich zu anderen Mausstämmen, wobei die Weibchen nochmal eine größere Knochenmasse haben als die männlichen STR/ort Mäuse. Dieses Phänomen ist assoziiert mit einer erhöhten Anzahl und Funktion der Osteoblasten sowie einer beeinträchtigten Osteoklastenfunktion (Pasold u. a. 2013).

Diese Mäuse entwickeln schon im frühen Lebensalter spontan Arthrose und zeigen dabei viele Charakteristiken, die auch die Arthrose beim Menschen aufweist. Hierzu zählen der Verlust von Proteoglykanen, Fibrillierung des Gelenkknorpels, Degenerierung der extrazellulären Matrix sowie die Bildung von Osteophyten und die subchondrale

Sklerosierung (Staines, Poulet, u. a. 2016). Ebenso können eine verstärkte Proliferation von Chondrozyten, Synovialhyperplasie und Clusterformierung als Versuch der Reparatur gedeutet werden (Poulet u. a. 2014). Die Arthrose entsteht in den Gelenken der Knie, der Knöchel, des Ellenbogens sowie im Temporomandibulargelenk (Walton 1978; Dreessen und Halata 1990; Evans u. a. 1994; Kumagai u. a. 2015). Im Kniegelenk ist die Arthrose vor allem am medialen Tibiaplateau am stärksten ausgeprägt. Es hat sich herausgestellt, dass der Entstehung der Arthrose bei den STR/ort Mäusen unter anderem eine mechanische Komponente zugrunde liegt. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine enge Beziehung zwischen Arthrose und Kreuzbandläsionen, medialer Dislokation der Patella, Kalzifizierung/Ossifikation des medialen Kollateralbandes sowie der lateralen Subluxation des Femur besteht (Walton 1977). Bei den Mäusen konnte ein erhöhter Kollagenmetabolismus sowie eine gesteigerte Aktivität von MMPs im Vergleich zu CBA Mäusen, die nicht spontan Arthrose entwickeln, festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass STR/ort Mäuse von Natur aus schwächere Bänder haben und sich daraus die verstärkte Neigung zu Patelladislokation und einem insgesamt instabileren Gelenk erklären lässt (Jaeger u. a. 2008; Poulet u. a. 2014). Zudem ist das vordere Kreuzband bei STR/ort Mäusen dicker. Trotz normaler Proteoglykan- und Kollagenexpression der Knorpelzellen weisen 85% der Männchen bereits im Alter von 10 Wochen eine veränderte Integrität des vorderen Kreuzbandes auf. Auch die Chondrozyten wandeln ihren Phänotyp und es kommt zu einer gestörten Funktion. Im Alter von 35 Wochen sind diese Veränderungen bereits stark pathologisch (Chambers u. a. 2001; S. Mahr u. a. 2003; Staines, Madi, u. a. 2016). Interessanterweise konnte auch ein epigenetischer Einfluss festgestellt werden. Bei männlichen STR/ort Mäusen im Alter von 26 Wochen gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Arthrose und der Anzahl der Jungtiere der Mutter. Je höher die Zahl der geborenen Tiere je Wurf, desto schwerwiegender die Arthrose. Im Gegenteil dazu ist die Arthrose geringer ausgeprägt, je jünger die Mutter ist (Poulet u. a. 2014).

Desweiteren neigen diese Mäuse mit zunehmendem Alter zur Fettleibigkeit (Sokoloff u. a. 1962). Adipositas zählt zu den Risikofaktoren für Arthrose und könnte daher auch bei den STR/ort Mäusen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Arthrose spielen. STR/ort Mäuse weisen einen höheren Cholesterol- und Phospholipidspiegel im Blut auf als andere Mausstämme, sodass diese Mäuse sowohl an einer Hypercholesterolämie als auch an einer Hyperlipidämie leiden (Uchida u. a. 2009). Der Versuch, das Körpergewicht mittels Fenofibrat zu reduzieren, wirkte sich weder auf die Serumlipide noch den OA Score aus. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der gestörte Fettstoffwechsel keine primäre Ursache für die spontan auftretende Arthrose der STR/ort Mäuse darstellt (Wei u. a. 2014). Auch weisen Tiere mit einem höheren Gewicht keinen erhöhten OA Score auf. Tatsächlich

gibt es eine eher umgekehrte Tendenz, dass Mäuse mit einem geringeren Gewicht einen höheren OA Score aufweisen als schwerere Tiere (Jaeger u. a. 2008).

Im Vergleich zu den weiblichen STR/ort Mäusen entwickeln die Männchen eine deutlich ausgeprägtere Arthrose. Ab der 18. Lebenswoche nimmt die Arthrose bei den männlichen Tieren kontinuierlich zu. Dieser geschlechtsabhängige Dimorphismus ist bei den Mäusen genau gegenteilig ausgeprägt im Vergleich zum Menschen, bei dem im Alter von unter 65 Jahren vor allem die Frauen verstärkt zu Arthrose neigen (Walton 1977; Y. Zhang und Jordan 2010).

1.4.2 Der Mausstamm C57BL/6

C57BL/6 Mäuse sind ein vielfältig verwendeter Inzuchtstamm von Labormäusen. Sie sind der am weitesten verbreitete „genetic background“ von genetisch modifizierten Mäusen bei der Untersuchung von humanen Erkrankungen. Charakteristisch für diese Mäuse ist ein dunkelbraunes, fast schwarzes Fell (Engber und Lithwick 2011). 1921 wurde von C. C. Little der Stamm C57L/BR etabliert und 1937 der Zweig C57BL/6 als 6. Stamm separiert (Mekada u. a. 2009).

Diese Mäuse sind ungewöhnlich empfindlich gegenüber Schmerzen und Kälte. Zudem sind Schmerzmittel bei C57BL/6 Mäusen weniger effektiv als bei anderen Mausstämmen. Im Gegensatz dazu sind sie überdurchschnittlich anfällig für Morphinabhängigkeit, Artherosklerose und altersbedingte Schwerhörigkeit (Mogil u. a. 1999; Crusio u. a. 2013). Eine gesteigerte Neigung zu Arthrose besteht bei diesen Tieren im Unterschied zu den STR/ort Mäusen nicht.

1.4.3 Induktion sekundärer Arthrose bei STR/ort und C57BL/6 Weibchen

Die Tiere des Mausstammes C57BL/6 entwickeln spontan keine primäre Arthrose und auch bei den weiblichen STR/ort Mäusen ist sie sehr viel weniger ausgeprägt als bei den Männchen. Deshalb ist es notwendig, bei diesen Mäusen eine sekundäre Arthrose zu induzieren. Ein häufig hierfür verwendetes Verfahren ist das Durchtrennen des vorderen Kreuzbandes sowie die Entfernung des medialen Meniskus nach Kamekura (Kamekura u. a. 2005). Das vordere Kreuzband stabilisiert das Kniegelenk in mehreren Ebenen und verhindert eine übermäßige Rotation. Die Menisken dienen als Puffer und bewirken, dass die Knorpelflächen von Tibia und Femur nicht direkt aufeinander reiben und zudem eine optimale Verteilung des Drucks herrscht. Beide Funktions- und Schutzmechanismen fallen durch die Operation weg. Es entsteht das klinische Bild der „vorderen Schublade“ (S.

Glasson und Little 2011). Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich von Daniel Thiem gefertigte Paraffinschnitte von operierten und auch nicht operierten Mäusen verwendet, die er ebenfalls für seine Dissertation mit dem Titel „Einfluss des Knochenphänotyps auf die Ausbildung der Gelenkarthrose“ aus dem Jahr 2015 nutzte. In Abbildung 3 sind mit Hämatoxylin/Eosin gefärbte frontale Paraffinschnitte von STR/ort und C57BL/6 Mäusen zu sehen. Jeweils ein linkes Knie, das unbehandelt blieb und ein rechtes Knie, das operiert wurde. Gut zu sehen ist das Fehlen des medialen Meniskus bei den Paraffinschnitten der rechten Knie. Osterberg u. a. konnten 2016 zeigen, dass durch diese Behandlung der OA Score im rechten Knie signifikant höher ist als im linken, nicht operierten Knie (siehe Abbildung 4). Dies gilt für alle vier Gelenkflächen des Knies: Mediale und laterale Femurkondylen sowie mediales und laterales Tibiaplateau. In Abbildung 4 ist desweiteren ersichtlich, dass die medialen Gelenkflächen von Femur und Tibia des rechten, operierten Knies einen signifikant höheren OA Score als die lateralen Gelenkflächen aufweisen. Ohne mediale Menishektomie und Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes unterscheiden sich die medialen und lateralen Gelenkflächen von Femur und Tibia hinsichtlich des OA Scores nicht. Auch gibt es keinen Unterschied zwischen STR/ort und C57BL/6 Maus (Osterberg u. a. 2016).

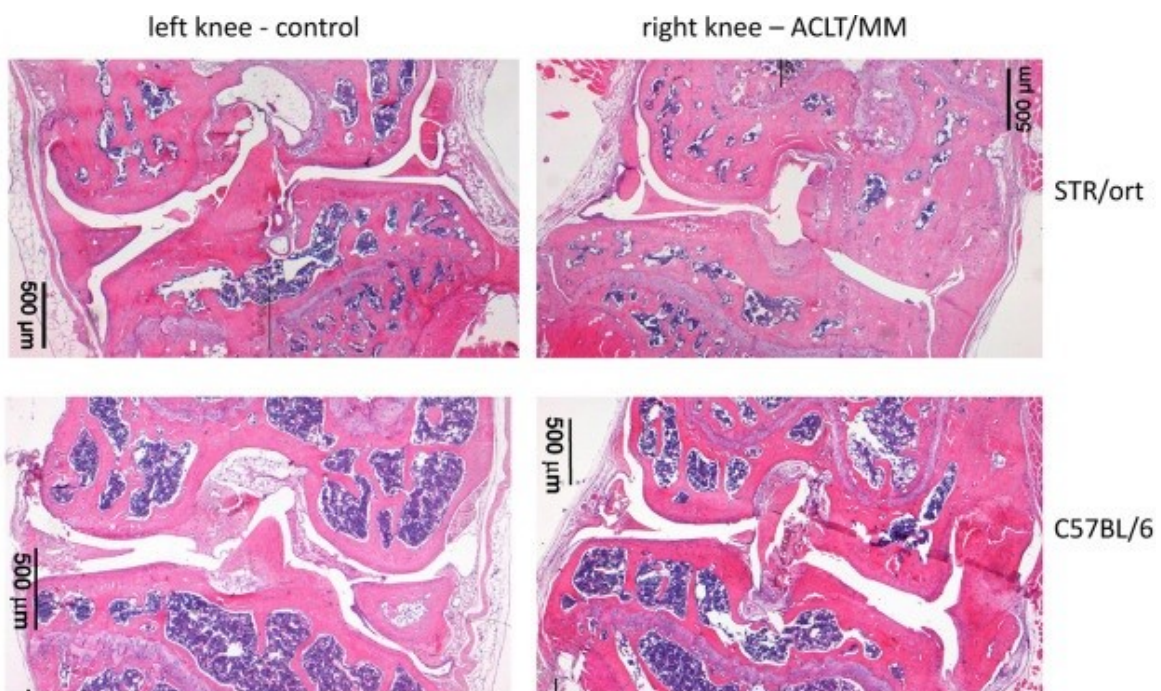


Abb. 3: Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes (anterior cruciate ligament transection, ACLT) und mediale Menishektomie (MM). Hämatoxylin/Eosin gefärbte frontale Paraffinschnitte (5 µm) zeigen linke (unbehandelte) und rechte (ACLT/MM) Knie von STR/ort und C57BL/6 Mäusen. (Quelle: Osterberg u. a. 2016)

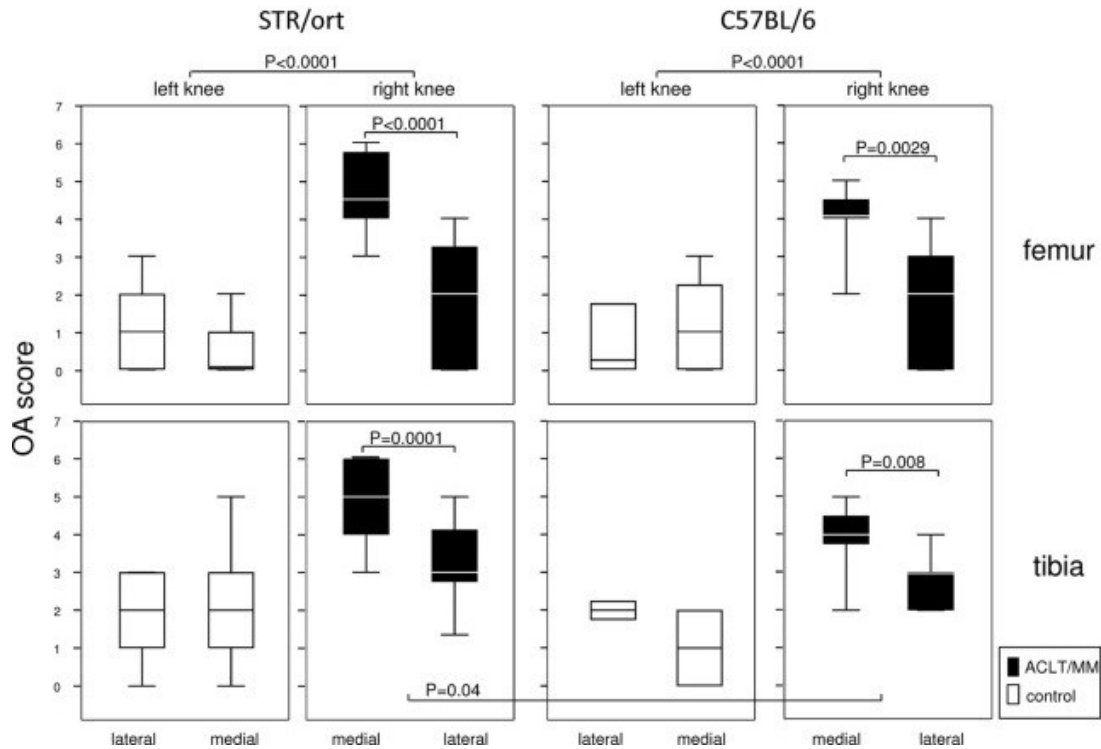


Abb. 4: Schweregrad der Arthrose nach OA-Induktion mittels Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes (anterior cruciate ligament transection, ACLT) in Kombination mit medialer Menishektomie (MM). Die Box-Plots veranschaulichen die OA Scores für linke (unbehandelte) und rechte (ACLT/MM) Knie, unterteilt nach lateralem und medialem tibialen und femoralen Kompartiment. Die Boxen repräsentieren sowohl die Mediane als auch das untere und obere Quartil. Die „Whisker“ markieren das 90. und 10. Perzentil. Es sind die nicht korrigierten P-Werte dargestellt, errechnet mittels Mann-Whitney U-Test. (Quelle: Osterberg u. a. 2016)

1.5 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der Pathogenese der Arthrose. Speziell wird geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Arthrose und der Bildung von 5hmC in der DNA von Knorpelzellen gibt.

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf die Untersuchungen von Taylor u.a. aus den Jahren 2014 – 2016 und knüpft an diese an. Taylor u.a. verglichen 2014 Knorpelzellen von Arthrosepatienten mit Zellen gesunder Probanden hinsichtlich des Anteils an 5hmC. Dabei zeigte sich, dass der 5hmC-Anteil bei den OA Patienten global erhöht war im Vergleich zu den nicht an Arthrose erkrankten Personen. Gleiches galt für die relative mRNA-Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, 3, 9 und 13), welche Knorpelmatrix abbauenden Proteinen entsprechen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich ein vermehrtes Vorhandensein von 5hmC in den Promotoren der Gene, die für die MMP-1 und 3 kodieren. Die Limitation dieser Studie ist im Patientenkreis zu sehen, der größtenteils aus Frauen bestand und über 40 Jahre alt war, wohingegen die Teilnehmer der Kontrollgruppe alle unter 40 Jahre alt und nur zur Hälfte weiblich waren. Somit ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur bedingt vorhanden und wir entschlossen uns eine ähnliche Studie an Versuchstieren durchzuführen, bei denen Alter und Geschlecht besser vergleichbar sind.

5hmC stellt ein Zwischenprodukt des Vorgangs der aktiven Demethylierung dar (siehe Abbildung 2). Durch Demethylierung von Promotoren werden die entsprechenden Gene aktiviert und das Genprodukt, in diesem Fall Matrixmetalloproteinasen, verstärkt gebildet (Roach u. a. 2005; K. Hashimoto u. a. 2009). Somit kann ein gesteigerter Anteil von 5hmC mit Arthrose in Verbindung gebracht werden.

Auf Grundlage dieser Betrachtungen versuchten wir einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Arthrose und dem Anteil an 5hmC im Mausmodell herzustellen. Dazu wurde sowohl ein Modell für primäre als auch eins für sekundäre Arthrose genutzt. Als Modell für die primäre Arthrose dienten männliche STR/ort Mäuse, die mit steigendem Alter spontan eine Arthrose entwickeln. Die sekundäre Arthrose wurde mit weiblichen STR/ort und C57BL/6 Mäusen simuliert, bei denen Arthrose chirurgisch induziert wurde. So ist es möglich, nicht nur einen Zusammenhang zwischen Arthrose und 5hmC herzustellen, sondern es kann untersucht werden, ob es einen Unterschied bei der Bildung von 5hmC zwischen primärer und sekundärer Arthrose gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniak	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific
Eosin	Carl Roth
Essigsäure	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Ethanol 96%, 80%, 70%	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Fast Green	Thermo Fisher Scientific
Fetales Rinderserum 10%	Biochrom
Flüssiger Stickstoff	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Hämalaun	Merck
HCl 37%	Carl Roth
Isofluran 5%	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Kanadabalsam	Carl Roth
Mounting Medium	Carl Roth
NaCl	Braun
Paraffin	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phosphate-Buffered Saline (PSB) pH 7,2 Packs	Thermo Fisher Scientific
Propanol	Apotheke Universitätsklinikum Rostock
Rinderserum-Albumin 1%	Carl Roth
Roti-Histol	Carl Roth
Safranin O	Thermo Fisher Scientific

Tris Base 0,5 M	Sigma Aldrich
Tris-HCl	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypanblau	Gibco
Trypsin	Thermo Fisher Scientific
UseDecalc	Medita

2.1.2 Angefertigte Lösungen

Tab. 2

Lösung	Zusammensetzung
Blocking Buffer	1% BSA, 10% FCS, 0,4% Triton X-100, Aqua dest.
HCl 2N	20% HCl 37%, 80% Aqua dest.
Minimum Essential Medium	10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, Aqua dest.
Permeabilisierungs-Medium	0,4% Triton X-100, PBS, 500ml Aqua dest.
TBS (pH 8,4)	61g Tris Base, 90g NaCl, 25ml HCl, 975ml Aqua dest.
Tris-HCl 100 mM (pH 8,5)	7,88g Tris-HCl, 500ml Aqua dest.

2.1.3 Antikörper und DNA-bindende Moleküle

Tab. 3

Bezeichnung/Reaktivität	Konjugat	Hersteller
α -5hmC	Alexa Fluor 488	Active Motif
α -COX IV	Alexa Fluor 647	Abcam
Anti-mitochondriale	DyLight 650	Universität Rostock, Thermo
Antikörper (AMA)		Fisher
DAPI	-	Molecular Probes

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser	Schott
Deckglas	Thermo Fisher Scientific
Eppendorfröhrchen	Eppendorf
Falcon Tubes 50 ml, 15 ml	Thermo Fisher Scientific
Heißluftschrank	Heraeus
Histologiekassetten	Thermo Fisher Scientific
Inkubator 37°C 5% CO ₂	Heraeus
Konfokales Laser Raster Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss Jena
Lichtmikroskop Axioplan 2 Imager	Carl Zeiss Jena
Mikroliterpipette	Eppendorf
Mikrotom RM2145	Leica
Neubauer Zählkammer	Brand
Objekträger	Thermo Fisher Scientific
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pinzette	Aesculap
Pipette	Braun
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Braun
Pipettierhilfe "Pipetboy"	Integra Biosciences
Rüttelplatte	Hager & Werken
Sicherheitswerkbank Herasafe KS12	Heraeus
Skalpell	Dahlhausen
Feinwaage	Ohaus
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific
Zellslides mit 4 Wells	Nunc
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus

2.2 Versuchstiere und Zellreihen

2.2.1 Versuchstiere

Tab. 5

Mausstamm	Geschlecht	Alter (Monate)	Anzahl	Arthroseinduktion ja/nein
STR/ort	weiblich	9	9	Ja
STR/ort	weiblich	4, 6	13	Nein
STR/ort	männlich	2 – 19	14	Nein
C57BL/6	weiblich	2	5	ja

Als Versuchstiere wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse vom STR/ort Stamm und ausschließlich Weibchen vom C57BL/6 Stamm verwendet, die im Tierhaus der experimentellen Chirurgie der Universität Rostock gezüchtet wurden. Bei den weiblichen Tieren beider Stämme wurde im Alter von 8 Wochen das Kniegelenk zur Induktion einer sekundären Arthrose mittels Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes und medialer Menishektomie destabilisiert (Kamekura u. a. 2005). Ebenfalls wurden weibliche STR/ort Mäuse im Alter von 4 und 6 Monaten verwendet, bei denen keine Arthroseinduktion durchgeführt wurde. Dies gilt auch für die männlichen STR/ort Mäuse, deren Alter zwischen 2 und 19 Monaten lag. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden größtenteils von Daniel Thiem gefertigte Paraffinschnitte von operierten und nicht operierten Mäusen verwendet, die ebenfalls in seiner Dissertation mit dem Titel „Einfluss des Knochenphänotyps auf die Ausbildung der Gelenkarthrose“ aus dem Jahr 2015 Anwendung fanden.

Die Haltung für die Tiere wurde durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern legitimiert (Aktenzeichen: 7221.3-1.1-033/12). Die Versuchstiere wurden in „spezifisch pathogenfreier Haltung“ untergebracht. Die Tiere waren hier einem 20fachen Luftwechsel bei 20°C +/- 2°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% +/- 20% ausgesetzt. Die Beleuchtung der Tierräume fand in einem Licht-Dunkelheit-Wechsel von 12 Stunden bei 200 Lux und einer Dämmerungsphase von 30 Minuten statt.

2.2.2 Zellreihen

Tab. 6

Zelllinie	Spezies	Zelltyp	Morphologie	Kultur	Verdopplungszeit
HELA	Homo sapiens	Zervixcarzinom	Epithelzell-ähnlich (Monolayer)	1-2 x 10 ⁶ Zellen/80 cm ²	48 Stunden
NIH-3T3	Maus (Mus musculus)	Embryonalzellen	Fibroblasten-ähnlich (Monolayer)	1 x 10 ⁴ Zellen/cm ²	20 Stunden

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung der histologischen Schnitte

Als erster Schritt wurden die Versuchstiere mit Isofluran 5% bei einem Sauerstofffluss von 0,8 l/min und einem N₂O-Fluss von 1,6 l/min betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach dem Freipräparieren und Exartikulieren der Femura und Tibiae wurden diese in eine Histologiekassette überführt und für eine Woche in PFA 4% fixiert. Im Anschluss daran fand eine 30-minütige Waschung unter fließendem Leitungswasser mit nachfolgendem Entkalken mittels UseDecalc für 3-5 Tage statt. Dann wurden die Knochen wieder für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend die proximale Hälfte vom Femur und die distale Hälfte von der Tibia entfernt, sodass nur das Kniegelenk mit den angrenzenden halben Knochen übrig blieb. Diese wurden in 70%iges Ethanol überführt und in Paraffin eingebettet. Die so entstandenen Paraffinblöcke mit den darin eingeschlossenen Knochen sowie dem Kniegelenk wurden mit dem Mikrotom in 5 µm dünne Schnitte in der Frontalebene geschnitten. Nach dem Aufbringen der Schnitte auf Objektträger wurden sie in einem Heißluftschank bei 50°C für eine Stunde getrocknet und abschließend nach unterschiedlichen histologischen Protokollen eingefärbt. Einen Teil der für die vorliegende Arbeit verwendeten Paraffinschnitte habe ich nach diesem Protokoll selbst hergestellt. Zum Großteil wurden von Daniel Thiem gefertigte Paraffinschnitte verwendet, die er selbst für seine Dissertation mit dem Titel „Einfluss des Knochenphänotyps auf die Ausbildung der Gelenkarthrose“ aus dem Jahr 2015 nutzte.

2.3.2 Zellkultur

2.3.2.1 Anlegen der Zellkultur

- 1) Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen
- 2) In MEM-Medium übertragen
- 3) Zentrifugieren für 7 Minuten bei 300 U/min
- 4) Überstand entfernen
- 5) MEM-Medium hinzugeben
- 6) Zelldichte erfassen mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau
- 7) Entsprechend der vorgegebenen Zelldichte in Zellkulturflaschen (75 cm²) aussäen
- 8) 15 ml MEM-Medium hinzufügen
- 9) Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂

2.3.2.2 Zellkultur splitten

- 1) MEM-Medium entfernen
- 2) PBS hinzufügen und wieder entfernen (Waschen)
- 3) 3 ml Trypsin hinzugeben
- 4) Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂ für 3 Minuten
- 5) 17 ml MEM-Medium hinzufügen
- 6) Zellsuspension in Falcon-Tubes überführen
- 7) Zentrifugieren für 7 Minuten bei 300 U/min
- 8) Überstand entfernen
- 9) 10 ml MEM-Medium hinzufügen
- 10) Zelldichte erfassen mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau
- 11) Entsprechend der vorgegebenen Zelldichte in Zellkulturflaschen (75 cm²) aussäen
- 12) 15 ml MEM-Medium hinzufügen
- 13) Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂

2.3.2.3 Zellen in Slides mit 4 Wells zur histologischen Färbung umbetten

- 1) MEM-Medium entfernen
- 2) PBS hinzufügen und wieder entfernen (Waschen)
- 3) 3 ml Trypsin hinzugeben
- 4) Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂ für 3 Minuten
- 5) 17 ml MEM-Medium hinzufügen
- 6) Zellsuspension in Falcon-Tubes überführen
- 7) Zentrifugieren für 7 Minuten bei 300 U/min
- 8) Überstand entfernen
- 9) 10 ml MEM-Medium hinzufügen
- 10) Zelldichte erfassen mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau
- 11) Entsprechend der vorgegebenen Zelldichte in Wells aussäen
- 12) Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂ für 72 Stunden
- 13) MEM-Medium entfernen
- 14) PBS hinzufügen und wieder entfernen (Waschen)
- 15) Fixieren mit PFA 4% für 30 Minuten
- 16) PFA entfernen
- 17) PBS hinzufügen und wieder entfernen (Waschen)
- 18) Histologische Färbung

2.3.3 Histologische Färbung

2.3.3.1 Entparaffinieren, Wässern und Entwässern

Nur für Paraffinschnitte. Bei den Slides der Zellkultur entfällt dieser Schritt.

Färbeprotokoll gemäß Herstellerangaben „merck-KGaA“.

Arbeitsschritt	Dauer
-----------------------	--------------

1) Entparaffinieren

- | | |
|-------------------|--------|
| a) Roti-Histol I | 10 min |
| b) Roti-Histol II | 10 min |

2) Wässern

- | | |
|------------------|-------|
| a) Propanol I | 5 min |
| b) Propanol II | 5 min |
| c) Ethanol 96% | 5 min |
| d) Ethanol 80% | 5 min |
| e) Ethanol 70% | 5 min |
| f) Aqua dest. I | 5 min |
| g) Aqua dest. II | 5 min |

3) Entwässern

- | | |
|---|-----------------|
| a) Ethanol 70% +
1 Tropfen NH ₃ | kurz eintauchen |
| b) Ethanol 80% | 5 min |
| c) Ethanol 96% | 5 min |
| d) Propanol I | 5 min |
| e) Propanol II | 5 min |
| f) Roti-Histol I | 5 min |
| g) Roti-Histol II | über Nacht |

2.3.3.2 Immunhistochemische Färbung von 5hmC

Färbeprotokoll gemäß Taylor u. a. 2014.

Arbeitsschritt	Dauer
1) Entparaffinieren	s.o.
2) Wässern	s.o.
3) Permeabilisieren mit Triton X-100 0,4%	15 min
4) Denaturieren mit HCl 2N	15 min
5) Neutralisieren mit Tris-HCl 100 mM (pH 8,5)	10 min
6) Blocken in PBS mit BSA, FCS, Triton X-100	60 min
7) α -5hmC (1:100)	über Nacht
8) Spülen	
a) TBS I	5 min
b) TBS II	5 min
9) α -Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:250)	60 min
10) Spülen	
a) TBS I	5 min
b) TBS II	5 min
11) DAPI (1:1000)	15 min

12) Spülen

- a) TBS I 5 min
- b) TBS II 5 min
- c) Leitungswasser I 30 s
- d) Leitungswasser II 30 s
- e) Leitungswasser III 30 s
- f) Leitungswasser IV 30 s
- g) Aqua dest. 5 min

13) Eindecken mit

Mounting Medium über Nacht

2.3.3.3 Histologische Knorpelgewebsfärbung

Färbeprotokoll gemäß Herstellerangaben „merck-KGaA“.

Arbeitsschritt	Dauer
1) Entparaffinieren	s.o.
2) Wässern	s.o.
3) Kernfärbung mit Hämalaun	30 s
4) Bläuen	
a) Fließendes H ₂ O	30 s
b) Aqua dest.	5 min
5) Plasmafärbung	
a) Fast Green	15 min
b) Essigsäure	15 s
c) Aqua dest.	kurz eintauchen
6) Knorpelfärbung	
a) Safranin O	1 min
b) Aqua dest.	kurz eintauchen
6) Entwässern	
7) Eindecken mit Kanadabalsam	über Nacht

2.3.3.4 Histologische Bindegewebsfärbung

Färbeprotokoll gemäß Herstellerangaben „merck-KGaA“.

Arbeitsschritt	Dauer
1) Entparaffinieren	s.o.
2) Wässern	s.o.
3) Kernfärbung mit Hämalaun	30 s
4) Bläuen	
a) Fließendes H ₂ O	30 s
b) Aqua dest.	5 min
5) Plasmafärbung mit	
a) Eosin	2 min
b) Aqua dest.	kurz eintauchen
6) Entwässern	
7) Eindecken mit Kanadabalsam	über Nacht

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS Statistics® (Version 22) von IBM® verwendet. Nach einer Prüfung auf Normalverteilung, wurden die Signifikanzen mit einem Mann-Whitney-U-Test bzw. einem gepaarten/ungepaarten t-Test erhoben. Ebenfalls mit dieser Software wurden die Korrelationen nach Spearman bzw. Pearson berechnet. Ab einem P-wert von $< 0,05$ wurde ein Ergebnis als signifikant bezeichnet. Signifikanzniveaus $< 0,05$ sind mit einem * gekennzeichnet, Signifikanzniveaus $< 0,01$ mit **.

Sämtliche Abbildungen wurden sowohl mit SPSS Statistics® (Version 22) von IBM® als auch mit GraphPad Prism® (Version 7) von GraphPad Software® erstellt.

Für die Erstellung und Auswertung der mikroskopischen Bilder wurde die Software Zen 2011® von Carl Zeiss® verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Zielstellung und experimentelles Design

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Veränderung von 5hmC bei an primärer und sekundärer Gonarthrose erkrankten Mäusen zu analysieren. Als Beispiel für eine primäre Arthrose dienen männliche Mäuse eines STR/ort Stammes, die spontan eine Arthrose entwickeln. Als Beispiel für die sekundäre Arthrose wurden weibliche Tiere desselben Stammes und eines C57BL/6 Stammes genutzt, bei denen die Arthrose chirurgisch mittels medialer Meniskektomie sowie Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes induziert wurde. Um das Auftreten des 5hmC bei unterschiedlichen Mausstämmen sowie nach verschiedener Induktion der Arthrose zu analysieren, wurden verschiedene Methoden angewandt (Abbildung 5). Zum einen war dies die Ermittlung des OA Scores der einzelnen Gelenkflächen, zum anderen musste die Darstellung des 5hmCs mittels einer immunhistochemischen Färbung etabliert werden. Auf Grundlage dessen konnte das 5hmC bei unterschiedlich stark ausgeprägter Arthrose untersucht werden. Hierzu zeigten sich zwei Methoden auf: Einerseits die quantitative Ermittlung des prozentualen Anteils aller 5hmC-positiven Chondrozyten und andererseits eine qualitative Auswertung, die die Intensität des 5hmC-Signals in den einzelnen Zellkernen sowie die Verteilung des 5hmCs in verschiedenen Kompartimenten (Zellkern und Mitochondrien) untersucht. Beide Methoden wurden sowohl

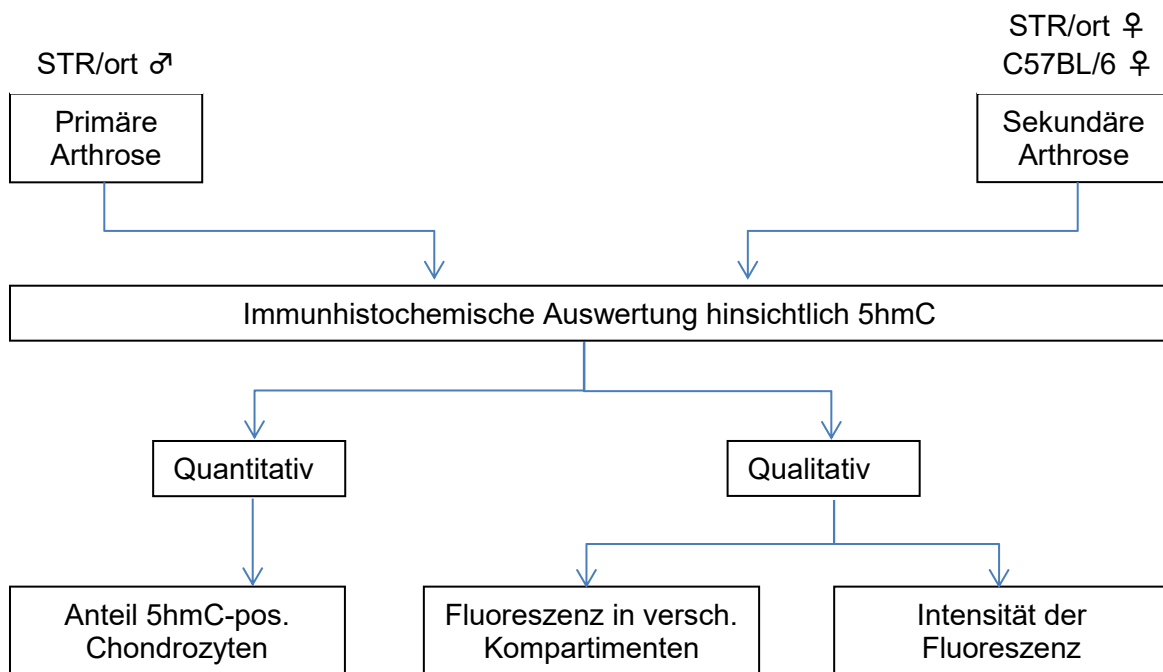


Abb. 5: Experimentelles Design. Die Kniegelenkflächen von Mäusen verschiedener Stämme mit primärer oder sekundärer Arthrose wurden hinsichtlich des 5hmC sowohl anhand quantitativer als auch qualitativer Parameter immunhistochemisch untersucht.

Tab. 7

OA Score	Osteoarthrotischer Schaden
0	Keiner
0,5	Verlust von Safranin-O ohne strukturellen Schaden
1	Kleine Abfaserungen ohne Verlust von Knorpel
2	Vertikale Spalten bis zur Schicht unmittelbar unterhalb der oberflächlichen Schicht und etwas Verlust der oberflächlichen Schicht
3	Vertikale Spalten/Erosionen bis zum kalzifizierten Knorpel bis <25% der Gelenkfläche
4	Vertikale Spalten/Erosionen bis zum kalzifizierten Knorpel bis 25-50% der Gelenkfläche
5	Vertikale Spalten/Erosionen bis zum kalzifizierten Knorpel bis 50-75% der Gelenkfläche
6	Vertikale Spalten/Erosionen bis zum kalzifizierten Knorpel ab >75% der Gelenkfläche

Quelle: Glasson u. a. 2010

bei weiblichen STR/ort und C57BL/6 Mäusen mit sekundärer Arthrose angewandt sowie bei dem männlichen STR/ort Mausstamm mit primärer Arthrose. Da neben dem Zellkern auch Mitochondrien DNA enthalten, war zu erwarten, dass auch in diesen 5hmC angefärbt wird. Um dies nachzuweisen, wurden verschiedene Antikörper gegen Mitochondrien zusammen mit denen gegen 5hmC getestet sowie eine Zellkultur aus murinen Fibroblasten (3T3 Zellen) und humanen Epithelzellen (HeLa Zellen) angelegt.

3.2 Etablierung von Methoden

3.2.1 Bestimmung des OA Scores

Um den Grad der Arthrose bei jedem Knie zu bestimmen, wurden die Paraffinschnitte zunächst mit Safranin-O und Fast Green gefärbt. Safranin-O hat eine rote Farbe und bindet spezifisch an Proteoglykane im Knorpel, sodass es diesen darstellt. Je intensiver das rot, desto höher ist der Anteil an Proteoglykanen. Eine hellrote bis weiße Fläche hat somit nur einen sehr geringen Anteil an Proteoglykanen und stellt damit einen nicht mehr intakten, arthrotischen Knorpel dar. Fast Green färbt im Gegenzug alle nicht Proteoglykan-haltigen Strukturen grün an und stellt somit einen guten Kontrast zum mit Safranin-O gefärbten Knorpel dar (siehe Abbildung 6). Um den OA Score zu bestimmen, wurde die Qualität der Safranin-O-Färbung beurteilt sowie die Beschaffenheit der mit Safranin-O gefärbten Strukturen.

Dabei orientierte man sich an einem Scoring-System, dass von Glasson u. a. empfohlen wurde. Die verschiedenen OA Scores sind in Tabelle 7 dargestellt. Das Scoring-System reicht von Grad 0 bis Grad 6, wobei Grad 0 einem gesunden Knorpel entspricht und bei Grad 6 über 75% der Knorpeloberfläche zerstört sind. Die Grade 0,5 bis 5 reihen sich

entsprechend Tabelle 7 dazwischen ein. Diese Technik erlaubt es, jeder der 4 Gelenkflächen des Knies (mediale Femurkondyle, laterale Femurkondyle, mediales Tibiaplateau, laterales Tibiaplateau) einen OA Score zuzuweisen.

In Abbildung 6 sind frontale Schnitte der Gelenkflächen der Femurkondylen (jeweils kranial) und des Tibiaplateaus (jeweils kaudal) mit verschiedenen OA Scores zu sehen. Abbildung 6 A zeigt den Arthrosegrad 0, B Grad 2, C Grad 5 und D Grad 6. Alle Paraffinschnitte wurden mit Safranin-O und Fast Green gefärbt, unter dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet und der OA Score nach Tabelle 7 bestimmt.

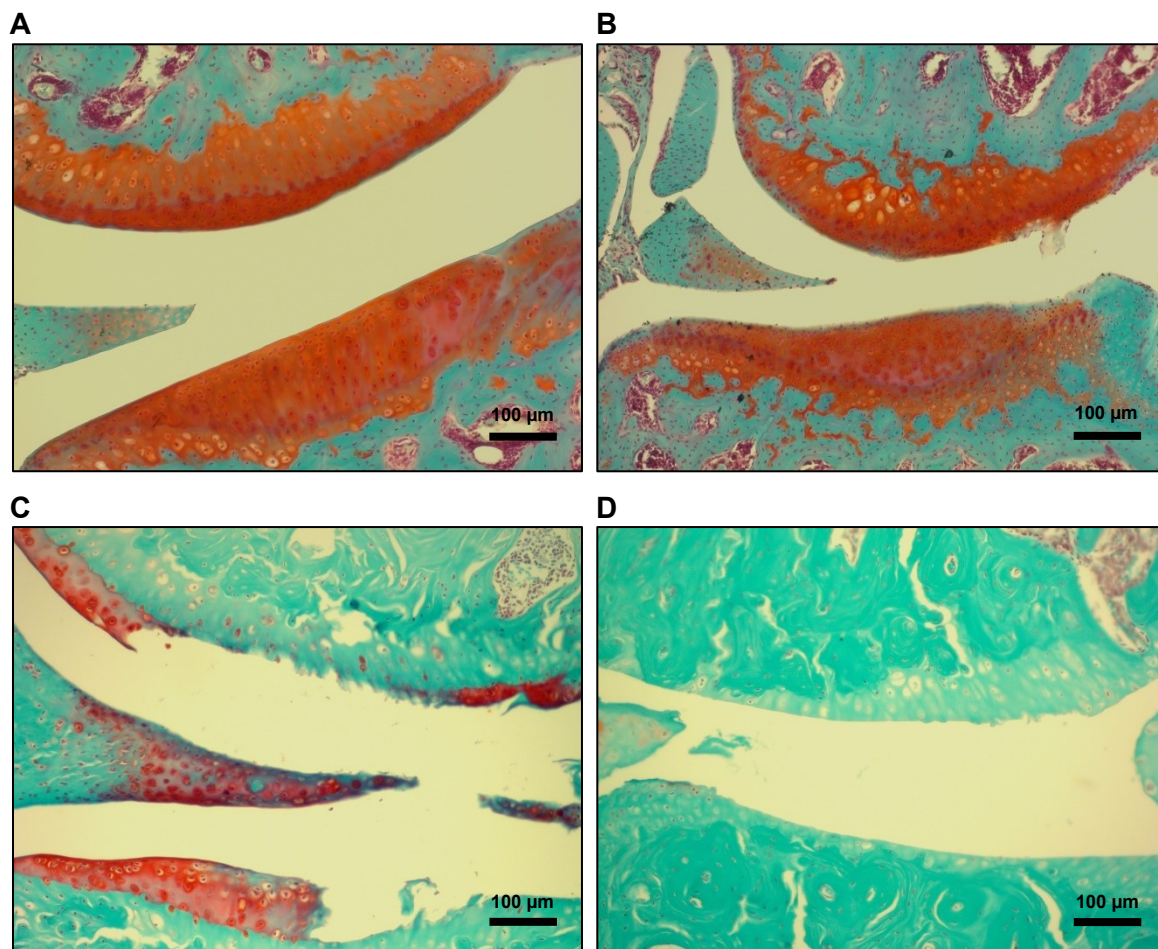


Abb. 6: Beispielhafte Darstellung von OA Scores. Mit Fast Green/Safranin-O gefärbte frontale Paraffinschnitte von Kniegelenken. Jeweils kranial ist die Femurkondyle zu sehen und kaudal das Tibiaplateau. Vergrößerung 100fach. **(A)** OA Score = 0. **(B)** OA Score = 2. **(C)** OA Score = 5. **(D)** OA Score = 6.

3.2.2 Immunhistochemische Färbung

3.2.2.1 5hmC im Zellkern

Um das 5hmC in den Zellkernen der Paraffinschnitte sichtbar zu machen, wurden drei verschiedene Reagenzien verwendet: 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zum Anfärben der DNA mit einer blauen Fluoreszenz sowie ein primärer Antikörper gegen 5hmC und ein sekundärer Antikörper, der an den primären Antikörper bindet und mit einer grünen Fluoreszenz beladen ist. DAPI stellt somit die Zellkerne jeder einzelnen Zelle dar. Eine reine

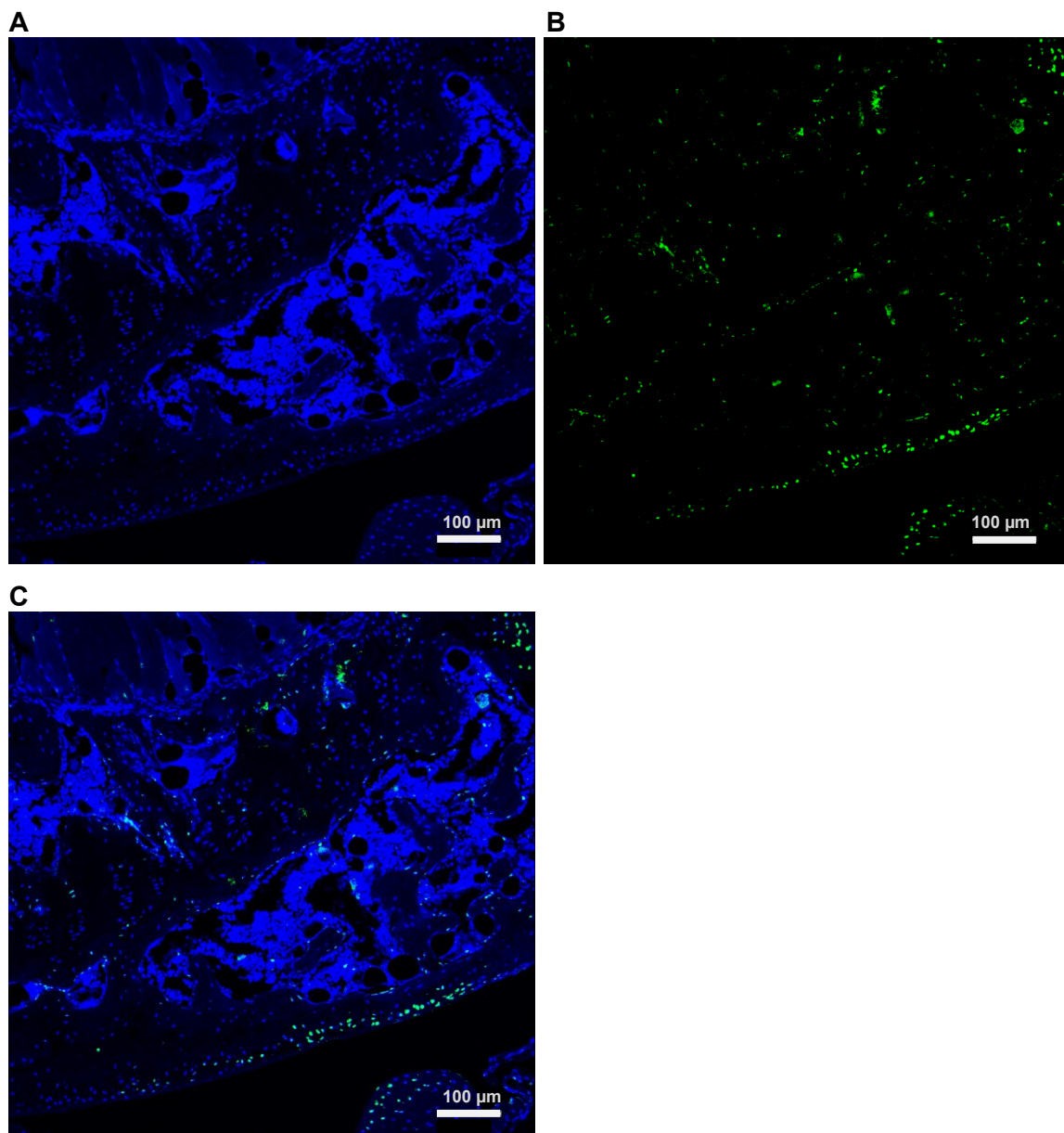


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung von frontalen Paraffinschnitten. Vergrößerung 100fach. **(A)** Kernfärbung mit DAPI. **(B)** Färbung von 5hmC mittels primärem Antikörper und sekundärem Antikörper Garb488. **(C)** Überlagerung von A und B.

DAPI-Färbung ist in Abbildung 7 A dargestellt. Der primäre Antikörper gegen 5hmC stammt vom Kaninchen, der sekundäre vom Typ IgG (Garb Alexa 488) stammt von der Ziege und ist gegen Kaninchen gerichtet (Garb = goat anti-rabbit antibody). Er hat sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 495$ nm und sein Emissionsmaximum bei $\lambda = 519$ nm. Die sichtbare Fluoreszenz ist cyan-grün, welches im Bereich der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm liegt („Alexa 488“; „The Alexa Fluor Dye Series—Note 1.1“ 2016). In Abbildung 7 B ist eine Färbung desselben Ausschnitts wie in 7 A mit primärem und sekundärem Antikörper gegen 5hmC dargestellt. Abbildung 7 C zeigt eine Überlagerung der Bilder A und B und somit eine simultane Darstellung von Zellkernen (DNA) und 5hmC.

Um die Bindungsaffinität des sekundären Antikörpers zu überprüfen, wurde das Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Färbung derart abgewandelt, dass anstelle des primären Antikörpers gegen 5hmC nur eine Pufferlösung auf den Objektträger gegeben wurde und anschließend der sekundäre Antikörper. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war so kein 5hmC-typisches Signal sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass der sekundäre Antikörper sehr spezifisch an den primären Antikörper bindet und nicht zusätzlich an andere Strukturen, sodass das Ergebnis verfälscht sein könnte. Abbildung 8 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder dieser Negativkontrolle. Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme eines Knies einer weiblichen STR/ort Maus. Die Bilder 8 A und B sind durch Zugabe der Pufferlösung anstatt des primären Antikörpers entstanden. Es sind sowohl bei der 200fachen (A) als auch bei der 630fachen (B) Vergrößerung keine Strukturen mit einer 5hmC-spezifischen Fluoreszenz sichtbar. Die Bilder 8 C und D sind serielle Schnitte von A und B. Hier wurde der primäre Antikörper verwendet, sodass der sekundäre Antikörper binden konnte und man 5hmC-spezifische Signale in den Zellkernen sehen kann. Demnach lag bei der Anfertigung der Bilder A und B auch kein Defekt des sekundären Antikörpers vor.

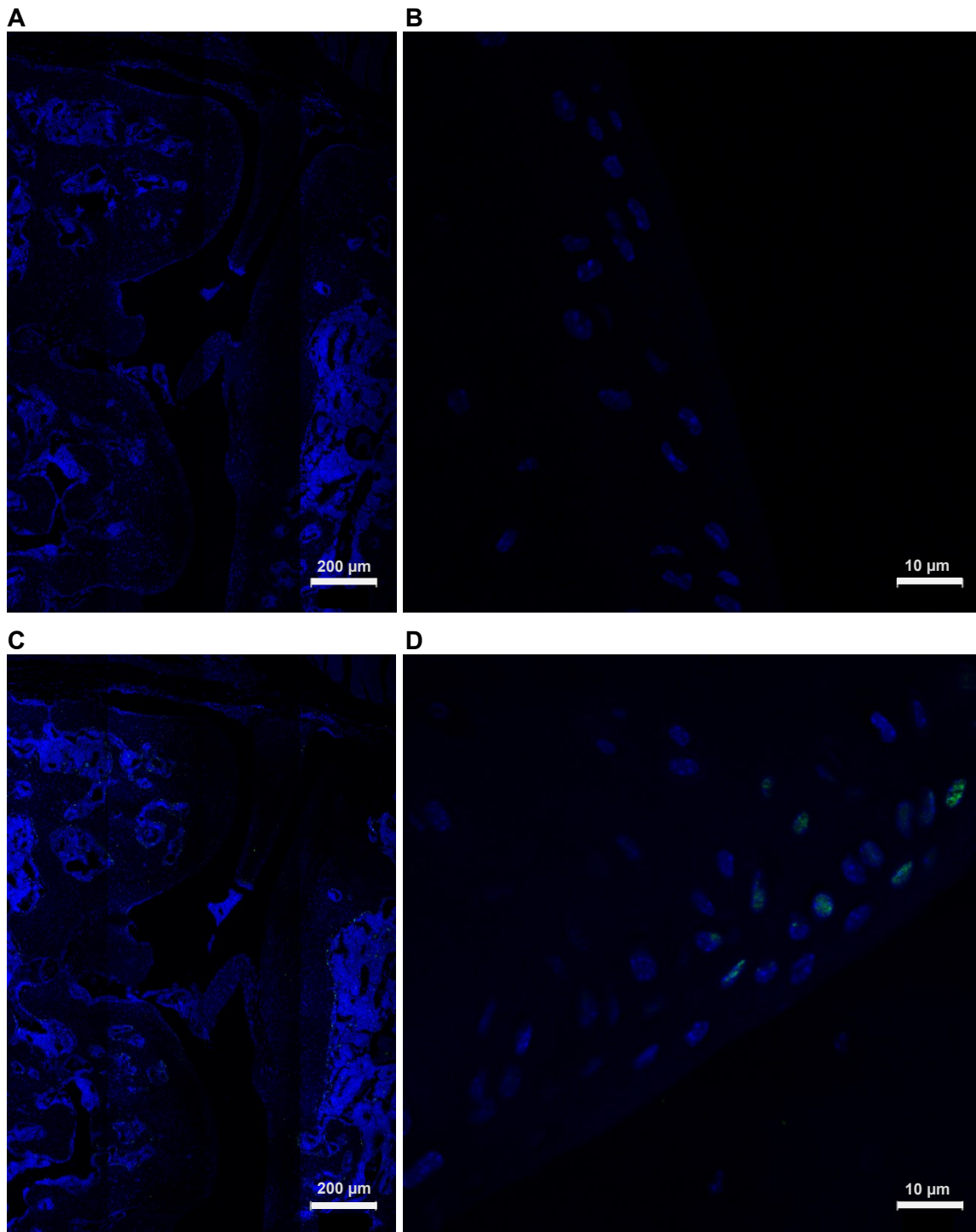


Abb. 8: Negativkontrolle zur Überprüfung der Bindungsaffinität des sekundären Antikörpers Garb488. A und C Vergrößerung 200fach als Übersichtsaufnahme, B und D 630fach. **(A, B)** Ohne den primären Antikörper gegen 5hmC bindet der sekundäre Antikörper Garb488 nicht und es ist kein 5hmC-spezifisches Signal zu empfangen. **(C, D)** Mit dem primären Antikörper bindet der sekundäre Antikörper spezifisch an das 5hmC im Kern und eine für 5hmC typische Fluoreszenz ist sichtbar.

3.2.2.2 5hmC in Mitochondrien

Einige der dargestellten Knorpelzellen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop ein 5hmC-Signal sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (siehe Abbildung 9 A und B). Mögliche Zielstruktur für eine Bindung des Antikörpers gegen 5hmC außerhalb des Zellkerns sind die Nukleinsäuren enthaltenden Mitochondrien. Um zu überprüfen, ob die durch Färbung aufleuchtenden extranukleären Strukturen tatsächlich Mitochondrien sind, verwendeten wir ein humanes Patientenserum, welches anti-mitochondrialen Antikörper (AMA) enthält sowie einen sekundären Antikörper mit einer roten Fluoreszenz gegen diesen. Wie auf Abbildung 10 zu sehen ist, gab es kein für Mitochondrien spezifisches Fluoreszenzsignal. Ein Urteil über das eventuelle Vorkommen von 5hmC in mitochondrialer DNA war somit nicht möglich. Daraufhin verwendeten wir einen spezifisch gegen Komplex IV der Atmungskette gerichteten Antikörper sowie einen mit rotem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper gegen diesen. Komplex IV befindet sich in der inneren Membran von Mitochondrien (Schartl u.a. 2013). Somit ist es möglich, mit diesem Antikörper spezifisch Mitochondrien nachzuweisen. Allerdings zeigte sich hier das gleiche Problem wie bei den AMAs: es gab kein für Mitochondrien spezifisches Fluoreszenzmuster. Das fluoreszenzmikroskopische Bild ähnelte dem in Abbildung 10, welches die Färbung mit den AMAs zeigt.

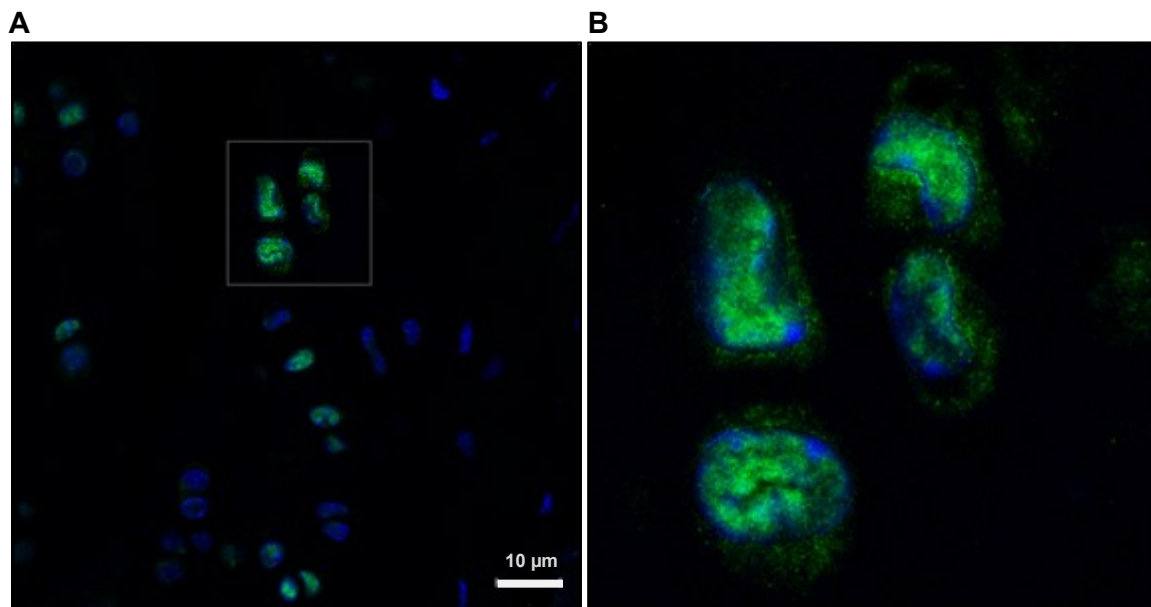


Abb. 9: 5hmC im Zytoplasma von Chondrozyten. (A) Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten von weiblichen STR/ort Mäusen. Blau entspricht DNA (Zellkern), grün 5hmC. Vergrößerung 630fach. **(B)** Nochmals vergrößerter Ausschnitt aus A. Auffällig ist, dass auch im Bereich des Zytoplasmas um den Kern herum eine für 5hmC spezifische Fluoreszenz sichtbar ist.

Da nun bei zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Mitochondrien kein spezifisches Signal sichtbar war, wurde die komplette Arbeitsstrecke überdacht und sukzessive ausgetestet. Möglich wäre, dass die Konzentration der AMA oder des sekundären Antikörpers zu niedrig gewählt wurde, dass bei einer gleichzeitigen Färbung von Mitochondrien und 5hmC die verwendeten Antikörper interferieren oder auch die Art der Fixierung mit Paraformaldehyd, die Einbettung in Paraffin, das Entparaffinieren der Schnitte mit Roti[®]-Histol, das Wässern mit einer absteigenden Alkoholreihe oder das Denaturieren der DNA mit Salzsäure. Daher wurde zunächst geprüft, die Antikörper gegen 5hmC und Mitochondrien nicht simultan zu verwenden, sondern nacheinander auf die Paraffinschnitte zu geben. Als nächstes wurde die Konzentration des sekundären Antikörpers gegen die AMA von 1:500 auf 1:100 erhöht, was jedoch nur zu noch mehr unspezifischen Bindungen führte. Auch eine stärkere Verdünnung auf 1:1000 brachte keinen Erfolg, hier war keine Fluoreszenz mehr sichtbar. Ferner schlugen Kombinationen mit einer AMA-Konzentration zwischen 1:20 und 1:10000 fehl. Als weiterer Schritt wurde die Behandlungszeit mit Salzsäure verkürzt, aber auch dies führte zu keiner Veränderung. Auch wurden die Schritte des Färbeprotokolls „Permeabilisieren mit Triton X-100“, „Neutralisieren mit Tris-HCl“ und „Blocken mit der PBS-Lösung“ ganz weggelassen, was jedoch keine Veränderung mit sich brachte. Als nächste Abwandlung wurde ein anderer Antikörper verwendet. Dieser richtete sich gegen Komplex IV der Atmungskette. Aber auch alle eben beschriebenen Versuche mit diesem neuen Antikörper blieben erfolglos. Deshalb erschien es sinnvoll, eine Zellkultur anzulegen, die man auf einem Objektträger kultivieren kann, um an diesen Zellen die AMAs auszuprobieren. Zur Anwendung kamen humane HeLa

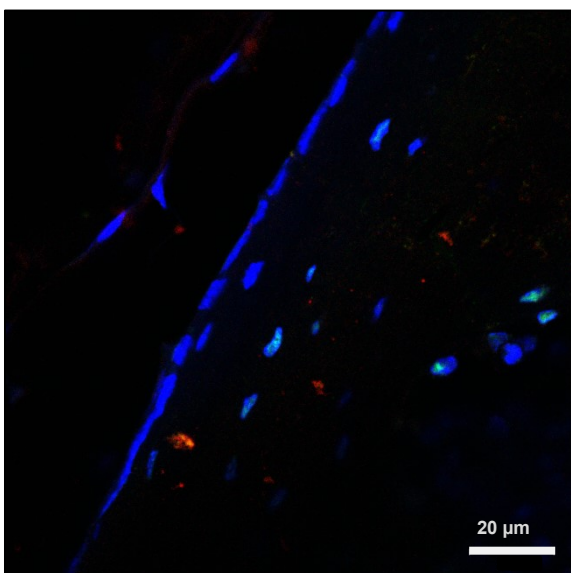


Abb. 10: Nachweis von Mitochondrien in Chondrozyten mittels AMA. Zusätzlich zu DAPI (blau) und den Antikörpern gegen 5hmC (grün) wurde der Paraffinschnitt des Kniegelenks einer weiblichen STR/ort Maus mit einem Antikörper gegen Mitochondrien sowie einem sekundären Antikörper mit roter Fluoreszenz gefärbt. Es ist keine spezifische Bindung dieses Antikörpers erkennbar. Vergrößerung 630fach.

Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und murine 3T3 Zellen (Fibroblasten; Ncayiyana 2011, Hsueh u. a. 2016). Diese Zellen wurden auf dem Objektträger mit Paraformaldehyd fixiert, jedoch nicht in Paraffin eingebettet. Sie wurden nach dem im Methoden-Teil beschriebenen Protokoll mit AMA gefärbt, was auch umgehend gelang. Man konnte spezifische, granulär-filamentöse Fluoreszenzen im Zytoplasma erkennen, die Mitochondrien entsprachen. Da der einzige Unterschied bei diesen Zellen im Vergleich zu den Knorpelschnitten darin bestand, dass die Schnitte in Paraffin eingebettet wurden und die Zellen auf dem Objektträger nicht, ließ sich schlussfolgern, dass es wahrscheinlich ist, dass das Nicht-Binden der AMA an der Einbettung in Paraffin liegt. Es wäre möglich, dass das Paraffin wichtige Antigene der AMA blockiert und so diese nicht an die Mitochondrien binden können. Auch eine simultane Färbung von 5hmC war erfolgreich.

Eine Färbung mit dem Antikörper gegen Komplex IV der Atmungskette war nicht nötig, da die AMA-Färbung direkt erfolgreich war. Abbildung 11 zeigt eine granulär-filamentöse Fluoreszenz im Zytoplasma bei den 3T3 Zellen, welche Mitochondrien entspricht. Allerdings wurde hier die 5hmC-Färbung nicht durchgeführt, d.h. es wurden nur DAPI und AMA angewendet. Auf den Bildern 9 A und B ist eine 5hmC-Färbung von Chondrozyten dargestellt, bei denen das 5hmC-Signal nicht nur im Zellkern sondern auch im Zytoplasma erkennbar ist. Vergleicht man nun die Fluoreszenzmuster der Zellen in Abbildung 9 B und in Abbildung 11, so sehen sie auf den ersten Blick unterschiedlich aus. Die Chondrozyten in 9 B zeigen eine fein gesprenkelte Fluoreszenz des 5hmCs sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und die 3T3 Zellen in 11 eine granulär-filamentöse, für Mitochondrien typische

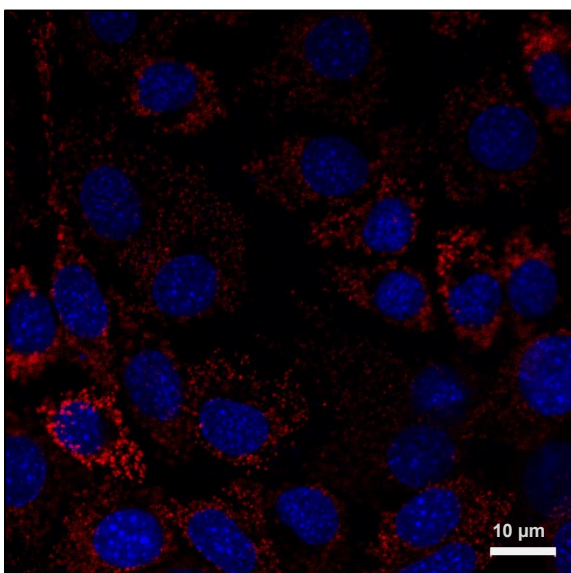


Abb. 11: Mitochondrien in 3T3 Zellen. Immunhistochemische Färbung von 3T3 Zellen. Blau entspricht DNA (Zellkern), rot Mitochondrien. Das für Mitochondrien typische Signal zeigt eine granulär-filamentöse Fluoreszenz im Zytoplasma. Vergrößerung 630fach.

Fluoreszenz allein im Zytoplasma. Betrachtet man lediglich die Fluoreszenzen im Zytoplasma in den Abbildungen 9 B und 11 (die Zellkerne lässt man außer Acht), so kann man schlussfolgern, dass sich die extranukleäre Fluoreszenz von 5hmC aus 9 B in Mitochondrien befindet, die in Abbildung 11 granulär-filamentös dargestellt sind. Dieses Ergebnis unterstützt die simultane Färbung von 5hmC und Mitochondrien mittels AMA bei HeLa Zellen in Abbildung 12. Hier wurden 5hmC und Mitochondrien simultan dargestellt. Erkennbar ist, dass die 5hmC-Signale außerhalb des Kerns sich im Bereich der angefärbten Mitochondrien befinden. Jedoch ist auffällig, dass sich gerade die für 5hmC spezifische Fluoreszenz dieser Abbildung sehr von der in Abbildung 9 A und B unterscheidet. Sie ist insgesamt weniger vorhanden. Dieser Unterschied kann durch die verschiedenen Zellarten – murine Chondrozyten und humane HeLa Zellen – zustande kommen, aber auch durch den Umstand, dass in Abbildung 9 A und B in den Chondrozyten das 5hmC allein angefärbt wurde und in Abbildung 12 5hmC und Mitochondrien gemeinsam, sodass sich die Antikörper eventuell gegenseitig beeinflusst haben und so weniger 5hmC dargestellt wurde. Allerdings ist in Abbildung 12 B auch zu erkennen, dass nur einige Mitochondrien positiv für 5hmC sind und es auch Zellen gibt, die gar kein 5hmC besitzen, weder im Zellkern noch im Zytoplasma (siehe Abbildung 12 A). Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen bei den Chondrozyten der Kniegelenkflächen. Dort zeigte nur ein geringer Teil der Knorpelzellen ein 5hmC-Signal außerhalb des Zellkerns und es gab auch Knorpelzellen, die gar kein 5hmC besaßen. Somit lässt auch dieses Ergebnis den Rückschluss zu, dass sich in mitochondrialer DNA

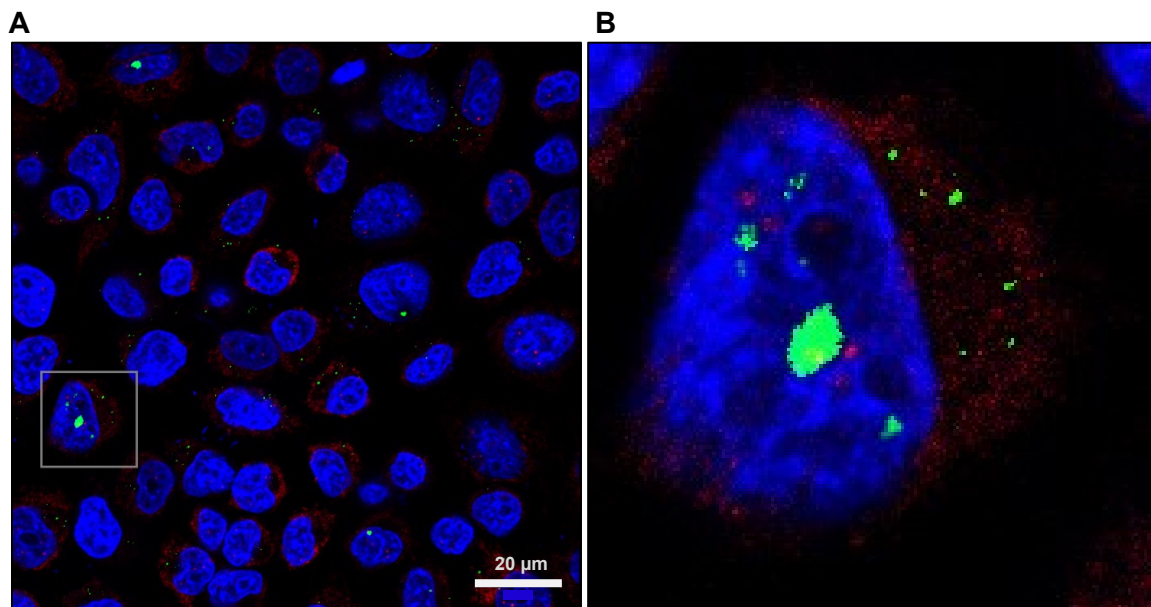


Abb. 12: 5hmC in mitochondrialer DNA von humanen HeLa Zellen. (A) Simultane Färbung von HeLa Zellen mit einem Antikörper gegen 5hmC (grün) und AMAs (rot) sowie den entsprechenden sekundären Antikörpern, die die Fluoreszenz erzeugen. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Vergrößerung 630fach. (B) Nochmals digital vergrößerter Ausschnitt aus A.

hydroxymethyliertes Cytosin befindet. Um diesen Umstand eindeutig zu beweisen, müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden, wie z.B. eine epigenetische Analyse der DNA aus den Mitochondrien.

3.2.2.3 Zusammenfassung der etablierten Methoden

Mittels der Safranin-O und Fast Green Färbung lässt sich für jede Gelenkfläche des Knies der OA Score einzeln bestimmen.

Der primäre Antikörper gegen 5hmC bindet selektiv an dieses und mittels des fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpers lässt sich ein spezifisches Signal im Zellkern der Knorpelzellen darstellen.

Die Fluoreszenzmuster der angefärbten Mitochondrien in den 3T3 und HeLa Zellen gleichen in erheblichem Maße denen des 5hmC außerhalb des Zellkerns in den Chondrozyten der untersuchten Mäuse. Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem extranukleären 5hmC in den Knorpelzellen um hydroxymethyliertes Cytosin in der DNA von Mitochondrien handelt.

3.3 Untersuchung des 5hmC

In diesem Abschnitt wurde zur Auswertung die quantitative Methode angewandt, die den prozentualen Anteil der 5hmC-positiven Knorpelzellen ermittelt. Eine Zelle wurde als 5hmC-positiv gewertet, wenn sie entweder nur im Zellkern oder sowohl im Zellkern als auch im Zellplasma eine 5hmC-typische Fluoreszenz zeigte. Chondrozyten, bei denen das 5hmC-Signal allein aus dem Zellplasma stammte, wurden nicht in die Wertung einbezogen, weil man nicht mit Sicherheit davon ausgehen kann, dass es sich hierbei wirklich um Zellen handelt, wenn der Kern nicht richtig dargestellt wird.

In den folgenden Abbildungen repräsentiert je ein Punkt eine Gelenkfläche von Tibiaplateau oder Femurkondyle.

3.3.1 Bei männlichen STR/ort Mäusen steigt mit dem Alter der OA Score während der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten abnimmt

Männliche Mäuse des STR/ort Stammes zeichnet aus, dass sie mit steigendem Alter eine idiopathische, primäre Arthrose entwickeln. Es wurden 45 Gelenkflächen von 14 Tieren mit einem Alter zwischen 2 und 19 Monaten untersucht. Neben der Bestimmung des Anteils an 5hmC-positiven Chondrozyten wurde der Grad der Arthrose bei jeder einzelnen Gelenkfläche der Tiere bestimmt. In Abbildung 13 A bis D sind verschieden alte Tiere mit unterschiedlichem OA Score dargestellt. Beginnend mit einer 3 Monate jungen Maus mit einem OA Score von 0 (Abbildung 13 A) bis zu einem 18 Monate alten Tier mit einem OA Score von 6 (Abbildung 13 D). Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigten auch unsere männlichen STR/ort Mäuse einen signifikant zunehmenden OA Score mit steigendem Alter (Abbildung 13 E; Korrelation nach Spearman mit $r = 0,547$ und $p = 0,0001$).

Die Auswertung des 5hmC zeigt einen stark negativen Zusammenhang zwischen dem Grad der Arthrose und dem prozentualen Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten (Abbildung 14 C). Steigt bei den männlichen STR/ort Mäusen der OA Score, so fällt der Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten ab (Korrelation nach Spearman mit $r = -0,605$ und $p = 1,1E-5$). Die Bilder 14 A und B zeigen repräsentative Schnitte eines Knies einer männlichen STR/ort Maus. Abbildung 14 A zeigt bei einer 100fachen Vergrößerung links eine Femurkondyle und rechts das Tibiaplateau. Auf Abbildung 14 B ist ein Ausschnitt aus A 630fach vergrößert dargestellt. Zu sehen sind auf beiden Abbildungen mit DAPI gefärbte Zellkerne und eine für hydroxymethyliertes Cytosin typische Fluoreszenz. Zur besseren Orientierung ist ein Durchlichtbild dem fluoreszenzmikroskopischen Bild überlagert.

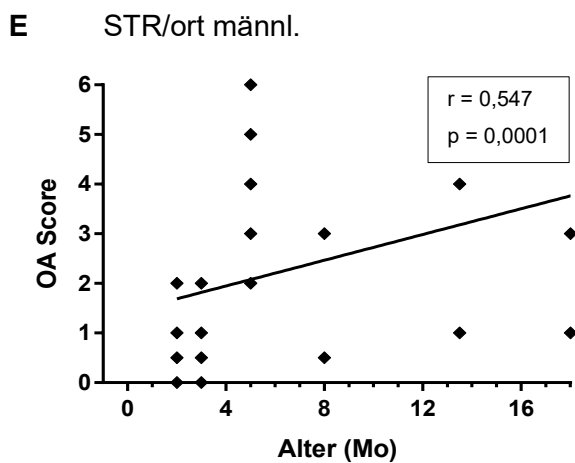
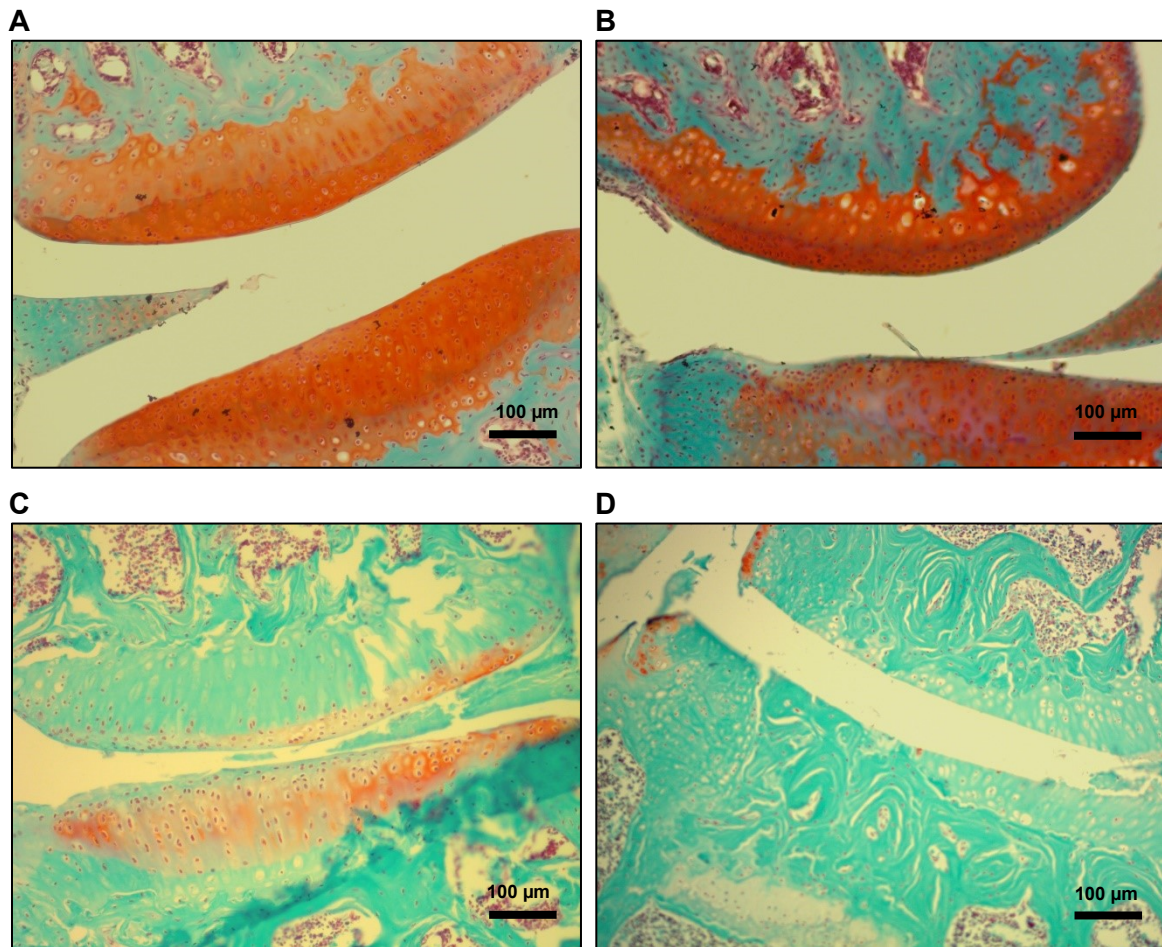


Abb. 13: Mit zunehmendem Alter steigt der Grad der Arthrose bei männlichen STR/ort Mäusen. Mit Fast Green/Safranin-O gefärbte frontale Paraffinschnitte von Kniegelenken. Jeweils kranial ist die Femurkondyle zu sehen und kaudal das Tibiaplateau. Vergrößerung 100fach. **(A)** Alter 3 Monate, OA Score = 0. **(B)** Alter 5 Monate, OA Score = 2. **(C)** Alter 8 Monate, OA Score = 3. **(D)** Alter 18 Monate, OA Score = 6. **(E)** Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Alter in Monaten und OA Score bei männlichen STR/ort Mäusen. Je höher das Alter desto größer der OA Score. Korrelation nach Spearman $r = 0,547$; $p = 0,0001$.

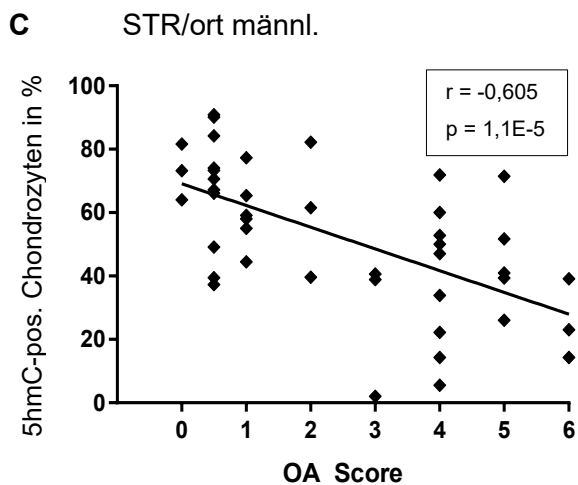
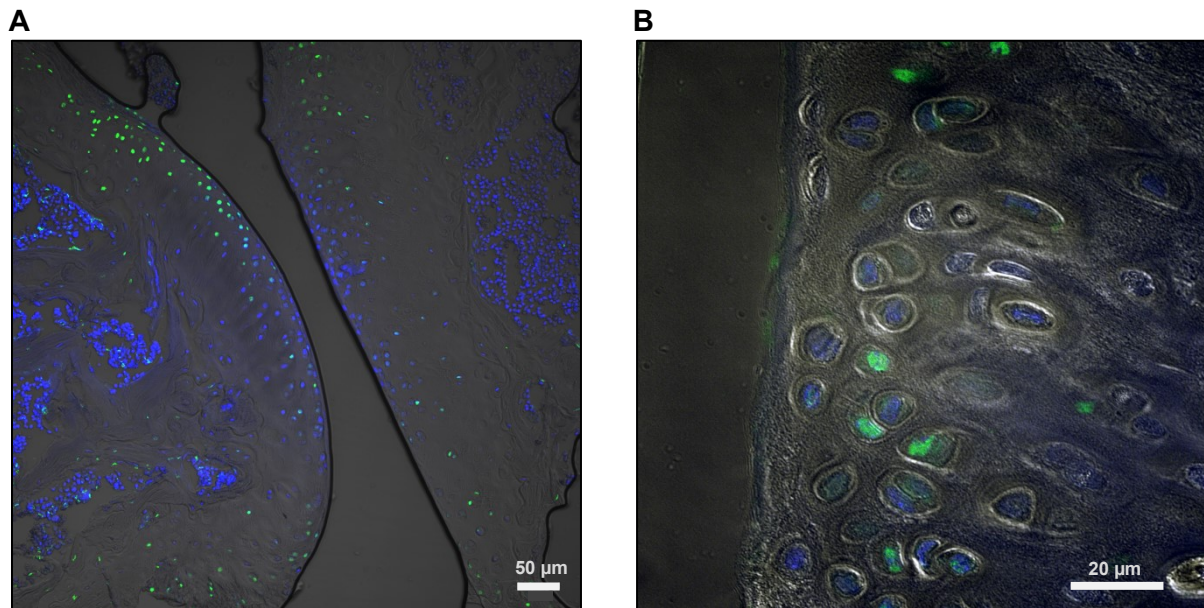


Abb. 14: Bei den männlichen STR/ort Mäusen nimmt mit steigendem OA Score der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten ab. (A), (B) Immunhistochemische Färbung von frontalen Paraffinschnitten. Blau entspricht DNA (Zellkern), grün 5hmC. Zusätzliche Überlagerung eines Durchlicht-Bildes. In **(A)** ist links eine Femurkondyle und rechts das Tibiaplatau zu erkennen. Vergrößerung 100fach. **(B)** 630fach vergrößerter Ausschnitt aus A. **(C)** Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen OA Score und dem prozentualen Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei männlichen STR/ort Mäusen. Je höher der OA Score desto geringer der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten. Korrelation nach Spearman $r = -0,605$; $p = 1,1E-5$.

3.3.2 Die Veränderung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten ist bei sekundärer Arthrose abhängig vom Mausstamm

Tab. 8

Mausstamm	Knie rechts/links	5hmC-positive Chondrozyten in % (Median)	P-Wert*
C57BL/6 weiblich	Links	23,88	} 0,039
	Rechts	48,00	
STR/ort weiblich	Links	21,79	} 0,838
	Rechts	25,49	

* Mann-Whitney-U-Test

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, weisen die weiblichen C57BL/6 und STR/ort Mäuse am rechten Knie eine operativ induzierte, sekundäre Arthrose und damit einen signifikant höheren OA Score auf, als am linken Knie, das nur dem altersbedingten Gelenkverschleiß unterliegt. Daher stellte sich die Frage, ob es auch einen Unterschied im Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten zwischen rechtem und linkem Knie gibt. Dabei zeigte sich, dass der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten in den Gelenkflächen von operiertem und nicht-operiertem Knie abhängig vom Mausstamm ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Gelenkflächen des rechten Knies der weiblichen C57BL/6 Mäuse weisen einen signifikant höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten auf als die des linken Knies ($p = 0,039$). Die Gelenkflächen des rechten Knies der weiblichen STR/ort Mäuse haben nur einen unwesentlich höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als die des linken Knies ($p = 0,838$). Die P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet.

In einem weiteren Schritt wurde nicht nur zwischen links und rechts bzw. operiert und nicht operiert unterschieden, sondern bei jeder einzelnen Gelenkfläche der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten in Abhängigkeit vom OA Score bestimmt. In Abbildung 15 A und B sind beispielhaft zwei Gelenkflächen der Femurkondylen und des Tibiaplateaus in 630facher Vergrößerung dargestellt. Jeweils gefärbt mit DAPI und den Antikörpern gegen 5hmC, sodass man die 5hmC-positiven Chondrozyten erkennt. Bild B zeigt den gleichen Ausschnitt wie A, nur ist hier zusätzlich ein Durchlichtbild überlagert, sodass die Gelenkflächen von Femurkondylen und Tibiaplateau besser sichtbar sind. Bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen konnte eine starke sowie signifikant positive Korrelation nach Spearman mit $r = 0,598$ und $p = 0,005$ nachgewiesen werden. Steigt der OA Score, so nimmt auch der prozentuale Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten zu (Abbildung 15 C). Die Auswertung der weiblichen STR/ort Mäuse in Abbildung 15 D zeigte keinen Zusammenhang zwischen OA Score und prozentualem Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten (Korrelation nach Spearman mit $r = -0,030$ und $p = 0,883$). Lediglich eine leicht negative Tendenz ist erkennbar.

Zur Auswertung wurden 20 Gelenkflächen von 5 weiblichen C57BL/6 Mäusen und 27 Gelenkflächen von 9 weiblichen STR/ort Mäusen betrachtet.

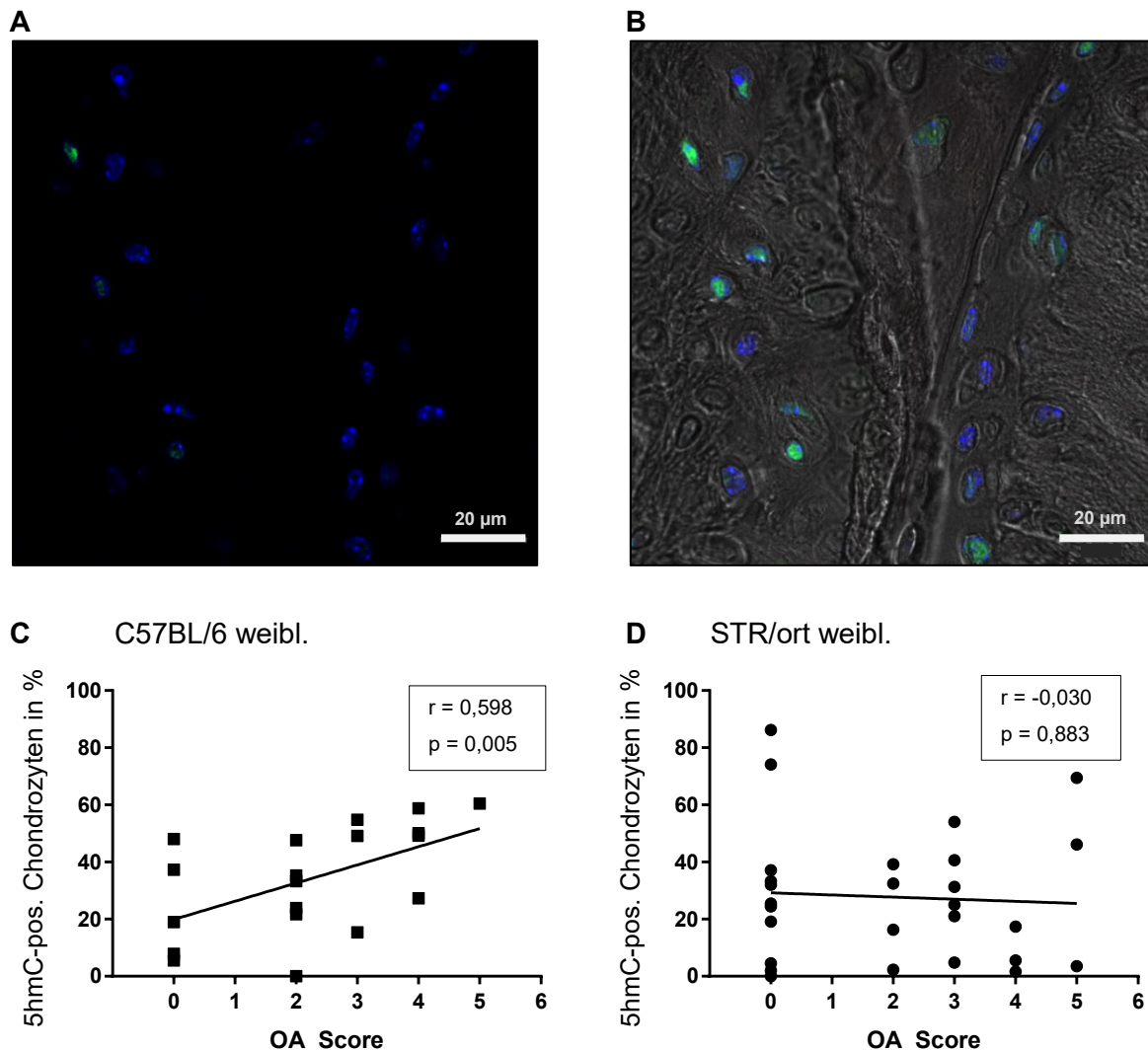


Abb. 15: Die Veränderung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten ist bei sekundärer Arthrose abhängig vom Mausstamm. (A) Immunhistochemische Färbung von frontalen Paraffinschnitten. Blau entspricht DNA (Zellkern), grün 5hmC. Vergrößerung 630fach. **(B)** Färbung und Vergrößerung wie in A, ebenso derselbe Ausschnitt. Zusätzliche Überlagerung mit einer Durchlichtaufnahme zur genaueren Lokalisierung. Erkennbar sind die Gelenkflächen von Femurkondyle und Tibiaplateau. **(C)** Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen OA Score und prozentualem Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei operativ induzierter OA bei weiblichen C57BL/6 Mäusen. Mit zunehmendem OA Score nimmt der Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten zu. Korrelation nach Spearman $r = 0,598$; $p = 0,005$. **(D)** Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen OA Score und prozentualem Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei operativ induzierter OA bei weiblichen STR/ort Mäusen. Mit zunehmendem OA Score bleibt der Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten annähernd konstant mit leicht negativer Tendenz. Korrelation nach Spearman $r = -0,030$; $p = 0,883$.

3.3.3 Männliche STR/ort Mäuse haben einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als weibliche

Tab. 9

OA Score	Geschlecht	5hmC-positive Chondrozyten in % (Median)	P-Wert*
0	männlich	73,17	} 0,031
	weiblich	23,99	
0,5	männlich	67,49	} 0,004
	weiblich	27,42	
1	männlich	59,09	} 0,001
	weiblich	18,52	
2	männlich	61,45	} 0,138
	weiblich	25,51	
3	männlich	38,89	} 0,980
	weiblich	15,38	
4	männlich	47,06	} 0,298
	weiblich	8,33	
5	männlich	40,98	} 0,797
	weiblich	53,32	

* Mann-Whitney-U-Test

In einem weiteren Schritt der Auswertung wurden die bisher erhobenen Daten von männlichen und weiblichen STR/ort Mäusen gemeinsam betrachtet. Ziel ist, herauszufinden, ob das Geschlecht der Mäuse einen Einfluss auf den Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten hat ohne Einwirkung der Arthrose. Hierzu wurden die männlichen und weiblichen STR/ort Mäuse in Gruppen eingeteilt, die alle den gleichen OA Score haben. In Tabelle 9 sind die Gruppen des OA Scores von 0 bis 5 aufgelistet sowie die entsprechenden Mediane des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten und der P-Wert, der jeweils pro Gruppe Männchen und Weibchen hinsichtlich des prozentualen Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten vergleicht. Dabei zeigte sich, dass in jeder Gruppe, d.h. bei jedem Ausprägungsgrad der Arthrose – außer bei Grad 5 – die männlichen STR/ort Mäuse einen größeren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten haben als die weiblichen. Bei einem OA Score von 0 sowie 0,5 und 1 ist dieser Unterschied signifikant ($P = 0,031$ sowie $P = 0,004$ und $P = 0,001$; Mann-Whitney-U-Test). In Abbildung 16 ist dieser Unterschied zwischen Männchen und Weibchen noch einmal für die OA Scores 0,5 (Abbildung 16 B) und 1 (Abbildung 16 C) grafisch dargestellt. Bei einem Score von 2 bis 4 ist der Anteil bei den männlichen STR/ort Mäusen immer noch höher, allerdings nicht mehr signifikant. Haben die Tiere einen OA Score von 5, so besitzen

3.3.4 OA Score und Geschlecht interagieren miteinander bezüglich der Beeinflussung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten

Tab. 10

Mausstamm/Geschlecht	Faktor 1	Faktor 2	P-Wert*
Weibliche C57BL/6 sowie weibliche und männliche STR/ort	OA Score	Gelenkfläche	0,548
	OA Score	Geschlecht	0,020
	OA Score	Alter	0,094
	Gelenkfläche	Geschlecht	0,393
	Gelenkfläche	Alter	0,968
	Geschlecht	Alter	0,093
männliche STR/ort	OA Score	Alter	0,415
	OA Score	-	0,040
	Alter	-	0,910

* multivariate Varianzanalyse

Nachdem nun die Faktoren OA Score, Geschlecht und Alter der Tiere jeweils einzeln in Bezug auf ihren Einfluss auf die Ausbildung von 5hmC betrachtet wurden, wurde zum Abschluss eine multivariate Varianzanalyse durchgeführt, um herauszufinden, ob die verschiedenen Faktoren sich gegenseitig beeinflussen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt. Dabei zeigte sich, wenn man alle Tiere zusammen betrachtet (143 Gelenkflächen von 41 Mäusen), dass sowohl der OA Score als auch das Geschlecht einen Einfluss auf den Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten haben, jedoch in unterschiedlicher Weise. Beide Faktoren interagieren signifikant miteinander ($P = 0,020$). So wirkte sich bei weiblichen Tieren der OA Score anders auf den Anteil 5hmC-positiver Knorpelzellen aus als bei den Männchen. Dies zeigten auch die vorherigen Versuche. In Abbildung 15 ist dargestellt, dass der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei weiblichen Mäusen mit steigendem OA Score zunimmt (weibliche C57BL/6 Mäuse) bzw. annähernd konstant bleibt (weibliche STR/ort Mäuse). Abbildung 14 zeigt dagegen einen abfallenden Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei zunehmendem OA Score bei männlichen STR/ort Mäusen. Bei einer Betrachtung allein der männlichen STR/ort Mäuse zeigt sich, dass der OA Score einen signifikanten Einfluss auf den Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten hat ($P = 0,040$).

Eine Interaktion zwischen den Faktoren OA Score und Alter konnte nicht nachgewiesen werden ($P = 0,094$). Ebenso gibt es keine Interaktion zwischen den Faktoren Alter, Geschlecht oder OA Score und der Gelenkfläche (Femurkondyle medial/lateral, Tibiaplateau medial/lateral), die für die Auswertung betrachtet wird (jeweils $P > 0,3$). Somit hat die Gelenkfläche keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten.

3.3.5 Zusammenfassung der quantitativen Auswertung

Die verschiedenen Mausstämme sowie die männlichen und weiblichen STR/ort Mäuse zeigten ein unterschiedliches Verhalten bei der Expression des 5hmC mit Veränderung des OA Scores. Während bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten mit steigendem Schweregrad der Arthrose zunahm, blieb er bei den weiblichen STR/ort Mäusen annähernd konstant. Ein gegenteiliges Verhalten zeigten die männlichen STR/ort Mäuse. Sie präsentierten einen fallenden Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten bei sich verschlechternder Arthrose.

Vergleicht man weibliche und männliche STR/ort Mäuse miteinander, die denselben OA Score besitzen, so haben die Männchen einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als die Weibchen.

3.3.6 Der Anteil von 5hmC an der gesamten DNA pro Zellkern verändert sich mit steigendem OA Score kaum

Nachdem nun das 5hmC vor allem quantitativ ausgewertet wurde, soll nun eine qualitative Auswertung der Fluoreszenz ermitteln, wie viel 5hmC in den einzelnen Zellkernen enthalten ist und wie es sich mit zunehmendem Schweregrad der Arthrose verändert. Dazu wurde die ZEN 2011 Software zu Hilfe genommen. Es wurde per Hand der gewünschten Zellkern markiert (Abbildung 17 B zeigt ein Beispiel einer Zelle) und die Software gibt an, wie stark das Signal ist, das der gesamten DNA entspricht (DAPI), und das Signal des 5hmC (Garb Alexa 488). Zudem stellt das Programm eine Häufigkeitsverteilung verschiedener Intensitäten dar. Dies ist in Abbildung 17 A demonstriert. Angenommen, dass die Intensität des eingefangenen Signals die Menge an DNA bzw. 5hmC widerspiegelt, wurde nun die Intensität des 5hmC-spezifischen Signals mit dem von DAPI ins Verhältnis gesetzt, um so den Anteil von 5hmC an der Gesamt-DNA zu bestimmen. Es wurden für diese Art der Auswertung die gleichen Mausstammgruppen wie in den vorherigen Versuchen verwendet: männliche STR/ort Mäuse mit primärer Arthrose, davon 45 Gelenkflächen von 14 Tieren mit einem Alter zwischen 2 und 19 Monaten sowie weibliche C57BL/6 und STR/ort Mäusen mit sekundärer Arthrose, davon 20 Gelenkflächen von 5 weiblichen C57BL/6 Mäusen und 27 Gelenkflächen von 9 weiblichen STR/ort Mäusen. Abbildung 18 A zeigt exemplarisch eine Gelenkfläche der medialen Femurkondyle mit 5hmC-haltigen und nicht 5hmC-haltigen Zellkernen von Knorpelzellen in 630facher Vergrößerung.

Bei den männlichen STR/ort Mäusen konnte mit steigendem OA Score kaum eine Veränderung des prozentualen Gehalts des Zellkerns an 5hmC festgestellt werden

(Abbildung 18 B; Korrelation nach Spearman $r = -0,030$; $p = 0,857$). Auch bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen war keine signifikante Änderung zu erkennen (Abbildung 18 C). Tendenziell fällt hier der Quotient 5hmC / gesamte DNA ab (Korrelation nach Spearman $r = -0,055$; $p = 0,827$). Ebenso stellte sich das Ergebnis bei den weiblichen STR/ort Mäusen dar (Abbildung 18 D): ein tendenzieller Abfall des Anteils an 5hmC mit steigendem OA Score (Korrelation nach Spearman $r = -0,188$; $p = 0,401$).

Es zeigte sich also bei allen untersuchten Gruppen von Mäusen dasselbe Ergebnis: Der prozentuale Anteil von 5hmC blieb mit steigendem OA Score entweder konstant oder es bestand eine minimal negative Tendenz. Dies war sowohl bei den weiblichen C57BL/6 und STR/ort Mäusen mit sekundärer Arthrose so als auch bei den männlichen STR/ort Mäusen mit primärer Arthrose.

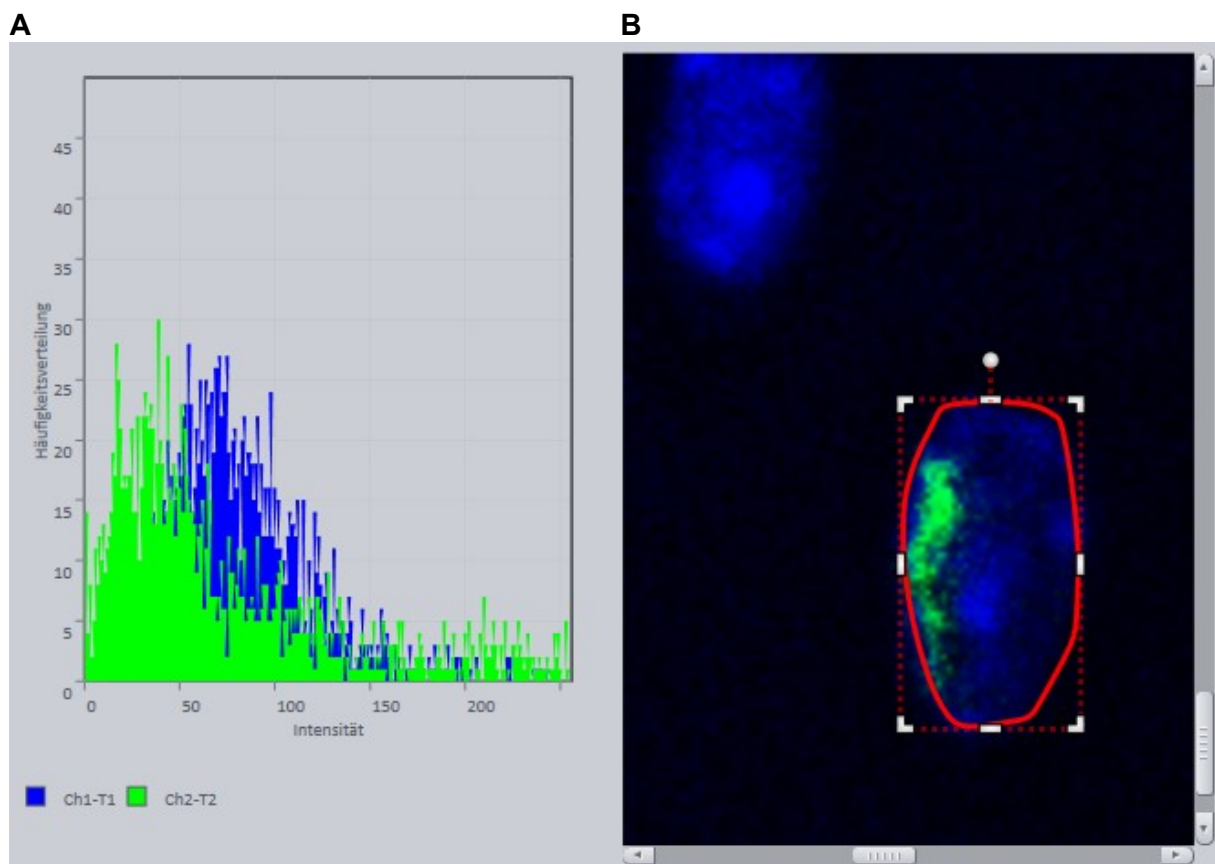


Abb. 17: Beispielhafter Auszug aus dem Programm ZEN 2011 zur Quantifizierung der verschiedenen Signale. (A) Häufigkeitsverteilung verschieden intensiver Fluoreszenzsignale. Ch1-T1 entspricht DAPI bzw. DNA und Ch2-T2 5hmC. **(B)** Ausschnitt des zuvor mit dem Mikroskop erzeugten Bildes, in dem ein bestimmter auszumessender Bereich (hier ein Zellkern) manuell markiert wurde.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Quantitative Auswertung

Das Ziel der Arbeit bestand darin, herauszufinden, wie sich der Anteil 5hmC-positiver Knorpelzellen bei primärer und sekundärer Arthrose im Mausmodell verändert. Dabei stellte sich kein eindeutiges Ergebnis heraus: Mit sich verschlechternder Arthrose stieg bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen mit sekundärer Arthrose der Anteil der 5hmC-positiven Chondrozyten, wohingegen er bei den männlichen STR/ort Mäusen mit primärer Arthrose abnahm. Bei den weiblichen STR/ort Mäusen mit sekundärer Arthrose blieb der Anteil nahezu auf demselben Niveau. Dieser Unterschied zwischen den weiblichen C57BL/6 Mäusen bzw. den weiblichen STR/ort Mäusen und den männlichen STR/ort Mäusen könnte in der unterschiedlichen Genetik der verwendeten Mausstämme (STR/ort und C57BL/6) begründet sein oder auch im Geschlecht. Die Untersuchungen zeigten, dass die männlichen STR/ort Mäuse generell einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten haben als die weiblichen, unabhängig vom OA Score. Jedoch ist auch zu beachten, dass die Arthrose bei den männlichen und weiblichen Mäusen eine andere Ursache hat. Bei den weiblichen STR/ort sowie C57BL/6 Mäusen liegt eine sekundäre, chirurgisch induzierte Arthrose vor, währenddessen sie bei den männlichen STR/ort Mäusen spontan mit zunehmendem Alter auftritt (primäre Arthrose). Somit könnte auch die Art der Arthroseinduktion und nicht das Geschlecht einen Einfluss auf die Bildung von 5hmC haben.

Desweiteren besteht die Frage, was zuerst vorliegt: Besteht anfangs die Arthrose und daraufhin wird reaktiv das 5hmC verstärkt gebildet oder wird vermehrt 5hmC gebildet und aufgrund der dadurch veränderten Epigenetik und Proteinexpression in den Knorpelzellen entsteht die Arthrose? Diese Frage konnten wir mit unseren Versuchen nicht abschließend klären. Bei den weiblichen Mäusen wurde erst die Arthrose sekundär induziert und anschließend untersucht, wie die Anzahl von 5hmC-haltigen Chondrozyten ist. Somit könnte man schlussfolgern, dass erst die Arthrose entsteht und sich dann der Anteil an 5hmC verändert. Von den männlichen STR/ort Mäusen wurden Tiere verschiedenen Alters in die Versuche miteinbezogen, sodass hier auch der Anteil an 5hmC-haltigen Zellen bestimmt werden konnte, noch bevor eine Arthrose entsteht. Dies betraf vor allem die 2 und 3 Monate jungen Tiere, bei denen kaum arthrotisches Gewebe gefunden wurde (OA Scores 0 bis 2). Bei ihnen war der Anteil an 5hmC-positiven Knorpelzellen noch hoch (ca. 40 bis 90%, siehe Abbildung 13 und 14). Mit steigendem OA Score fiel der Anteil an 5hmC-haltigen Chondrozyten ab auf unter 20% bei einem OA Score von 6 (Abbildung 14). Die Knorpelzellen proliferieren, werden hypertroph und es entwickelt sich das klinische Bild der

Arthrose (Bühling, Lepenies, und Witt 2004). Dies könnte die Theorie stützen, dass sich erst das 5hmC verändert und dann die Arthrose entsteht. Wird 5hmC gebildet, so wird der Prozess der Demethylierung von Cytosin gestartet (siehe Abbildung 19). Eine Demethylierung von bestimmten Genabschnitten, wie z.B. Promotoren, kann Gene aktivieren oder deaktivieren und damit die Expression von bestimmten Proteinen fördern oder hemmen (Schartl u.a. 2013). Somit wäre es möglich, dass die Chondrozyten auf einen bisher unbekanntem äußeren Reiz reagieren und diverse Gene durch Veränderung der Epigenetik aktiviert oder deaktiviert werden, was dazu führt, dass der gesamte Knorpel arthrotisch wird. Ein Beispiel für eine Genaktivierung stellen die Matrixmetalloproteinasen dar. Die Promotoren der MMPs werden durch Demethylierung aktiviert und die MMPs dadurch verstärkt exprimiert, sodass die Zellmatrix im Knorpel abgebaut und der gesamte Knorpel arthrotisch wird (Roach u. a. 2005, K. Hashimoto u. a. 2009). Einer dieser äußeren Reize könnte natürlich eine Entzündung im Gelenk sein, hervorgerufen durch falsche Belastung des Gelenks mit anschließender Verletzung, wie sie in unseren Versuchen bei Tieren, die bereits Daniel Thiem für seine Dissertation mit dem Thema „Einfluss des Knochenphänotyps auf die Ausbildung der Gelenkarthrose“ aus dem Jahr 2015 verwendete, durch die Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes und die Entfernung des medialen Meniskus herbeigeführt wurde. Andererseits könnte die veränderte Expression von 5hmC auch reaktiv auf die Entzündung als Schutzmechanismus auftreten. Das Gelenk wird arthrotisch und als Folge dessen wird der Gehalt an 5hmC in den Knorpelzellen verändert, um Gene zu aktivieren, die für Proteine kodieren, die die Knorpelzellen vor dem weiteren Verfall schützen sollen.

Schaut man sich den Vorgang der Demethylierung an (Abb. 19), so sieht man, dass das 5hmC nur ein Zwischenprodukt in diesem Prozess ist. Daher besteht die Frage, ob es überhaupt geeignet ist, als Marker für eine Erkrankung zu dienen. Schließlich stellt es in diesem Vorgang, bei dem methyliertes Cytosin (5mC) wieder in einfaches Cytosin (C)

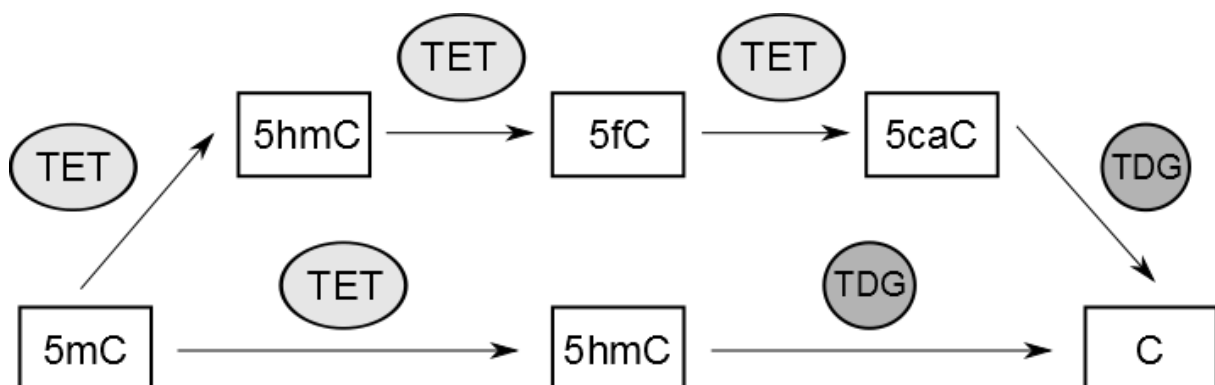


Abb. 19: Demethylierung von 5mC. Der erste Schritt der Demythylierung besteht darin, dass die TETs 5mC in 5hmC umwandeln und dieses weiter in 5fC. Dieses kann weiter mithilfe der TETs zu 5caC und schließlich zu Cytosin reagieren. In einem alternativen Weg wird 5fC oder 5caC direkt zu Cytosin mittels TDG umgewandelt. (Quelle: Taylor u. a. 2014).

umgewandelt wird, nur ein Intermediat dar, das sowohl durch die TET Enzyme aus 5mC gebildet, aber auch gleich weiter verarbeitet wird zu 5fC und dann zu 5caC, sodass die Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) daraus (oder auch direkt aus 5hmC) wieder Cytosin herstellen kann. Das 5hmC unterliegt also einer ständigen Neubildung sowie einem fortwährenden Abbau, sodass der Anteil an 5hmC und damit der Methylierungsstatus des Genoms sich kontinuierlich verändert. Der Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten kann also nicht zu jedem Zeitpunkt identisch sein, auch wenn der Grad der Arthrose über einen längeren Zeitraum konstant bleibt. Demzufolge ist es nicht direkt möglich, über den Anteil an 5hmC einen Rückschluss auf den Krankheitsverlauf der Arthrose zu ziehen. Münzel, Globisch und Carell gelang es bei ihren Versuchen 2011 nicht, die anderen Intermediate der Demethylierung, 5fC und 5caC, in somatischen Zellen nachzuweisen, obwohl sie theoretisch hätten vorhanden sein müssen. 5hmC ist ebenso nur ein Intermediat, also wäre es denkbar, dass auch dieses nicht immer nachgewiesen werden kann, auch wenn es vorliegt. Ein Erklärungsansatz für dieses Verhalten wäre, dass die Zwischenprodukte der Demethylierung so schnell auf- und abgebaut werden, dass entsprechende Antikörper nicht binden können, um sie nachzuweisen. Daher erscheint es sinnvoll, in einer weiteren Untersuchung das Hauptaugenmerk auf die TET Enzyme zu legen. Schließlich sind sie das Schlüsselenzym, das sowohl 5hmC bildet als auch abbaut. Somit dürfte ihr quantitatives Vorhandensein nicht so starken Schwankungen unterliegen wie das des 5hmC und sie eventuell sogar besser als Marker für Arthrose dienen können. Taylor u. a. untersuchten 2014 Knorpelzellen von gesunden Probanden sowie Patienten mit Osteoarthrose und verglichen diese hinsichtlich des Gehalts an 5hmC und TET Enzymen. Dabei stellte sich heraus, dass in den Chondrozyten der OA Patienten die Expression des Enzyms TET1 signifikant geringer war als in Knorpelzellen gesunder Probanden. Für TET2 und 3 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Aufgrund dieser Ergebnisse würde sich eine weitere Untersuchung an Mäusen mit induzierter oder spontaner Arthrose als sinnvoll erweisen, um dort zu prüfen, ob der OA Score mit der relativen Expression von TET1 korreliert. Ebenso wäre ein Immunblot zur Quantifizierung von TET1 durchaus denkbar.

Im Gegensatz zu den TET Enzymen sind bei Arthrose die DNMT Enzyme (wichtigste Vertreter: 1A und 3A) unverändert in ihrer Expression (Bhutani, Burns, und Blau 2011). Somit könnte man diese DNA-Methyltransferasen in weiteren Untersuchungen vorerst außer Acht lassen.

Desweiteren zeigte sich bei Taylor u.a. ein signifikanter Anstieg des 5hmC-Anteils in Knorpelzellen von Patienten mit Arthrose, was in dieser Arbeit lediglich bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden konnten. Taylor u.a. untersuchten hierfür Knorpelzellen von OA Patienten, die zwischen 47 und 84 Jahren alt und zu 72% weiblich waren. Nach der Menopause fällt bei Frauen der Östrogenspiegel kontinuierlich ab und sie

entwickeln ein erhöhtes Risiko für Arthrose (Roman-Blas u. a. 2009). Nun könnte man behaupten, dass der Anstieg von 5hmC bei diesen Patienten auf den Abfall von Östrogen zurückzuführen ist, da ein Großteil der untersuchten Patienten weiblich und postmenopausal war. Auch ist die Arthrose bei diesen Patienten eventuell nicht auf einen Anstieg des 5hmC zurückzuführen, sondern lediglich auf einen Abfall des Östrogens. Somit wäre es unter Umständen folgerichtig, denselben Versuch entweder nur mit Männern, die Arthrose haben, durchzuführen oder auch mit Frauen, die zwar schon Arthrose haben, sich aber noch vor der Menopause befinden.

Arthrose wird u.a. bedingt durch einen Anstieg an Enzymen und Zytokinen, wie Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP-3, 9 und 13) und Interleukin 1 β . Die Promotoren der MMPs werden demethyliert und dadurch aktiviert, sodass die Zellmatrix im Knorpel abgebaut und der Knorpel arthrotisch wird (Roach u. a. 2005, K. Hashimoto u. a. 2009). Taylor u.a. haben nun auch im Genbereich der Promotoren von MMP-1 und 3 einen Anstieg an 5hmC festgestellt, was mit einer verstärkten Demethylierung und Entstehung von Arthrose vereinbar ist. Somit könnte man auch im Mausmodell untersuchen, ob Matrix-Metalloproteinasen verstärkt exprimiert werden und wie der 5hmC-Anteil in den Promotoren der entsprechenden kodierenden Gene sich verändert.

In einem weiteren Schritt konnten Taylor u. a. 2016 herausfinden, dass hydroxymethyliertes Cytosin die Entwicklung von Knorpelzellen bedingt. Sie untersuchten Chondrozyten-Progenitorzellen am Tag 0 und verfolgten den Anteil von 5hmC sowie 5mC bis zum Tag 20, an dem die Zellen reife Chondrozyten darstellen. Dabei stellte sich heraus, dass das 5hmC kontinuierlich ansteigt, währenddessen das 5mC auf demselben Niveau bleibt. Auch die TET Enzyme nehmen bis Tag 10 zu, fallen dann allerdings wieder ab bzw. bleiben konstant. In einem weiterführenden Versuch wurden Knockout-Mäuse verwendet, die die Fähigkeit verloren haben, TET1 zu produzieren. Bei diesen Mäusen zeigte sich, dass ihre Knorpelzellen weniger 5hmC besaßen und kaum Glykosaminoglykane produzierten, sodass kein reifer Knorpel entstehen konnte. Daraus schloss man, dass 5hmC für die Entstehung von Knorpelzellen essentiell ist. Allerdings steht diese Aussage in Bezug auf die Entstehung von Arthrose im Widerspruch mit der vorher aufgezeigten, dass das 5hmC die Bildung von MMPs fördert und dadurch der Knorpel abgebaut wird. Somit wären auch hier weitere Untersuchungen durchzuführen, vielleicht auch am entsprechenden Mausmodell, um die Grundlagen zu klären, bevor man die Forschung am Menschen weiterführt.

4.1.2 Qualitative Auswertung

4.1.2.1 Anteil von 5hmC an der gesamten DNA pro Zellkern

Taylor u. a. haben 2014 gezeigt, dass in humanen Knorpelzellen das 5hmC mit steigendem OA Score ebenfalls zunimmt. Sie verwendeten kultivierte Chondrozyten von an Arthrose erkrankten Menschen und ermittelten durch einen Immunoblot den Anteil an 5hmC. Da in der vorliegenden Arbeit in Paraffin eingebettete Kniegelenke von Mäusen für die Versuche verwendet wurden, war diese Art der Auswertung mittels Immunoblot nicht möglich. Deshalb wurde eine Alternative gesucht, die darin bestand, die Fluoreszenzintensitäten zu vergleichen und über das Verhältnis der Intensität der Fluoreszenz von DAPI und 5hmC den prozentualen Anteil von 5hmC in der DNA von jedem einzelnen Zellkern zu bestimmen. Das Ergebnis war, dass der Anteil von 5hmC sich weder bei den männlichen STR/ort Mäusen mit primärer Arthrose noch bei den weiblichen STR/ort und C57BL/6 Mäusen mit sekundärer Arthrose signifikant bei steigendem Schweregrad verändert. Zudem streuten die einzelnen Werte sehr stark um den Mittelwert, sodass eventuell davon auszugehen ist, dass diese Methode nicht geeignet ist, um DNA-Anteile zu quantifizieren. Eine andere Methode bestünde darin, die Knorpelzellen aus den arthrotischen Gelenkflächen der Mäuseknie zu isolieren und einen Immunoblot durchzuführen, um den Anteil von 5hmC zu bestimmen. Jedoch können bei dieser Art der Auswertung andere Fehlerquellen auftreten. Denkbar wäre beispielsweise, dass durch das Herauslösen der Chondrozyten aus dem Gewebeverbund das Methylierungsmuster verändert und damit das Ergebnis verfälscht wird.

4.1.2.2 5hmC in mitochondrialer DNA

Abbildung 9 A und B zeigen ein 5hmC-spezifisches Fluoreszenzmuster bei Chondrozyten außerhalb des Zellkerns. Die einzigen Zellorganellen, die neben dem Zellkern ebenfalls DNA besitzen, sind die Mitochondrien. Wenn man davon ausgeht, dass es sich hierbei nicht um eine unspezifische Bindung des 5hmC-Antikörpers oder des Garb488 handelt (siehe Abbildung 8), so ist anzunehmen, dass diese extranukleäre Fluoreszenz hydroxymethyliertem Cytosin in mitochondrialer DNA entspricht.

Es ist bereits bekannt, dass 5hmC in Mitochondrien vorkommt (Shock u. a. 2011; Sun u. a. 2013) ebenso wie die TET-Enzyme, die das 5mC in 5hmC und dieses weiter in 5fC und 5caC umwandeln (Bellizzi u. a. 2013; Dzitoyeva, Chen, und Manev 2012). Dies wurde bereits 1983/84 an menschlichen und murinen Fibroblasten nachgewiesen (Pollack u. a. 1984; Shmookler Reis und Goldstein 1983). Nach und nach wurde in weiteren Zelltypen die Methylierung von mitochondrialer DNA belegt, jedoch gibt es bisher noch keine

Untersuchung an Chondrozyten. Ebenso gibt es keine Forschungsergebnisse bezüglich der Epigenetik mitochondrialer DNA in Zusammenhang mit Osteoarthritis oder Rheumatoider Arthritis.

Derzeit weiß man, dass diverse Umwelteinflüsse die Methylierung der DNA in Mitochondrien von Gehirn, Plazenta, Leber und Blutzellen verändern. Dazu gehören verschiedene Toxine (Metalle, Luftverschmutzung) und einige Erkrankungen sowie das Lebensalter (Janssen u. a. 2015). Baccarelli und Byun haben 2015 aufgezeigt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen zu einer Steigerung der Methylierung von mitochondrialer DNA in Thrombozyten führen. Auch das Leiden an einer Nicht-alkoholischen Fettleber führt zu einer Hypermethylierung mitochondrialer DNA (Pirola u. a. 2013). Induziert man bei Mäusen eine Amyotrophe Lateralsklerose, so nimmt bei ihnen die Expression von DNA-Methyltransferasen und die Methylierung mitochondrialer DNA zu (Wong u. a. 2013). Dzitoyeva, Chen, und Manev beschrieben 2012, dass mit zunehmendem Alter auch die Expression von 5mC, 5hmC und TET-Enzymen sich abhängig vom Gewebe (man unterscheidet Cortex und Cerebellum) verändern. Bei Mäusen mit einem Alter zwischen 4 und 24 Monaten stellte sich mit steigendem Alter ein Absinken des 5hmC-Anteils in Mitochondrien und der DNA-Methyltransferasen dar sowie ein annähernd konstanter Anteil von 5mC in mitochondrialer DNA im Cortex. Im Cerebellum dagegen nahm die Expression von TET-Enzymen und damit die Produktion von 5hmC in der DNA von Mitochondrien zu. In einem anderen Experiment verabreichte man Mäusen Valproinsäure. Dies führte zu einer Abnahme von TET-Enzymen sowie 5hmC in mitochondrialer DNA von murinen Fibroblasten (Chen, Dzitoyeva, und Manev 2012).

Die mitochondriale DNA kodiert für einen Großteil der Proteine, die für die Atmungskette benötigt werden. Daher wäre es denkbar, dass eine Veränderung im Methylierungsmuster der entsprechenden Gene zu einer abgeänderten Funktion der Atmungskette und damit des gesamten Mitochondriums führt. Über die genauen Auswirkungen der Methylierung und Demethylierung ist jedoch bisher wenig bekannt. Zwar hat man schon viele Gene detektiert, deren Methylierungsstatus nicht konstant ist, jedoch welche Folgen für das Mitochondrium dabei entstehen, ist weitgehend unklar (Clayton 2000). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass durch eine Hypermethylierung im entsprechenden Genabschnitt die Expression der Untereinheit 6 der NADH-Dehydrogenase supprimiert wird. Diese Untereinheit ist ein wichtiger Bestandteil von Komplex I der Atmungskette (Shock u. a. 2011).

Somit wäre im Zusammenhang mit Arthrose ein nächster, sinnvoller Schritt, die Mitochondrien in Knorpelzellen hinsichtlich des Vorkommens von 5hmC in der mitochondrialen DNA zu untersuchen und die Quantität des 5hmC in einen Zusammenhang mit dem Ausprägungsgrad der Arthrose zu bringen.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Bestimmung des Arthrose Scores

Um den Grad der Arthrose der Kniegelenke zu ermitteln, wurde das in Tabelle 7 abgebildete Scoring System von Glasson u.a. verwendet. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten. Man kann entweder den Mittelwert aus den OA Scores für die einzelnen Gelenkflächen des Knies bilden oder alle Werte und Gelenkflächen einzeln betrachten. In dieser Arbeit hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die OA Scores für jede der 4 Gelenkfläche einzeln zu betrachten. Dies hat den Hintergrund, dass bei den Mäusen mit chirurgisch induzierter Arthrose nur auf der medialen Seite des Knies operiert wurde und somit die mediale Femurkondyle und das mediale Tibiaplateau einen signifikant höheren OA Score besitzen als die entsprechenden Gelenkflächen auf der lateralen Seite (siehe Abbildung 4). Bei den männlichen STR/ort Mäusen ist die Arthrose in den medialen Gelenkflächen ebenfalls deutlicher ausgeprägt (Staines, Poulet, u. a. 2016). Entsprechend könnte sich auch das 5hmC unterschiedlich verteilen. Daher würde die Bildung eines Mittelwertes die wahren OA Scores verzerren und ein Zusammenhang mit der Expression von 5hmC ließe sich nur schwer herleiten.

4.2.2 Nachweis von 5hmC

Zum Darstellen des 5hmC in der DNA von Knorpelzellen wurde ein spezifisch gegen 5hmC gerichteter Antikörper verwendet, sowie ein sekundärer Antikörper mit einer grünen Fluoreszenz (Garb Alexa 488), der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dass dieser sekundäre Antikörper nicht auch an anderen Strukturen als den 5hmC-Antikörpern bindet, hat die Negativkontrolle in Abbildung 8 gezeigt. Allerdings kann trotz dieser guten Bindungsaffinität nicht in jeder Zelle 5hmC bzw. nicht jede 5hmC-positive Zelle dargestellt werden. Schließlich handelt es sich bei den verwendeten Proben um 5 µm dünne Paraffinschnitte der Kniegelenke. Zellen sind dreidimensionale Objekte und das 5hmC muss nicht immer homogen verteilt vorliegen. So kann es sein, dass sich beispielsweise das gesamte 5hmC im kaudalen Pol des Zellkerns befindet, dieser Bereich jedoch beim Anfertigen der Schnitte entfernt wird und somit erscheint die Zelle nicht 5hmC-haltig. Desweiteren kann sogar der gesamte Kern abgeschnitten sein, sodass sich keine Aussage treffen lässt, ob die Zelle 5hmC besitzt oder nicht. Diese Zellen sind deshalb nicht in die Wertung eingeflossen.

4.2.3 Intensität der Floreszenzen

Mit der Methode, die Intensitäten der Floreszenz vom 5hmC mit der der gesamten DNA (DAPI) ins Verhältnis zu setzen, war es nicht gelungen, eine Veränderung des prozentualen Anteils von 5hmC festzustellen. Diese Art der Auswertung wurde zusätzlich zum Auszählen gewählt als Versuch, das 5hmC zu quantifizieren, d.h. um zu sagen, wie viel Prozent der gesamten DNA hydroxymethyliertes Cytosin sind. Um die Floreszenzen der einzelnen Proben überhaupt vergleichen zu können, wurde stets dieselbe Konzentration von jeweils DAPI und den Antikörpern gegen 5hmC verwendet. Jedoch zeigte sich bei keinem Mausstamm oder Geschlecht eine Veränderung des 5hmC-Anteils. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen müssen die entsprechenden Zellkerne manuell ausgewählt und der zu quantifizierende Bereich per Hand definiert werden. Dabei kann es passieren, dass nicht alle relevanten Chondrozyten erfasst werden und möglicherweise Chondrozyten mit einer besonders starken oder schwachen Floreszenz zu stark ins Gewicht fallen und so das Gesamtergebnis verfälschen. Zudem ist fraglich, wie lange die jeweilige Floreszenz ihre Intensität konstant hält, denn viele Fluorochrome bleichen mit der Zeit und unter Einfluss von UV-Strahlung aus. Dass dies auch bei DAPI der Fall ist, wurde von Gallardo-Escárate u. a. 2007 untersucht und beschrieben. Aufgrund verschiedener Umstände, wie z.B. die Probenmenge und die starke Auslastung des Floreszenzmikroskops durch andere Mitarbeiter, war es nicht immer möglich alle gefärbten Proben am selben Tag zu mikroskopieren. Somit kam es vor, dass manche Proben direkt nach dem Färben unter dem Mikroskop betrachtet und die Intensität der Floreszenz aufgenommen wurde und andere Proben erst mehrere Tage nach dem Färben untersucht werden konnten. Daher kann es sein, dass die Floreszenzen bei diesen letzteren Proben abgeschwächt waren im Vergleich zu den direkt mikroskopierten. Hinzukommt, dass die Floreszenzen von DAPI und 5hmC sich mit der Zeit unterschiedlich verändern. Eines bleicht schneller aus als das andere. Dadurch wird das später ermittelte Verhältnis aus beiden Floreszenzen umso mehr verändert. Als dritter Punkt ist zu beachten, dass bei jedem mikroskopischen Bild nur ein 5 µm dünner Schnitt durch die Zelle bzw. den Zellkern betrachtet wird. So kann es sein, dass nicht das gesamte Ausmaß an 5hmC erfasst wird, da es einfach weggeschnitten wurde und sich so nur ein sehr geringes Verhältnis von 5hmC/gesamt-DNA darstellt. Oder es sind in der betrachteten Schnittebene sehr viele 5hmC-reiche Abschnitte der DNA erfasst, dafür wurden 5hmC-arme Bereiche abgetrennt und es macht den Anschein, als wäre sehr viel 5hmC vorhanden.

Zusammenfassend lässt sich zur Quantifizierung der DNA mittels Floreszenzintensitäten sagen, dass diese Methode einigen Fehlerquellen unterliegt und daher nicht geeignet ist, ein valides Ergebnis zu erzielen. Es müsste eine Methode gewählt werden, die weniger

mögliche Mängel aufweist. Hierzu zählt beispielsweise, dass die verwendeten primären Antikörper dieselbe Bindungsaffinität aufweisen oder die sekundären Antikörper jeweils mit der gleichen Menge an Fluorochromen beladen sein müssten.

4.3 Ausblick

In den oben erläuterten Experimenten wurde die primäre Arthrose bei männlichen und die sekundäre, chirurgisch induzierte Arthrose bei weiblichen Tieren untersucht. Folglich ist eine Schlussfolgerung schwierig, ob die Veränderung des Anteils 5hmC-positiver Zellen von der Art der Arthroseinduktion oder des Geschlechts abhängig ist. Daher wäre als nächster Schritt denkbar, bei männlichen und weiblichen Tieren eines Mausstammes, dessen Männchen nicht spontan Arthrose entwickeln, Arthrose auf ein und dieselbe Weise zu induzieren und sich dann das Verhalten des 5hmC bei beiden Geschlechtern anzuschauen.

In weiterführenden Untersuchungen sollte das 5hmC nicht nur per immunhistochemischer Färbung dargestellt, sondern auch ein quantitativ reproduzierbarer Nachweis gewählt werden.

Auch scheint der Anteil des 5hmC in den Nukleinsäuren von Mitochondrien eine nicht unwichtige Rolle zu spielen. Daher erscheint es sinnvoll, auch dieses, getrennt vom 5hmC im Zellkern, zu untersuchen und in einen Zusammenhang mit Arthrose zu bringen.

Da das 5hmC nur ein Zwischenprodukt im Prozess der Demethylierung darstellt, muss dessen Anteil an der gesamten DNA großen Schwankungen unterliegen. Deswegen wäre es folgerichtig, nicht nur das 5hmC, sondern auch die TET Enzyme, die es produzieren, in Zusammenhang mit Arthrose bei Mäusen zu untersuchen, wie es Taylor u.a. bereits beim Menschen getan haben. Sie zeigten, dass das Enzym TET1 in Knorpelzellen von Arthrosepatienten signifikant geringer exprimiert wurde als beim Gesunden. Im Gegensatz dazu weisen die an Arthrose erkrankten Patienten einen signifikant höheren Gehalt an 5hmC auf als die Kontrollprobanden (Taylor u. a. 2014). Jenes Ergebnis konnte mit dieser Arbeit am Mausmodell nicht nachvollzogen werden. Lediglich die weiblichen C57BL/6 Mäuse zeigten einen Anstieg des Anteils an 5hmC bei zunehmender Arthrose. Bei den weiblichen und männlichen STR/ort Mäusen blieb der Anteil annähernd konstant bzw. nahm ab.

5 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Zusammenhang zwischen Arthrose und dem Anteil von 5-hydroxymethyliertem Cytosin in Chondrozyten zu untersuchen. In der Literatur war bereits durch eine Studie von Taylor u.a. beschrieben, dass Arthrosepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden ein global erhöhtes 5hmC aufweisen. In Anlehnung an diese Arbeit führten wir Versuche am Tiermodell durch, da dieses hinsichtlich der verschiedenen Faktoren wie Alter und Geschlecht besser standardisierbar sowie kontrollierbar ist. Wir entschieden uns für ein Modell für primäre und eines für sekundäre Arthrose. Für das Modell der primären Arthrose dienten männliche Mäuse eines STR/ort Stammes, die mit steigendem Alter spontan eine Arthrose entwickeln, wohingegen weibliche STR/ort und C57BL/6 Mäuse als Modell für die sekundäre Arthrose genutzt wurden, indem bei ihnen das Kniegelenk chirurgisch destabilisiert und damit die Erkrankung induziert wurde. Bei primärer Arthrose nahm mit steigendem Arthrosegrad der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten ab. Entgegengesetzt dazu stieg er bei sekundärer Arthrose bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen an bzw. blieb bei den weiblichen STR/ort Mäusen konstant. Desweiteren konnte bei den männlichen STR/ort Mäusen ein insgesamt höherer Anteil 5hmC-positiver Knorpelzellen nachgewiesen werden als bei den weiblichen STR/ort Mäusen, unabhängig vom Schweregrad der Arthrose.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Faktoren OA Score und Geschlecht einen Einfluss auf den Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten haben und dabei miteinander interagieren.

Bei der Auswertung der Fluoreszenzen des 5hmC und des DAPI, welche dazu diente, den Anteil von 5hmC an der gesamten DNA in jedem einzelnen Knorpelzellkern zu ermitteln, zeigte sich, dass der prozentuale Gehalt des Zellkerns an 5hmC konstant blieb, unabhängig von Geschlecht oder Schweregrad der Arthrose.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass sowohl das Geschlecht der betroffenen Tiere als auch die Pathogenese (idiopathisch und chirurgisch induziert) einen Einfluss auf den Anteil an 5hmC in Chondrozyten bei an Arthrose erkrankten Individuen haben. Um diese Einflussgrößen näher zu charakterisieren, sind weitere Tierexperimente und Studien mit menschlichem Knorpel und adäquaten Kontrollen nötig.

6 Literaturverzeichnis

- Adalsteinsson, Bjorn T., und Anne C. Ferguson-Smith. 2014. „Epigenetic Control of the Genome-Lessons from Genomic Imprinting“. *Genes* 5 (3): 635–55. doi:10.3390/genes5030635.
- Andrianakos, Alexandros A., Leonidas K. Kontelis, Dimitrios G. Karamitsos, Spyros I. Aslanidis, Athanasios I. Georgountzos, George O. Kaziolas, Kyriaki V. Pantelidou, Elizabeth V. Vafiadou, Petros C. Dantis, und ESORDIG Study Group. 2006. „Prevalence of Symptomatic Knee, Hand, and Hip Osteoarthritis in Greece. The ESORDIG Study“. *The Journal of Rheumatology* 33 (12): 2507–13.
- Arden, Nigel, und Michael C. Nevitt. 2006. „Osteoarthritis: Epidemiology“. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 20 (1): 3–25. doi:10.1016/j.berh.2005.09.007.
- Baccarelli, Andrea A., und Hyang-Min Byun. 2015. „Platelet Mitochondrial DNA Methylation: A Potential New Marker of Cardiovascular Disease“. *Clinical Epigenetics* 7: 44. doi:10.1186/s13148-015-0078-0.
- Baron, Roland, und Georges Rawadi. 2007. „Targeting the Wnt/Beta-Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton“. *Endocrinology* 148 (6): 2635–43. doi:10.1210/en.2007-0270.
- Bellizzi, Dina, Patrizia D’Aquila, Teresa Scafone, Marco Giordano, Vincenzo Riso, Andrea Riccio, und Giuseppe Passarino. 2013. „The Control Region of Mitochondrial DNA Shows an Unusual CpG and Non-CpG Methylation Pattern“. *DNA Research* 20 (6): 537–47. doi:10.1093/dnares/dst029.
- Bhutani, Nidhi, David M. Burns, und Helen M. Blau. 2011. „DNA Demethylation Dynamics“. *Cell* 146 (6): 866–72. doi:10.1016/j.cell.2011.08.042.
- Blow, Matthew J., Tyson A. Clark, Chris G. Daum, Adam M. Deutschbauer, Alexey Fomenkov, Roxanne Fries, Jeff Froula, u. a. 2016. „The Epigenomic Landscape of Prokaryotes“. *PLoS Genetics* 12 (2): e1005854. doi:10.1371/journal.pgen.1005854.
- Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, und D. A. Low. 1994. „Methylation Patterns in Pap Regulatory DNA Control Pyelonephritis-Associated Pili Phase Variation in E. Coli“. *Cell* 76 (3): 577–88.
- Bühling, Kai Joachim, Julia Lepenies, und Karsten Witt. 2004. *Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pathologie; mit 90 Tabellen*. 3., Aktualisierte und erw. Aufl. Klinik. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Cadigan, K. M., und R. Nusse. 1997. „Wnt Signaling: A Common Theme in Animal Development“. *Genes & Development* 11 (24): 3286–3305.
- Chambers, M. G., L. Cox, L. Chong, N. Suri, P. Cover, M. T. Bayliss, und R. M. Mason. 2001. „Matrix Metalloproteinases and Aggrecanases Cleave Aggrecan in Different Zones of Normal Cartilage but Colocalize in the Development of Osteoarthritic

- Lesions in STR/Ort Mice“. *Arthritis and Rheumatism* 44 (6): 1455–65. doi:10.1002/1529-0131(200106)44:6<1455::AID-ART241>3.0.CO;2-J.
- Chen, Hu, Svetlana Dzitoyeva, und Hari Manev. 2012. „Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics“. *European journal of pharmacology* 690 (1–3): 51–59. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.019.
- Clayton, David A. 2000. „Transcription and replication of mitochondrial DNA“. *Human Reproduction* 15 (suppl_2): 11–17. doi:10.1093/humrep/15.suppl_2.11.
- Crusio, W. E., Frans Sluyter, R. T. Gerlai, und Susanna Pietropaolo, Hrsg. 2013. *Behavioral genetics of the mouse*. Cambridge handbooks in behavioural genetics. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
- Daura-Oller, Elias, Maria Cabre, Miguel A. Montero, Jose L. Paternain, und Antoni Romeu. 2009. „Specific Gene Hypomethylation and Cancer: New Insights into Coding Region Feature Trends“. *Bioinformatics* 3 (8): 340–43.
- Dreessen, D., und Z. Halata. 1990. „Age-Related Osteo-Arthrotic Degeneration of the Temporomandibular Joint in the Mouse“. *Acta Anatomica* 139 (1): 91–96.
- Dunn, D. B., und J. D. Smith. 1958. „The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids“. *Biochemical Journal* 68 (4): 627–36.
- Dzitoyeva, Svetlana, Hu Chen, und Hari Manev. 2012. „Effect of Aging on 5-Hydroxymethylcytosine in Brain Mitochondria“. *Neurobiology of Aging* 33 (12): 2881–91. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.006.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Carreira, L. G. Ljungdahl, K. C. Kuo, und C. W. Gehrke. 1985. „DNA Methylation in Thermophilic Bacteria: N4-Methylcytosine, 5-Methylcytosine, and N6-Methyladenine“. *Nucleic Acids Research* 13 (4): 1399–1412.
- Engber, Daniel, und Dahlia Lithwick. 2011. „The Trouble With Black-6“. *Slate*, November 17. http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_ab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html.
- Evans, R. G., C. Collins, P. Miller, F. M. Ponsford, und C. J. Elson. 1994. „Radiological Scoring of Osteoarthritis Progression in STR/ORT Mice“. *Osteoarthritis and Cartilage* 2 (2): 103–9.
- Fan, Zhiyong, Stephan Söder, Stephan Oehler, Katrin Fundel, und Thomas Aigner. 2007. „Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage“. *The American Journal of Pathology* 171 (3): 938–46. doi:10.2353/ajpath.2007.061083.
- Fassl, Christian, und Burkard F. Leeb. 2006. „SYSADOA/DMOAD-Konzept setzt auf langsame positive Effekte“. *rheuma plus*, Nr. 01.

- Ficz, Gabriella, Miguel R. Branco, Stefanie Seisenberger, Fátima Santos, Felix Krueger, Timothy A. Hore, C. Joana Marques, Simon Andrews, und Wolf Reik. 2011. „Dynamic Regulation of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse ES Cells and during Differentiation“. *Nature* 473 (7347): 398–402. doi:10.1038/nature10008.
- Fink, W., und G. Haidinger. 2007. „Die Häufigkeit von Gesundheitsstörungen in 10 Jahren Allgemeinpraxis“. *ZFA - Zeitschrift für Allgemeinmedizin* 83 (03): 102–8. doi:10.1055/s-2007-968157.
- Gallardo-Escárate, Cristian, Josué Alvarez-Borrego, Elisabeth Von Brand, Enrique Dupré, und Miguel Angel Del Río-Portilla. 2007. „Relationship between DAPI-Fluorescence Fading and Nuclear DNA Content: An Alternative Method to DNA Quantification?“. *Biological Research* 40 (1): 29–40. doi:/S0716-97602007000100004.
- Glasson, S., und C. Little. 2011. „The Recent Paper ‚Multimodal Imaging Demonstrates Concomitant Changes in Bone and Cartilage after Destabilization of the Medial Meniscus and Increased Joint Laxity‘“. *Osteoarthritis and Cartilage* 19 (8): 1076–1077; author reply 1078. doi:10.1016/j.joca.2011.04.018.
- Glasson, S. S., M. G. Chambers, W. B. Van Den Berg, und C. B. Little. 2010. „The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in the Mouse“. *Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 18 Suppl 3 (Oktober): S17-23. doi:10.1016/j.joca.2010.05.025.
- Graw, Jochen. 2010. *Genetik*. 5., Vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Lehrbuch. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer.
- Hackett, Jamie A., Roopsha Sengupta, Jan J. Zyllicz, Kazuhiro Murakami, Caroline Lee, Thomas A. Down, und M. Azim Surani. 2013. „Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure through 5-Hydroxymethylcytosine“. *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118): 448–52. doi:10.1126/science.1229277.
- Hashimoto, Ko, Richard O. C. Oreffo, Marc B. Gibson, Mary B. Goldring, und Helmut I. Roach. 2009. „DNA Demethylation at Specific CpG Sites in the IL1B Promoter in Response to Inflammatory Cytokines in Human Articular Chondrocytes“. *Arthritis and Rheumatism* 60 (11): 3303–13. doi:10.1002/art.24882.
- Hashimoto, S., R. L. Ochs, S. Komiyama, und M. Lotz. 1998. „Linkage of Chondrocyte Apoptosis and Cartilage Degradation in Human Osteoarthritis“. *Arthritis and Rheumatism* 41 (9): 1632–38. doi:10.1002/1529-0131(199809)41:9<1632::AID-ART14>3.0.CO;2-A.
- Hirsch-Kauffmann, Monica, und Manfred Schweiger. 2006. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler: 74 Tabellen*. 6., Unveränd. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Hsueh, Yi-Jen, Shiang-Fu Huang, Jui-Yang Lai, Shih-Chieh Ma, Hung-Chi Chen, Sung-En Wu, Tze-Kai Wang, u. a. 2016. „Preservation of Epithelial Progenitor Cells from Collagenase-Digested Oral Mucosa during Ex Vivo Cultivation“. *Scientific Reports* 6 (November): 36266. doi:10.1038/srep36266.

- Huang, Yun, und Anjana Rao. 2012. „New functions for DNA modifications by TET-JBP“. *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (11): 1061–64. doi:10.1038/nsmb.2437.
- Hunter, D. J., und C. B. Little. 2016. „The great debate: Should Osteoarthritis Research Focus on “Mice” or “Men”?“ *Osteoarthritis and Cartilage* 24 (1): 4–8. doi:10.1016/j.joca.2015.07.029.
- Jabbari, Kamel, und Giorgio Bernardi. 2004. „Cytosine Methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA Frequencies“. *Gene* 333 (Mai): 143–49. doi:10.1016/j.gene.2004.02.043.
- Jaeger, K., C. Selent, W. Jaehme, S. Mahr, U. Goebel, S. Ibrahim, B. Vollmar, und B. Mueller-Hilke. 2008. „The Genetics of Osteoarthritis in STR/Ort Mice“. *Osteoarthritis and Cartilage* 16 (5): 607–14. doi:10.1016/j.joca.2007.09.004.
- Janning, Wilfried, und Elisabeth Knust. 2008. *Genetik: allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungs-genetik; 37 Tabellen*. 2., Vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Janssen, Bram G., Hyang-Min Byun, Wilfried Gyselaers, Wouter Lefebvre, Andrea A. Baccarelli, und Tim S. Nawrot. 2015. „Placental Mitochondrial Methylation and Exposure to Airborne Particulate Matter in the Early Life Environment: An ENVIRONAGE Birth Cohort Study“. *Epigenetics* 10 (6): 536–44. doi:10.1080/15592294.2015.1048412.
- Jeltsch, A. 2006. „Molecular Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases“. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 301: 203–25.
- Kamekura, S., K. Hoshi, T. Shimoaka, U. Chung, H. Chikuda, T. Yamada, M. Uchida, u. a. 2005. „Osteoarthritis Development in Novel Experimental Mouse Models Induced by Knee Joint Instability“. *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (7): 632–41. doi:10.1016/j.joca.2005.03.004.
- Kizawa, Hideki, Ikuyo Kou, Aritoshi Iida, Akihiro Sudo, Yoshinari Miyamoto, Akira Fukuda, Akihiko Mabuchi, u. a. 2005. „An Aspartic Acid Repeat Polymorphism in Asporin Inhibits Chondrogenesis and Increases Susceptibility to Osteoarthritis“. *Nature Genetics* 37 (2): 138–44. doi:10.1038/ng1496.
- Ko, Myunggon, Yun Huang, Anna M. Jankowska, Utz J. Pape, Mamta Tahiliani, Hozefa S. Bandukwala, Jungeun An, u. a. 2010. „Impaired Hydroxylation of 5-Methylcytosine in Myeloid Cancers with Mutant TET2“. *Nature* 468 (7325): 839–43. doi:10.1038/nature09586.
- Kumagai, Kenichi, Satsuki Suzuki, Yoriaki Kanri, Ryota Matsubara, Keisuke Fujii, Masahiro Wake, Ryuji Suzuki, und Yoshiki Hamada. 2015. „Spontaneously Developed Osteoarthritis in the Temporomandibular Joint in STR/Ort Mice“. *Biomedical Reports* 3 (4): 453–56. doi:10.3892/br.2015.467.
- Kumar, S., X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts, und G. G. Wilson. 1994. „The DNA (Cytosine-5) Methyltransferases“. *Nucleic Acids Research* 22 (1): 1–10.

- Lawrence, Reva C., David T. Felson, Charles G. Helmick, Lesley M. Arnold, Hyon Choi, Richard A. Deyo, Sherine Gabriel, u. a. 2008. „Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States. Part II“. *Arthritis and Rheumatism* 58 (1): 26–35. doi:10.1002/art.23176.
- Lohmander, L. Stefan, Scarlett Hellot, Don Dreher, Eduard F. W. Krantz, Dawie S. Kruger, Ali Guermazi, und Felix Eckstein. 2014. „Intraarticular Sprifermin (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 18) in Knee Osteoarthritis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial“. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (7): 1820–31. doi:10.1002/art.38614.
- Loughlin, John, Barbara Dowling, Kay Chapman, Lucy Marcelline, Zehra Mustafa, Lorraine Southam, Athena Ferreira, Cathleen Ciesielski, Dennis A. Carson, und Maripat Corr. 2004. „Functional Variants within the Secreted Frizzled-Related Protein 3 Gene Are Associated with Hip Osteoarthritis in Females“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9757–62. doi:10.1073/pnas.0403456101.
- Mahr, S., J. Menard, V. Krenn, und B. Müller. 2003. „Sexual Dimorphism in the Osteoarthritis of STR/Ort Mice May Be Linked to Articular Cytokines“. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62 (12): 1234–37.
- Mahr, Sandra, Gerd-Rüdiger Burmester, Dietmar Hilke, Udo Göbel, Andreas Grützkau, Thomas Häupl, Matthias Hauschild, u. a. 2006. „Cis- and Trans-Acting Gene Regulation Is Associated with Osteoarthritis“. *American Journal of Human Genetics* 78 (5): 793–803. doi:10.1086/503849.
- Mahr, Sandra, und Brigitte Müller-Hilke. 2007. „Transcriptional Activity of the RHOB Gene Is Influenced by Regulatory Polymorphisms in Its Promoter Region“. *Genomic Medicine* 1 (3–4): 125–28. doi:10.1007/s11568-007-9012-7.
- Mekada, Kazuyuki, Kuniya Abe, Ayumi Murakami, Satoe Nakamura, Hatsumi Nakata, Kazuo Moriwaki, Yuichi Obata, und Atsushi Yoshiki. 2009. „Genetic Differences among C57BL/6 Substrains“. *Experimental Animals* 58 (2): 141–49.
- Menschik, M., J. Neumüller, C. W. Steiner, L. Erlacher, M. Köller, R. Ullrich, W. Graninger, und W. B. Graninger. 1997. „Effects of Ciprofloxacin and Ofloxacin on Adult Human Cartilage in Vitro.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (11): 2562–65.
- Mogil, J. S., S. G. Wilson, K. Bon, S. E. Lee, K. Chung, P. Raber, J. O. Pieper, u. a. 1999. „Heritability of Nociception I: Responses of 11 Inbred Mouse Strains on 12 Measures of Nociception“. *Pain* 80 (1–2): 67–82.
- Moos, V., M. Rudwaleit, V. Herzog, K. Höhlig, J. Sieper, und B. Müller. 2000. „Association of Genotypes Affecting the Expression of Interleukin-1beta or Interleukin-1 Receptor Antagonist with Osteoarthritis“. *Arthritis and Rheumatism* 43 (11): 2417–22. doi:10.1002/1529-0131(200011)43:11<2417::AID-ANR7>3.0.CO;2-R.
- Moxley, G., J. Han, A. G. Stern, und B. P. Riley. 2007. „Potential Influence of IL1B Haplotype and IL1A-IL1B-IL1RN Extended Haplotype on Hand Osteoarthritis Risk“. *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (10): 1106–12. doi:10.1016/j.joca.2007.03.022.

- Müller, Brigitte. 2002. „Cytokine Imbalance in Non-Immunological Chronic Disease“. *Cytokine* 18 (6): 334–39.
- Müller-Hilke, B. 2007. „[Pathogenesis of osteoarthritis--a snapshot]“. *Zeitschrift Fur Rheumatologie* 66 (8): 703–5. doi:10.1007/s00393-007-0235-8.
- Münzel, Martin, Daniel Globisch, und Thomas Carell. 2011. „5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome“. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 50 (29): 6460–68. doi:10.1002/anie.201101547.
- Ncayiyana, Daniel J. 2011. „The Extraordinary Story of the Life after Death of Henrietta Lacks“. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 101 (3): 141.
- Niethard, Fritz Uwe, Joachim Pfeil, und Peter Biberthaler. 2014. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 7., Überarbeitete Auflage. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme.
- Osterberg, Anja, Daniel Thiem, Philipp Herlyn, Thomas Mittlmeier, Bernhard Frerich, und Brigitte Müller-Hilke. 2016. „Subchondral bone sclerosis and cancellous bone loss following OA induction depend on the underlying bone phenotype“. *Joint Bone Spine*. Zugegriffen September 29. doi:10.1016/j.jbspin.2015.11.012.
- Pasold, Juliane, Robby Engelmann, Johannes Keller, Sarah Joost, Robert P. Marshall, Bernhard Frerich, und Brigitte Müller-Hilke. 2013. „High Bone Mass in the STR/Ort Mouse Results from Increased Bone Formation and Impaired Bone Resorption and Is Associated with Extramedullary Hematopoiesis“. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 31 (1): 71–81. doi:10.1007/s00774-012-0394-9.
- Penn, N. W., R. Suwalski, C. O’Riley, K. Bojanowski, und R. Yura. 1972. „The Presence of 5-Hydroxymethylcytosine in Animal Deoxyribonucleic Acid“. *The Biochemical Journal* 126 (4): 781–90.
- Pirola, Carlos Jose, Tomas Fernández Gianotti, Adriana Laura Burgueño, Manuel Rey-Funes, Cesar Fabian Loidl, Pablo Mallardi, Julio San Martino, Gustavo Osvaldo Castaño, und S. Sookoian. 2013. „Epigenetic Modification of Liver Mitochondrial DNA Is Associated with Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease“. *Gut* 62 (9): 1356–63. doi:10.1136/gutjnl-2012-302962.
- Pollack, Y, J Kasir, R Shemer, S Metzger, und M Szyf. 1984. „Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA.“ *Nucleic Acids Research* 12 (12): 4811–24.
- Poulet, Blandine, Roberto de Souza, Chancie B. Knights, Clive Gentry, Alan M. Wilson, Stuart Bevan, Yu-Mei Chang, und Andrew A. Pitsillides. 2014. „Modifications of Gait as Predictors of Natural Osteoarthritis Progression in STR/Ort Mice“. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (7): 1832–42. doi:10.1002/art.38616.
- Pschyrembel, Willibald, und Otto Dornblüth. 1977. *Klinisches Wörterbuch: mit klinischen Syndromen und einem Anhang Nomina Anatomica*. 253., Um einen Anh. „Nomina anatomica“ erw. Aufl. Berlin: de Gruyter.

- Reginato, Anthony M., und Bjorn R. Olsen. 2002. „The Role of Structural Genes in the Pathogenesis of Osteoarthritic Disorders“. *Arthritis Research* 4 (6): 337–45. doi:10.1186/ar595.
- Roach, Helmtrud I., Norikazu Yamada, Kelvin S. C. Cheung, Simon Tilley, Nicholas M. P. Clarke, Richard O. C. Oreffo, Shoichi Kokubun, und Felix Bronner. 2005. „Association between the Abnormal Expression of Matrix-Degrading Enzymes by Human Osteoarthritic Chondrocytes and Demethylation of Specific CpG Sites in the Promoter Regions“. *Arthritis and Rheumatism* 52 (10): 3110–24. doi:10.1002/art.21300.
- Roman-Blas, Jorge A., Santos Castañeda, Raquel Largo, und Gabriel Herrero-Beaumont. 2009. „Osteoarthritis associated with estrogen deficiency“. *Arthritis Research & Therapy* 11: 241. doi:10.1186/ar2791.
- Rüther, Wolfgang, Christoph H. Lohmann, Peter Pitzen, und Helmut Rössler. 2014. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 20., Überarbeitete und aktualisierte Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Saris, Daniel B. F., Johan Vanlauwe, Jan Victor, Miroslav Haspl, Michael Bohnsack, Yves Fortems, Bruno Vandekerckhove, u. a. 2008. „Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Structural Repair When Treating Symptomatic Cartilage Defects of the Knee in a Randomized Controlled Trial versus Microfracture“. *The American Journal of Sports Medicine* 36 (2): 235–46. doi:10.1177/0363546507311095.
- Schartl, Manfred, Manfred Gessler, und Arnold von Eckardstein. 2013. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Herausgegeben von Urban & Fischer. Elsevier.
- Seisenberger, Stefanie, Julian R. Peat, Timothy A. Hore, Fátima Santos, Wendy Dean, und Wolf Reik. 2013. „Reprogramming DNA Methylation in the Mammalian Life Cycle: Building and Breaking Epigenetic Barriers“. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 368 (1609): 20110330. doi:10.1098/rstb.2011.0330.
- Shen, Lanlan, und Robert A. Waterland. 2007. „Methods of DNA methylation analysis“. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 10 (5): 576–81.
- Shmookler Reis, R. J., und S. Goldstein. 1983. „Mitochondrial DNA in Mortal and Immortal Human Cells. Genome Number, Integrity, and Methylation“. *The Journal of Biological Chemistry* 258 (15): 9078–85.
- Shock, Lisa S., Prashant V. Thakkar, Erica J. Peterson, Richard G. Moran, und Shirley M. Taylor. 2011. „DNA Methyltransferase 1, Cytosine Methylation, and Cytosine Hydroxymethylation in Mammalian Mitochondria“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (9): 3630–35. doi:10.1073/pnas.1012311108.
- Smith, M. D., S. Triantafillou, A. Parker, P. P. Youssef, und M. Coleman. 1997. „Synovial Membrane Inflammation and Cytokine Production in Patients with Early Osteoarthritis“. *The Journal of Rheumatology* 24 (2): 365–71.
- Söder, S. 2016. „[Degenerative DNA alterations in osteoarthritis]“. *Der Pathologe* 37 (Suppl 2): 223–28. doi:10.1007/s00292-016-0211-7.

- Sokoloff, Leon, Lyman B. Crittenden, Richard S. Yamamoto, und George E. Jay. 1962. „The Genetics of Degenerative Joint Disease in Mice“. *Arthritis & Rheumatism* 5 (6): 531–46. doi:10.1002/art.1780050602.
- Staines, K. A., K. Madi, S. M. Mirczuk, S. Parker, A. Burleigh, B. Poulet, M. Hopkinson, u. a. 2016. „Endochondral Growth Defect and Deployment of Transient Chondrocyte Behaviors Underlie Osteoarthritis Onset in a Natural Murine Model“. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (4): 880–91. doi:10.1002/art.39508.
- Staines, K. A., B. Poulet, D. N. Wentworth, und A. A. Pitsillides. 2016. „The STR/Ort Mouse Model of Spontaneous Osteoarthritis - an Update“. *Osteoarthritis and Cartilage*, Dezember. doi:10.1016/j.joca.2016.12.014.
- Strong, L.C. 1944. „Genetic nature of the constitutional states of cancer susceptibility and resistance in mice and men“. *Yale J Biol Med* 17: 289–99.
- Sun, Zhiyi, Jolyon Terragni, Janine G. Borgaro, Yiwei Liu, Ling Yu, Shengxi Guan, Hua Wang, u. a. 2013. „High-Resolution Enzymatic Mapping of Genomic 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Embryonic Stem Cells“. *Cell Reports* 3 (2): 567–76. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.001.
- Taylor, Sarah E. B., Ye Henry Li, Piera Smeriglio, Madhusikta Rath, Wing H. Wong, und Nidhi Bhutani. 2016. „Stable 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Acquisition Marks Gene Activation During Chondrogenic Differentiation“. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31 (3): 524–34. doi:10.1002/jbmr.2711.
- Taylor, Sarah E. B., Piera Smeriglio, Lakshmi Dhulipala, Madhusikta Rath, und Nidhi Bhutani. 2014. „A Global Increase in 5-Hydroxymethylcytosine Levels Marks Osteoarthritic Chondrocytes“. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (1): 90–100. doi:10.1002/art.38200.
- Teichtahl, Andrew J., Anita E. Wluka, Pushpika Wijethilake, Yuanyuan Wang, Ali Ghasem-Zadeh, und Flavia M. Cicuttini. 2015. „Wolff’s Law in Action: A Mechanism for Early Knee Osteoarthritis“. *Arthritis Research & Therapy* 17 (September): 207. doi:10.1186/s13075-015-0738-7.
- Tetlow, L. C., D. J. Adlam, und D. E. Woolley. 2001. „Matrix Metalloproteinase and Proinflammatory Cytokine Production by Chondrocytes of Human Osteoarthritic Cartilage: Associations with Degenerative Changes“. *Arthritis and Rheumatism* 44 (3): 585–94. doi:10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C.
- „The Alexa Fluor Dye Series—Note 1.1“. 2016. Zugegriffen Oktober 28. <http://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/the-alexa-fluor-dye-series.html>.
- Timinskas, A., V. Butkus, und A. Janulaitis. 1995. „Sequence Motifs Characteristic for DNA [Cytosine-N4] and DNA [Adenine-N6] Methyltransferases. Classification of All DNA Methyltransferases“. *Gene* 157 (1–2): 3–11.

- Uchida, Kentaroo, Ken Urabe, Kouji Naruse, Zensuke Ogawa, Kiyoshi Mabuchi, und Moritoshi Itoman. 2009. „Hyperlipidemia and Hyperinsulinemia in the Spontaneous Osteoarthritis Mouse Model, STR/Ort“. *Experimental Animals* 58 (2): 181–87.
- Valdes, Ana M., John Loughlin, Mark Van Oene, Kay Chapman, Gabriela L. Surdulescu, Michael Doherty, und Tim D. Spector. 2007. „Sex and Ethnic Differences in the Association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with Genetic Susceptibility to Osteoarthritis of the Knee“. *Arthritis and Rheumatism* 56 (1): 137–46. doi:10.1002/art.22301.
- Vanyushin, B. F., S. G. Tkacheva, und A. N. Belozersky. 1970. „Rare Bases in Animal DNA“. *Nature* 225 (5236): 948–49.
- Walton, M. 1977. „Degenerative Joint Disease in the Mouse Knee; Histological Observations“. *The Journal of Pathology* 123 (2): 109–22. doi:10.1002/path.1711230207.
- . 1978. „A Spontaneous Ankle Deformity in an Inbred Strain of Mouse“. *The Journal of Pathology* 124 (4): 189–94. doi:10.1002/path.1711240403.
- Wei, W., S. Clockaerts, Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, L. M. Gierman, S. M. Botter, S. M. A. Bierma-Zeinstra, H. Weinans, u. a. 2014. „Statins and Fibrates Do Not Affect Development of Spontaneous Cartilage Damage in STR/Ort Mice“. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2): 293–301. doi:10.1016/j.joca.2013.11.009.
- Wong, Margaret, Barry Gertz, Barry A. Chestnut, und Lee J. Martin. 2013. „Mitochondrial DNMT3A and DNA Methylation in Skeletal Muscle and CNS of Transgenic Mouse Models of ALS“. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 279. doi:10.3389/fncel.2013.00279.
- Zhang, W., J. Robertson, A. C. Jones, P. A. Dieppe, und M. Doherty. 2008. „The Placebo Effect and Its Determinants in Osteoarthritis: Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials“. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 (12): 1716–23. doi:10.1136/ard.2008.092015.
- Zhang, Yuqing, und Joanne M. Jordan. 2010. „Epidemiology of Osteoarthritis“. *Osteoarthritis* 26 (3): 355–69. doi:10.1016/j.cger.2010.03.001.

7 Thesen

- 1) Der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten ist abhängig von der Art der Arthrose bzw. dem Geschlecht.
- 2) Bei männlichen STR/ort Mäusen steigt mit dem Alter der OA Score während der Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten abnimmt.
- 3) Bei weiblichen STR/ort Mäusen bleibt mit steigendem OA Score der prozentuale Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten konstant.
- 4) Bei weiblichen C57BL/6 Mäusen nimmt mit steigendem OA Score der prozentuale Anteil an 5hmC-positiven Chondrozyten zu.
- 5) Männliche STR/ort Mäuse haben einen höheren Anteil 5hmC-positiver Chondrozyten als weibliche STR/ort Mäuse.
- 6) OA Score und Geschlecht interagieren miteinander bezüglich der Beeinflussung des Anteils 5hmC-positiver Chondrozyten.
- 7) Der Anteil von 5hmC an der gesamten DNA pro Zellkern bleibt mit steigendem OA Score unabhängig von Mausstamm und Geschlecht konstant.

8 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Müller-Hilke. Insbesondere bedanke ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Hilfe und Unterstützung, die ich jederzeit bekommen habe, wenn ich sie benötigte und vor allem für die vielen guten Ratschläge, konstruktive Kritik sowie Ideen und Hinweise, die diese Arbeit erst gelingen lassen haben.

Desweiteren möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. Anja Osterberg bedanken, die mich exzellent in die praktische Arbeit im Labor einführte und mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre geduldigen Erklärungen und praktischen Unterweisungen haben maßgeblich zum Erfolg der durchgeführten zahlreichen Experimente beigetragen.

Dieser Dank gebührt ebenso Frau Marlies Dettmer und Herrn Dr. Robby Engelmann, die mich ebenfalls in viele Praktiken der Labortätigkeiten einführten und immer eine offenes Ohr für meine auftretenden Fragen zeigten.

Danken möchte ich auch dem Arbeitsbereich Zellbiologie um Frau Prof. Dr. Barbara Nebe, der mir freundlicherweise seine Räumlichkeiten sowie sein Konfokales Laser Raster Mikroskop zur Auswertung meiner immunhistochemisch gefärbten Präparate überlies.

Weiteren Dank lasse ich all den Personen zukommen, die zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran Herr Dr. Daniel Thiem, der mir freundlicherweise einen Teil seiner Tierpräparate überlies, sodass ich auch an diesen meine Untersuchungen durchführen konnte.

Und zum Abschluss möchte ich mich bei meinen lieben Eltern und Großeltern bedanken, die mich immer schon auf diesem Weg mit aller Kraft unterstützt haben und es mit Sicherheit auch in Zukunft weiterhin gleich tun werden. Ohne euch wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin und hätte es niemals so weit gebracht. Dafür danke ich euch von tiefstem Herzen!

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.