



Andrea Linz

Die Rolle von ERp57 in der enchondralen Ossifikation

2012



Biologie

Die Rolle von ERp57 in der enchondralen Ossifikation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Andrea Linz (geb. Kemkers)
aus Nordhorn

- 2012 -

Dekan:	Prof. Dr. D. Prüfer
Erster Gutachter:	Prof. Dr. P. Bruckner
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. M. Bähler
Tag der mündlichen Prüfung:	09.10.2012
Tag der Promotion:	12.10.2012

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	1
II Zusammenfassung	6
III Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Der Knorpel	9
1.2 Die Wachstumsfuge	10
1.2.1 Enchondrale Ossifikation.....	10
1.2.2 Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge	12
1.2.3 Matrixvesikel	15
1.2.4 Marker der Chondrozytendifferenzierung	17
1.2.4.1 Sox9 (<i>sex determining region Y (SRY)-box 9</i> , geschlechtsbestimmende Region Y-Box 9)	18
1.2.4.2 Die Knorpel-Kollagene II und X.....	19
1.2.4.3 VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor).....	19
1.2.4.4 VDR (Vitamin D-Rezeptor).....	19
1.2.4.5 MMP13 (Matrix-Metalloproteinase 13).....	20
1.3 Vitamin D	21
1.3.1 Rolle von Vitamin D im Knochenwachstum	22
1.3.2 Rezeptoren von Vitamin D	24
1.3.2.1 Vitamin D Rezeptor (VDR)	24
1.3.2.2 VDR-knockout Mäuse.....	25
1.3.2.3 Knorpel-spezifische VDR-knockout Maus	26
1.3.2.4 CYP27B1-knockout Maus	27
1.3.2.5 Knorpel-spezifische CYP27B1-knockout und CYP27B1 überexprimierende Mäuse	28
1.3.2.6 ERp57.....	29
1.3.2.7 Die Rolle von ERp57 in Chondrozyten	29
1.3.2.8 Primäre Chondrozyten in Kultur	32

1.3.2.9	ERp57 knockout Mäuse	33
1.3.2.10	Das Cre/loxP-System	33
1.4	Zellulärer Stressabbau	34
1.5	Ziel der Arbeit.....	35
2	Material und Methoden	36
2.1	Liste der verwendeten Chemikalien& Materialien	36
2.2	Zellbiologische Analysen	37
2.2.1	Isolierung von Chondrozyten aus Hühnersterna.....	37
2.2.2	Isolierung von Chondrozyten aus murinen Brustkörben	38
2.2.3	Kultivierung von Chondrozyten in Agarose	38
2.2.4	Markierung mittels ¹⁴ C-Prolin	39
2.2.5	Isolierung von Matrixvesikeln	39
2.2.6	Transfektion von Chondrozyten	40
2.3	Proteinbiochemische Methoden	41
2.3.1	Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase	41
2.3.2	Isolierung von Proteinen aus Zellkulturmedien.....	41
2.3.3	Isolierung von Proteinen aus Zellen in Agarose	42
2.3.4	Isolierung von Proteinen aus murinen Hüftköpfen.....	42
2.3.5	Proteinmengenbestimmung mittels BCA-Test	42
2.3.6	Fällung von Protein mittel Trichloressigsäure (TCA-Fällung).....	42
2.3.7	Isolierung von Kollagenen aus Zellkulturmedien.....	42
2.3.8	Isolierung von Kollagenen aus Agarose	43
2.3.9	SDS-Gelelektrophorese.....	44
2.3.10	Färbung von SDS-Gelen mittels Coomassie-Blue.....	44
2.3.11	Fluorografie.....	45
2.3.12	Immuno-Blot und Immunanalyse	45
2.4	Molekularbiologische Analysen.....	46
2.4.1	Isolierung von RNA	46
2.4.2	Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen	46
2.4.3	Oligonukleotide (Primer)	47
2.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	48
2.4.5	Touchdown-PCR.....	49

2.4.6	Reverse Transkription (RT)-PCR	49
2.4.7	Gelelektrophorese	49
2.5	Histologische Analysen.....	50
2.5.1	Paraffineinbettung von Hinterbeinen.....	50
2.5.2	Entparaffinieren von Hinterbeinschnitten.....	50
2.5.3	Alcian Sirius Färbung	51
2.5.4	Kollagen X Färbung.....	51
2.5.5	Tartrat resistente saure Phosphatase-Färbung (TRAP-Färbung).....	51
2.5.6	Hartgewebeeinbettung mittels Technovit	52
2.5.7	Von Kossa Färbung.....	53
2.6	Eletronenmikroskopie (EM).....	53
2.7	Mikroskopie	54
2.8	Gesamtskelettfärbung von Mäusen	54
2.9	Periphere quantitative Computertomographie(pQCT).....	54
2.10	Versuchstierhaltung	55
2.11	Grafikprogramme und statistische Auswertung	55
2.12	Datenbanken	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Die Rolle von ERp57 und Matrixvesikeln in der <i>in vitro</i> Chondrozytendifferenzierung	56
3.1.1	Isolierung und Identifikation von Matrixvesikeln aus Hühnerchondrozytenkulturen.....	56
3.1.2	Nachweis von ERp57 in Matrixvesikeln und Überständen.....	58
3.1.3	Quantifizierung von ERp57	59
3.1.4	Qualifizierung von ERp57	60
3.1.5	Inaktivierung von ERp57 in primären Hühner-Chondrozytenkulturen.....	62
3.1.6	Analyse der Differenzierung von Chondrozyten nach Inaktivierung von ERp57	63
3.1.7	Expressionsanalyse von ER-Stress-Markern von si-Chondrozyten	66
3.1.8	Kompensation des Verlustes von ERp57 durch eine Proteindisulfidomerase	67

3.2	Herstellung eines Mausstammes mit Chondrozyten-spezifischer Deletion des ERp57 und Analyse des Knochenwachstumsphänotyps.....	68
3.2.1	Mausstamm mit einer Chondrozyten-spezifischen funktionellen ERp57-Deletion (ERp57 ^{cart/-} -Mäuse).....	68
3.2.2	Analyse des knorpel-spezifischen ERp57 knockouts auf DNA-Ebene	69
3.2.3	Analyse der ERp57 Deletion in ERp57 ^{cart/-} -Tieren auf Proteinebene.....	70
3.2.4	Beschreibung der ERp57 ^{cart/-} -Mäuse.....	71
3.2.5	Gewichtvergleich zwischen WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen	72
3.2.6	Knochenlängenbestimmung von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen	72
3.2.7	Analyse der Wachstumsfugen von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen	75
3.2.8	Analyse der hypertrophen Zone von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen.....	82
3.2.9	Analyse der Proliferation der Zellen in der Wachstumsfuge von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen	86
3.2.10	Analyse der Osteoklasten von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen	86
3.2.11	Analyse der Mineralisierung der Tibien von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen.....	90
3.2.12	pQCT-Analyse von WT- und ERp57 ^{cart/-} -Mäusen.....	92
4	Diskussion.....	95
4.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen.....	96
4.1.1	Die untergeordnete Rolle von ERp57 in Matrixvesikel-assoziiierter Form .	96
4.1.2	ERp57 wird zur Differenzierung von Chondrozyten <i>in vitro</i> benötigt	97
4.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	98
4.2.1	Allgemein.....	98
4.2.2	Die knorpel-spezifische ERp57 Inaktivierung führt zu einem starken Wachstumsfugen-Phänoptyp im Alter von 4 Wochen	99
4.2.2.1	Die Rolle der Nahrungsumstellung in der Entwicklung der knorpel-spezifischen ERp57-Mäuse	100
4.2.2.2	Die Rolle der Sexualhormone in der Entwicklung der knorpel-spezifischen ERp57-Mäuse	102
4.2.2.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung des Wachstumsfugen-Phänoptyp in den ERp57 ^{cart/-} -Tieren.....	105
4.2.3	Vergleich VDR- , CYP27B1- und ERp57 ^{cart/-} -Mäuse.....	106
4.2.3.1	Konstitutiver VDR- und CYP27B1-knockout in Mäusen	106

4.2.3.2	Knorpel-spezifischer VDR- und CYP27B1-knockout, sowie knorpel-spezifische Überexpression von CYP27B1 in Mäusen	107
4.2.3.3	Osteoklastogenese	108
4.3	Ausblick	113
5	Literaturverzeichnis	115
6	Danksagung.....	138
7	Lebenslauf	139

II Zusammenfassung

Das Steroidhormon Vitamin D₃ spielt sowohl in der Kalziumhomöostase als auch in der Knochenmineralisierung eine wichtige Rolle. Neben dem klassischen nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR) wurde ein Plasmamembran-Rezeptor für 1,25 Dihydroxy-Vitamin D (1,25-(OH)₂ Vit D₃) beschrieben, der die schnellen Antworten auf Vitamin D vermittelt, die keine Gen-Regulationsänderungen erfordern. Dieses Protein, ERp57, wurde zunächst mit seiner Hauptfunktion als ER Chaperon beschrieben, konnte aber auch auf der Zelloberfläche von Chondrozyten lokalisiert werden, wo es nach 1,25-(OH)₂ Vit D₃-Bindung die IGF-I stimulierte Differenzierung der Zellen inhibiert. In dieser Arbeit wurde unter anderem die Rolle von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung *in vitro* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Matrixvesikel-assozierte Form von ERp57 für die Entfernung des Rezeptors von der Chondrozytenoberfläche eine untergeordnete Rolle spielt. Zudem zeigte sich in si-RNA Experimenten, dass das Fehlen von ERp57 in Chondrozyten zu einer verminderten Differenzierung der Zellen unter Stimulation von IGF-I führt.

In vivo wurde die Rolle von ERp57 mittels einer knorpel-spezifischen ERp57 knock-out Maus (Erp57^{cart^{-/-}}-Maus) untersucht, die in dieser Arbeit durch Kreuzung einer Col2a cre Linie und ERp57 flox/flox Mäusen generiert wurden. Die Erp57^{cart^{-/-}}-Tiere waren lebensfähig, vital und hatten eine normale Lebenserwartung. Sie zeigten jedoch gegenüber den untersuchten Kontrollmäusen eine Verzögerung in der Gewichtszunahme und dem Wachstum der langen Knochen. Dieser Unterschied ist im Alter von 4 Wochen besonders ausgeprägt und bei männlichen Tieren stärker als bei weiblichen Tieren. Ursächlich für diese Verzögerung im Längenwachstum der Knochen scheint der später einsetzende Umbau der späten hypertrophen Zone der Wachstumsfuge durch Osteoklasten insbesondere beim pubertären Wachstumsschub zu sein. Der Ursprung für die hier gefundenen verminderten Osteoklastenzahlen liegen vermutlich im Fehlen des ERp57 auf der Oberfläche von Osteoblasten, welche die Osteoklastogenese dann gar nicht oder nur vermindert aktivieren.

Viele Veränderungen der Erp57^{cart^{-/-}}-Maus treten auch in der VDR- oder der 25-OH-1 α -Hydroxylase- knock-out Maus (CYP27B1-), die einen Vitamin D Synthese-Defekt hat, auf. Deshalb ist davon auszugehen, dass ERp57 und VDR in einem Signalweg, entweder synergistisch oder nacheinander geschaltet, agieren.

III Abkürzungsverzeichnis

1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	1,25 Dihydroxy-Vitamin D ₃
24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	24,25 Dihydroxy-Vitamin D ₃
AA	Arachidonsäure
AP	Alkalische Phosphatase
BIP	<i>B-cell immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
BLM-VDR	basaler, lateraler Vitamin D Membranrezeptor
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cre	Cre-Rekombinase
CYP27B1	25-OH-1 α -Hydoxylase
CYP27B1 ^{-/-} -Maus	CYP27B1-knockout Maus
CYP27B1 ^{cre^{-/-}} -Maus	knorpel-spezifische CYP27B1-knockout Maus
CYP27B1 ^{tg} -Maus	knorpel-spezifische transgene CYP27B1-überexprimierende Maus
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DHT	Dihydrotestosteron
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERp57	ER Protein 57
Erp57 ^{cart^{-/-}} -Maus	knorpel-spezifische Erp57-knockout Maus
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>fibroblast-growth factor</i>)
FKS	Fötales Kälber Serum
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormons
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HT-Agarose	Hochtemperatur-Agarose
IGF-I	Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I (<i>Insulin-like growth factor I</i>)
Ihh	Indian Hedgehog
IL	Interleukin
IP ₃	Phosphoinositol-1,4,5-trisphosphat
KO	<i>Knock-out</i>
MARRS	<i>1,25-(OH)₂ Vit D₃ membran-associated, rapid response steroid-binding protein</i>
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)

MHC-I	<i>major histo compatibility complex class I</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NT-Agarose	Niedrigtemperatur-Agarose
PDI	Proteindisulfidisomerase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Proteinlipase A ₂
PLC	Proteinlipase C
PTH	Parathormon
PTH-R	Parathormonrezeptor
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RT	Raumtemperatur
scr-RNA	Kontroll-RNA mit nicht-bindender durchmischter Nukleotidsequenz (<i>scrambled RNA</i>)
si-RNA	RNA mit Nukleotidsequenz gegen ERp57 bindend (<i>silencing RNA</i>)
Sox9	geschlechtsbestimmende Region Y-Box 9 (<i>sex determining region Y (SRY)-box 9</i>)
TRAP	Tartrat resistente saure Phosphatase (<i>tartrate resistant acid phosphatase</i>)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDR ^{-/-}	VDR-knockout Maus
VDR ^{-/-} cre	knorpel-spezifische VDR-knockout Maus
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Knorpel

Der Knorpel ist ein wichtiger Bestandteil des Binde- und Stützgewebes. Er ermöglicht ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen, indem er als Gelenkknorpel die Enden von Skelettknochen überzieht. Auch bietet er eine stabile, aber dennoch flexible Struktur in verschiedenen Geweben, zum Beispiel im Ohr- und Nasenknorpel. Weitere wichtige Funktionen des Knorpels sind das Auffangen von Scherkräften wie in den Bandscheiben und Schambeinfugen. In der Skelettentwicklung spielt der Knorpel ebenfalls eine wichtige Rolle, hier bildet der Knorpel das Grundgerüst bzw. die Vorläuferstufe vieler Knochen. In der embryonalen Entwicklung geht der Knorpel aus dem Mesoderm hervor, wie auch andere Bindegewebstypen, zum Beispiel Sehnen, Knochen, der Glaskörper des Auges und die Cornea.

Der Knorpel besteht aus unterschiedlichen Typen von Chondrozyten. Diese sind in einer extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) eingebettet, die von den Chondrozyten selbst produziert wird. Der Wasseranteil im Knorpel, ~70%, sorgt für den hohen Kompressionswiderstand des Knorpels. Aufgrund der nicht-vaskularisierten Struktur muss der Knorpel durch Diffusion mit den notwendigen Nährstoffen versorgt werden, was durch die in unmittelbarer Umgebung vorhandenen Gewebe mit ihren Blutgefäßen gewährleistet wird.

Man unterteilt den Knorpel in hyalinen, elastischen und Faserknorpel, wobei sowohl nach morphologischen und histologischen Aspekten, als auch nach dem Ursprung des Knorpels unterschieden wird:

1. **Hyaliner Knorpel** ist der Knorpeltyp im Menschen, der am häufigsten vorkommt. Man findet ihn an den Gelenkoberflächen (artikulärer Knorpel), im Rippenknorpel, Nasenknorpel und den Gelenkspangen der Luftröhre. An den Gelenkoberflächen dient der hyaline Knorpel z.B. als Schutz des Knochens vor mechanischer Belastung. Zudem spielt er in der Knochenentwicklung eine wichtige Rolle, dient er dort als Vorläuferstufe für den Knochen. Nach der Geburt bis zur Pubertät ist der hyaline Knorpel in den Wachstumsfugen zu finden. In einigen Tieren, z.B. der Maus befindet sich der hyaline Knorpel in kleinen Mengen auch in adulten Tieren im Knochen, da deren Wachstumsfugen sich nicht vollständig schließen.

Die Matrix des hyalinen Knorpels besteht zu großen Teilen aus Kollagenfibrillen bestehend aus den Kollagenen II, IX und XI, sowie den den Proteoglykanen wie zum Beispiel Aggrekan und Decorin, wobei Kollagen IX und Decorin nicht in allen Fibrillen zu finden ist (Heinegard & Oldberg, 1989)

2. **Elastischer Knorpel** kommt im Menschen z.B. im Ohr, den Bronchien und dem Kehildeckel vor. Der hohe Gehalt an Elastin zeichnet diesen Knorpel aus und lässt ihn sehr biegsam werden.
3. **Faserknorpel** lässt sich in den Zwischenwirbelscheiben, den Menisken, der Schambeinfuge und in Teilen des Kiefergelenks finden. Er wird häufig als das Zwischengewebe zwischen dem hyalinen und dem elastischen Knorpel bezeichnet. Die hohe Festigkeit des Knorpels lässt sich aufgrund des hohen Anteils an Kollagenfasern in der Matrix des Knorpels und der Fibrillenarchitektur erklären.

1.2 Die Wachstumsfuge

1.2.1 Enchondrale Ossifikation

Die chondrale Ossifikation ist neben der desmalen Ossifikation einer von zwei Mechanismen zum Knochenwachstum in Vertebraten. Bei der desmalen Ossifikation, zum Beispiel im Schädelknochen, entsteht aus dem embryonalen Mesenchym direkt der Knochen. Die mesenchymalen Zellen differenzieren zu Osteoblasten, welche das Osteoid aufbauen, das anschließend mineralisiert. Bei der chondralen Ossifikation hingegen kommt es zu einer indirekten Bildung des Knochens über eine knorpelige Zwischenstufe. Hier entwickeln sich aus dem Mesenchym zunächst die Knorpelanlagen, welche der Form der späteren Knochen entsprechen (Chung, 2004) (Abb. 1.1).

Die chondrale Ossifikation spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Entwicklung und dem Wachstum von Knochen, als auch in deren Reparatur. Man unterscheidet bei der chondralen Ossifikation zwischen der enchondralen und der perichondralen Ossifikation. Die enchondrale Ossifikation ist eine Knochenentwicklung aus dem Inneren des Knochens heraus. Hierbei kommt es zu einer Vaskularisierung des Knorpelgewebes, einem Umbau des Knorpels mittels Osteoblasten und Osteoklasten und einer Mineralisierung des entstehenden Knochens (Abb. 1.1).

Im Gegensatz hierzu ist die perichondrale Ossifikation eine Verknöcherung von außen. Hier kommt es zu einer Osteoblasten-Einwanderung durch das Perichondrium und einer Entstehung einer Knochenmanschette. Die enchondrale Ossifikation dient dem Längenwachstum von Knochen wohingegen die perichondrale Ossifikation zum Dickenwachstum der Knochen beiträgt (Wolpert, 1981; Frost & Jee, 1994).

Der Beginn der enchondralen Ossifikation ist die Differenzierung von zusammengelagerten multipotenten mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten. Diese mesenchymalen Zellen, bilden zunächst ein knorpeliges Model des Knochens. Im Zentrum dieser Struktur beginnen einige Chondrozyten sich zu verändern, indem sie eine Reihe von verschiedenen Reifungsstufen bis hin zum hypertrophen Chondrozyten durchlaufen (Abb. 1.1). Diese Reifung der Chondrozyten ist begleitet von einer Veränderung der Zellform und Zellproliferation und der veränderten Expression von Proteinen. An der Grenzregion zwischen Knorpel und Knochen dringen Blutgefäße ein, begleitet von Osteoblasten und Osteoklasten, die den Knorpel durch Knochen und Knochenmark ersetzen (Wong & Carter, 1990; Cancedda *et al.*, 1995).

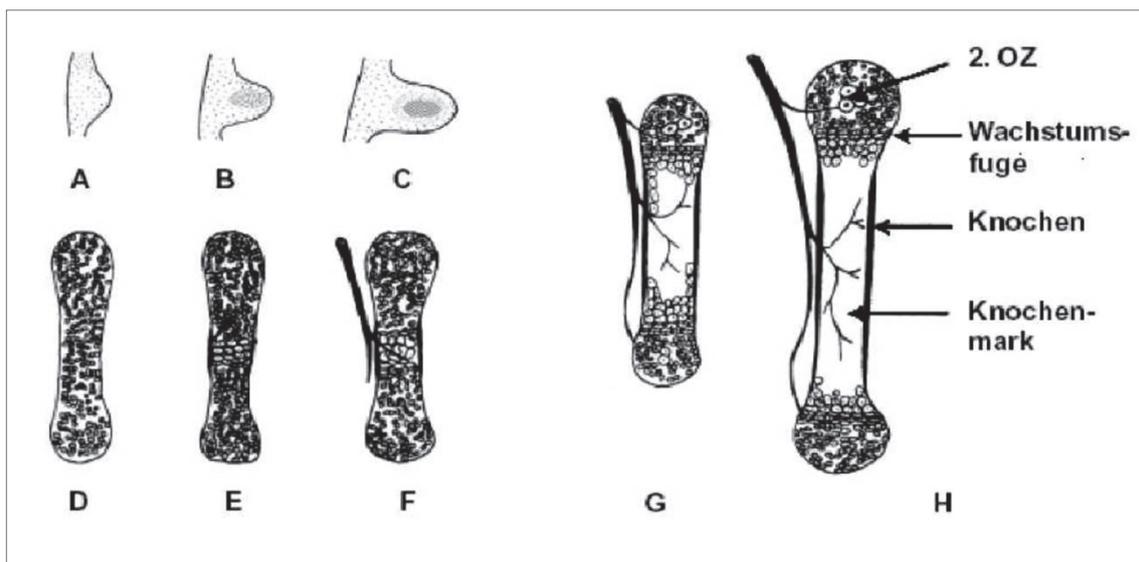


Abb. 1.1 **Enchondrale Ossifikation.** Die Kondensation der mesenchymalen Zellen hin zu den Knorpelanlagen des Knochens erfolgt in den frühen Stadien der Embryogenese (A-D). Die Chondrozyten differenzieren und die hypertrophen Chondrozyten befinden sich dann in der Diaphyse des knorpeligen Knochens (E) Blutgefäße wandern in den späteren Knochen ein (F) und die Knochenmarkhöhle und die epiphysäre Wachstumsfuge bilden sich (G). Das zweite Ossifikationszentrum (2. OZ) bildet sich im epiphysären Knorpel (H). Abbildung aus Cancedda *et al.*, 1995.

Ähnliche Prozesse wie in der Knochenentwicklung der langen Knochen, geschehen bei der Degeneration von Gelenken und der Knochenheilung.

In der Osteoarthritis, einem Verschleiß des artikulären Knorpels, kommt es in dem betroffenen Bereich zu charakteristischen Chondrozytendifferenzierungsprozessen wie zum Beispiel der Proliferation der Chondrozyten, der Expression von Hypertrophie-Markern und der Vaskularisierung des Knorpels (Dreier, 2010). Auch in der Heilung von Knochenbrüchen konnte man charakteristische Chondrozytendifferenzierungsprozesse beobachten (Ferguson *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1999; Gerstenfeld *et al.*, 2003).

1.2.2 Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge

Die Wachstumsfuge, auch Epiphysenfuge genannt, ist der Bereich zwischen der Epiphyse und der Metaphyse in Röhrenknochen (Abb.1.2). Sie besteht aus hyalinem Knorpel und ist der Ort an dem der Knochen mittels enchondraler Ossifikation in die Länge wächst (Cancedda *et al.*, 1995).

Histologisch lässt sich die Wachstumsfuge in folgende Zonen einteilen (Abb.1.2):

1. In der **Ruhezone** haben die Chondrozyten kugelförmige Gestalt, sind nur wenig metabolisch aktiv und proliferieren kaum. Die Chondrozyten sind von einer für den hyalinen Knorpel typischen Matrix umgeben in der sie weit voneinander getrennt liegen (Hunziker, 1994; Brochhausen *et al.*, 2009). Neue proliferierende Chondrozyten können hier durch die Stammzell-ähnlichen Zellen entstehen, welche in der Ruhezone zu finden sind (Abad *et al.*, 2002).
2. Die **proliferative Zone** ist der Bereich in der Wachstumsfuge, in welchem die Chondrozyten sich teilen und beginnen, Kolonnen aus abgeflachten Chondrozyten zu bilden. Hierbei ordnen sich die Mitosespindeln der Chondrozyten senkrecht zur Längsachse des Knochens an (Stevenson *et al.*, 1990). Die beiden Tochterzellen liegen zunächst horizontal nebeneinander und schieben sich dann übereinander (Hunziker, 1994). So entsteht die für die proliferierende Zone typische Säulenbildung, welche nach allgemeiner Meinung für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich ist (Morales, 2007).
3. Die Chondrozyten der **prä-hypertrophen Zone** haben ihre Fähigkeit zur Proliferation verloren und das Zellvolumen nimmt um ein Vielfaches zu, wohingegen das Volumen der ECM um die Zellen herum abnimmt. Die Zusammensetzung der ECM beginnt sich im Verlauf der prä-hypertrophe Zone zu verändern (Goldring *et al.*, 2006).

4. In der **hypertrophen Zone** beginnt die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix (Holtrop, 1972), hierfür werden Matrixvesikel von den Chondrozyten sezerniert. Dies führt zur Mineralisierung und im späten Stadium zum Umbau der ECM der hypertrophen Chondrozyten mittels Zellen wie z.B. Osteoklasten (Cancedda *et al.*, 1995) und Proteinen wie den Matrixmetalloproteinasen. Allgemein unterscheidet sich die ECM der hypertrophen Chondrozyten sehr von der ECM der proliferativen Zone und der Ruhezone. In der hypertrophen Zone werden als charakteristische Proteine Kollagen X und alkalische Phosphatase exprimiert (Alvarez *et al.*, 2000) wohingegen Kollagen II kaum noch exprimiert wird. Im Übergang von spät-hypertropher Zone zum Knochen werden die hypertrophen Chondrozyten apoptotisch (Olsen *et al.*, 2000), die mineralisierte Matrix wird vaskularisiert und Osteoblasten wandern über die Blutgefäße ein. Der trabekuläre Knochen entsteht indem die Osteoblasten die Knochenmatrix auf den als Gerüst verwendeten longitudinal verbliebenen Resten der Chondrozytenmatrix produzieren (Salle *et al.*, 2002). Einwandernde Osteoklasten bauen die restliche verbliebene Matrix ab (Lewinson & Silbermann, 1992; Vu *et al.*, 1998).

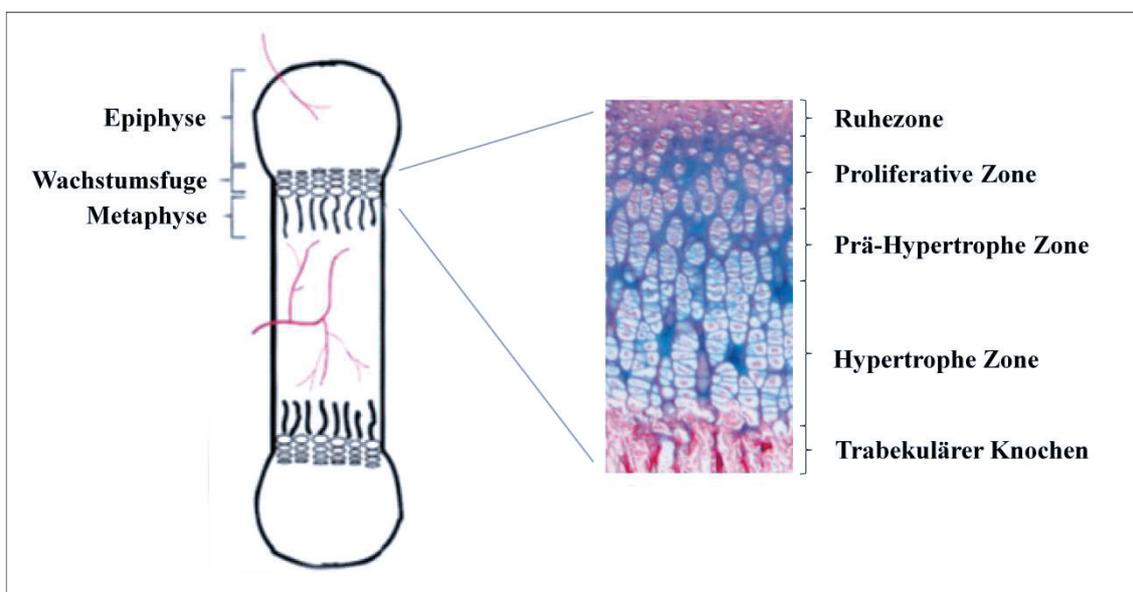


Abb. 1.2 **Wachstumsfuge**. **Links**: Schematische Darstellung eines wachsenden Knochens mit Epiphyse, Metaphyse und Wachstumsfuge. **Rechts**: Genauere Darstellung der Wachstumsfuge mit den unterschiedlichen Zonen. Rechts: Blau entspricht der Alcian Blau-Färbung und damit dem gesamten Knorpel, rot entspricht der Siriu-Rot-Färbung, einer Kollagen I- und damit Knochen Färbung. Verändert nach Vu *et al.*, 1998.

Um alle Stadien zu durchlaufen braucht ein Chondrozyt in der Ratte 3 Tage (Hunziker *et al.*, 1987). Reguliert wird die Chondrozytendifferenzierung über eine Anzahl von humoralen Hormonen und Faktoren, und vor Ort produzierter Cytokine. Solange die Zellen in der proliferativen Zone sich teilen wächst der Knochen. Während der Pubertät kommt es zu einer starken Veränderung im endokrinen System und einer veränderten Ausschüttung an Geschlechtshormonen wie Östrogen und Testosteron. Hohe Level dieser Hormone beeinflussen das epiphyseale Wachstum sowohl direkt (Carrascosa *et al.*, 1990) als auch indirekt, über die Regulierung hypophysärer Wachstumsfaktoren (Mauras *et al.*, 1996). Diese Veränderungen im Hormonhaushalt führen zur Hypertrophie aller Chondrozyten, so dass der gesamte Knorpel durch Knochen ersetzt wird (Keenan *et al.*, 1993).

Diese verschiedenen regulierenden Faktoren der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge beeinflussen diese teils aktivierend und teils inhibierend. Beispiele hierfür sind unter anderem das Parathormon (PTH) bzw. das Parathormon-verwandte Protein (*parathormone-related protein*; PTHrP) und Indian-Hedgehog (Ihh).

PTH/PTHrP sind sowohl wichtige autokrine als auch parakrine Faktoren in der enchondralen Ossifikation. Wird PTH/PTHrP in Mäusen ausgeschaltet oder überexprimiert, so ist die Entwicklung der Knochen dieser Tiere drastisch verändert (Schipani & Provot, 2003). PTH/PTHrP inhibiert die Hypertrophie der Chondrozyten indem es die Aktivität des Transkriptionsfaktors Runx2 inhibiert und dadurch die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Kalzifizierung der Matrix blockiert (Iwamoto *et al.*, 2003). Zudem unterstützt PTH/PTHrP die Proliferation der Chondrozyten via Aktivierung der Protein Kinase A und somit Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sox9 (1.2.4.1) (Huang *et al.*, 2001).

PTH/PTHrP reagieren zusammen mit Ihh via einer negativen Rückkopplungsschleife (Abb. 1.3). Die Expression von PTH/PTHrP in den Zellen des Perichondriums wird durch Ihh aktiviert, welches von prä-hypertrophen Chondrozyten produziert wird (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996; Kronenberg, 2003). Dadurch wird die Hypertrophie inhibiert und die Chondrozyten verbleiben im proliferierenden Zustand, welcher die Expression von Ihh inhibiert.

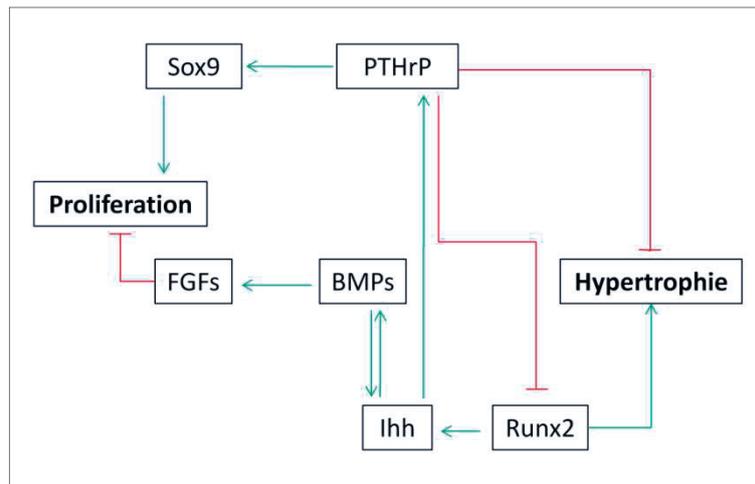


Abb. 1.3 **Negative Rückkopplungsschleife der Interaktion von PTHrP und Ihh.** Die Regulation der Proliferation und Hypertrophie von Chondrozyten in der Wachstumsfuge wird sowohl negativ als auch positiv via PTHrP und Ihh direkt als auch indirekt beeinflusst. FGFs: Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*), BMPs: knochenmorphogenetischen Proteine (*bone morphogenetic proteins*). Verändert nach (Löffler & Petrides, 2003)

Hedgehog-Proteine, zu welchen Ihh gehört, binden an den Hedgehog-Rezeptor namens patched-Rezeptor, woraufhin das Transmembranprotein smoothed freigesetzt wird, welches in den Chondrozyten aktiv ist. Die Ihh-Knockout Mäuse zeigen eine verstärkte Hypertrophie der Chondrozyten, wohingegen die Osteoblastenentwicklung in den Tieren zerstört ist (St-Jacques *et al.*, 1999). Wird Ihh überexprimiert, kommt es zu einer verzögerten Hypertrophie (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Dies lässt den Schluss zu, dass Ihh die Hypertrophie negativ und die Proliferation positiv reguliert. Ihh induziert die Proliferation unabhängig von PTHrP, wohingegen die Inhibierung der Hypertrophie PTHrP abhängig ist (Karp *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002).

1.2.3 Matrixvesikel

Bei der Kalzifizierung des Knochens spielen Matrixvesikel, die von Zellen produziert werden, wie in diesem von Fall Chondrozyten (Bonucci, 1970), eine wichtige Rolle (Abb. 1.4). Matrixvesikel sind extrazelluläre, mit einer Membran ausgestattete Strukturen (Anderson, 1969; Bonucci, 1970), welche von der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen wie Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten freigesetzt werden können (Borg *et al.*, 1981; Akisaka & Gay, 1985).

Sie haben einen Durchmesser von ~50-200 nm und sind unter anderem in der Mineralisierung von Knochen (Anderson & Reynolds, 1973) in der Wachstumsfuge (Anderson, 1969) als auch im Prädentin von Zähnen zu finden (Bernard, 1972).

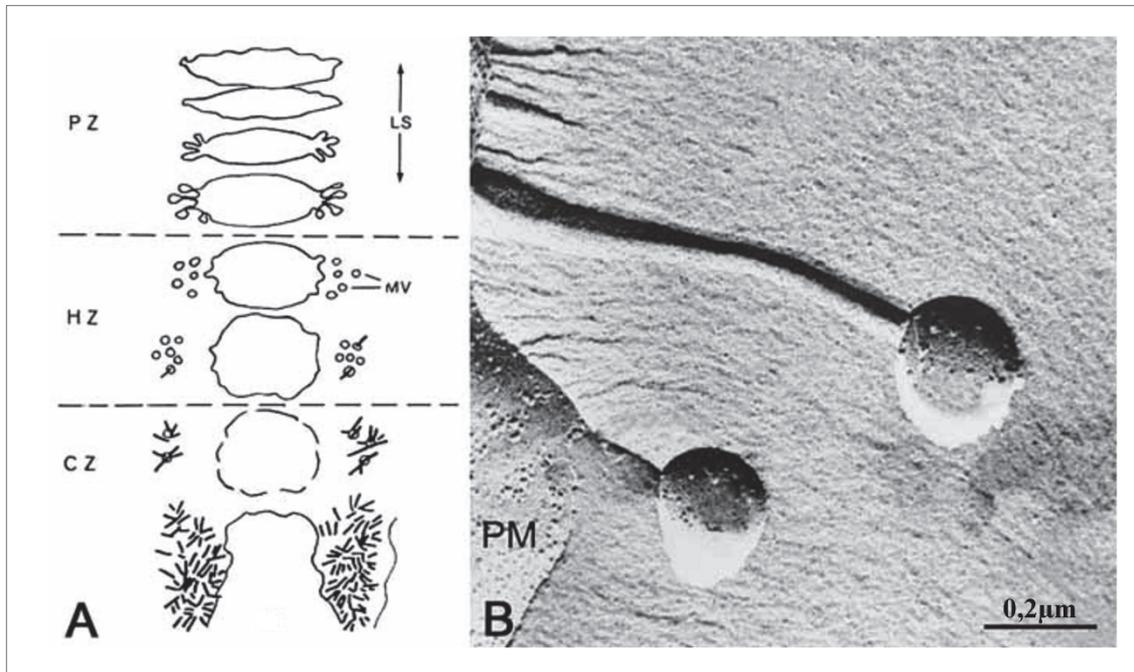


Abb. 1.4 **Entstehung von Matrixvesikel.** Diagramm der verschiedenen Chondrozytendifferenzierungsstadien und dem Abschnürungsprozess von Matrixvesikeln. In der proliferativen Zone (PZ) und der hypertrophen Zone (HZ) beginnt die Abschnürung von Matrixvesikeln (MV) an der lateralen Seite (LS) der Chondrozyten. In der unteren HZ bilden sich die ersten Hydroxyapatitkristalle in Form von Nadeln, welche sich in der kalzifizierten Zone (CZ) zusammenlagern. Die Matrixvesikel platzen und die Kristalle fusionieren an der Nahtstelle zur Metaphyse (M) (A). Gefrierbruchreplika mit deren Hilfe die Matrixvesikel, die sich von der Plasmamembran abschnüren, sichtbar gemacht wurden (B). Verändert nach (Anderson *et al.*, 2005)

Die Matrixvesikel werden von den Chondrozyten an ihren lateralen Seiten abgeschnürt (Cecil & Anderson, 1978; Ralphs & Ali, 1986) (Abb. 1.4).

Die Chondrozyten statten die Matrixvesikel mit einem speziellen Set an Lipiden, und Proteinen aus, welche für die Mineralisierung wichtig sind. Dieses Sortieren der Proteine in die Matrixvesikel konnte zum Beispiel anhand der Anreicherung von sauren Phospholipiden, welche in der Lage sind Kalzium zu binden, gezeigt werden (Peress *et al.*, 1974).

Diese Matrixvesikel enthalten hohe Konzentrationen an Kalzium und Phosphat sowie große Mengen an alkalischer Phosphatase (Ali *et al.*, 1970). Bei der Verknöcherung kommt es zur Ablagerung von Mineral im Gewebe.

Hierfür wird zunächst die benötigte alkalische Phosphatase von den hypertrophen Chondrozyten synthetisiert (Osdoby & Caplan, 1981). Durch die Aktivität dieser Phosphatase kommt es zur Phosphatfreisetzung und dadurch zu erhöhten Phosphatkonzentrationen. Sobald eine kritische Kalzium-Phosphat-Konzentration erreicht ist, ein im Organismus zu inhibierender Prozess, kann das Mineral als Hydroxyapatit ausfallen (Hunter, 1987). Da das Löslichkeitsprodukt von Hydroxyapatit durch die physiologischen Konzentrationen von $[Ca^{2+}]$, $[OH^-]$ und $[PO_4^{3-}]$ um ein vielfaches überschritten wird, wird die Mineralisierung negativ kontrolliert (Rutsch & Terkeltaub, 2003; Weissen-Plenz *et al.*, 2008). Die alkalische Phosphatase konnte an den Orten der Mineralisierung vermehrt gefunden werden (Genge *et al.*, 1988).

Dadurch initiieren Matrixvesikel die Ablagerung von Mineral im kalzifizierenden Knorpel (Anderson, 1969) (Abb. 1.4). Weiterhin ist bekannt, dass Matrixvesikel an Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen II und X (Wu *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1991) binden. Dies lässt vermuten, dass die Verbindung der Matrixvesikel mit den Kollagenen für die Mineralisierung notwendig ist.

1.2.4 Marker der Chondrozytendifferenzierung

Die Chondrozytendifferenzierung ist ein Prozess der von verschiedenen humoralen Hormonen und Faktoren und von vor Ort produzierten Cytokinen reguliert wird. Während der Differenzierung der Chondrozyten kommt es zu stetigen Veränderungen der Zellen und deren umgebender Matrix. Aus diesem Grund ist es möglich für die einzelnen Zellstadien verschiedene Marker zu definieren (Goldring *et al.*, 2006) (Abb. 1.5).

Für diese Arbeit wurden aus den verschiedenen Markern der unterschiedlichen Differenzierungsstadien einzelne ausgewählt, um die Differenzierungsstadien der untersuchten Chondrozyten bestimmen zu können. Diese sind folgenden genauer beschrieben.

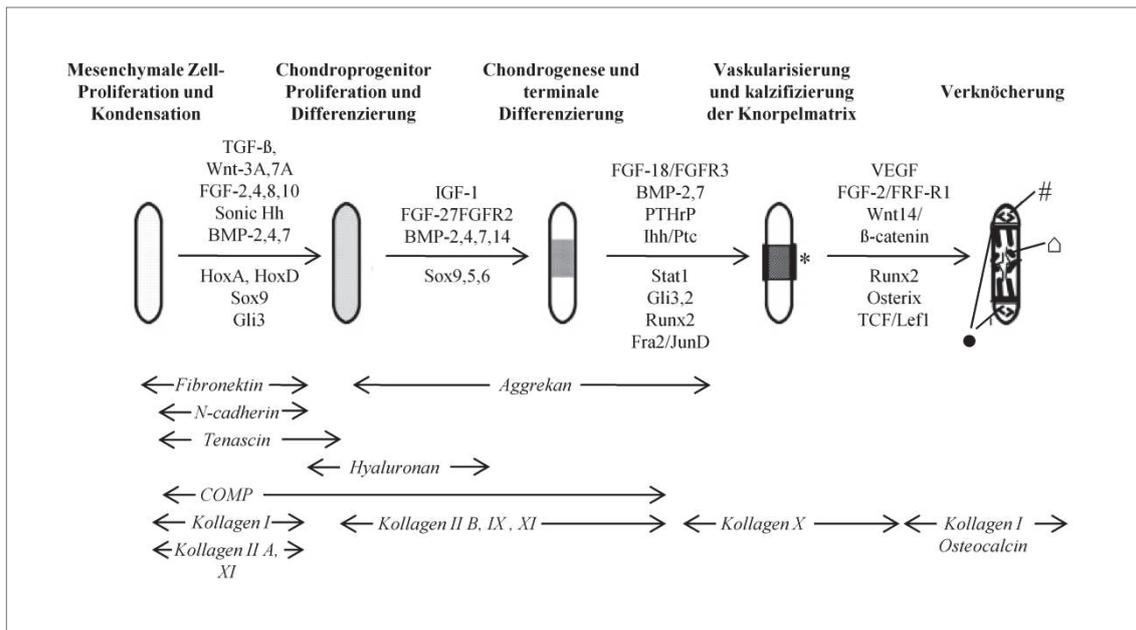


Abb. 1.5 **Marker der unterschiedlichen Chondrozytendifferenzierungsstadien.** Schematische Darstellung der einzelnen Differenzierungsstadien. Oberhalb der Pfeile ist das Muster der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren dargestellt, unterhalb der Pfeile die involvierten Transkriptionsfaktoren. Die Proteine der ECM, welche in den einzelnen Stadien unterschiedlich sind, sind ganz unten in kursiv dargestellt. (●) Wachstumsfuge, (Δ) Primäres Ossifikationszentrum, (#) Sekundäres Ossifikationszentrum. Verändert nach Goldring *et al.*, 2006.

1.2.4.1 Sox9 (*sex determining region Y (SRY)-box 9, geschlechtsbestimmende Region Y-Box 9*)

Der Transkriptionsfaktor Sox9 kann früh in der Chondrogenese während der mesenchymalen Kondensation gefunden werden. In der Mausentwicklung wurde Sox9 im Embryo an Tag E8.5 zum ersten Mal detektiert und erreicht seinen Expressionshöhepunkt zwischen den Tagen E11.5 und E14.5 (Wright *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1997). Sox9 induziert unter anderem die Expression von Kollagen II (Bell *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997) und wie Kollagen II wird Sox9 in Prächondrozyten und Chondrozyten exprimiert (Abb. 1.6). In der Wachstumsfuge findet man große Mengen an Kollagen II und Sox9 in Chondrozyten der Ruhezone und der proliferativen Zone. Sox9 wird in hypertrophen Chondrozyten nicht mehr exprimiert, wohingegen Kollagen II in einem sehr viel geringerem Anteil als zuvor zu finden ist.

1.2.4.2 Die Knorpel-Kollagene II und X

Kollagene sind neben Aggrekan die Hauptkomponenten der ECM des Knorpels. Es lassen sich die Kollagene II, IX, X und XI finden (Bruckner & van der Rest, 1994).

Das Kollagen II wurden in knorpeligen Strukturen von Klaus von der Mark gefunden (von der Mark *et al.*, 1976). Es kommt in der humanen Wachstumsfuge hauptsächlich in der proliferativen Zone, Reifungszone und oberen hypertrophen Zone vor (Sandberg & Vuorio, 1987) (Abb. 1.6) und bildet mit den Kollagenen IX und XI zusammen die Knorpelfibrillen (Mendler *et al.*, 1989; Bruckner & van der Rest, 1994). Im Huhn kommt Kollagen II in allen Knorpelbereichen vor, wird jedoch nur von den proliferierenden Chondrozyten neu synthetisiert (Leboy *et al.*, 1988). Kollagen X findet man sowohl im Säuger als auch im Huhn ausschließlich in der hypertrophen Zone (Schmid & Linsenmayer, 1985b; Schmid & Linsenmayer, 1985a; Kirsch & von der, 1991) (Abb. 1.6).

1.2.4.3 VEGF (*vascular endothelial growth factor*, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

In der enchondralen Ossifikation spielt VEGF eine essentielle Rolle bei der Invasion der Blutgefäße in dem Knorpel (Ferrara & vis-Smyth, 1997). VEGF ist sowohl an der Angiogenese während der Organentwicklung im prä-natalen Stadium beteiligt, als auch an der post-natalen physiologischen und pathologischen Angiogenese. Es ist ein starker Stimulator der Endothelzellproliferation, -migration als auch der Röhrenbildung von Gefäßen (Crivellato, 2011). Nachdem VEGF von den hypertrophen Chondrozyten in großen Mengen exprimiert (Abb. 1.4) wird kommt es zur Vaskularisierung des hypertrophen Knorpels und zum Abbau der ECM (Caplan, 1991; Gerber *et al.*, 1999).

1.2.4.4 VDR (Vitamin D-Rezeptor)

Der nukleäre Vitamin D-Rezeptor (VDR) (Abb. 1.6) wird von Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Narbaiz *et al.*, 1983; Boivin *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1996). Zudem ist bekannt das VDR wiederum als ein Transkriptionsfaktor die Genexpression von u.a. Osteoblasten und Chondrozyten reguliert (Demay *et al.*, 1990; Haussler *et al.*, 1998). Detailliertere Beschreibung von VDR siehe 1.3.2.1

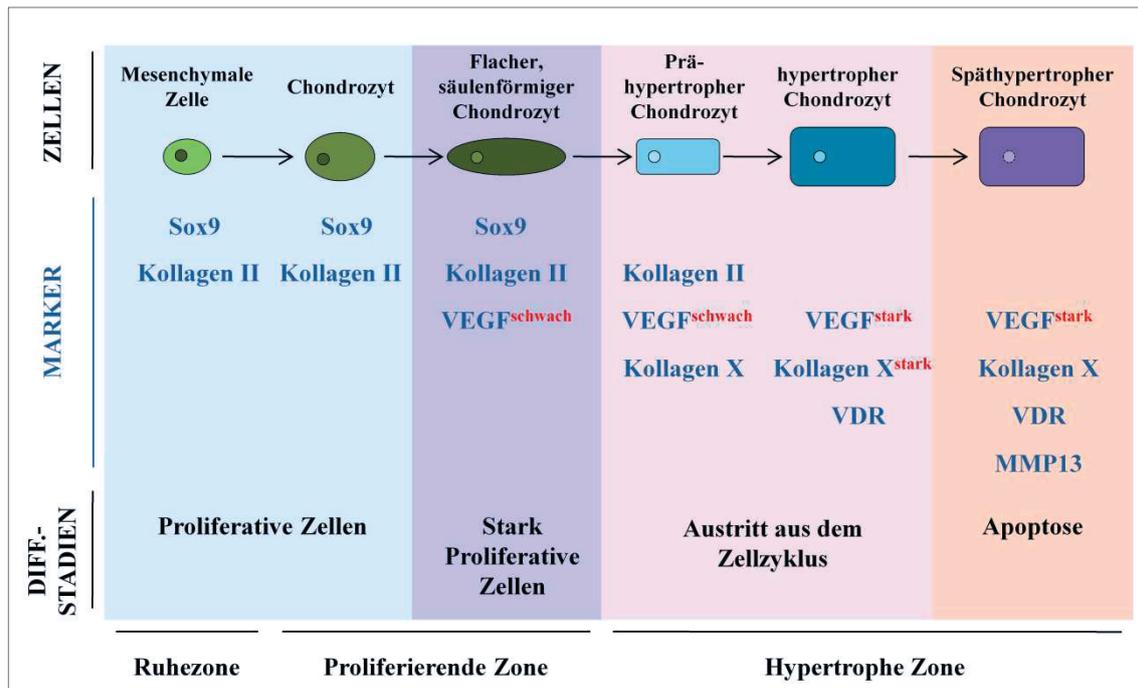


Abb. 1.6 Für diese Arbeit ausgewählte Marker der verschiedenen Chondrozytendifferenzierungsstadien. Marker der einzelnen Stufen der Differenzierung stehen unter den Zellen, die sie exprimieren und über den Differenzierungsstadien. Das Maß der Genexpression ist in rot dargestellt. Verändert nach (Zuscik *et al.*, 2008).

1.2.4.5 MMP13 (Matrix-Metalloproteinase 13)

Die Degradation der Knorpelmatrix an der unteren Wachstumsfuge erfolgt unter anderem durch MMP13. MMP13 gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), einer Familie von Endopeptidasen, welche als extrazelluläre Regulatoren des Zellwachstums, der Migration und des Umbaus der ECM gelten (Brinckerhoff & Matrisian, 2002). Andere bekannte Kollagenasen neben MMP13 sind MMP1 und MMP8, die für den Abbau der Kollagene in der ECM zuständig sind (Brinckerhoff & Matrisian, 2002).

MMP13 wird von spät hypertrophen Chondrozyten (Abb. 1.6) und Osteoblasten exprimiert und ermöglicht durch den Abbau der ECM die Mineralisierung durch Osteoblasten, die Vaskularisierung des Gewebes und die Schaffung des Knochenmarkraumes (Mattot *et al.*, 1995).

1.3 Vitamin D

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von ERp57, einem von zwei Vitamin D-Rezeptoren, in der Chondrozytendifferenzierung. Aus diesem Grund werden das Vitamin D, dessen Homöostase und die beiden Rezeptoren hier genauer beschrieben.

Für die chemische Identifikation und Synthese von Vitamin D bekam 1938 der deutsche Chemiker und Biochemiker Adolf Windaus den Nobelpreis für Chemie. Im Gegensatz zur allgemeinen Meinung ist Vitamin D kein Vitamin, sondern ein Steroidhormon. Vom Menschen kann es entweder über die Nahrung aufgenommen oder in der Haut mit Hilfe von UV-B-Licht hergestellt werden. Für diese reine Fotoreaktion wird als Substrat eine ausreichende Menge an 7-Dehydrocholesterol und UV-B-Licht benötigt (St-Arnaud, 2008).

Um die aktivste Form des Vitamin D, das 1,25 Dihydroxy-Vitamin D₃ (1,25-(OH)₂ Vit D₃) zu bilden, sind die 25- als auch die 1 α -Hydroxylierung des Vitamin D notwendig. Die erste Hydroxylierung des Vitamin D, die 25-Hydroxylierung, geschieht in der Leber. Im Menschen sind für die Hydroxylierung vier Enzyme bekannt, die diese katalysieren können: CYP2DII, CYP2D25, CYP3A4 und CYP2R1, wobei CYP2R1 vermutlich die Hauptrolle spielt (Cheng *et al.*, 2004). Für die zweite Hydroxylierung des Vitamin D, die 1 α -Hydroxylierung ist im Menschen nur die 25-OH-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) zuständig. Diese ist hauptsächlich in den Nieren aktiv und wird durch Phosphat und Kalzium sowie verschiedene Hormonen reguliert (Fraser & Kodicek, 1970). Anders als in den Lehrbüchern beschrieben, ist bekannt, dass das CYP27B1 konnte auch in verschiedenen anderen Geweben, wie der Haut, der Plazenta und dem Knorpel nachgewiesen werden (Miller & Portale, 2000), wodurch vermutet wird, dass es sich hierbei um die Aktivierung von Vitamin D zu autokrinen und parakrinen Zwecken handelt (Bikle, 2007; Jones, 2007). Die Inaktivierung des CYP27B1-Genes führt zu einer Krankheit, die in Kindern als Vitamin D-resistente Rachitis Typ 1 beschrieben wurde (PRADER *et al.*, 1961).

1,25-(OH)₂ Vit D₃ ist in der Erhaltung des Kalziumhaushaltes mittels Regulation der Kalziumaufnahme im Darm und der Kalziumabgabe in den Nieren von großer Bedeutung (St-Arnaud, 2008) (Abb.1.7).

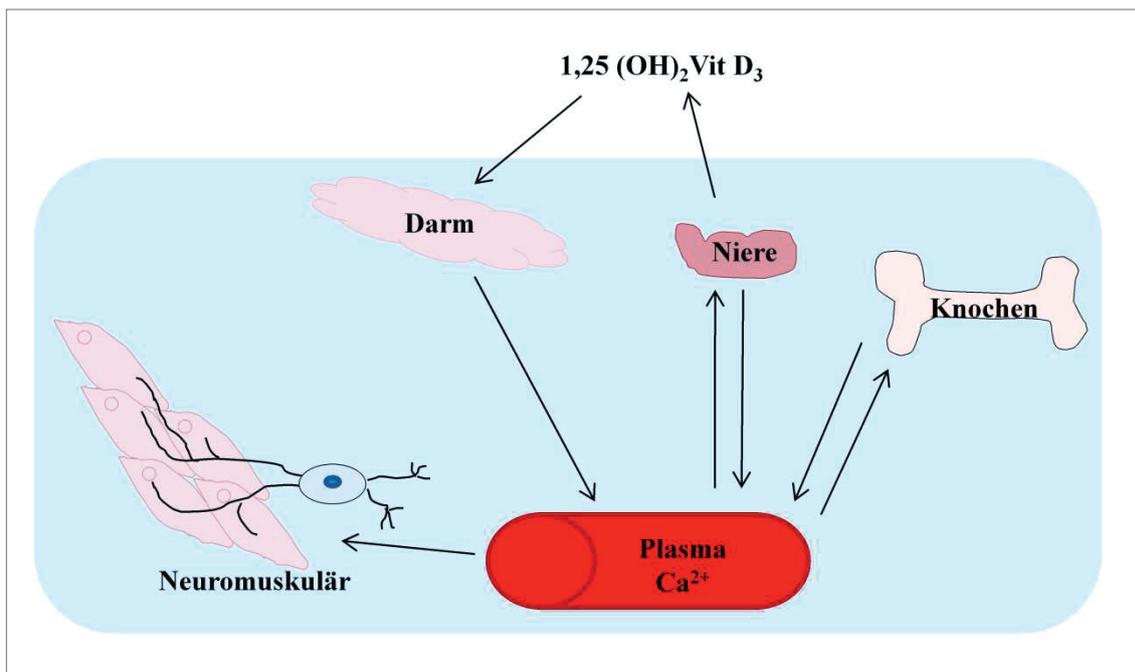


Abb. 1.7 **Regulation des Kalziumhaushalts.** Schematische Darstellung des Kalziumkreislaufs im Menschen. $1,25\text{-(OH)}_2\text{ Vit D}_3$ reguliert die Aufnahme von Kalzium im Darm. Bei einer hohen Kalzium-Plasmakonzentration kommt es zur Mineralisierung von Knochen und zur Abgabe von Kalzium über die Nieren. Dieser Haushalt ist zur Verhinderung der Dekalzifizierung von Knochen und zum Schutz vor hypokalzämischen Tetanie (Neuromuskulär) notwendig. Verändert nach DeLuca, 2004.

1.3.1 Rolle von Vitamin D im Knochenwachstum

$1,25\text{-(OH)}_2\text{ Vit D}_3$ spielt im Längenwachstum von Knochen eine wichtige, wenn auch indirekte Rolle (Underwood & DeLuca, 1984). Kommt es zu einer Vitamin D Defizienz führt das bei Kindern zu Rachitis (Pettifor & Prentice, 2011) und bei Erwachsenen zu Osteomalazie (Dawson-Hughes *et al.*, 1997), einer abgeschwächten Form der Rachitis. Die Rachitis tritt meist schon im Zeitraum zwischen dem zweiten Lebensmonat und 2 Jahren auf. Klassische Symptome der Rachitis sind verzögerter Verschluss der Schädelnähte und Erweichung der Schädelknochen. Im Skelett kommt es häufig zur Krümmung der Beine (O-Beine), Verbiegungen der Wirbelsäule und Umformung des Beckens aufgrund der weichen Knochen. Die Osteomalazie tritt bei Erwachsenen in Form von Knochenschmerzen auf (Pettifor & Prentice, 2011; Dawson-Hughes *et al.*, 1997).

Aufgrund der Erhaltung des Kalziumhaushaltes, reguliert $1,25\text{-(OH)}_2\text{ Vit D}_3$ unter anderem die Mobilisierung von Kalzium aus dem Knochen. Somit ist $1,25\text{-(OH)}_2\text{ Vit D}_3$ für die Homöostase des Skeletts essentiell. Reguliert wird der Kalziumhaushalt unter anderem von dem PTH (DeLuca, 2004).

PTH wird in der Nebenschilddrüse produziert und reguliert hauptsächlich die Kalziumkonzentration des Blutplasmas (Abb 1.8). Kommt es zu einer Absenkung des Kalziumlevels im Blut wird PTH freigesetzt und es kommt zur einer vermehrten Aktivität der 1α -Hydroxylase via Aktivierung von cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat) und zur Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen. Eine Erhöhung des Kalzium-Serumlevels über den Normalwert führt zu einer negativen Rückkopplung und somit zur Hemmung der PTH-Sekretion (Stubbs & Wetmore, 2011) (Abb 1.8).

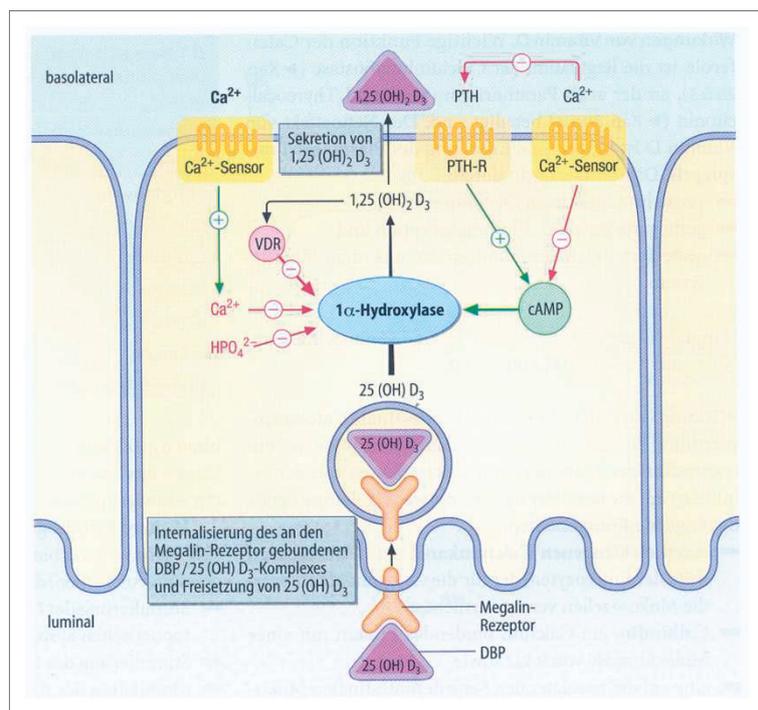


Abb. 1.8 **Regulation des Vitamin D- und Kalziumhaushalts.** Das 25 Hydroxy-Vitamin D_3 wird gebunden an das Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) aus dem Blut an der luminalen Seite der Epithelien der proximalen Tubuli der Niere an den Megalin-Rezeptor gebunden. Nach der Internalisierung und Freisetzung des 25 Hydroxy-Vitamin D_3 kommt es zur zweiten Hydroxilierung. Positiv reguliert wird die 1α -Hydroxylase-Expression über cAMP, wohingegen Phosphat, Kalzium und 1,25 Dihydroxy-Vitamin D_3 das Enzym hemmen. Parathormonrezeptor (PTH-R). Abbildung aus Löffler und Petrides, 2003.

Generell wird die Blutplasmakonzentration von Kalzium sehr konstant zwischen 2,0 - 2,6 mmol/l gehalten und ist in Bezug auf den Mineralhaushalt im Knochen gesättigt. Kommt es zu einer Reduktion des Kalzium- und Phosphatgehalts, kann dem über die Aufnahme von Kalzium und Phosphat im Darm entgegengewirkt werden. Eine weitere Kalziumquelle ist das Kalzium im Knochen, welches im Bedarfsfall freigesetzt werden kann (Abb. 1.7).

Der Auf- und Abbau des Knochens ist ein ständiger Prozess. Jährlich werden etwa 10% der Knochenmasse umgebaut (Kular *et al.*, 2012). Beim Menschen führt ein zu starker Abbau des Knochens zu Osteoporose, einer Abnahme der Knochendichte, welche häufig zu Knochenbrüchen führt. Bei Frauen im Alter ab 45 Jahren und Männern im Alter ab 55 tritt diese Krankheit auf, wobei 80% aller betroffenen Frauen nach der Menopause sind (Harvey *et al.*, 2010; Baron & Hesse, 2012).

Die Gabe von Kalzium führt zur Minimierung von Hypokalzämie und stellt die Knochenmineralisierung wieder her. Dies konnte sowohl in Menschen als auch in Mäusen beobachtet werden (al-Aqeel *et al.*, 1993).

1,25-(OH)₂ Vit D₃ wirkt auf den Knochenstoffwechsel indem es in Osteoblasten eine Reihe von Proteinenexpressionen induziert, welche am Aufbau der Knochenmatrix und der Kalzifizierung beteiligt sind. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Fähigkeit von Osteoblasten die Osteoklastogenese zu unterstützen, durch Vitamin D reguliert wird, Vitamin D aber hierfür nicht essentiell ist (Takeda *et al.*, 1999).

1.3.2 Rezeptoren von Vitamin D

1.3.2.1 Vitamin D Rezeptor (VDR)

Der klassische Vitamin D Rezeptor (VDR) gehört zur Superfamilie der nukleären Hormon-Rezeptoren. Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an VDR führt zu einer Induktion der Expression der 24-Hydroxylase, Calbindin und Osteocalcin, aber auch VDR und zu einer Repression der Expression der 1 α -Hydroxylase, PTH und Kollagen I. VDR wird in fast jedem humanen Gewebe exprimiert (Stumpf *et al.*, 1982; Clemens *et al.*, 1988; Haussler *et al.*, 1998), wobei Zellen mit wenig oder keinem VDR rote Blutzellen, reifer quergestreifter Muskel und teilweise die hoch differenzierten Gehirnzellen sind (Eyles *et al.*, 2005).

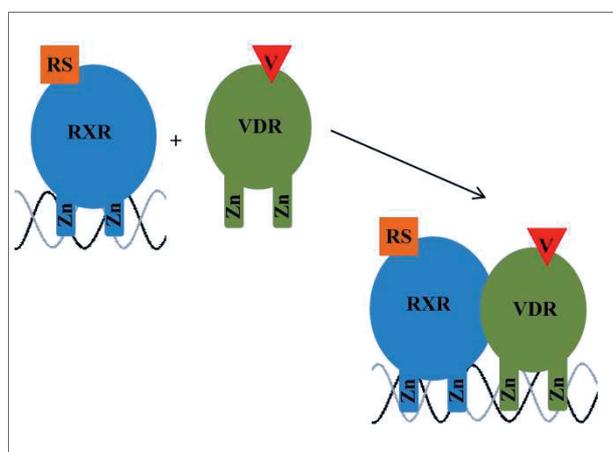


Abb. 1.9 **Bindung des Vitamin D Rezeptors (VDR) via Retin-9-cis-Säure-Rezeptor (RXR) an die DNA.** Nach Bindung des 1,25-(OH)₂Vit D₃ (V) an den VDR, bindet dieser Komplex über RXR mit Hilfe der zwei Zink-Finger (Zn) an die DNA. Retin-9-cis-Säure (RS). Verändert nach (Rassow J. *et al.*, 2008)

Wachstumsfugenchondrozyten exprimieren *in vitro* VDR nachdem sie aufgehört haben sich zu teilen und hypertroph werden (Jikko *et al.*, 1993). Bekannt ist, dass die Chondrogenese in Kultur von embryonalen mesenchymalen Zellen aus Hühner-Gliedmaßenknospe durch 1,25-(OH)₂ Vit D₃ stimuliert wird und dieser Effekt spezifisch ist, da 24,25-(OH)₂ Vitamin D₃ dies nicht auslöst (Tsonis, 1991).

1.3.2.2 VDR-knockout Mäuse

Mutationen im VDR-Gen führen zu einer Störung des Mineralhaushaltes und der Knochenmineralisierung. Die zwei Zink-Finger in der VDR-Struktur dienen als DNA-bindende Domänen (Abb. 1.9). Diese sind essentiell, Mutationen führen zu einem funktionslosen VDR (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001).

Es gibt 4 verschiedene VDR-knockout Mauslinien (VDR^{-/-}), bei denen VDR in allen Geweben deletiert wurde: je eine in Tokyo (Yoshizawa *et al.*, 1997), Boston (Li *et al.*, 1997), Leuven (Van Cromphaut *et al.*, 2001) und München (Erben *et al.*, 2002). Alle bisher hergestellten VDR-knockout Mäuse haben eine Mutation in einem der beiden Zink-Finger und ihnen allen fehlt, bis auf eine Ausnahme, das VDR komplett. Diese Tiere entwickeln denselben Phänotyp wie die Menschen mit diesen Mutationen. Eine VDR-knockout Maus (Erben *et al.*, 2002) hat ein mutiertes VDR das 1,25-(OH)₂ Vit D₃ jedoch nicht die DNA binden kann. Auch diese Maus zeigt den selben Phänotyp wie die VDR^{-/-}-Mäuse (Erben *et al.*, 2002).

Alle Mäuse zeigen bei der Geburt keinen Phänotyp, sie sind vital und entwickeln sich, solange sie gesäugt werden, normal. Die Knochenentwicklung der Tiere ist bis zur Phase des Entwöhrens normal (Kovacs *et al.*, 2005). Wenn die Tiere jedoch entwöhnt werden entwickeln sie Hypokalzämie, sowie (zum Teil) sekundären Hyperparathyroidismus (erhöhte PTH-Level aufgrund geringer Vitamin D Level) und Hypophosphatämie. Ab diesem Alter werden die Mäuse im Wachstum verzögert gegenüber Wildtyp-Mäusen (WT-Mäusen) und entwickeln schwere Rachitis bzw. Osteomalazie (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002). Nach dem Entwöhnen ist das longitudinale Wachstum der langen Knochen vermindert. Eine fortschreitende Rachitis und erweiterte epiphyseale Wachstumsfuge, die verstärkt ungeordnet ist, konnten bei den VDR^{-/-}-Tieren beobachtet werden. Die Wachstumsfugen dieser Tiere zeigen zunächst keine Veränderung; Ruhezone und proliferative Zone sind normal ausgebildet und auch die Differenzierungsmarker Kollagen X und Osteopontin sind gegenüber den Kontrolltieren nicht verändert (Li *et al.*, 1997; Yoshizawa *et al.*, 1997; Erben *et al.*, 2002).

Eine stark beeinträchtigte Apoptose der hypertrophen Chondrozyten führt in den VDR^{-/-}-Tieren zu einer Ausdehnung der Wachstumsfuge, welche sich schon kurz nach dem Entwöhnen zeigt (Donohue & Demay, 2002). Dieser Phänotyp tritt aufgrund einer veränderten Mineralzusammensetzung des Serums auf, da die Kalziumaufnahme im Darm in erwachsenen Mäusen stark reduziert ist (Van Cromphaut *et al.*, 2001). Zudem sind die Serumlevel von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ erhöht aufgrund des sekundären Hyperparathyroidismus. Eine erhöhte 1 α -Hydroxylase Aktivität und eine verminderte Aktivität der 24-Hydroxylase, sowie reduzierte Serumlevel von 24,25-(OH)₂ Vitamin D₃ nach dem Entwöhnen konnten nachgewiesen werden (Yoshizawa *et al.*, 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verhinderung der Fehlregulation des Mineralhaushaltes mittels Nahrungszusätzen, der rachitische Phänotyp aufgehoben werden konnte (Li *et al.*, 1998a; Amling *et al.*, 1999; Van Cromphaut *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Beobachtung wurde auf einen indirekten Effekt von Vitamin D auf die Mineralisierung des Skeletts geschlossen, indem das Fehlen von Vitamin D zu einer Fehlregulation des Mineralhaushaltes führt welche der eigentliche Ursprung des Phänotypen ist.

1.3.2.3 Knorpel-spezifische VDR-knockout Maus

Neben den vier verschiedenen VDR-knockout Mäusen, bei denen in allen Geweben VDR deletiert wurde, wurde von Masuyama *et al.*, 2006 eine knorpel-spezifische VDR-knockout Maus (VDR^{-/-}cre-Maus) generiert um zwischen direkten und indirekten Vitamin D Effekten bzgl. der Chondrozytendifferenzierung unterscheiden zu können. Hierfür wurden das Cre/loxP-System verwendet (siehe 1.3.2.10), welches es ermöglicht, Gene unter einem spezifischen Promoter zu deletieren.

Da Kollagen II in den frühen Stadien der Chondrozytendifferenzierung gefunden werden kann (Sandberg & Vuorio, 1987) (Abb. 1.6), wird der Kollagen 2a1 Promotor mit Hilfe der Cre-Rekombinase genutzt um spezifisch in Chondrozyten mit Hilfe des Cre/loxP-Systems Gene auszuschalten. Mit Hilfe dieser Col2a1-cre-Maus von Ovchinnikov *et al.* und der Col2a1-cre-Maus von Sakai *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expression des fusionierten Col2a1-cre Gens ab Tag E9.5 in den Somiten von Mäusen statt findet. Am Tag 12.5 der embryonalen Entwicklung konnten in den Rippen, den sich entwickelnden Gliedmaßen und dem Meckel-Knorpel die Expression des fusionierten Col2a1-cre Gens nachgewiesen werden (Ovchinnikov *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2001).

Die so entstandenen VDR^{-/-}cre-Mäuse waren lebendig und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Im Alter von E15.5, bei Neugeborenen, bei 15 Tage und 8 Wochen alten Mäusen zeigten die Tiere normale Wachstumskurven. Weder bei den Femurlängen, noch in den Gesamtwachstumslängen konnten zu den untersuchten Zeitpunkten Unterschiede zwischen den VDR^{-/-}cre- und den WT-Tieren gefunden werden. Histologisch konnte keine Veränderung des hypertrophen Knorpels beobachtet werden, jedoch wurde eine reduzierte Expression von Kollagen X bei 15 Tage alten VDR^{-/-}cre-Tieren entdeckt. Zu anderen Zeitpunkten konnte diese Expressionsveränderung nicht gefunden werden. Die Kollagen II Expression war zu allen Zeitpunkten unverändert. Die Hauptunterschiede zwischen den VDR^{-/-}cre- und WT-Tieren wurden in der Mineralisierung der Knochen gefunden. In Neugeborenen und 15 Tage alten Tieren war das Knochenvolumen pro Gesamtvolumen bei VDR^{-/-}cre-Tieren signifikant um 50% erhöht. Zudem reichen die Trabekel der VDR^{-/-}cre-Tiere zu diesen Zeitpunkten weiter in die Metaphyse als die der WT-Tiere. Im Alter von 8 Wochen konnten diese Unterschiede nicht mehr gefunden werden. Diese Veränderung ging mit einer signifikanten Verminderung der Osteoklastenzahlen bei E15.5, Neugeborenen und 15 Tage alten VDR^{-/-}cre-Tieren einher. Die Zahl der Osteoblasten war unverändert. Erklärt wurde die Verminderung der Osteoklasten mit einer verringerten VEGF und *Receptor Activator of NF-κB Ligand*- (RANKL-) Expression, welche zu einer beeinträchtigten Gefäß Invasion und einer verminderten Osteoklastenzahl in der Metaphyse führt (Masuyama *et al.*, 2006).

1.3.2.4 CYP27B1-knockout Maus

Sowohl Dardenne *et al.* als auch Panda *et al.* haben 2001 eine Maus mit fehlender 25-OH-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) generiert. Diese Tiere entwickelten einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die konstitutiven VDR-knockout Mäuse. Nach dem Entwöhnen entwickeln die Tiere eine veränderte Wachstumsfuge mit vermindertem Knochenwachstum und eine breite Wachstumsfuge, wie bei einer Rachitis (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001). Dies ist bedingt durch Hypokalzämie und sekundären Hyperparathyroidismus (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001). Der Phänotyp der Tiere kann ebenfalls durch Nahrungsumstellung korrigiert werden (Hoenderop *et al.*, 2002; Dardenne *et al.*, 2003a; Dardenne *et al.*, 2003b; Rowling *et al.*, 2007).

Zudem kommt es nach dem Entwöhnen wie bei den $VDR^{-/-}$ Mäusen zu Osteomalazie: das trabekuläre Knochenvolumen ist aufgrund einer vermehrten Menge an unmineralisiertem Knochen erhöht, die Anzahl der Osteoblasten an der Knochenoberfläche ist erhöht, der Serumlevel von alkalischer Phosphatase ist erhöht und die Mineralanlagerung ist stark beeinträchtigt, jedoch wurde eine unveränderte Anzahl der Osteoklasten gefunden (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001).

1.3.2.5 Knorpel-spezifische CYP27B1-knockout und CYP27B1 überexprimierende Mäuse

Neben der konstitutiven CYP27B1-knockout Maus ($CYP27B1^{-/-}$ -Maus) wurde von Naja *et al.*, 2009 eine knorpel-spezifische CYP27B1-knockout Maus ($CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Maus) generiert, um zwischen direkten und indirekten Vitamin D Effekten bzgl. der Chondrozytendifferenzierung unterscheiden zu können. Die $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Tiere zeigten gegenüber den WT-Tieren im Alter von 2 Tagen normale Kalzium-Serumlevel. Die Tibien der Tiere wurden histologisch und per μ CT untersucht. Im Alter von E15.5 waren die hypertrophe Zonen, der Tiere signifikant breiter als die der WT-Tiere. Der Grund hierfür war nicht eine verstärkte Proliferation, sondern eine verminderte Osteoklasten Rekrutierung. Die Anzahl an Osteoklasten war in $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Mäusen im Alter von E15.5 reduziert. Bei 2 Tage alten Tieren konnte dieser Unterschied nicht mehr gefunden werden. In diesem Alter zeigten die $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Mäuse im μ CT signifikant mehr Knochenvolumen, dickere und mehr Trabekel und eine Verminderung der Trennung einzelner Trabekel. Im Alter von 14 und 42 Tagen konnten keine Unterschiede zwischen den $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ - und den WT-Mäusen bei diesen Analysen gefunden werden.

Parallel zur $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Maus generierten Naja *et al.* 2009 eine knorpel-spezifische transgene CYP27B1- überexprimierende Maus ($CYP27B1^{tg}$). Diese Tiere zeigten im Alter von E14.5 den gegenläufigen Phänotypen histologisch und im μ CT im Vergleich zu den E15.5 alten $CYP27B1^{cre^{-/-}}$ -Mäusen. Im Alter von 2 und 42 Tagen konnten keine Unterschiede zwischen den $CYP27B1^{tg}$ - und den WT-Tieren gefunden werden (Naja *et al.*, 2009).

1.3.2.6 ERp57

Neben dem klassischen Vitamin D Rezeptor (VDR) ist ERp57 als ein zweiter Rezeptor für 1,25-(OH)₂ Vit D₃ beschrieben worden (Boyan *et al.*, 2003). Dieses ERp57 wird in der Literatur auch als PDIA3, GRp58, ERp60, ERp61 und MARRS (*1,25-(OH)₂Vit D₃ membran-associated, rapid response steroid-binding protein*) genannt.

Es sind verschiedene Funktionen des ERp57 bekannt, wobei die beiden meist beschriebenen zum einen die Chaperonfunktion des ERp57 im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist und zum anderen die Bindung von 1,25-(OH)₂Vit D₃.

ERp57 gehört neben ERp72, P5, PDIR, PDIp, TMX, ERp44 und weiteren Proteinen zu den Proteindisulfidisomerase- (PDI-) ähnlichen Proteinen (Ferrari & Soling, 1999). Im ER ist ERp57 wie PDI und die anderen PDI-ähnlichen Proteine hauptsächlich an der Qualitätskontrolle neu synthetisierter Glykoproteine beteiligt (Oliver *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1999; Molinari & Helenius, 1999). Zudem ist ERp57 an dem Zusammenbau des MHC-I (*major histocompatibility complex class I*) beteiligt, indem es in den schweren Ketten der Moleküle die Disulfid-Bildung katalysiert (Lindquist *et al.*, 1998; Garbi *et al.*, 2006).

Als 1,25-(OH)₂ Vit D₃-Rezeptor wurde ERp57 zunächst als basolateraler Vitamin D Membranrezeptor (BLM-VDR) beschrieben, welcher für die schnelle nicht-genomische Antwort auf 1,25-(OH)₂Vit D₃ verantwortlich gemacht wurde (Abb.1.10). Diese schnellen nicht-genomischen Effekte von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ wurden in verschiedenen Geweben und Spezies beschrieben (Karsenty *et al.*, 1985; Nemere & Szego, 1981; Nemere *et al.*, 1994; Nemere, 1996; Nemere, 1999).

Es war jedoch zunächst nicht klar, ob BLM-VDR mit dem eigentlichen VDR verwandt ist. Die Gruppe um Ilka Nemere konnte 2000 zeigen, dass BLM-VDR und VDR zwei unterschiedliche 1,25-(OH)₂ Vit D₃-Rezeptoren sind (Nemere *et al.*, 2000). Möglich ist aber, dass diese nicht unabhängig von einander agieren sondern in Kooperation miteinander. So könnte es sein, dass ERp57 upstream vom VDR agiert und das an der Zelloberfläche gebundene 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an das zelluläre VDR übergibt.

1.3.2.7 Die Rolle von ERp57 in Chondrozyten

Stimulation von Wachstumsfugen-Chondrozyten Kulturen mit 1,25-(OH)₂ Vit D₃ führen zu einer schnellen Ausschüttung von Kalziumionen in das Kulturmedium (Langston *et al.*, 1990). Da dies innerhalb von einer Minute geschieht, ist davon auszugehen, dass dies ohne die Expression von Genen passiert.

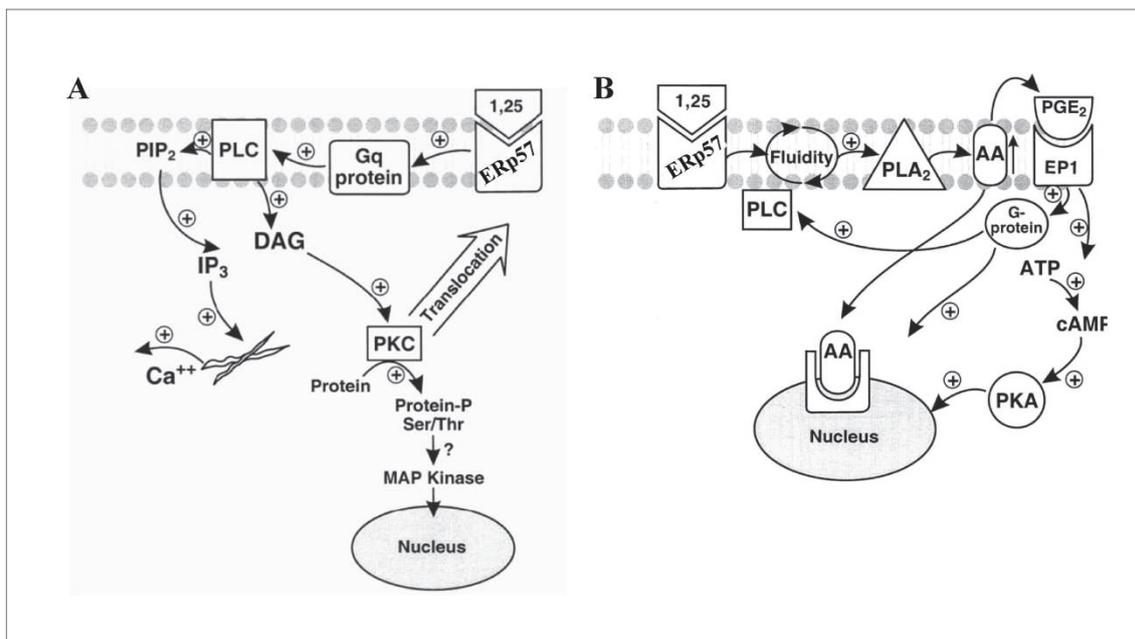


Abb. 1.10 **Schnelle nicht-genomische Antwort auf 1,25-(OH)₂ Vit D₃**. Vermutete Mechanismen der Reaktion von hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge auf die Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ (1,25) an ERp57. Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an ERp57 führt via der Phospholipase C (PLC) zum schnellen Anstieg von Diacylglycerol (DAG) welcher zur Translokation von Proteinkinase C (PKC) und darüberhinaus zur Aktivierung der Expression verschiedener Gene führt. Zudem kommt es über PLC zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol (PIP₂), welche zur Produktion von DAG und zur vermehrten Kalziumausschüttung führt (A). Außerdem kommt es nach Bindung von 1,25-(OH)₂D₃ an ERp57 und Stimulation von Phospholipase A₂ (PLA₂) zur Aktivierung der Biosynthese von Prostaglandin (PGE₂) mit Hilfe von Arachidonsäure (AA). Dadurch kommt es zur erhöhten Aktivität von PLC, zur Transkription verschiedener Gene via AA und Proteinkinase A (PKA) (B). Phosphoinositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAP Kinase), Prostaglandin Rezeptor 1 (EP1), Guaninnucleotid-bindendes Protein (G-Protein), aktivierte Untereinheit des G-Proteins (Gq Protein). Verändert nach Boyan *et al.*, 2002.

Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass die Stimulation von Chondrozyten mit 1,25-(OH)₂ Vit D₃ zu einer Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran führt, welche zu einer erhöhten Membranfluidität führt (Matsumoto *et al.*, 1981; Rasmussen *et al.*, 1982; Swain *et al.*, 1993) (Abb. 1.10, B). Die Gruppe um Zvi Schwartz und Barbara Boyan konnte zeigen, dass dies an dem direkten Einfluss von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ auf den Phospholipid-Metabolismus via Phospholipase A₂ (PLA₂) und Arachidonsäure (AA) liegt (Schwartz *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1992) (Abb. 1.10, B). Die Bindung des 1,25-(OH)₂ Vit D₃ geschieht hierbei an der Zelloberfläche über ERp57 (Nemere *et al.*, 2000; Nemere *et al.*, 2004; Nemere, 2005).

Durch die Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an ERp57 kommt es zudem zu einer Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch Phospholipase C (PLC) und dadurch zur Expression verschiedener Gene (Sylvia *et al.*, 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PLC zu einer Produktion von Phosphoinositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) führt, was den schnellen Kalziumstrom zur Folge hat (Sylvia *et al.*, 1998).

Zudem konnten Schwartz und Boyan zeigen, dass diese Effekte zu denen in Ruhechondrozyten und mit 24,25-(OH)₂Vit D₃ unterschiedlich sind (Boyan *et al.*, 2002)

Bei dem Vergleich der Arbeiten der Gruppe um Barbara D. Boyan und Zvi Schwartz sollte in Betracht gezogen werden, dass die meisten Zellkulturexperimente mit Serum-haltigen Medien durchgeführt worden sind. Dieses Serum kann nachweislich die Differenzierung der Chondrozyten positiv beeinflussen (Bruckner *et al.*, 1989). Zudem ist unklar welche Vitamin D-Metaboliten und Vitamin D-Inhibitoren in den Seren enthalten sind, die möglicherweise die Experimente in unterschiedliche Art und Weise beeinflussen können. Zumal das eingesetzte Serum je nach Charge unterschiedliche Inhaltsstoffe haben kann und somit eine gleichbleibende Kulturbedingung nicht garantiert werden kann. In unserer Gruppe werden alle Zellkulturexperimente aufgrund dieser Tatsache serumfrei durchgeführt. Auch die Kulturbedingungen welche die Gruppe um Barbara D. Boyan und Zvi Schwartz für Chondrozyten verwendet sind kritisch zu betrachten. Sie lassen die Chondrozyten in Monolayer wachsen und passagieren diese je nach Zellrasendichte. Diese Kulturbedingungen können im Gegensatz zu den von uns verwendeten Suspensionskulturen auf bzw. in Agarose zur Dedifferenzierung der Chondrozyten führen (1.3.2.8).

In unserer Gruppe konnte 2008 gezeigt werden, dass Chondrozyten dieses ERp57 an der Zelloberfläche tragen. *In vitro* bindet 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an ERp57 auf der Zelloberfläche von Chondrozyten. Nach Stimulation dieser Zellen mit IGF-I kam es zu einer Freisetzung bzw. einem Abbau von ERp57 mittels Cysteinproteasen, wie zum Beispiel Cathepsin L, was zur Differenzierung der Zellen führte. Dies lies den Schluß zu, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ *in vitro* die Differenzierung von Hühner-Chondrozyten via den Zelloberflächenrezeptor ERp57 inhibiert. Diese, für die Differenzierung der Chondrozyten essentielle Abspaltung, geschieht durch Cysteinproteinasen, welche von den Chondrozyten nach IGF-I Stimulation selbst produziert werden (Dreier *et al.*, 2008) (Abb. 1.11).

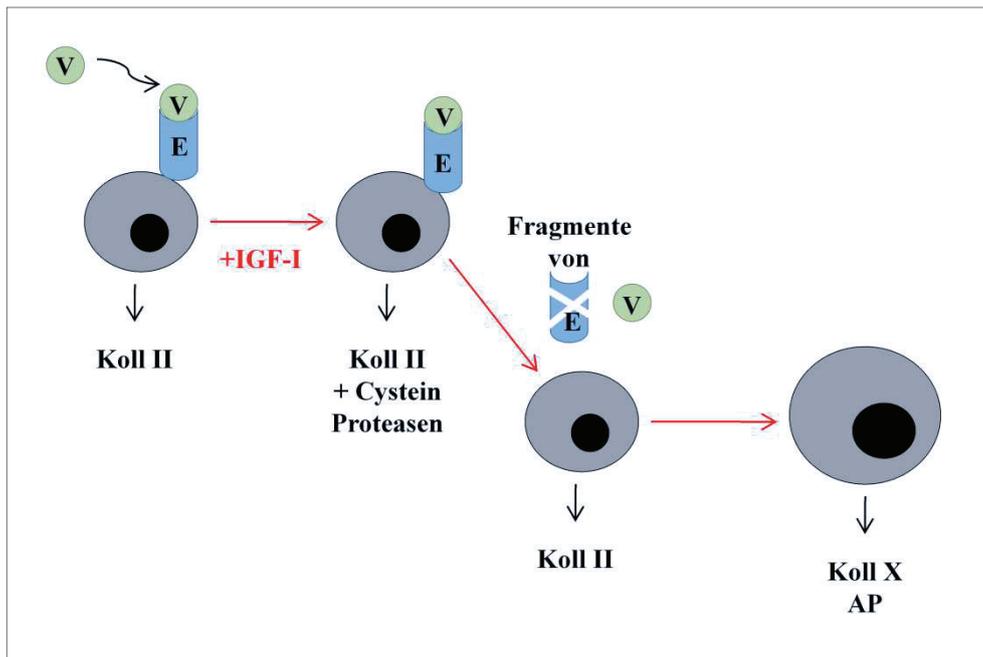


Abb. 1.11 Einfluss von $1,25\text{-(OH)}_2\text{Vit D}_3$ auf die IGF-I vermittelte Differenzierung von Chondrozyten. IGF-I Stimulation von Chondrozyten führt zur Sekretion von Cysteinproteinasen, welche ERp57 (E) von der Zelloberfläche entfernen und so die Differenzierung der Chondrozyten einleiten. Die nicht differenzierten Chondrozyten produzieren Kollagen II (Koll II), wohingegen die hypertrophen Chondrozyten Kollagen X (Koll X) und alkalische Phosphatase (AP) produzieren. Das Volllänge ERp57 wird zu jedem Stadium ins Medium abgegeben, die Fragmente von ERp57 lassen sich erst nach Stimulation mit IGF-I finden. (V) $1,25\text{-(OH)}_2\text{ Vit D}_3$. Verändert nach Dreier *et al.*, 2008.

1.3.2.8 Primäre Chondrozyten in Kultur

Primärkulturen mit Chondrozyten werden häufig verwendet, um *in vitro* Untersuchungen an den Chondrozyten unterschiedlicher Reifungsstufen zu realisieren. Hierfür eignen sich Chondrozyten aus Hühnersterna besonders, da die Entwicklung des embryonalen Hühnersternums der Bildung des primären Ossifikationszentrums ähnelt (Cancedda *et al.*, 1995). Innerhalb des Hühnersternums entwickeln sich ab dem 17. Tag *in ovo* zwei Populationen von Chondrozyten, die unterschiedlich differenziert sind. Der kraniale Teil des Sternums, rechts und links von der Mittelachse, enthält hypertrophe Chondrozyten, wohingegen im peripheren Bereich die Chondrozyten weiterhin proliferierend sind (D'Angelo & Pacifici, 1997).

Die kranialen Chondrozyten beginnen die Produktion von Kollagen X (Gibson & Flint, 1985; Reginato *et al.*, 1986a; Reginato *et al.*, 1986b) und ab Tag 18 *in ovo* beginnt in diesem Bereich die Verknöcherung und Vaskularisierung des Sternums. Im Gegensatz zum kranialen bleibt der kaudale Bereich bis zu zwei Monate nach dem Schlüpfen des Huhns knorpelig (Iwamoto *et al.*, 1993).

Ein häufiges Problem hierbei ist allerdings, dass der Chondrozytenphänotyp instabil ist (Coon, 1966). Chondrozyten aus Primärkulturen (Hühner Tibien und Sterna) dedifferenzieren unter adhäsiven Kulturbedingungen und in Gegenwart von Serum in den Kulturmedien und erlangen einen Fibroblastenphänotypen, wohingegen Chondrozyten, die in Suspension in oder auf Agarose gehalten werden, ihren Phänotypen erhalten und differenzieren können (Castagnola *et al.*, 1986; Gibson & Flint, 1985; Bruckner *et al.*, 1989).

Um die suspendierten Zellen proliferieren und differenzieren zu lassen, benötigen sie Stimulanzen wie z.B. den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I (Insulin-like growth factor I, IGF-I) (Bohme *et al.*, 1992), hohe Insulinkonzentrationen (Quarto *et al.*, 1992) oder Fötale Kälber Serum (FKS) (Bruckner *et al.*, 1989). Zudem bedarf es der Zugabe von Ascorbat, einem Cofaktor der Prolyl- und Lysylhydroxylase, durch den Kollagenketten korrekt hydroxyliert werden und stabile Triplehelices gebildet werden können (Prockop *et al.*, 1979), welche für eine Differenzierung der Chondrozyten notwendig sind (Dozin *et al.*, 1992).

1.3.2.9 ERp57 knockout Mäuse

Der konstitutive knockout von ERp57 in Mäusen ist embryonal letal (Garbi *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden von Wang *et al.* 2010 Mäuse, welche heterozygot für den ERp57 knockout waren untersucht. Die heterozygoten Tiere waren lebensfähig und fertil. Die Tiere zeigten gegenüber WT-Tieren im Alter von 15 Wochen eine signifikante Zunahme in der Bildung des trabekulären Knochens in der distalen femuralen Metaphyse jedoch keine Unterschiede in der femuralen Epiphyse und eine geringe Abnahme des kortikalen Knochens in der Mitte der femuralen Diaphyse (Wang *et al.*, 2010).

1.3.2.10 Das Cre/loxP-System

Um Mäuse zu generieren in denen spezifische Gene an bestimmten Lokalisationen ausgeschaltet sind, verwendet man das Cre/loxP-System. Hierbei wird das gewünschte Gen mit einer cre-Rekombinase, die unter Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert ist, nur an Lokalisationen, in denen der Promotor aktiv ist, ausgeschaltet.

Das Enzym Cre-Rekombinase *vermittelt* die Rekombination zwischen zwei identischen Erkennungssequenzen, den loxP-Elementen (loxP = *locus of crossing over* (x) aus Phage1). Die Cre-Rekombinase funktioniert als Topoisomerase und schneidet innerhalb der loxP-Sequenz doppelsträngige DNA heraus (Feil *et al.*, 1997; Feil *et al.*, 2009).

Zur Generierung einer Maus mit einer Gewebe-spezifischen Deletion eines Gens (Gewebe-spezifische KO) bedarf es somit zwei verschiedener Maus-Stämme, die miteinander verpaart werden. Zum einen einer Maus mit einem von loxP-Elementen flankierten Ziel-Gen. Zum anderen einer Maus, welche die Expression der Cre-Rekombinase mit Hilfe eines Gewebe-spezifischen Promotors kontrolliert.

Im Falle dieser Arbeit soll eine Maus mit einer Chondrozyten-spezifischen Deletion des ERp57-Gens generiert werden. Hierfür wurde eine generierte gentechnisch veränderte Maus genutzt, bei welcher loxP-Sequenzen vor das Exon 2 und hinter Exon 3 des ERp57-Gens gelegt wurden (Garbi *et al.*, 2006). Diese Maus wurde mit einer Maus verpaart, in welcher die Cre-Rekombinase knorpel-spezifisch unter dem Promotor des Col2a1-Gens exprimiert wird (Sakai *et al.*, 2001).

1.4 Zellulärer Stressabbau

Da ERp57 ein Protein des endoplasmatischen Retikulums ist und an der Proteinfaltung im ER beteiligt ist (siehe 1.3.2.6), spielt der zelluläre Stressabbau in dieser Arbeit womöglich eine wichtige Rolle.

Das ER ist der Ort in der Zelle, der die idealen Bedingungen für die Reifung sekretorischer und membrangebundener Proteine schafft. Hier kommt es zur Faltung und Zusammenlagerung von Proteinen, welche hierbei von Chaperonen, wie zum Beispiel ERp57 unterstützt werden. Zudem werden neben der Proteinreifung auch die Qualitätskontrolle und der Transport der Proteine aus dem ER hinaus sichergestellt. Kommt es zu einer falschen Faltung von Proteinen im ER, welche durch Mutationen oder Zellgifte zustande kommen können, kann es zu einer Zusammenlagerung dieser Proteine kommen. Die Zelle bzw. das ER reagieren auf diese Situation mit ER-Stress (Kozutsumi *et al.*, 1988; Kohno *et al.*, 1993). Können die mißgefalteten Proteine von der Zelle nicht abgebaut werden, wird die Zelle aufgrund des ER-Stresses apoptotisch.

Als Marker für ER-Stress gelten die beiden Chaperone BIP (*B-cell immunoglobulin heavy chain binding protein*) und Hsp90 (Hitzeschockprotein 90), deren Expression in der Situation von ER-Stress hochreguliert werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Um Prozesse wie die Chondrodysplasien oder Osteoarthrose zu verstehen, ist es notwendig das Wachstum der langen Knochen via enchondraler Ossifikation in Gänze zu verstehen. Die Aufklärung molekularer Mechanismen der Differenzierung von Knorpelzellen in der Wachstumsfuge ist hierfür von besonderer Bedeutung. In dieser Arbeit soll die Rolle von ERp57 in diesem Prozess untersucht werden.

Zum einen sollte mit Hilfe von kranialen Chondrozyten aus dem Sternum von Hühnerembryonen *in vitro* untersucht werden, welche Rolle ERp57 in differenzierenden Chondrozyten und den von diesen Zellen freigesetzten Matrixvesikeln spielt.

Kraniale Chondrozyten befinden sich am 17. Tag *in ovo* in einem Differenzierungsstadium, in welchem sie begonnen haben zu differenzieren. Dieser Prozess kann *in vitro* mit Hilfe von Stimulanzen wie IGF-I fortgesetzt und untersucht werden. Diese differenzierenden Chondrozyten setzen Matrixvesikel frei.

Mit Hilfe von Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ERp57, welches an der äußeren Oberfläche von Chondrozyten 1,25-(OH)₂ Vit D₃ bindet, eine inhibierende Rolle in der Differenzierung von Chondrozyten *in vitro* spielt. Wird dieses ERp57 von der an der äußeren Oberfläche von Chondrozyten entfernt, sind die Chondrozyten in der Lage zu differenzieren (Dreier *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse kam die Frage auf ob das ERp57 von Chondrozyten in löslicher oder Matrixvesikel-assoziiierter Form abgegeben werden.

Zum anderen sollte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems Chondrozyten-spezifische ERp57 defiziente Mäuse generiert werden. Hierfür sollten die Maus, welche ein Lox-P-flankiertes ERp57-Gen besitzt und welche in der Arbeitsgruppe von G.J. Hämmerling (Heidelberg) generiert wurde (Garbi *et al.*, 2006) mit der *Col2a1-Cre*-Maus, welche Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Kollagen 2a1-Promotors exprimiert (Sakai *et al.*, 2001), verpaart werden. Mittels dieser Tiere soll die knorpel-spezifische Rolle von ERp57 *in vivo* untersucht werden.

Am Ende der Arbeit sollte die Funktion von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung mit Hilfe der *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen besser verstanden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Chemikalien & Materialien

Allgemein gebräuchliche Chemikalien und Materialien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Alle speziellen Chemikalien sind folgend aufgelistet:

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
Acid Phosphatase, Leukocyte-Kit (387A)	Sigma Aldrich (USA)
Agarose HT/NT	FMC Bioproducts (USA)
Alzian Blau 8 GS	Serva (Heidelberg)
AmershamHyperfilm™ MP	GE Healthcare (USA)
BCA-Protein-Assay Kits	Pierce (USA)
BSA	Serva (Heidelberg)
Coomassie Blue R-250	Serva (Heidelberg)
DakoCytomation ARK Animal Research Kit	Dako (Hamburg)
Dako-Pen	Dako (Hamburg)
DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs	NEB (Frankfurt)
Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)	Serva (Heidelberg)
Fluoromount G	SouthernBiotech (USA)
FKS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
GeneRuler™100bp DNA Ladder	Fermentas (Litauen)
Glycerol	USB Corporation (USA)
Ham`s F-12	PAA Laboratories (Österreich)
Human ChondrocyteNucleofectorKit™	Lonza (Köln)
Ladepuffer, 6x	Fermentas (Litauen)
Lumasafe Plus	Perkin Elmer (Niederlande)
MemCode™ Reversible Protein Kit	Thermo Scientific (USA)
Nonidet P40	Biomol (Hamburg)
Paraformaldehyd (PFA)	Serva (Heidelberg)
Penicillin/Streptomycin, 100x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Pepsin	Serva (Heidelberg)

Polyethylenfolien	Heraeus Kulzer (Wehrheim/Ts.)
Prestained Broad Range Standards	Bio-Rad (München)
Prolin, ¹⁴ C	MP Biomedicals (Eschwege)
Protran [®]	Schleicher & Schuell (Dassel)
Qiagen [®] One Step RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Red Taq Polymerase	Omni Life Science (Bremen)
Seakam Agarose	Biozym (Oldendorf)
Super Signal [®] WestFemto Maximum Sensitive Substrat	Thermo Scientific (USA)
Technovit [®] 9100	Heraeus Kulzer (Wehrheim/Ts.)
Trizol Reagenz	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trypanblau	Biochrom (Berlin)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Cölbe)
Ziegenserum	Dako (Hamburg)

2.2 Zellbiologische Analysen

Wenn nicht anders erwähnt, wurde als Zellkulturmedium Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 4,5g/l Glukose verwendet. Die Arbeiten wurden unter einer Sterilbank Mikroflow Biological Safety Cabinet (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Alle nicht käuflich erworbenen Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm).

2.2.1 Isolierung von Chondrozyten aus Hühnersterna

Die zur Chondrozytenkultur benötigten Sterna wurden aus Hühnerembryonen gewonnen. Hierfür wurden nach 17tägiger Bebrütung die Embryonen aus den Eiern entnommen und die Sterna mittels sterilen Pinzetten präpariert. Das Perichondrium (Knochenhaut) wurde von den Sterna entfernt und diese anschließend dreimal in Krebs-Ringer-Puffer gewaschen. Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurden die Sterna jeweils in ein kaudales, kraniales und mittleres Drittel geteilt. Der kraniale Bereich wurde mittels Kollagenase B (1mg/ml) in DMEM mit 1mM Cystein, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ verdaut. Anschließend wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und zur Entfernung unverdauter Stücke über einen Swinex-Filter mit 3 Lagen Nylonmembran (Porengröße 100µm) gegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit Krebs-Ringer-Puffer wurden die Zellen durch Zentrifugation (600g, 7 min, RT) sedimentiert, in 5-10ml DMEM resuspendiert und in Trypanblau die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt.

Chondrozytenmedium

DMEM, 4,5g/l Glucose	
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml

Kollagenase-Lösung

DMEM	
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
Kollagenase B	1mg/ml
Cystein	1mM
steril filtrieren	(Porengröße 0,2µm)

Krebs-Ringer-Puffer:

Glukose	13,0mM
KCl	5,4mM
KH ₂ PO ₄	1,6mM
MgCl	1,3mM
NaCl	111,2mM
NaHCO ₃	4,0mM
Na ₂ HPO ₄	15,7mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
auf pH7,4 bringen	

2.2.2 Isolierung von Chondrozyten aus murinen Brustkörben

Von neugeborenen Mäusen wurden die Brustkörbe zur Gewinnung von Chondrozyten aus den Mäusen frei präpariert und von allen Geweberesten befreit. Die Brustkörbe wurden in Krebs-Ringer-Puffer gewaschen und anschließend über Nacht bei 37°C, 5%CO₂ mittels Kollagenase-Lösung (2.2.1) verdaut. Die Zellen wurden im Anschluss wie Chondrozyten aus Hühnersterna aufgereinigt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Kammer in Trypanblau bestimmt.

2.2.3 Kultivierung von Chondrozyten in Agarose

Die von Benya und Shaffer entwickelte Methode zur Einbettung von Chondrozyten (Benya & Shaffer, 1982) wurde hier wie folgt modifiziert verwendet. Auf den Boden einer 35mm Kulturschale wurde zunächst 0,7ml 1%iger (w/v) Hochtemperatur-Agarose (HT-Agarose) gleichmäßig gegossen. Nach dem Verfestigen dieser Agarose bei 4°C wurden Chondrozyten zur optimalen Kultur in Niedrigtemperatur-Agarose (NT-Agarose) eingebettet.

Dafür wurden pro Schale 175µl einer 2%igen NT-Agarose (w/v) mit 175µl zweifach DMEM und den Zusätzen BCP (5µl/ml) vermischt. Zu diesem Ansatz wurden 350µl Chondrozytensuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen) gegeben. Zum Absinken der Zellen auf eine Ebene wurde die Schale für 15 min auf einen Wärmetisch (37°C) gestellt und anschließend zum Verfestigen der Agarose weitere 15 min bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden so über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert und am folgenden Tag mit 1ml DMEM und den Zusätzen ABCP (5µl/ml) versorgt. Alle 2–3 Tage wurde das Medium der Zellen gewechselt. Zudem wurden je nach Versuch die Zellen IGF-I (100ng/ml) und/oder E-64 (5µg/ml) stimuliert.

(A)BCP-Stammlösung:

Ascorbinsäure (A)	5mg/ml
Aminopropionitril (B)	10mg/ml
Cystein (C)	35,1mg/ml
Pyruvat (P)	22mg/ml
in H ₂ O	
sterilfiltrieren, (Porengröße 0,2µm)	

2.2.4 Markierung mittels ¹⁴C-Prolin

Zur Bestimmung der Kollagene bzw. der Kollagen-Menge im Medium und in den Agarosegelen der Chondrozytenkulturen, wurde diesen an Tag 14 in Kultur ¹⁴C-Prolin (1µCi/ml) zu neuem Medium hinzugefügt. Hierdurch wurden die neusynthetisierten Proteine radioaktiv markiert. Die markierten Kollagene wurden isoliert, aufgereinigt, mittels SDS-Gel aufgetrennt (2.3.8 und 2.3.9) und die Kollagen II und X wurden fluorographisch (2.3.11) und densitometrisch quantifiziert.

2.2.5 Isolierung von Matrixvesikeln

Matrixvesikel können aus dem Medium von Chondrozyten isoliert werden. Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mittels Zentrifugation (600g, 7 min, RT) von sämtlichen Agaroseresten befreit. Anschließend können durch Ultrazentrifugation (100.000g, 1 h, 4°C) die Matrixvesikel isoliert werden. Die so entstandenen Matrixvesikelpellets wurden je nach Verwendung in PBS, Lysepuffer oder Probenpuffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

<u>PBS (10x)</u>		<u>Lysepuffer</u>	
NaCl	137mM	Trisbase	0,2M
KCl	2,7mM	MgCl ₂	1,6mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4,3mM	pH8,1	
KH ₂ PO ₄	1,4mM	Triton X-100	1% (v/v)
<u>Reduzierender Probenpuffer (1x)</u>			
SDS	2% (w/v)		
Glycerol	10% (v/v)		
Tris-HCl, pH6,8	60mM		
Bromphenolblau	0,001% (w/v)		
Mercaptoethanol	5% (v/v)		

2.2.6 Transfektion von Chondrozyten

Vor der Transfektion von Chondrozyten wurden diese für zwei Tage in Vorkultur unter adhäsiven Kulturbedingungen gehalten, so dass sich die Zellen von der Isolierung regenerieren können. Hierfür wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen in einer 100mm Kulturschale in 1:1 DMEM/Ham's F-12 Medium serumfrei ausgesät. Zum Ablösen der Chondrozyten wurde die Schale zunächst vom Medium befreit, 1x Trypsin auf die Zellen gegeben und dieses nach 10–15 min mit DMEM + 20% FKS inhibiert. Danach wurden die Zellen mit sterilem PBS mehrmals gewaschen.

Für die Transfektion wurde das Human Chondrocyte Nucleofector KitTM mit dem NucleofectorTM unter Anwendung des Programms X-05 verwendet. Wie vom Hersteller empfohlen wurden $1,1 \times 10^6$ Chondrozyten mit 0,5µg (10µl) siRNA (Tabelle 2.1) transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in 100µl Human Chondrocyte Nucleofector-Lösung aufgenommen, mit der siRNA versetzt und in den mitgelieferten Küvetten transfiziert. Direkt nach der Elektroporation wurde 500µl vorgewärmtes DMEM + 10% FKS zu den Zellen gegeben und diese für 1 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch DMEM + BCP ersetzt und die Zellen wurden in Agarose (2.2.3) mit und ohne Zugabe von IGF-I kultiviert.

Zur Isolierung von RNA aus transfizierten Chondrozyten wurden diese in Suspensionskultur gehalten. Hierfür wurden 35mm Kulturschalen mit 0,7ml 1%iger (w/v) HT-Agarose (in DMEM gelöst) beschichtet und anschließend die Chondrozyten in einer Dichte von $2,2 \times 10^6$ Zellen in 1ml DMEM und 5µl BCP über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Am folgenden Tag wurde Ascorbinsäure (5mg/ml) zu den Zellen gegeben und diese für vier Tage in Kultur gehalten, um anschließend die RNA dieser Zellen zu isolieren (2.4.1)

Tabelle 2.1: Sequenzen für die siRNA (*Gallus gallus*)

Name	Sequenz 5' → 3'	Funktion
stealth_346 (si)	ugacaauuccaucugcuguccuggg	siRNA spezifisch gegen ERp57
stealth_1005 (si)	caugcaggaagaauucuccgugau	siRNA spezifisch gegen ERp57
stealth_control_1005 (scr)	caugaaggaaauuccgcucggau	Kontroll-siRNA

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde nach einer modifizierten Methode von Bessey (BESSEY *et al.*, 1946) durchgeführt. Hierfür wurden 50µl des zu untersuchenden Mediums bzw. der zu untersuchenden Matrixvesikel, die in Lysepuffer gelöst wurden, mit 450µl Reaktionslösung versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500µl Stopplösung beendet und anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 405nm bestimmt.

Reaktionslösung

p-Nitrophenylphosphat 0,2% (w/v)
in Diethanolamin-HCl 1M
pH 9,8

Stopplösung

NaOH 2M
EDTA 0,2mM

2.3.2 Isolierung von Proteinen aus Zellkulturmedien

Zur Bestimmung verschiedener Proteine, die von Chondrozyten sezerniert werden, wurden diese aus dem Medium der Zellen gewonnen. Hierfür wurde das Medium zunächst mittels 60%iger Trichloressigsäure (225µl/ml Medium) und 1% (v/v) Triton X-100 (139µl/ml Medium) für 20 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (14500g, 20 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit zweimal 96%igem eiskaltem EtOH und einmal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Abschließend wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und je nach Verwendung mit PBS oder reduzierendem Probenpuffer (2.2.5) versetzt.

2.3.3 Isolierung von Proteinen aus Zellen in Agarose

Für die Isolierung von Proteinen aus Zellen wurde die Agaroseschicht in Lysepuffer (2.2.5) bei 4°C über Nacht rotiert und anschließend zentrifugiert (600g, 7 min, RT). Zur Gewinnung der Proteine wurde der Überstand anschließend gefällt (2.3.6) und mit reduzierendem Probenpuffer versetzt (2.2.5).

2.3.4 Isolierung von Proteinen aus murinen Hüftköpfen

Zur biochemischen Untersuchung der Proteine muriner Chondrozyten wurden Hüftköpfe aus neugeborenen Mäusen isoliert und der artikuläre Knorpel mit Hilfe eines Skalpell vom Hüftkopf abgetrennt. Dieser wurde gemörsert und anschließend mit reduzierendem Probenpuffer versetzt (2.2.5).

2.3.5 Proteinmengenbestimmung mittels BCA-Test

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit Hilfe eines BCA-Protein-Assays Kits nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Farbveränderung der Proteinlösung wurde gegen eine BSA-Standardreihe bei einer Extinktion von 560nm gemessen.

2.3.6 Fällung von Protein mittel Trichloressigsäure (TCA-Fällung)

Um Proteine im Medium nachweisen zu können, mussten diese zunächst mit 60%iger Trichloressigsäure (225µl/ml Medium) und 1%igem Triton (139µl/ml Medium) für mindestens 20 min auf Eis gefällt werden. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (14500g, 20 min 4°C) das Pellet zweimal mit 96%igem Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen. Zum Abschluss wurde das getrocknete Pellet in PBS oder Probenpuffer aufgenommen.

2.3.7 Isolierung von Kollagenen aus Zellkulturmedien

Um Kollagene aus Zellkulturmedien nachzuweisen wurde zunächst 1ml Medium der Kultur nach ¹⁴C –Prolin Markierung (2.2.4) abgenommen, zentrifugiert (14500g, 15 min 4°C), der Überstand mit 100µl Pepsin (10mg/ml in 1N HCl) versetzt und für 2 h bei RT rotiert. Zur Neutralisation der Probe wurden 70µl Tris (1M) hinzugefügt und anschließend wurden die Proben durch Zusetzen von 1M NaOH auf pH 7 gebracht.

Mit 4,5M NaCl wurden die Proteine über Nacht bei 4°C gefällt, am nächsten Morgen zentrifugiert (14500g, 30 min 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100µl H₂O dest aufgenommen, 300µl eiskaltes 96% EtOH wurden hinzugefügt und bei -20°C für mindestens 1 h inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (14500g, 30 min 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei 95°C getrocknet und in 70µl reduzierendem Probenpuffer (2.2.5) aufgenommen. 2µl der Probe wurden in einem Szintillationsgefäß mit 100µl H₂O dest und 2ml Lumasafe Plus versetzt und die Zählrate mittels Szintillation (β-Counter) (Beckman, Krefeld) ermittelt, so dass anhand der Werte gleich viel radioaktivmarkierte Kollagene von jeder Probe auf ein SDS-Gel (2.3.9) aufgetragen werden konnte.

2.3.8 Isolierung von Kollagenen aus Agarose

Zum Nachweis von Kollagenen aus Agarose wurden zunächst die ¹⁴C –Prolin markierten (2.2.4) Zellen inklusive des Mediums über Nacht bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden sie bei RT aufgetaut, und sowohl das Medium als auch die obere Agaroseschicht wurden in JA20.1 Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5ml Pepsinlösung (1mg/ml Pepsin in 0,2M NaCl, 0,5M CH₃COOH) bei 4°C für 72 h gerührt. Die Proben wurden anschließend mit 500µl 1M Tris und 10µl NaOH zur Inaktivierung des Pepsins auf pH 7 gebracht. Über Nacht wurden die Proben anschließend mit 17,5mg/ml NaCl bei 4°C gerührt. Die Proben wurden zentrifugiert (22500g, 30 min, 4°C), die Überstände in neue JA20.1 Röhrchen überführt und die Kollagene über Nacht bei 4°C mit 200mg/ml NaCl-Lösung gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (34500g, 45 min, 4°C) und der Überstand anschließend verworfen. Die verbliebenen Pellets wurden in 300µl 0,4M NaCl in 0,1M Tris-HCl aufgenommen, 900µl kaltes 96%iges EtOH hinzugegeben und für mindestens 2 h bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (14500g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 300µl H₂O dest aufgenommen, 900µl kaltes 96%iges EtOH hinzugefügt und die Kollagene über Nacht gefällt. Nachdem die Proben zentrifugiert (14500g, 30 min, 4°C) wurden, wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 70µl Probenpuffer (2.2.5) aufgenommen. Wie bei der Isolierung von Kollagenen aus dem Kulturmedium (2.3.7) wurde die Menge an radioaktivmarkierten Kollagenen durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

2.3.9 SDS-Gelelektrophorese

Gemische von Proteinen wurden nach der von Laemmli entwickelten Methode (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurden diskontinuierliche Gradientengele (Acrylamidgehalt 4,5-15%) verwendet. Zur Aufkonzentration der Proteine und Gewinnung einer einheitlichen Lauffront wurde das Trenngel mit einem 4,5%igen Sammelgel überschichtet. Die in reduzierendem Probenpuffer befindlichen Proteine wurden 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Um die Größen der Proteine bestimmen zu können wurde zusätzlich zu den Proben ein Molekulargewichtsstandard (Prestained Broad Range Standards) mit bekannten Größen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine geschah bei einer Stromstärke 15-30mA bei Raumtemperatur.

<u>Trenngelpuffer (4x)</u>		<u>Sammelgelpuffer (4x)</u>	
Tris-HCl, pH 8,8	1,5M	Tris-HCl, pH 6,8	0,5M
SDS	0,4% (w/v)	SDS	0,4% (w/v)
<u>Laufpuffer</u>			
Tris-HCl, pH 8,8	25mM		
SDS	0,1% (w/v)		
Glycin	0,2M		
<u>SDS-Trenngel</u>		<u>SDS-Sammelgel</u>	
Trenngelpuffer	1x	Trenngelpuffer	1x
Acryl/Bisacrylamid (32:1)	4,5 bis 15% (w/v)	Acryl/ Bisacrylamid (32:1)	4,5% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)	TEMED	0,33% (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	100 µg/ml	Ammoniumperoxodisulfat	75µg/ml

2.3.10 Färbung von SDS-Gelen mittels Coomassie-Blue

Für die Gesamtfärbung der aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurden diese zunächst mittels Entfärbelösung 1 für 30 min fixiert. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Coomassiefärbelösung gegeben, für 30 min in Entfärbelösung 1 und, bis das Gel entfärbt war, in Entfärbelösung 2 gegeben. Diese wurde mehrfach gewechselt.

<u>Entfärbelösung 1</u>		<u>Entfärbelösung 2</u>	
Methanol	50% (v/v)	Methanol	10% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)	Essigsäure	10% (v/v)
<u>Coomassiefärbelösung</u>			
CoomassieBrilliantblau R-250	0,1% (v/v)		
Essigsäure	25% (v/v)		
Isopropanol	10% (v/v)		

2.3.11 Fluorografie

Zum Nachweis der radioaktivmarkierten, im SDS-Gel aufgetrennten Kollagene, wurde dieses nach dem Färben des Gels mit Coomassie (2.3.10), getrocknet. Hierfür wurde das Gel dreimal für 20 min in DMSO entwässert und für mindestens 3 h in 20% (w/v) Diphenyloxazol in DMSO inkubiert. Hiernach wurde das Gel für mindestens 45 min gewässert und abschließend im Geltrockner (Bio-Rad, München) getrocknet. Zur Detektion der radioaktivmarkierten Kollagene wurden Röntgenfilme (Amersham HyperfilmTM MP) bei -80°C für 1-4 Wochen exponiert.

2.3.12 Immuno-Blot und Immunanalyse

Zur genauen Bestimmung von Proteinen wurden diese nach erfolgreichem Auftrennen durch SDS-Gelelektrophorese (2.3.9) bei einer Stromstärke von 80mA bei 4°C auf eine Nitrozellulosemembran (Protran®) 3 h mittels eines SDS-haltigen Transferpuffers transferiert.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Membran wurden die Proteine mit MemCodeTM Reversible Protein Kit nach Angaben des Herstellers angefärbt.

Nachdem die Membran entfärbt wurde, wurde diese mit TBS-T kurz gewaschen und für mindestens 30 min bei RT mit Hilfe des Blockpuffers blockiert. Über Nacht wurde die Membran mit dem Primäantikörper (siehe Tabelle 2.2) in Blockpuffer und TBS-T 1:1, bei 4°C schüttelnd inkubiert, anschließend mehrmals für insgesamt 45 min mit TBS-T gewaschen und mit dem Sekundäantikörper (siehe Tabelle 2.3) in Blockpuffer und TBS-T 1:1, bei RT für 1 h schüttelnd inkubiert. Erneut wurde die Membran mehrmals für mindestens 45 min mit TBS-T gewaschen und abschließend mit Femto-ECL (Super Signal[®] WestFemto Maximum Sensitive Substrat) 5 min inkubiert. Zur Dokumentation der Chemilumineszens wurden sowohl ein Chemilumineszenzdetektor Fusion-SL 4.2 MP (Peglab, Erlangen), als auch Röntgenfilme verwendet, welche mit dem Entwickler Curix 60 (Agfa, Belgien) entwickelt wurden.

<u>TBS</u>		<u>TBS-T</u>	
Tris-HCl, pH 7,4	50mM	TBS	
NaCl	150mM	Tween-20	0,05% (v/v)
<u>Transferpuffer</u>		<u>Blockpuffer</u>	
Tris	50mM	Milchpulver	5% (w/v)
Glycin	380mM	BSA	1% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)		
Methanol	20% (v/v)		

Tabelle 2.2: „Primärantikörper Immuno-Blot“

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AB099, rabbit polyclonal	Ilka Nemere, Utah, USA	1:5000
Anti-ERp57 mouse monoclonal (Bestellnummer: SPA-725)	Stressgen, Kanada	1:2000

Tabelle 2.3: „Sekundärantikörper Immuno-Blot“

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti MouseIgG Peroxidase conjugated(Bestellnummer: A-9917)	Sigma-Aldrich, USA	1:10000
ECL TM Anti rabbit IgG Horseradish Peroxidase conjugated (Bestellnummer: NA934)	Amersham Bioscience, USA	1:10000

2.4 Molekularbiologische Analysen

2.4.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der RNA wurden 5 - 10x10⁶ Zellen mit 1ml TRIzol versetzt und durch Auf- und Abpipettieren mittels einer 20 Gauge Kanüle lysiert und anschließend wurden die Proben 5 min bei RT inkubiert. Hiernach wurde 0,2ml Chloroform zur Phasenseparation hinzugegeben, für 2-3 min inkubiert und zentrifugiert (12.000g, 15 min, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit 0,5ml Isopropanol vermischt und erneut zentrifugiert (12.000g, 15 min, 4°C). Vom entstandenen RNA-Pellet wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (7.500g, 5 min, 4°C). Zum Abschluss wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 50µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen

Für die Gewinnung von DNA aus Mäuseschwanzspitzen wurden diese zunächst in 300µl PBND-Puffer für mindestens 30 min bei RT gewaschen. Anschließend wurde der Puffer abgesaugt, 300µl PBND-Puffer und 8µl Proteinase K (Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O; Roche, Mannheim) hinzugefügt und die Schwänze über Nacht bei 56°C schüttelnd lysiert.

Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die Probe bei 95°C für 10 min geschüttelt, anschließend zentrifugiert (13000rpm, 5 min, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Genotypisierung wurden 2µl der so gewonnenen DNA unverdünnt in die PCR (2.4.4) eingesetzt.

PBND-Puffer

KCl	50mM
Tris-HCl, pH8,3	10mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,5mM
Gelatin	0,1mg/ml
Nonidet p40	0,45% (v/v)
Tween	0,45% (v/v)

2.4.3 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgeführt und wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) bzw. Biologio B.V. (Nijmegen, NL) synthetisiert. Die Sequenzen der Primer wurden mit Hilfe der Datenbank NCBI ausgewählt.

Tabelle 2.4: **Housekeeping-Primer (*Gallus gallus*)**

Gen	Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	T _M [°C]	Amplikon (bp)
β-Aktin	chaktin_for	ggtatgtgcaaggccggttt	58	353 cDNA
	chaktin_rev	atggctggggtgtgaaggt		1197 genom. DNA

Tabelle 2.5: **Primer zur Expressionsanalyse (*Gallus gallus*)**

Gen	Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	T _M [°C]	Amplikon (bp)
BIP	BIP for	gccatggtcctgacaaagat	57	245 cDNA
	BIP rev	ccaccaccaggccaatac		540 genom. DNA
Col II	chicken Col2a1 mRNAfor chicken Col2a1 mRNArev	agaaggaatccagcccaat acacctgccagattgatcc	60	237 cDNA
Col X	CollXmRNACHickenfor CollXmRNACHickenrev	ccagttggaccacaaggagt gccttaggtccaggaggtc	64	231 cDNA
ERp57	marrs_for marrs_rev	tgatccaagggaaggacttg agggccatcattgttttcag	53	371 cDNA 1461 genom. DNA
ERp72	ERp72 for ERp72 rev	atatgcatggagccagaag caccatgggcatagaactc	57	210 cDNA 795 genom. DNA

Fortsetzung Tabelle 2.5: **Primer zur Expressionsanalyse (*Gallus gallus*)**

Gen	Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	T _M [°C]	Amplikon (bp)
Hsp90	Hsp90 for Hsp90 rev	aaggcacaggctttgagaga ccaggccaagttgatcatt	57	247 cDNA
MMP13	chicken MMP13 mRNAfor chicken MMP13 mRNArev	cttcgtggagaaatgctggtatt cgttcttcaccgacttctc	68 *	632 cDNA 2743 genom. DNA
Sox9	chicken Sox9 mRNAfor chicken Sox9 mRNArev	aggagctggctgaccagta cgttcttcaccgacttctc	62 *	193 cDNA 1029 genom. DNA
VDR	VDR chickenfor VDR chickenrev	tgtttccaacctggaccte accagtcctccacatggagt	59	245 cDNA
VEGF	chicken VEGF mRNAfor chicken VEGF mRNArev	caaccatgaactttctgctcacttgg agaaatcagggtccagaaacagg	68 *	701 cDNA 20906 genom. DNA

* Touchdown-PCR (2.4.5) verwendet

Tabelle 2.6: **Genotypisierungsprimer (*Mus musculus*)**

Gen	Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	T _M [°C]	Amplikon [bp]
Col2 cre	Crefor Crerev	aacatgctcatcgtcgg ttcggatcatcagctacacc	57	400 cDNA
ERp57	ERp57 for ERp57 revwt 355	cgccagcctctccatttag caggctgtgatcaccctttt	58	wt 355, ko 543
SRY ¹	SRY for SRY rev	agagatcagcaagcagctgg tcttgctgtatgtgatgg	60 *	249 cDNA

* Touchdown-PCR (2.4.5) verwendet, ¹ Primer aus (Lavrovsky *et al.*, 1998)

2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki *et al.*, 1988) können spezifische Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primer) und Polymerasen exponentiell amplifiziert wurden. Diese klassische PCR-Methode wurde für die Bestimmung der Genotypen von Mäusen verwendet. Isolierte DNA (2.4.2) wurde als Matrize der PCR genutzt. Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet:

<u>Pro Ansatz</u>		<u>PCR-Puffer (10x)</u>	
DNA	2 μ l	KCl	500mM
PCR Puffer (10x)	2,5 μ l	Tris-HCl, pH8,3	100mM
MgCl ₂ (25mM)	1,25 μ l	MgCl ₂	15mM
dNTPs (je 10mM)	1 μ l		
forward Primer (for) (100nM)	1 μ l		
reverse Primer (rev) (100nM)	1 μ l		
Red Taq Polymerase (2U)	1 μ l		
H ₂ O	ad 25 μ l		

Die Parameter der PCR wurden wie folgt festgelegt:

1. Primäre Denaturierung	94°C	45 sec	25-30 Zyklen
2. Denaturierung	94°C	30 sec	
3. Hybridisierung	T _M der Primer	30 sec	
4. Elongation	72°C	1 min	
5. Finale Elongation	72°C	7 min	

2.4.5 Touchdown-PCR

Wie die klassische PCR wurde die Touchdown-PCR zur Amplifikation von spezifischen Nukleinsäuresequenzen genutzt. Bei der Touchdown-PCR wurde der Reaktionsansatz der klassischen PCR verwendet (2.4.4). Für die Touchdown-PCR wurde jedoch die Hybridisierungstemperatur in jedem PCR-Zyklus um 1°C verringert bis die optimale Hybridisierungstemperatur (T_M der Primer) erreicht wurde, wobei mit einer Hybridisierungstemperatur von T_M der Primer + 12°C begonnen wurde. Wurde die optimale Hybridisierungstemperatur erreicht, folgten 20 weitere Zyklen bei dieser Temperatur.

2.4.6 Reverse Transkription (RT)-PCR

Zur Analyse der mRNA Expression verschiedener Gene der Chondrozyten ist eine semiquantitative-PCR notwendig. Diese wurde mit Hilfe des Qiagen[®] OneStep RT-PCR Kit durchgeführt, so dass es möglich war, in einer PCR sowohl das Umschreiben der RNA in cDNA als auch die Amplifikation dieser cDNA durchzuführen. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers mit 2 μ l RNA durchgeführt.

2.4.7 Gelelektrophorese

Die Produkte der unterschiedlichen PCRs wurden alle mit Hilfe von 2%igen (w/v) Agarose-Gele analysiert. Hierfür wurden die Proben mit 6x Ladepuffer vermischt und auf die mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml) versetzten Agarose-Gele aufgetragen.

Um die Größen der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein Standard (Gene Ruler 100bp DNA Ladder) mit bekannten Größen auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 80-120V für 30 - 60 min wurden die Nukleinsäuresequenzen der Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe von UV-Licht (UV-Transilluminator-System 2UV; Eurofins MWG, Ebersberg) konnten anschließend die DNA-Fragmente bei einer Wellenlänge von 302nm sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.5 Histologische Analysen

2.5.1 Paraffineinbettung von Hinterbeinen

Die einzubettenden Hinterbeine wurden zunächst für 24 h bei 4°C mit 4% (w/v) PFA in PBS fixiert und anschließend in Kassetten gegeben. Verknöcherte Hinterbeine wurden in Entkalker bis zu sechs Wochen inkubiert, so dass die Hinterbeine mit einem Mikrotom geschnitten werden konnten. Anschließend wurden die Proben für 24 h in PBS gegeben. Die Hinterbeine wurden entwässert in dem sie erst für 2–6 h bei 4°C in 50%igem EtOH, dann für 2–6 h bei 4°C in 70%igem EtOH und anschließend über Nacht bei 4°C in 96%igem EtOH gelagert wurden. Nach weiteren 4 h bei 4°C in 96%igem EtOH wurden die Kassetten zweimal für 2–6 h bei 4°C in Isopropanol inkubiert. Nach dem Einkapseln der Präparate wurden diese bei 60°C für 24 h in ein Intermedium gegeben. Anschließend wurden die Präparate in hartes Paraffin für 12 h bei 60°C inkubiert und danach in Paraplast gegossen. Von den Paraffinblöcken wurden nach dem Aushärten mittels des Rotationsmikrotom HM 355 (MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf) 5µm dicke Serienschnitte hergestellt, die nach dem Glätten und Austrocknen bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

Intermedium

Isopropanol	50% (v/v)
Paraffin	50% (w/v)

Entkalker

EDTA	10% (w/v)
Tris-HCl	3% (w/v)
auf pH 7,4 bringen	

2.5.2 Entparaffinieren von Hinterbeinschnitten

Die zu färbenden Schnitte wurden zunächst entparaffiniert indem sie bei 50 -60°C für 20 min in einem Wärmeschrank gegeben wurden und anschließend jeweils für 5 min durch eine Reihe von Bädern zweimal Roti[®]Histol, dreimal 96%iges EtOH, einmal 70%iges EtOH und einmal H₂O dest gezogen wurden.

2.5.3 Alcian Sirius Färbung

Nach dem Entparaffinieren (2.5.2) der Schnitte wurden diese für 15 min in Weigerts Hämatoxylin gefärbt, anschließend 10 min in H₂O dest und 10 min in fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach einer Inkubation von 3 min in 3%iger Essigsäure wurden die Schnitte 30 min in einer Alcianblau Lösung (1% Alcian-Blau in 3%iger Essigsäure (pH 2,5)) gefärbt. Die Schnitte wurden für 10 min mit Leitungswasser gewaschen und anschließend 1 h in einer Siriusrot Lösung (0,1% (w/v) Siriusrot in Pikrinsäure (1,2% (w/v))) gefärbt. Zum Entfernen des ungebundenen Farbstoffes wurden die Schnitte für 2 min in 0,01N HCl gegeben und danach jeweils 5 min in H₂O dest, 70%igem EtOH, zweimal 96%igem EtOH, zweimal Isopropanol entwässert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min in Roti[®]Histol gegeben und mit Entellan eingedeckt.

2.5.4 Kollagen X Färbung

Für die Färbung von Kollagen X wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren (2.5.2) in PBS gegeben und mittels eines Dako-Pen umrandet. Anschließend erfolgt eine enzymatische Vorbehandlung: 10 min Protease XIV, dreimal waschen mit PBS für 5 min, 90 min Hyaluronidase, erneut dreimal waschen mit PBS für 5 min. Für die eigentliche Kollagen X Färbung wurde das Dako Cytomation ARK Animal Research Kit verwendet. Anschließend wurden die Schnitte mit Weigerts Hämatoxylin für 2–5 sec gefärbt, 10 min mit Leitungswasser gebläut und jeweils 5 min in H₂O dest, 70%igem EtOH, zweimal 96%igem EtOH, zweimal Isopropanol entwässert. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal 5 min in Roti[®]Histol gegeben und mit Entellan eingedeckt. Für diese Färbung wurde der Mouse-Anti-Human Collagen Type X –Antikörper der Firma Quartett aus Berlin (1:25) verwendet.

2.5.5 Tartrat resistente saure Phosphatase-Färbung (TRAP-Färbung)

Zur Färbung der Osteoklasten in der Wachstumsfuge von Mäusetibien wurde die TRAP-Färbung mit Hilfe des Acid Phosphatase, Leukocyte-Kits durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (2.5.2) jedoch ohne die Hitzeentfernung des Paraffins, 5 min in H₂O dest gewaschen und mittels eines Dako-Pens umrandet. Anschließend wurden 200µl/Schnitt der zuvor fertiggestellten TRAP-Färbelösung 1 auf die Schnitte gegeben und diese bei 37°C für 1 h lichtgeschützt inkubiert.

5µl/Schnitt der TRAP-Färbelösung 2 wurde zu der TRAP-Färbelösung 1 auf den Schnitten hinzugegeben, vermischt und bis zur gewünschten Färbeintensität bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Waschen der Schnitte in H₂O dest wurden die Proben mit KAISERS Glyceringelatine eingedeckt.

<u>TRAP-Färbelösung 1</u>		<u>TRAP-Färbelösung 2</u>	
Naphthol AS-BI Phosphorsäure	0,25ml	Fast Garnet GBC	0,5ml
Azetat	1ml	Natriumnitrit	0,5ml
Tartrat	0,5ml		
H ₂ Odest, 37°C	22,5ml		

2.5.6 Hartgewebeeinbettung mittels Technovit

Die einzubettenden Hinterbeine wurden zunächst für 24 h bei 4°C mit Hilfe von 4% (w/v) PFA in PBS fixiert und anschließend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 3 Tage 70%iger EtOH, 80%iger EtOH, zweimal 96%iger EtOH). Nach der Fixierung wurden die Hinterbeine für 24 h in frisch angesetzten Sörensens Phosphatpuffer und über Nacht in Xylol inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem Technovit[®]9100 Kit nach Herstellerangaben wie folgt eingebettet: Für die Infiltration der Hinterbeine mit Präinfiltrationslösung 3 und Infiltrationslösung wurde zusätzlich mehrmals für 30 min ein Vakuum angelegt. Abschließend wurden die Hinterbeine in Einbettformen gelegt, mit einem Polymerisationsgemisch übergossen und im vorgekühlten Exsikator im Vakuum belassen bis keine Blasen mehr aufstiegen. Die Einbettformen wurden dann verschlossen und konnten bei -2°C-0°C mindestens 2 Tage auspolymerisieren. Mit Hilfe des Mikrotoms RM 2165 (Leica, Nußloch) wurden von den Technovitblöcken 5µm dicke Serienschnitte hergestellt und diese mit einer Polyethylenfolie überzogen.

<u>Sörensens Phosphatpuffer</u>		<u>Sörensens Stammlösung A</u>	
SörensensStammlösung A	20ml	KH ₂ PO ₄	0,1M
SörensensStammlösung B	80ml		
		<u>Sörensens Stammlösung B</u>	
		Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,1M

2.5.7 Von Kossa Färbung

Mit Hilfe der von Kossa-Färbung werden kalzifizierte Bereiche sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Technovit-Schnitte zunächst entplastet indem sie jeweils 20 min zweimal in Xylol, einmal in 2-Methoxyethylacetat und anschließend 10 min in Aceton inkubiert wurden. Nach kurzem Spülen der Schnitte in H₂O dest und Leitungswasser, wurden die Schnitte 30 min im Tageslicht in 5% (w/v) Silbernitrat in H₂O dest gefärbt. Dreimal wurden die Schnitte in Leitungswasser kurz gespült, 2 min in Na₂CO₃-Formaldehydlösung gegeben, erneut dreimal in Leitungswasser kurz gespült und zum Binden des überschüssigen Silbers in 10% (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zur Gegenfärbung 8 min mit 0,1% (w/v) Safranin O inkubiert. Nach erfolgtem Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte jeweils 5 min 70%igem EtOH, 80%igem EtOH, zweimal 96%igem EtOH und zweimal Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckelt. Anschließend wurden die Fotos der Schnitte mittels des Computerprogrammes ImageProPlus5 der Firma Media Cybernetics ausgewertet.

Na₂CO₃-Formaldehydlösung

Na ₂ CO ₃	5 g
Formaldehyd	25 ml
destH ₂ O	75 ml

2.6 Elektronenmikroskopie (EM)

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Matrixvesikel wurden diese nach der Isolierung in PBS resuspendiert und 20µl dieser Lösung auf ein Stück Parafilm gegeben. Auf diesen Tropfen wurden für 5 - 10 min ein zuvor befilmtes und mit Kohle bedampftes EM-Grid gelegt, so dass das Probenmaterial an das Grid adhären konnte. Nach fünfmaligem waschen des Grids in HPLC-H₂O wurden die Proben mit Hilfe von 20µl 2%ige (w/v) Uranylacetatlösung 7 -10 min kontrastiert. Abschließend wurde das Grid kurz HPLC-H₂O, an Filterpapier abgetupft und bei RT bis zur Analyse gelagert.

2.7 Mikroskopie

Für die Analyse der unterschiedlichen Präparate wurden folgende Mikroskope und Programme verwendet:

Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen), Programm: Axio Vision Version 2.0.5 (Zeiss)

EM-410 (Philips, Niederlande)

2.8 Gesamtskelettfärbung von Mäusen

Die Gesamtskelettfärbung von Mäusen dient zur Unterscheidung von Knochen und Knorpel im Skelett was durch die blaue Färbung des Knorpels mittels Alcianblau und rote Färbung des Knochens mittels Alizarinrot möglich wurde.

Zur Färbung der Knochen und Knorpel des Gesamtskelettes von ERp57^{cart^{-/-}} und WT-Mäusen, wurden diese zunächst von Haut und Innereien frei präpariert. Nach einwöchiger Fixation in 90%igem EtOH wurden die Skelette drei Tage in einer Alcianblau Färbelösung gefärbt und anschließend für mind. 6 h in 96%igem EtOH fixiert. Die Skelette wurden über Nacht in 2%iger KOH inkubiert, so dass das Gewebe um die Knochen und Knorpel transparent wurde. Anschließend erfolgte die Färbung mittels einer Alizarinrot Lösung für 12–24 h. Die Skelette wurden zunächst in 1%iger KOH für 6 h inkubiert und dann bis zur endgültigen Farbentwicklung in einer Lösung aus 1% (w/v) KOH und 20% (v/v) Glycerin überführt. Abschließend wurden die Skelette in einem Gemisch aus 50% (v/v) Glycerin und 50% (v/v) EtOH bei 4°C gelagert. Für die Analyse der Skelette wurden einzelne Knochen freipräpariert, fotografiert und am Computer mittels ImageJ 1.43u ausgemessen.

Alcianblau Färbelösung

Alcianblau	0,01% (w/v)
EtOH	96% (v/v)
Essigsäure	20% (v/v)

Alizarinrot Lösung

Alizarinrot	0,003% (w/v)
KOH	1% (w/v)

2.9 Periphere quantitative Computertomographie(pQCT)

Für die Analyse der Femura mittels pQCT wurden diese zunächst aus den Mäusen entnommen und von jeglichen Geweberesten befreit. Die Knochen wurden in ein in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Stück Gaze gebettet, anschließend mit Alufolie umwickelt und dann bei –20°C bis zu Analyse gelagert.

Die Messungen wurden von Dr. Anja Niehoff am Institut für Biomechanik und Orthopädie an der Deutschen Sporthochschule Köln mit dem XCT Research M scanner (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) und dem dazugehörigen Programm 5.50 durchgeführt. Der linke Femur wurde an der distalen Metaphyse (15%, 17,5% und 20% der Gesamtknochenlänge vom distalen Gelenk ausgehend) und am Mittelschaft (50% der Gesamtknochenlänge) gescannt.

2.10 Versuchstierhaltung

Die *Col2a1-Cre*-Mäuse (Sakai *et al.*, 2001) wurde von A. Aszodi (München) und die *LoxP-flanked ERp57*-Mäuse (Garbi *et al.*, 2006) von G.J. Hämmerling (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Alle Mäuse wurden im Tierstall des Institutes für physiologische Chemie und Pathobiochemie, Uniklinikum Münster, nach den Richtlinien des Landes NRW (Haltungsgenehmigung: 39.35.7.1) unter SPF-Bedingungen gehalten und gezüchtet. Sowohl der Genotyp der Tiere als auch die Abwesenheit bestimmter Pathogene wurde regelmäßig an Stichproben kontrolliert.

2.11 Grafikprogramme und statistische Auswertung

Alle Messungen innerhalb dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Programme ImageQuant 5.0 oder ImageJ 1.43u durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit Graph Pad Prism 4 und zur Prüfung der Signifikanz wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. In allen Abbildungen mit statistischen Analysen wurde der arithmetische Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung gezeigt.

2.12 Datenbanken

Alle Sequenzinformationen wurden aus der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gewonnen.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Funktion von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung untersucht. Bei den *in vitro* Analysen lag der Fokus auf der Funktion von Matrixvesikel-assoziiertem ERp57 und auf Zellkulturexperimente bei denen das ERp57-Gen mit Hilfe von RNA Interferenz ausgeschaltet wurde, in denen der Einfluss von ERp57 Verlust bzw. Reduktion auf die Differenzierung von cranialen Hühnersternumchondrozyten analysiert wurde. Hauptsächlich wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch eine knorpel-spezifische ERp57 knockout Maus hergestellt und phänotypisch charakterisiert.

3.1 Die Rolle von ERp57 und Matrixvesikeln in der *in vitro* Chondrozytendifferenzierung

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass bei der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten die Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an ERp57 an der Zelloberfläche von Knorpelzellen eine inhibierende Rolle spielt (Dreier *et al.*, 2008). Wird ERp57 von der Zellmembran mittels Cystein-Proteasen entfernt oder aber mit Hilfe eines Antikörpers gegen ERp57 blockiert, kann dieser Effekt aufgehoben werden und die Chondrozyten sind in der Lage nach IGF-I Stimulation auch in Anwesenheit von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ zu differenzieren. Da ERp57 in Hühnertibien mittels histologischen Färbungen auch in der ECM in Zell-entfernten Bereichen gefunden werden konnte, kam die Frage auf, ob das ERp57 mittels gerichteten Transports durch Matrixvesikel von den Chondrozyten entfernt wird, um eine Differenzierung der Chondrozyten gewährleisten zu können.

3.1.1 Isolierung und Identifikation von Matrixvesikeln aus Hühnerchondrozytenkulturen

Zur Isolierung von Matrixvesikeln aus Chondrozytenkulturen wurden die Chondrozyten zunächst aus Hühnerembryonen gewonnen und in Suspensionskulturen in Agarose genommen (2.2.2, 2.2.3). Nach 14tägiger Kultur wurden die Matrixvesikel mittels Ultrazentrifugation aus den Zellkulturmedien gewonnen und in PBS aufgenommen (2.2.5). Matrixvesikel enthalten alkalische Phosphatase (AP), deshalb gilt die AP-Aktivitätsbestimmung als Nachweis für das Vorhandensein von Matrixvesikeln. Die AP-Aktivität wurde sowohl in den Matrixvesikeln als auch den Zentrifugationsüberständen gemessen, um eine erfolgreiche Matrixvesikelisolation zu überprüfen (2.3.1).

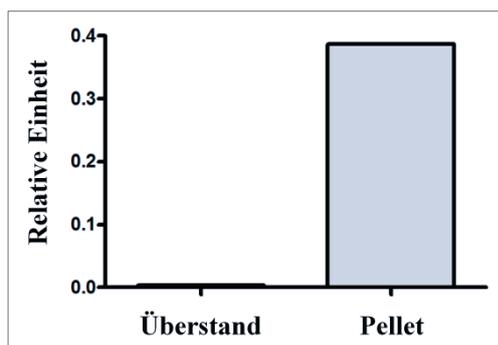


Abb. 3.1 **Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase nach Ultrazentrifugation von Zellkulturmedien.** Hierfür wurden Hühnerchondrozyten 14 Tage mit IGF-I als Differenzierungsstimulanz kultiviert, die Medien ultrazentrifugiert und die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Pellet und im Überstand photometrisch bei 405nm bestimmt. Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

In den Zentrifugationsüberständen konnte keine aktive alkalische Phosphatase gemessen werden, wohingegen diese in den Pellets detektiert werden konnte (Abb. 3.1). Somit konnte gezeigt werden, dass die Matrixvesikel erfolgreich und quantitativ aus den Zellkulturmedien isoliert werden konnten.

Zur zusätzlichen Kontrolle der erfolgreichen Isolierung der Matrixvesikel wurden diese nach einer Kontrastierung mit Uranylacetat im EM sichtbar gemacht (2.6). Wie in der Literatur beschrieben lassen sich Vesikel mit einer Größe bis zu ca. 200nm Durchmesser und einer Doppelmembran finden (Anderson & Reynolds, 1973) (Abb. 3.2).

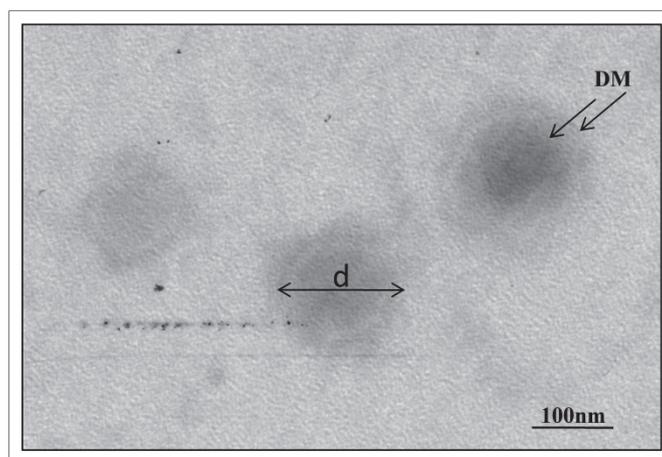


Abb. 3.2 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Matrixvesikeln.** Isolierte Matrixvesikel wurden mit Uranylacetat kontrastiert und im EM bei einer 38.000x Vergrößerung sichtbar gemacht. Es lassen sich Strukturen mit den für Matrixvesikel beschriebenen Doppelmembranen (DM) erkennen, die einen Durchmesser (d) von 100-200nm aufweisen.

3.1.2 Nachweis von ERp57 in Matrixvesikeln und Überständen

Um die Rolle von ERp57 in Matrixvesikeln zu untersuchen, muss dieses Protein zunächst in oder auf den Matrixvesikeln nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte mittels Immuno-Blot Analyse (2.3.9, 2.3.12). Hierfür wurden zunächst die Matrixvesikel aus Kulturmedien von Chondrozytenkulturen isoliert (2.2.5), in Lysepuffer (2.2.5) aufgenommen und der Proteingehalt mittels BCA-Test bestimmt (2.3.5). Anschließend wurden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer (5x) versetzt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immuno-Blot analysiert. Zur Identifikation des ERp57 in bzw. auf den Matrixvesikeln wurden sowohl der AB099- als auch der SPA-725-Antikörper verwendet (2.3.12).

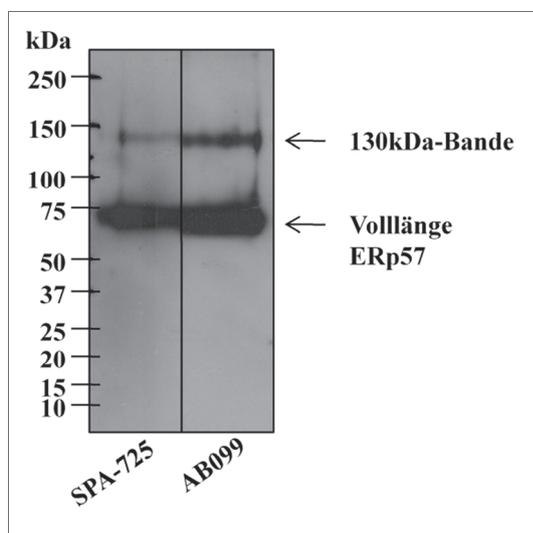


Abb. 3.3 Analyse der Matrixvesikel auf ERp57 mittels Immuno-Blot. Nach der Isolierung der Matrixvesikel wurden deren Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immuno-Blot mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen ERp57 (SPA-725 und AB099) analysiert. Zwei Banden wurden mit beiden Antikörpern sichtbar, das Volllänge ERp57 (66kDa) und eine größere ca. 130kDa große Bande. Als Größenstandard wurde der Prestained Broad Range Standard der Firma Bio-Rad verwendet.

Sowohl mit dem N-terminal bindenden (AB099) als auch dem C-terminal bindenden ERp57 Antikörper (SPA-725) lässt sich Matrixvesikel-assoziiertes ERp57 nachweisen (Abb.3.3). ERp57 ist in der Spezies Huhn mit einem Molekulargewicht von 66kDa beschrieben (Nemere *et al.*, 1994). Dieses Volllängeprotein kann mit beiden Antikörpern gefunden werden. Eine zusätzliche Bande mit einer Größe von ca. 130kDa tritt in ca. 70% der Experimente auf. Dabei könnte es sich eventuell um ein ERp57-Dimer handeln.

Zur Kontrolle, ob nach dem Isolieren von Matrixvesikeln noch ERp57 in den verbliebenen Überständen zu finden ist, wurde ein Aliquot des Kulturmediums, mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (2.3.6) und ebenfalls nach Zugabe von Probenpuffer, zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. ERp57 wurde mittels Immuno-Blot mit Hilfe des SPA-725-Antikörpers in diesen Überständen identifiziert (Abb. 3.4).

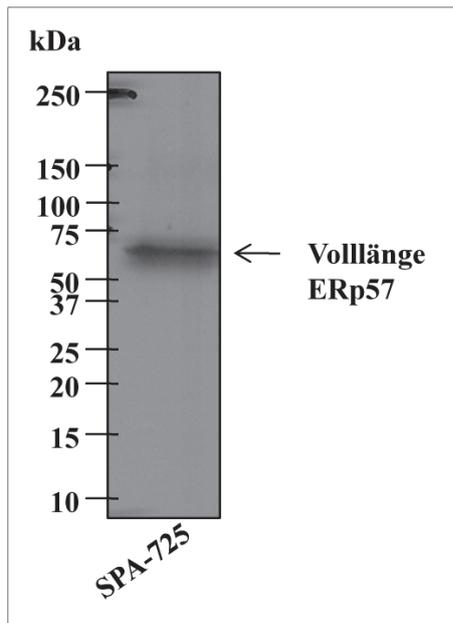


Abb. 3.4 **Analyse der Überstände auf ERp57 mittels Immuno-Blot.** Die Kulturüberstände wurden nach der Matrixvesikelisolierung mittels TCA gefällt, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immuno-Blot mit Hilfe des SPA-725Antikörpers auf verbliebenes ERp57 analysiert. Als Größenstandard wurde der Prestained Broad Range Standard der Firma Bio-Rad verwendet.

Auch in Überständen, nach Matrixvesikelisolierung, konnten erhebliche Mengen von ERp57 gefunden werden (Abb.3.4). Daraus folgt, dass große Mengen des ERp57 nicht in Matrixvesikel assoziierter Form, sondern in löslicher Form vorliegen.

3.1.3 Quantifizierung von ERp57

Um festzustellen, wie viel ERp57 von Chondrozyten in löslicher Form von der Zelle freigesetzt wird, wie viel Matrixvesikel-gebunden und wie viel ERp57 sich in der Zelle bzw. an der Zelle gebunden befindet, wurden Chondrozyten bis zu 14 Tage mit verschiedenen Stimuli (ohne Stimulation, IGF-I und IGF-I + E-64) kultiviert (2.2.3). Aus den Medien der Zellen wurden Matrixvesikel an verschiedenen Zeitpunkten (2, 5, 7, 9, 12 und 14 Tage Kultur) isoliert (2.2.5) und in Probenpuffer aufgenommen. Aus bei dieser Isolation verbliebenen Überständen wurden die Proteine mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (2.3.6) und in Probenpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit der Agaroseschicht in Lysepuffer über Nacht lysiert, anschließend gefällt (TCA-Fällung, 2.3.6), in PBS aufgenommen und auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Blau gefärbt und die Bandenintensitäten mit Hilfe des Computerprogrammes ImageQuant 5.0 bestimmt. Auf SDS-Gelen wurden die Matrixvesikel, die Überstände und die Zelllysate der unterschiedlichen Zeitpunkte aufgetragen und nach der Auftrennung gegen ERp57 (Tab. 2.2) geblottet und die Bandenintensitäten quantifiziert.

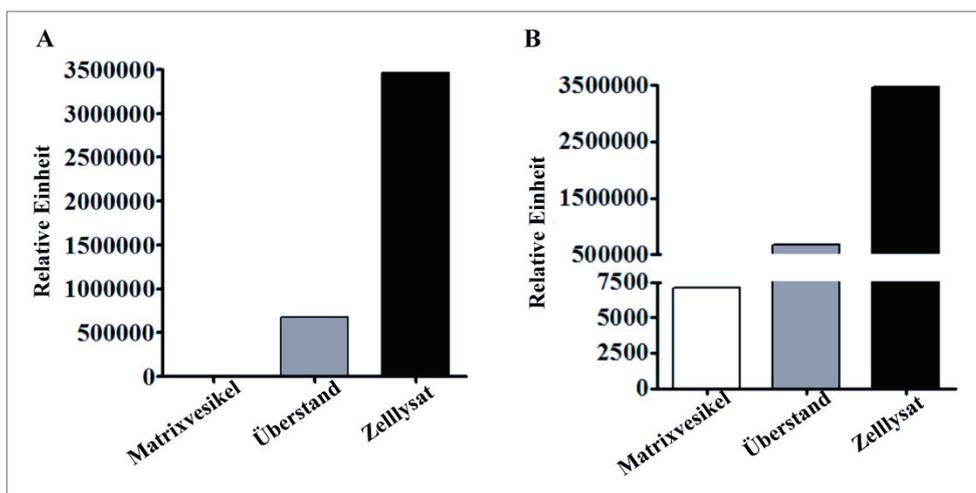


Abb. 3.5 **Quantifizierung des ERp57-Vorkommens in verschiedenen Lokalisationen der Zelle.** An Tag 9 isolierte Matrixvesikel, Überstand und Zellysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des SPA-725 und der Immuno-Blot-Technik analysiert. Die Menge von ERp57 in den einzelnen Lokalisationen wurde mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von insgesamt vier Experimenten. **A** und **B** zeigen dieselben Daten, jedoch mit unterschiedlichen y-Achsen zur besseren Darstellung des Matrixvesikel-assoziierten ERp57 in **B**.

In Abbildung 3.5 ist die Quantifizierung von ERp57 aus isolierten Matrixvesikeln, Überstand und Zellysate an Tag 9 nach IGF-I Stimulation gezeigt. Es lassen sich durchschnittlich 75% des ERp57 einer Kulturschale im Zellysate finden, <1% in den Matrixvesikeln und ca. 25% im restlichen Überstand. In allen Experimenten und bei allen Stimuli ließ sich beobachten, dass der größte Anteil an ERp57 in bzw. auf den Zellen zu finden ist, wohingegen der Anteil an ERp57 in Matrixvesikeln im Verhältnis zu den anderen Lokalisationen sehr gering ist.

3.1.4 Qualifizierung von ERp57

Da die Menge von ERp57 in bzw. auf Matrixvesikeln nur einen sehr geringen Anteil am extrazellulären bzw. zellulärem ERp57 ausmacht, stellt sich die Frage ob sich das lösliche bzw. zelluläre ERp57 in seiner Form (Struktur oder Größe) vom Matrixvesikel-assoziierten ERp57 unterscheidet und das unterschiedlich lokalisierte ERp57 somit unterschiedliche Funktionen ausüben kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Immuno-Blots gegen ERp57 mit den Antikörpern AB0999 und SPA-725 mit den Proteinlysaten der unterschiedlichen Lokalisationen durchgeführt (Abb. 3.6).

Die Proteinmengen der einzelnen Fraktionen (Matrixvesikel, Überstand und Zellysate) unterscheiden sich zwischen den beiden Immuno-Blots nicht. Innerhalb eines Immuno-Blots sind die Proteinmengen der drei Fraktionen jedoch unterschiedlich.

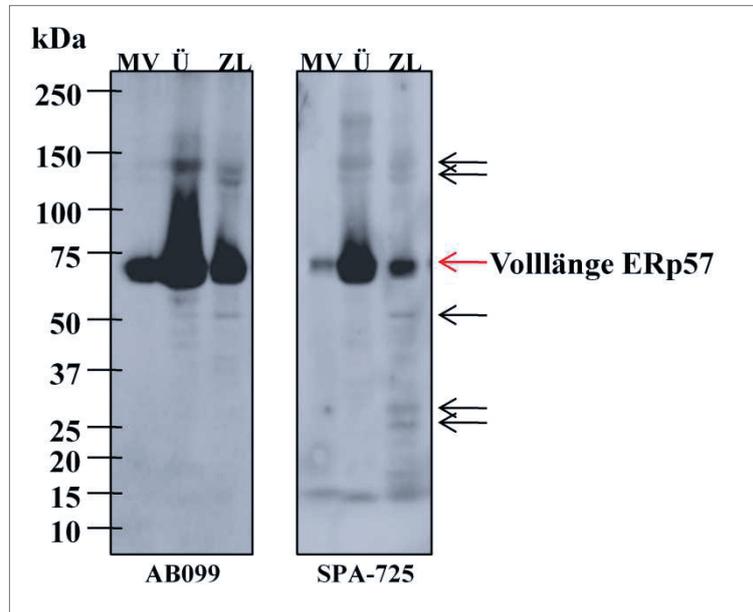


Abb.3.6 **Analyse von Matrixvesikeln, Überstand und Zellysate auf verschiedene ERp57-Formen.** Nach der Kultivierung von Chondrozyten mit IGF-I über 14 Tagen wurden Matrixvesikel (MV) isoliert, Zellysate (ZL) hergestellt und die Überstände (Ü) mittels TCA-gefällt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von Immuno-Blot und zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen ERp57 (AB099 und SPA-725) analysiert. Es konnten sowohl das Volllänge ERp57 (←) als auch weitere Banden (←) gefunden werden. Als Größenstandard wurde der Prestained Broad Range Standard der Firma Bio-Rad verwendet.

In allen Fraktionen konnte sowohl mit dem AB099- als auch dem SPA-725-Antikörper das Volllänge ERp57, mit einer Größe von 66kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Weitere Formen von ERp57 in Zellysate und Überstand im Vergleich zu den Matrixvesikeln, sowohl unter Verwendung des N-terminal bindenden AB099 als auch des C-terminal bindenden SPA-725-Antikörpers gefunden werden. Somit konnten keine Formen von ERp57 Matrixvesikel-assoziiert gefunden werden, die nicht auch in löslicher und zellulärer Form vorkommen. Dies war auch bei unstimulierten und IGF-I + E-64 stimulierten Zellen der Fall (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung des AB099-Antikörpers sind z.B. die Volllänge-Banden stärker als unter Verwendung des SPA-725-Antikörpers.

Das Verhältnis der Fraktionen zueinander ändert sich hierdurch allerdings nicht, so dass von einer stärkeren Reaktivität des AB099-Antikörpers ausgegangen werden kann. Die Banden im SPA-725-Antikörper-Blot mit einer Größe von ca. 30kDa lassen sich in anderen Experimenten auch im AB099-Blot finden, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass kleinere Proteinfragmente nur mit C-Terminus zu finden sind. Somit lässt sich zusammenfassen, dass das ERp57, welches sich auf bzw. in den Matrixvesikeln befindet, sich nicht von dem löslichen ERp57 in seiner Form unterscheidet.

3.1.5 Inaktivierung von ERp57 in primären Hühner-Chondrozytenkulturen

Zur weiteren Analyse der Rolle von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung wurde mittels siRNA das ERp57-Gen in diesen Knorpelzellen abgeschaltet. Hierfür wurden die Chondrozyten nach ihrer Gewinnung zunächst mit Hilfe von Elektroporation mit zwei gegen ERp57 gerichtete siRNAs (si) bzw. einer Kontroll-RNA mit nicht-bindender durchmischter Nukleotidsequenz (*scrambled RNA*, scr) transfiziert (2.2.6). Die hierfür zusammen in einem Ansatz genutzten zwei siRNAs wurden mit Hilfe eines Programmes von Invitrogen (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) im Bereich des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) von ERp57 ausgewählt. Außerdem wurde die von diesem Programm bestimmte scr Kontrolle genutzt. Als weitere Kontrollen wurde den Zellen lediglich ein Stromstoß (st) zugefügt und untransfizierte Zellen (\emptyset) genutzt. Nach der Transfektion wurden alle Zellen 3 Tage kultiviert und anschließend die RNA der Zellen aufgereinigt (2.4.1) und mit Hilfe von One-Step PCR (2.4.6) analysiert.

Abbildung 3.7, A zeigt das erfolgreiche Abschalten des ERp57-Gens in Chondrozyten. Eine starke Expression von ERp57 in den drei Kontrollen (scr, st und \emptyset) war nachweisbar, wohingegen in der si-Probe keine Expression von ERp57 zu detektieren war. Zum Abgleich der auf das Gel aufgetragenen DNA-Konzentrationen der einzelnen Ansätze wurde eine β -Aktin One-Step PCR genutzt (Abb. 3.7, B). Die Banden entsprachen mit ~ 370 bp von ERp57 und ~ 350 bp von β -Aktin den erwarteten Größen.

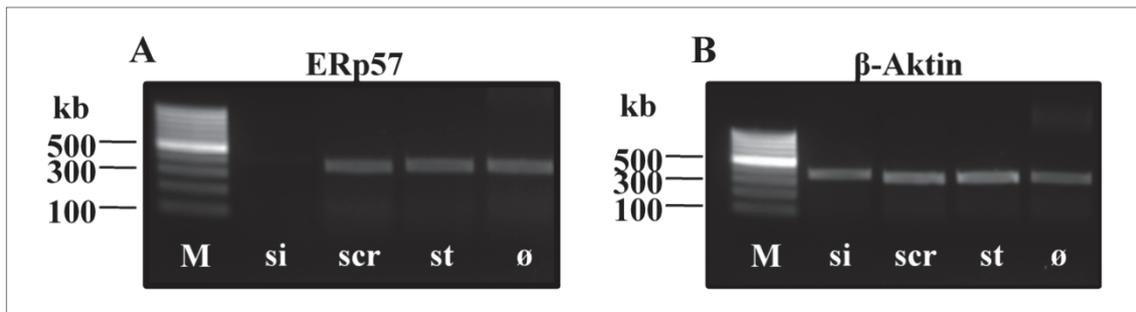


Abb. 3.7 **Genexpressionsanalyse mittels PCR zur Kontrolle der Transfektion.** Die RNA aus si-transfizierten (si), Kontroll-transfizierten (scr), mit Stromstoß behandelten (st) und unbehandelten (Ø) Chondrozyten wurde isoliert und die Expression von ERp57 (A) und β -Aktin (B) mittels One-Step PCR untersucht. Die PCR-Proben wurden auf 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht dokumentiert. Als Größenstandard (M) wurde der Gene Ruler 100bp DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet.

3.1.6 Analyse der Differenzierung von Chondrozyten nach Inaktivierung von ERp57

Aufgrund des Vorkommens von Kollagen II und X in unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Chondrozyten, lässt sich mit Hilfe des Verhältnisses von Kollagen X zu Kollagen II etwas über den Grad der Differenzierung von Chondrozyten aussagen. Ruhende und proliferierende Chondrozyten produzieren Kollagen II, wohingegen hypertrophe Chondrozyten Kollagen X produzieren. Um den Einfluss von ERp57 auf die Differenzierung von Chondrozyten zu untersuchen wurden in den Zellen zunächst das ERp57-Gens abgeschaltet (2.2.6), 14 Tage unter Zugabe von IGF-I in Kultur gehalten (2.2.3) und mit radioaktivem ^{14}C -Prolin ($1\mu\text{Ci/ml}$ Medium) über Nacht inkubiert (2.2.4). Anschließend wurden die Kollagene aus dem Medium und der Agaroseschicht gewonnen (2.3.8) und mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (2.3.9) und Fluorographie (2.3.11) sichtbar gemacht (Abb. 3.8, A).

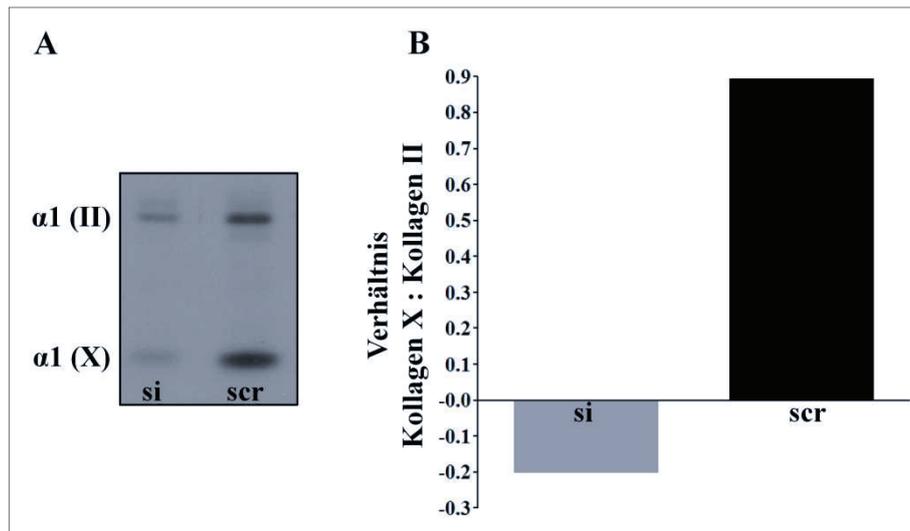


Abb. 3.8 **Kollagenpräparation von Chondrozyten nach Inaktivierung von ERp57.** Mit si-RNA (si)- und Kontroll-RNA (scr)-transfizierte Zellen wurden über Nacht ^{14}C -Prolin ($1\mu\text{Ci/ml}$ Medium) markiert, die Kollagene aus Zellen und Medium aufgereinigt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (A). Die Bandenstärke von Kollagen II [$\alpha 1$ (II)] und Kollagen X [$\alpha 1$ (X)] wurde mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und deren Verhältnis zueinander in B dargestellt.

In Abbildung 3.8, A ist das Fluorogramm nach Transfektion der Zellen mit si-RNA und scr-RNA zu sehen. Die Bandenintensität der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen X und $\alpha 1$ -Kette von Kollagen X wurde in dem Fluorogramm mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und anschließend das Verhältnis der Kollagene zueinander berechnet (Abb. 3.8, B). Die Kontrollzellen produzieren unter IGF-I Stimulation mehr Kollagen X als Kollagen II. Dies ist bei den Zellen, in welchen das ERp57-Gen abgeschaltet wurde nicht der Fall, sie produzieren mehr Kollagen II als Kollagen X. Somit differenzieren Chondrozyten, denen ERp57 fehlt, unter IGF-I Stimulation weniger stark als die Kontrollzellen.

Neben den oben genannten Markern Kollagen II und Kollagen X, sind noch weitere Marker für die unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Chondrozyten beschrieben worden (Zuscik *et al.*, 2008). Zur genauen Analyse dieser veränderten Differenzierung der si-Zellen gegenüber Kontrollzellen wurden die Expressionslevel von Sox9 (*sex determining region Y (SRY)- box 9*, geschlechtsbestimmende Region Y- Box 9), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), Kollagen II, Kollagen X, VDR (Vitamin-D-Rezeptor) und MMP13 (Matrix-Metalloprotease 13) als Differenzierungsmarker untersucht.

Hierfür wurden wie in vorherigen Experimenten die mRNA der Zellen nach Transfektion (2.2.6) und drei tägiger Kultur mit IGF-I (2.2.3) aufgereinigt (2.4.1) und über Genexpression per One-Step PCR analysiert (2.4.6).

Die Expression der einzelnen Proteine der si- und der scr-Proben wurden zunächst auf die Expression von β -Aktin und anschließend die si-Proben auf die scr-Proben bezogen. In Abbildung 3.9 sind die so berechneten Werte für die einzelnen Gene aufgetragen.

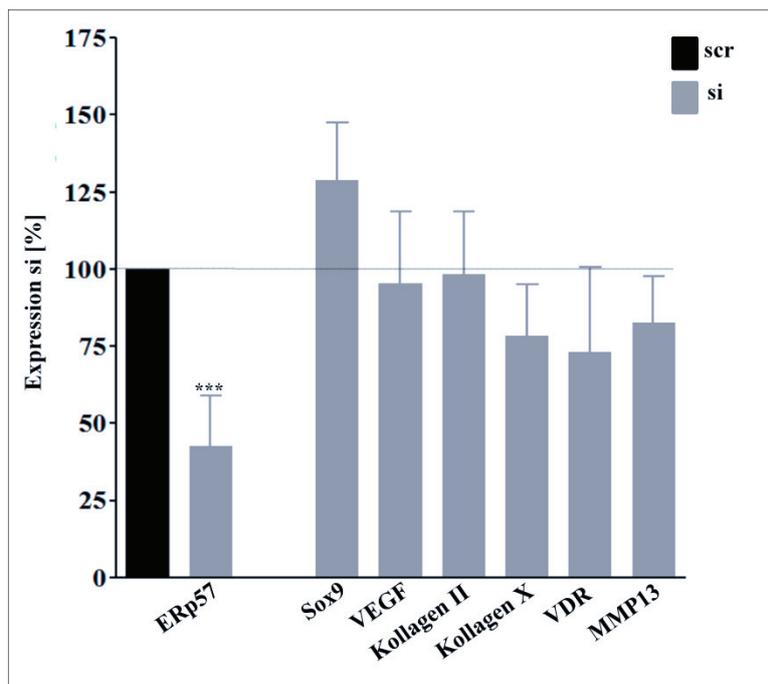


Abb.3.9 Analyse der Genexpression verschiedener Differenzierungsmarker. Chondrozyten wurden zunächst mit si-RNA (si) oder Kontroll-RNA (scr) transfiziert, die RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene mittels One-Step PCR und anschließender Gelelektrophorese analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und auf die Expression von β -Aktin normiert. Die Expression der Kontrolle (scr) wurde auf 100% gesetzt und so die Expression der si-Proben errechnet. $n \geq 3$; ***: $p < 0,0001$ (2.10).

Die Expression von Sox9, einem Marker für chondrogene Vorläuferzellen ist in si-Zellen tendenziell stärker (129%) als in scr-Zellen (100%), wohingegen die Expression der Hypertrophie-Marker Kollagen X (78%), MMP13 (83%) und VDR (73%) tendenziell schwächer ist. Die Expression von VEGF scheint 3 Tage nach dem Inaktivieren von ERp57 unverändert (95%) gegenüber der Kontrolle. Auch die Expression von Kollagen II (98%) scheint nach Abschalten des ERp57-Gens unverändert gegenüber der Kontrolle zu sein.

Insgesamt lässt sich aus den beiden Experimenten folgern, dass die Zellen in denen das ERp57-Gen abgeschaltet wurde gegenüber ihren Kontrollzellen unter Stimulation mit IGF-I, weniger stark differenzieren. Die Aussagekraft dieser Experimente ist jedoch auf Grund der schwachen Abweichungen eher gering einzustufen.

3.1.7 Expressionsanalyse von ER-Stress-Markern von si-Chondrozyten

ERp57 ist ein ER-Chaperon und an der Faltung verschiedener Proteine beteiligt. Kommt es im ER zu einer Fehlfaltung oder einer Ansammlung von ungefalteten Proteinen, führt dies zu ER-Stress. Dieser ER-Stress löst eine Kaskade von Signalwegen aus, die je nach Schweregrad der Faltungsprobleme, zu einer Rettung der Zelle oder aber zu Apoptose führen können. Um auszuschließen, dass die Veränderung der Differenzierung der Chondrozyten auf Grund von ER-Stress ausgelöst wurde, wurde die Expression der ER-Stress-Marker BIP (*Binding immunoglobulin protein*, Immunglobulin-bindendes Protein) und Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) wie im vorherigen Experiment analysiert (Abb. 3.10).

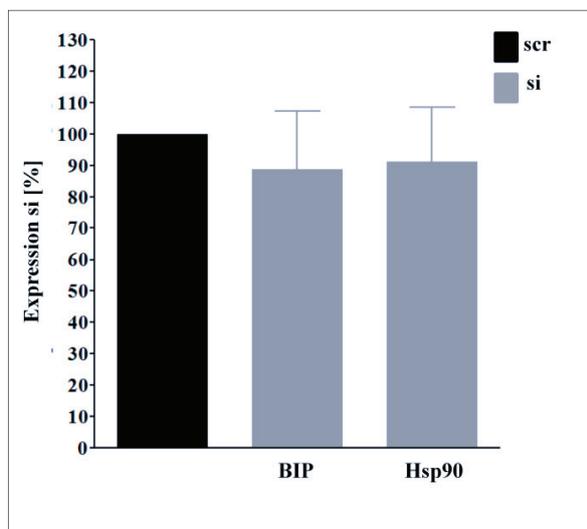


Abb. 3.10 **Analyse der Genexpression von ER-Stress-Markern.** Chondrozyten wurden mit si-RNA (si) oder Kontroll-RNA (scr) transfiziert, die RNA isoliert und die Expression von BIP und Hsp90 mittels One-Step PCR und anschließender Gelelektrophorese analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und auf die Expression von β -Aktin abgeglichen. Die Expression der Kontrolle (scr) wurde auf 100% gesetzt und so die Expression der si-Proben verrechnet. $n \geq 7$ (2.10).

In Abbildung 3.10 ist gezeigt, dass die Expression beider Marker in si-Zellen (BIP: 89% und Hsp90: 91%) unverändert ist gegenüber den Kontrollzellen (100%), so dass davon auszugehen ist, dass die si-Zellen keinem ER-Stress unterliegen, der zur Veränderung der Differenzierung führt.

3.1.8 Kompensation des Verlustes von ERp57 durch eine Proteindisulfidisomerase

In Hefen ist bekannt, dass ERp72 einen Verlust von ERp57 kompensieren kann (Gunther *et al.*, 1993). Da kein ER-Stress in den si-Zellen detektiert werden konnte, wurde untersucht, ob eine solche Kompensation durch ERp72 auch in Chondrozyten stattfindet, bei denen ERp57 ausgeschaltet wurde (Abb. 3.11).

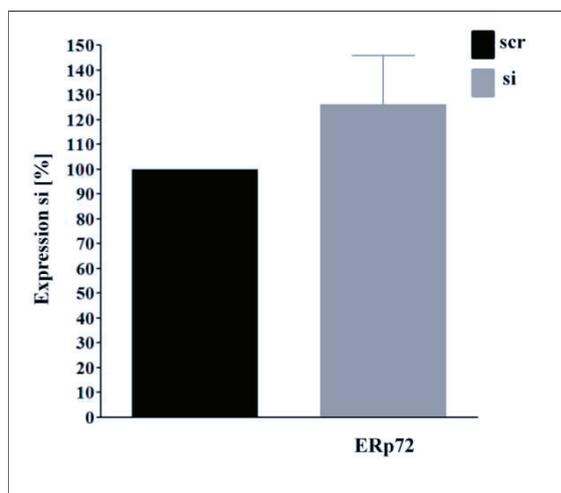


Abb.3.11 **Analyse der Genexpression von ERp72.** Chondrozyten wurden zunächst mit si-RNA (si) oder Kontroll-RNA (scr) transfiziert, die RNA isoliert und die Expression von ERp72 mittels One-Step PCR und anschließender Gelelektrophorese analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageQuant 5.0 bestimmt und auf die Expression von β -Aktin abgeglichen. Die Expression der Kontrolle (scr) wurde auf 100% gesetzt und so die Expression der si-Probe verrechnet, $n \geq 7$ (2.10).

Abbildung 3.11 zeigt die Expression von ERp72 in si-Zellen, abgeglichen auf scr-Zellen. Tendenziell ist die Expression von ERp72 in si-Zellen erhöht (126%) gegenüber den Kontrollzellen (100%), so dass eine Kompensation von ERp57 durch ERp72 möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich über die *in vitro*-Ergebnisse folgendes sagen:

1. Für die Entfernung von ERp57 von der Chondrozytenoberfläche spielt die Matrixvesikel-assoziierte Form von ERp57 nur eine untergeordnete Rolle, da sich hier nur ein kleiner Anteil des Gesamt-ERp57 finden lässt, der sich in der Form und Struktur vom löslichen und zellulären ERp57 nicht unterscheidet. Somit ist davon auszugehen, dass Matrixvesikel-assoziierte Transport von ERp57 nicht dazu führt, dass die Inhibition der Chondrozytendifferenzierung durch ERp57 gebundenes Vitamin D an der Zelloberfläche aufgehoben wird.
2. Chondrozyten, denen ERp57 fehlt, differenzieren unter Stimulation mit IGF-I weniger stark als Kontrollzellen. Ein möglicher ER-Stress scheint somit als Grund für dieses Verhalten nicht sehr wahrscheinlich zu sein.

3.2 Herstellung eines Mausstammes mit Chondrozyten-spezifischer Deletion des ERp57 und Analyse des Knochenwachstumsphänotyps

3.2.1 Mausstamm mit einer Chondrozyten-spezifischen funktionellen ERp57-Deletion (ERp57^{cart/-}-Mäuse)

Zur Beantwortung der Frage, welche Rolle ERp57 bei der Differenzierung von Chondrozyten *in vivo* spielt, wurden mit Hilfe des Cre/loxP-Systems Chondrozyten-spezifische ERp57 defiziente Mäuse generiert. Dies war nötig, da die generelle Deletion des ERp57 embryonal letal ist (Garbi *et al.*, 2006). Das Cre/loxP-System ermöglicht es Gene unter einem spezifischen Promotor zu deletieren, so dass nur an Lokalisationen, an denen der Promotor aktiv ist, das gewünschte Gen ausgeschaltet wird. Zur Generierung einer Chondrozyten-spezifische ERp57 defizienten Maus (ERp57^{cart/-}-Maus) wurde die in der Arbeitsgruppe von G.J. Hämmerling (Heidelberg) generierte gentechnisch veränderte Maus (Garbi *et al.*, 2006) genutzt. Bei dieser Maus wurden loxP-Sequenzen vor das Exon 2 und hinter Exon 3 gelegt (Abbildung 3.12). Eine Cre-Rekombinase-Aktivität führt deshalb zu einer Deletion der Exone 2 und 3 und somit zu einem Verlust der Funktion des Gens. Zur Rekombination des ERp57-Gens in Chondrozyten wurden ERp57^{fl/fl}-Mäuse mit einem Mausstamm verpaart, in welchem die Cre-Rekombinase knorpel-spezifisch unter dem Promotor des Col2a1-Gens exprimiert wird. In der Col2a1-Cre-Maus (Sakai *et al.*, 2001) konnte eine Cre-Rekombinase-Aktivität in den Knorpelanlagen der Mäuse im Embryonalstadium ab Tag 12.5 gezeigt werden.

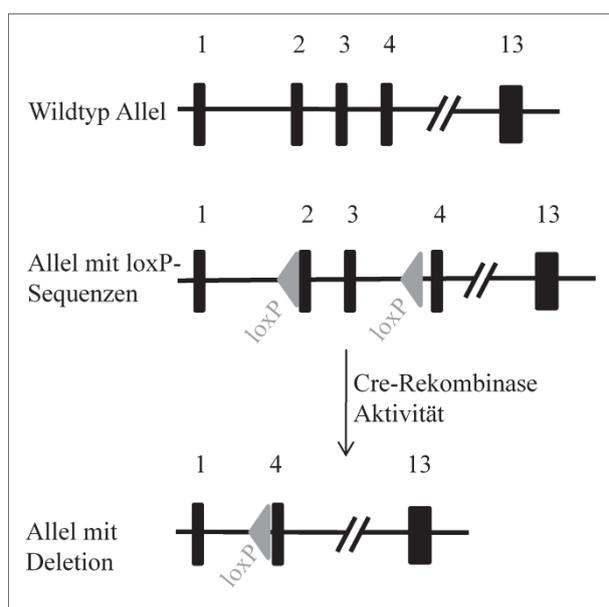


Abb.3.12 **Das ERp57-flox Konstrukt.** Vor dem Exon 2 und zwischen Exon 3 und 4 wurden die beiden loxP-Sequenzen (graue Dreiecke) inseriert. Nach einer Cre-Rekombinase Aktivität wird das Exon 2 und 3 aus der Sequenz deletiert. 1-4 & 13 stellen die Exone dar (Modifiziert nach Garbi et al 2006).

3.2.2 Analyse des knorpel-spezifischen ERp57 knockouts auf DNA-Ebene

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde DNA der Tiere aus den Schwanzspitzen isoliert (2.4.2) und eine PCR für die beiden Genotypen (cre pos/neg und flox) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primersequenzen (Tabelle 2.6) wurden von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

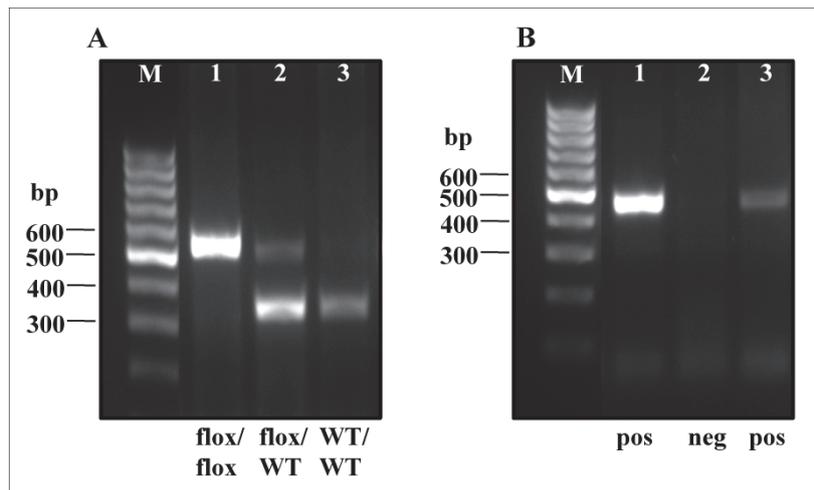


Abb.3.13 **Genotypisierungs-PCR der knorpel-spezifischen ERp57 knockout-Mäuse.** Mit Hilfe von verschiedenen PCRs konnten Genotypen der Tiere bestimmt werden. **A.** Nachweis des ERp57-Allels mit einer Größe des Amplikons von 355bp im Falle eines Wildtyp-Allels (1) und 543bp eines geflochten Allels (3). **B.** Nachweis des Cre-Rekombinase-Transgen mit einer Größe von 400bp. Die Bandengröße wurde mit Hilfe des Gene Ruler 100bp DNA Ladder (M) analysiert. Positiv (pos), Negativ (neg).

In Abbildung 3.13 wird exemplarisch eine Genotypisierung dargestellt. Das Tier 1 (Spur 1) besitzt die Bande für das geflochte ERp57 (A) was auf einen homozygoten Genotyp für das geflochte ERp57 schließen lässt. Zudem konnte im Tier 1 das Cre-Rekombinase-Transgen nachgewiesen werden, woraus sich schließen lässt, dass diese Maus eine knorpel-spezifische ERp57-deletierte Maus (ERp57^{cart^{-/-}}-Maus) sein könnte. Das Tier 2 (Spur 2) hat sowohl ein gefloxtes- als auch ein Wildtyp-ERp57 Allel. Es konnte kein Cre-Rekombinase-Transgen nachgewiesen werden, so dass diese Maus mutmaßlich den Phänotyp einer Wildtyp-Maus (WT) besitzt. In Maus 3 (Spur 3) wurde nur eine Bande für das Wildtyp-ERp57 Allel gefunden. Trotz Expression des Cre-Rekombinase-Transgens ist in dieser Maus die Expression von normalem ERp57 immer noch möglich, weshalb sie wahrscheinlich den WT-Phänotypen aufweist.

Da die optische Bestimmung des Geschlechtes von Mäusen in einem Alter von 1-21 Tagen oft schwierig ist, wurde eine PCR (2.4.5) zum Nachweis des Y-Chromosoms (SRY) für besagte Altersstadien durchgeführt. Die in Abbildung 3.14 dargestellte Geschlechtsbestimmung zeigt ein Amplikon mit einer Größe von 249bp bei den Tieren 2 und 3, die somit als Männchen identifiziert werden konnten. Maus 1 hingegen zeigt kein Amplikon und ist somit ein Weibchen.

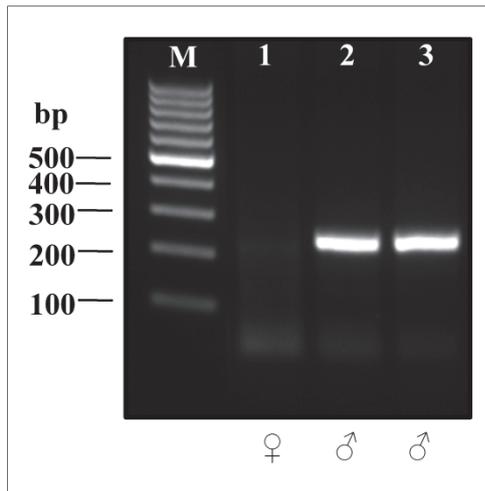


Abb.3.14 **Geschlechtsbestimmung der Mäuse.** Das Geschlecht der Mäuse wurde mittels einer PCR zum Nachweis des Y-Chromosoms (SRY) bestimmt. Die Größe des Amplikons dieser PCR lag bei 249 bp. Die Bandengröße wurde mit Hilfe des Gene Ruler 100bp DNA Ladder (M) analysiert.

3.2.3 Analyse der ERp57 Deletion in ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren auf Proteinebene

Um auf Proteinebene nachzuweisen, dass das ERp57 in den Chondrozyten der ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere effizient deletiert wurde, wurden Immuno-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Hüftköpfe von 12 Tage alten WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen aus einem Wurf präpariert, aus dem artikulären Knorpel des Hüftkopfes Proteine gewonnen (2.3.4) und analysiert.

Die gleichmäßige Auftragung der Proteinmengen wurde mittels einer Gesamtproteinfärbung der Nitrozellulosemembran (2.3.12) kontrolliert (Abb. 3.15, A). Anschließend wurde ein Immuno-Blot mit dem SPA-725-Antikörper durchgeführt. Eine Bande für das ERp57 auf Höhe des Volllängeproteins bei 58 kDa konnte nur in WT- und nicht im Knorpel der ERp57^{cart^{-/-}}-Maus gefunden werden (Abb. 3.15, B), womit nachgewiesen werden konnte, dass diese Mäuse im hyalinen Knorpel kein ERp57-Protein haben und somit eine knorpel-spezifische ERp57 knockout-Maus erfolgreich generiert werden konnte.

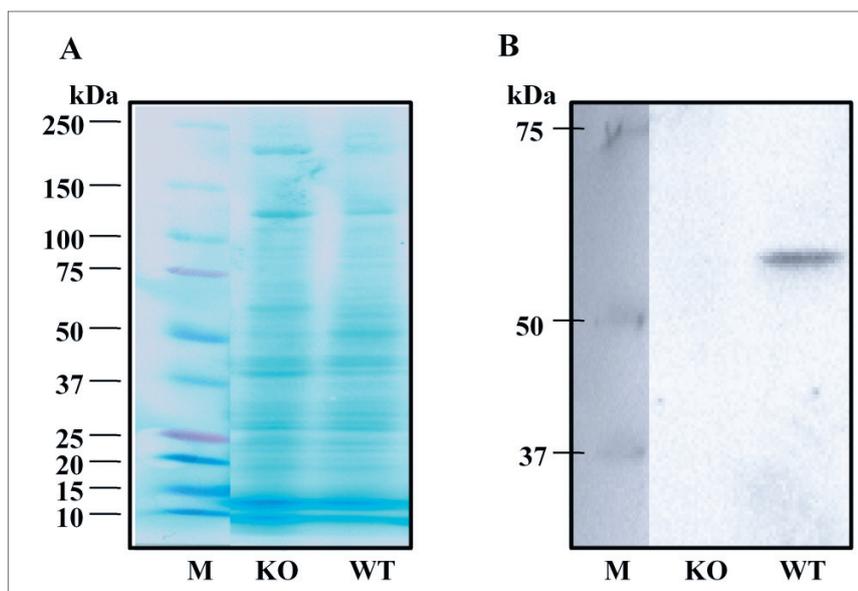


Abb. 3.15 **Immuno-Blot Nachweis von ERp57 in ERp57^{cart/-}- und WT-Tieren.** **A.** Gesamtproteinfärbung der Nitrocellulosemembran zeigt eine etwas größere Proteinmenge in der ERp57^{cart/-}-(KO) Bahn im Vergleich zur WT-Bahn. **B.** Es konnte kein ERp57 im Immuno-Blot mittels SPA-725-Antikörper in der KO-Bahn nachgewiesen werden. Als Größenstandard (M) wurde der Prestained Broad Range Standard der Firma Bio-Rad verwendet.

3.2.4 Beschreibung der ERp57^{cart/-}-Mäuse

Die generierten ERp57^{cart/-}-Tiere waren, anders als die konstitutiven ERp57-KO-Tiere (Garbi *et al.*, 2006), lebensfähig und fertil. Einige der ERp57^{cart/-}-Tiere waren deutlich kleiner als ihre WT-Geschwistertiere. In seltenen Fällen waren die ERp57^{cart/-}-Tiere etwa 50% kleiner als ihre WT-Geschwistertiere (Abb. 3.16).

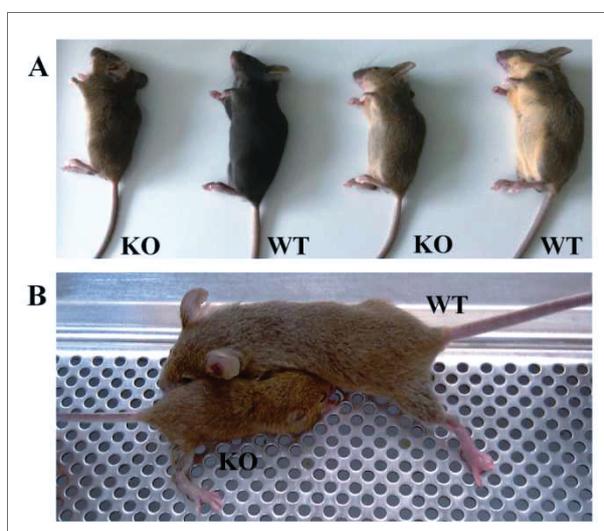


Abb. 3.16 **Vergleich WT- und ERp57^{cart/-}-Tiere.** **A.** Ein Wurf männlicher Mäuse im Alter von 4 Wochen. **B.** Zwei männliche Tiere eines Wurfs im Alter von 4 Wochen.

3.2.5 Gewichtsvergleich zwischen WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Aufgrund von teilweise deutlichen Größenunterschieden der Mäuse wurde zunächst eine Erfassung des Gewichts der Tiere zu verschiedenen Altersstufen durchgeführt. Hierfür wurden die WT- als auch ERp57^{cart/-}-Tiere an folgenden Altersstufen gewogen: 1 Tag, 7 Tage, 12 Tage, 3 Wochen, 4 Wochen, 2 Monate. Bis zu einem Alter von 3 Wochen unterscheiden sich WT – und ERp57^{cart/-}-Tiere weder bei den männlichen (Abb. 3.17) noch bei den weiblichen Tieren (Abb. 3.17) signifikant von einander. Im Alter von 4 Wochen zeigen sowohl die ERp57^{cart/-}-Weibchen als auch die ERp57^{cart/-}-Männchen ein signifikant niedrigeres Gewicht als die dazu vergleichbaren WT-Tiere. Bei den weiblichen ERp57^{cart/-}-Tieren ist dieser Unterschied im Alter von 2 Monaten nicht mehr vorhanden, wohingegen bei den Männchen der Gewichtsunterschied auch im Alter von 2 Monaten signifikant, jedoch rückläufig ist (Abb. 3.17).

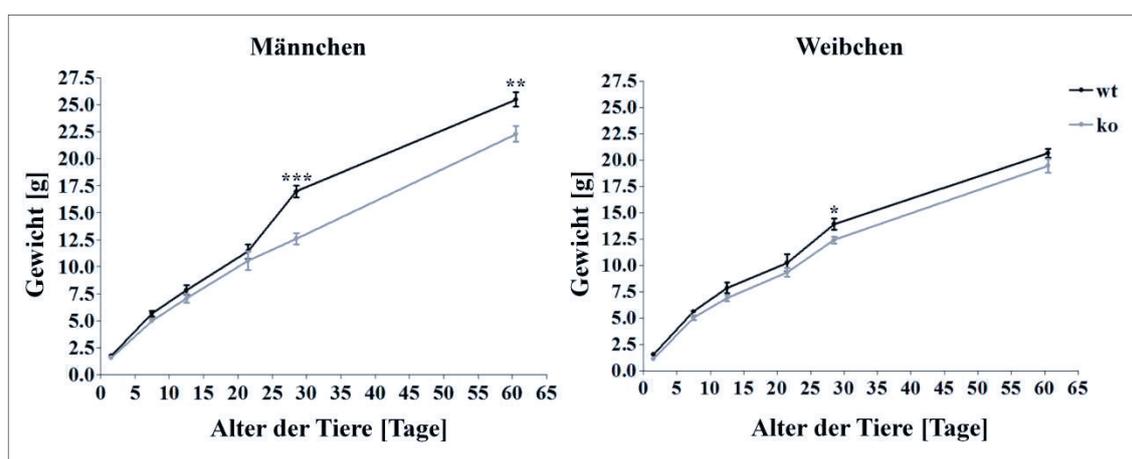


Abb.3.17 Gewichtsvergleich WT- und ERp57^{cart/-}-Tiere. Weibliche und männliche ERp57^{cart/-}-(KO)- und WT-Tiere wurden im Alter von 1 Tag, 7 Tagen, 12 Tagen, 3 Wochen, 4 Wochen und 2 Monaten gewogen. n≥3; *: p<0,05, **: p<0,005, ***: p<0,0001 (2.10).

3.2.6 Knochenlängenbestimmung von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Da Größe, Gewicht und Knochenwachstum zusammenhängen und die ERp57^{cart/-}-Tiere kleiner erscheinen, wurde die Länge unterschiedlicher Knochen von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren gemessen. Hierfür wurden jene Knochen genutzt, deren Längenwachstum auf endochondraler Ossifikation beruht und somit Chondrozyten eine Rolle in der Entwicklung der Knochen spielen. Die Skelette der Tiere wurden mittels Gesamtskelettfärbung (2.8) angefärbt (Abb. 3.18).

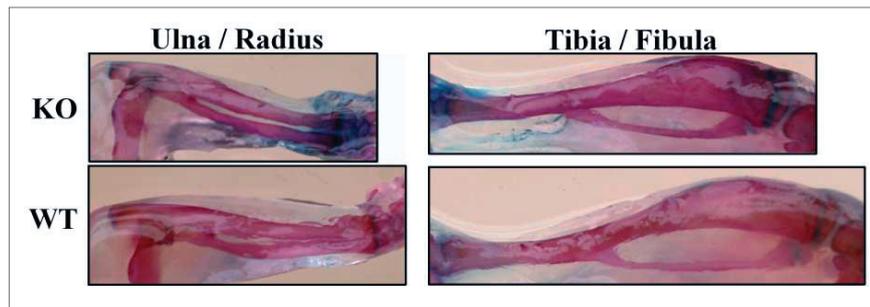


Abb. 3.18 **Ausschnitt aus der Gesamtskelettfärbung von männlichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren.** Das Skelett von WT- und ERp57^{cart/-}(KO)-Mäusen wurde mittels Gesamtskelettfärbung in knorpeligen Bereichen blau und in verknöcherten Bereichen rot gefärbt. Exemplarisch dargestellt sind Ulna/Radius und Tibia/Fibula von jeweils einem repräsentativem WT- und ERp57^{cart/-}-Tier. Bilder zeigen die gleiche Vergrößerung.

Die Knochen der WT-Tiere sind länger als die der ERp57^{cart/-}-Tiere (Abb. 3.18). Zudem scheinen die knorpeligen Bereiche (Blaufärbung) in den ERp57^{cart/-}-Tieren größer zu sein als in den WT-Tieren. Nach der Gesamtskelettfärbung wurden Ulna, Humerus, Tibia und Femur freipräpariert. Die einzelnen Knochen wurden fotografiert und mittels ImageJ 1.43u am Computer ausgemessen und statistisch ausgewertet.

Im Alter von 4 Wochen konnten bei beiden Geschlechtern der ERp57^{cart/-}-Tiere signifikant kürzere Knochen gefunden werden. Bei den männlichen Tieren (Abb. 3.19) waren alle gemessenen Knochen signifikant kleiner, wohingegen bei den weiblichen ERp57^{cart/-}-Tieren Ulna und Humerus signifikant kleiner waren, Tibia und Femur jedoch nicht (Abb. 3.20). Im Alter von 7 Tagen, 12 Tagen und 2 Monaten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Knochenlänge der vier verschiedenen Knochen zwischen WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren sowohl bei den Männchen (Abb. 3.19) als auch den Weibchen (Abb. 3.20) gefunden werden.

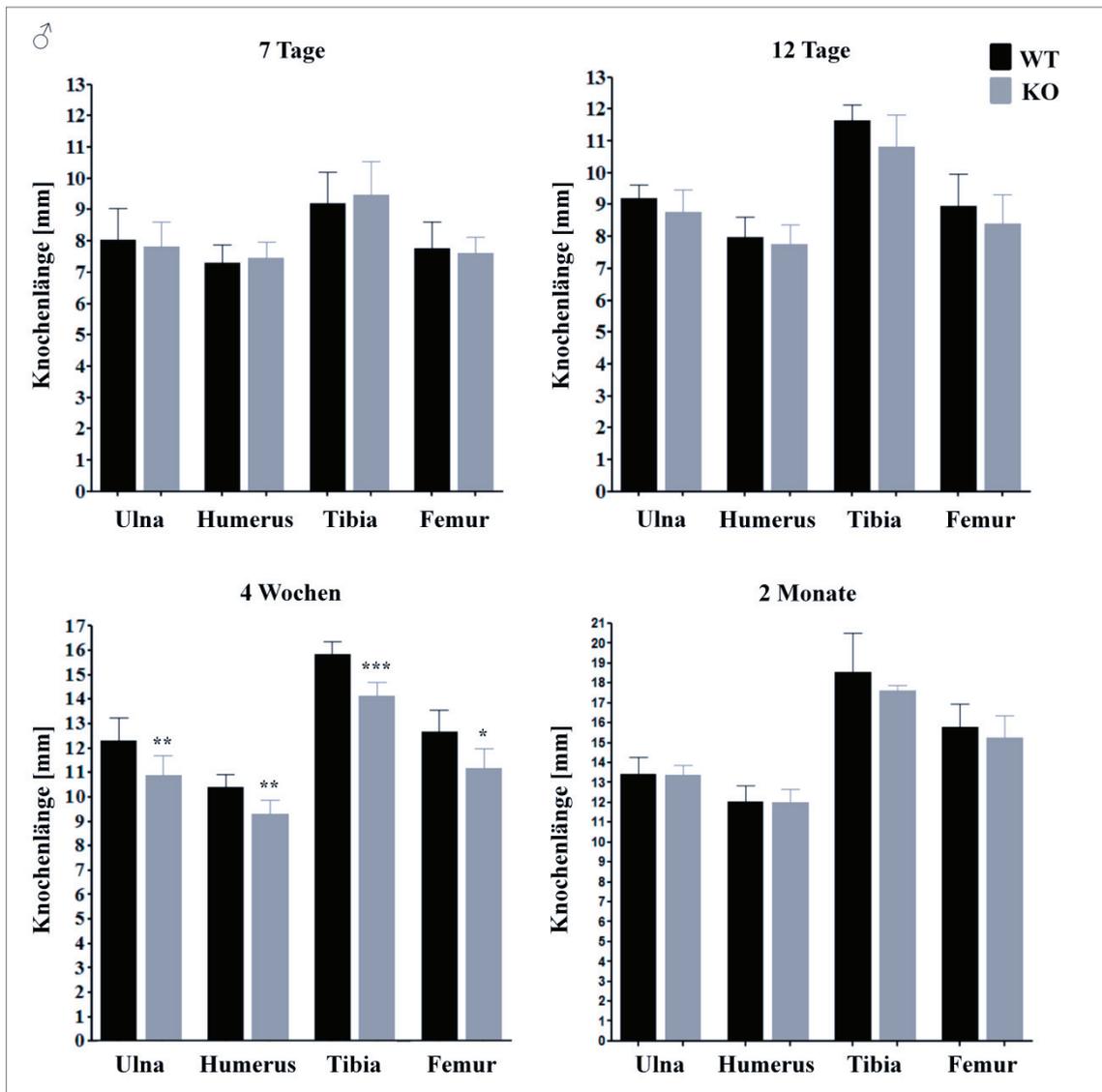


Abb. 3.19 Vergleich der Knochenlänge von männlichen WT- und ERp57^{cart}-/-Tieren. Nach der Gesamtskelettfärbung von männlichen WT- und ERp57^{cart}-/(KO) Mäusen unterschiedlichen Alters, wurden Ulna, Humerus, Tibia und Femur frei präpariert, fotografiert und mittels ImageJ 1.43u vermessen. n≥5; *: p<0,05, **: p<0,005, ***: p<0,0001 (2.10).

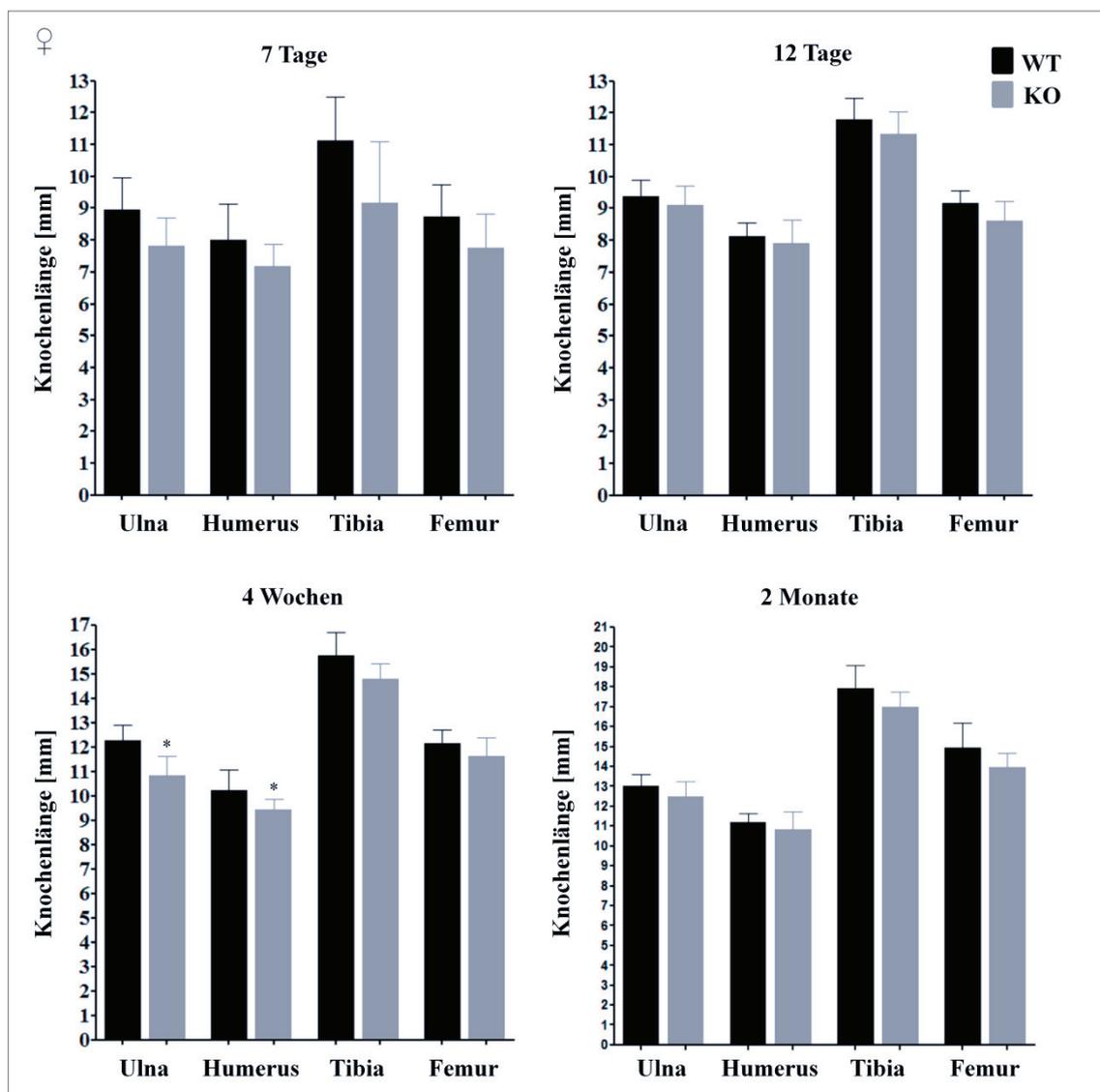


Abb. 3.20 Vergleich der Knochenlänge von weiblichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren. Nach der Gesamtskelettfärbung von männlichen WT- und ERp57^{cart/-}-(KO) Mäusen unterschiedlichen Alters, wurden Ulna, Humerus, Tibia und Femur frei präpariert, fotografiert und mittels ImageJ 1.43u vermessen. n≥4; *: p<0,05 (2.10).

3.2.7 Analyse der Wachstumsfugen von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Aufgrund der veränderten Knochenlänge der ERp57^{cart/-}-Tiere wurden die Wachstumsfugen der Tiere untersucht. Hierfür wurden die Hinterbeine von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen unterschiedlichen Alters gewonnen (7 Tage, 12 Tage, 4 Wochen und 2 Monate), in Paraffin eingebettet, in 5µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend mit unterschiedlichen Methoden gefärbt.

Für einen Überblick über die Wachstumsfuge wurde eine Alcian-Sirius Färbung durchgeführt (2.5.3). Das Alzianblau färbt im Knie knorpelige Bereiche an, wohingegen das Siriusrot den knöchernen Bereich, Bindegewebe und Muskeln anfärbt.

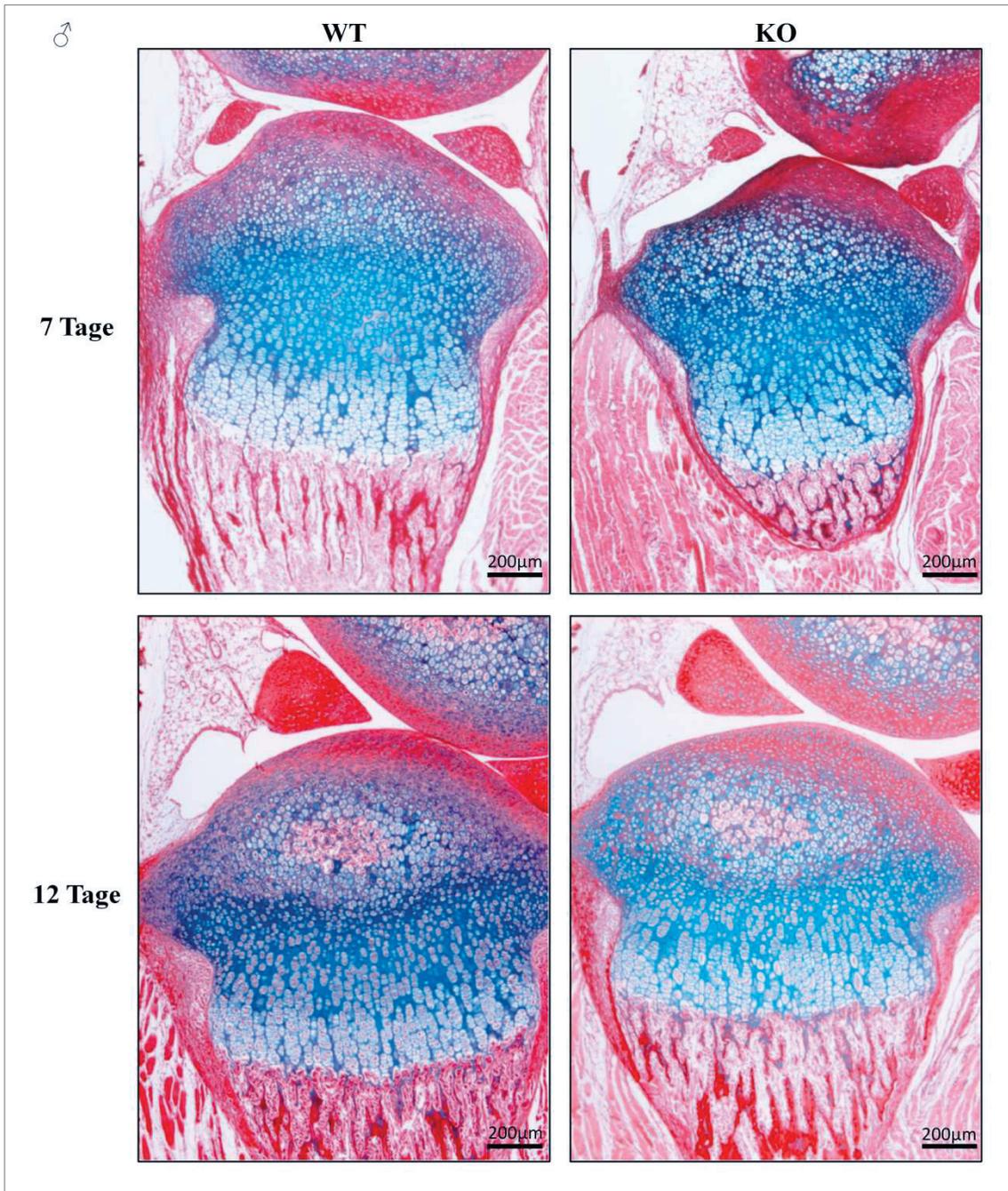
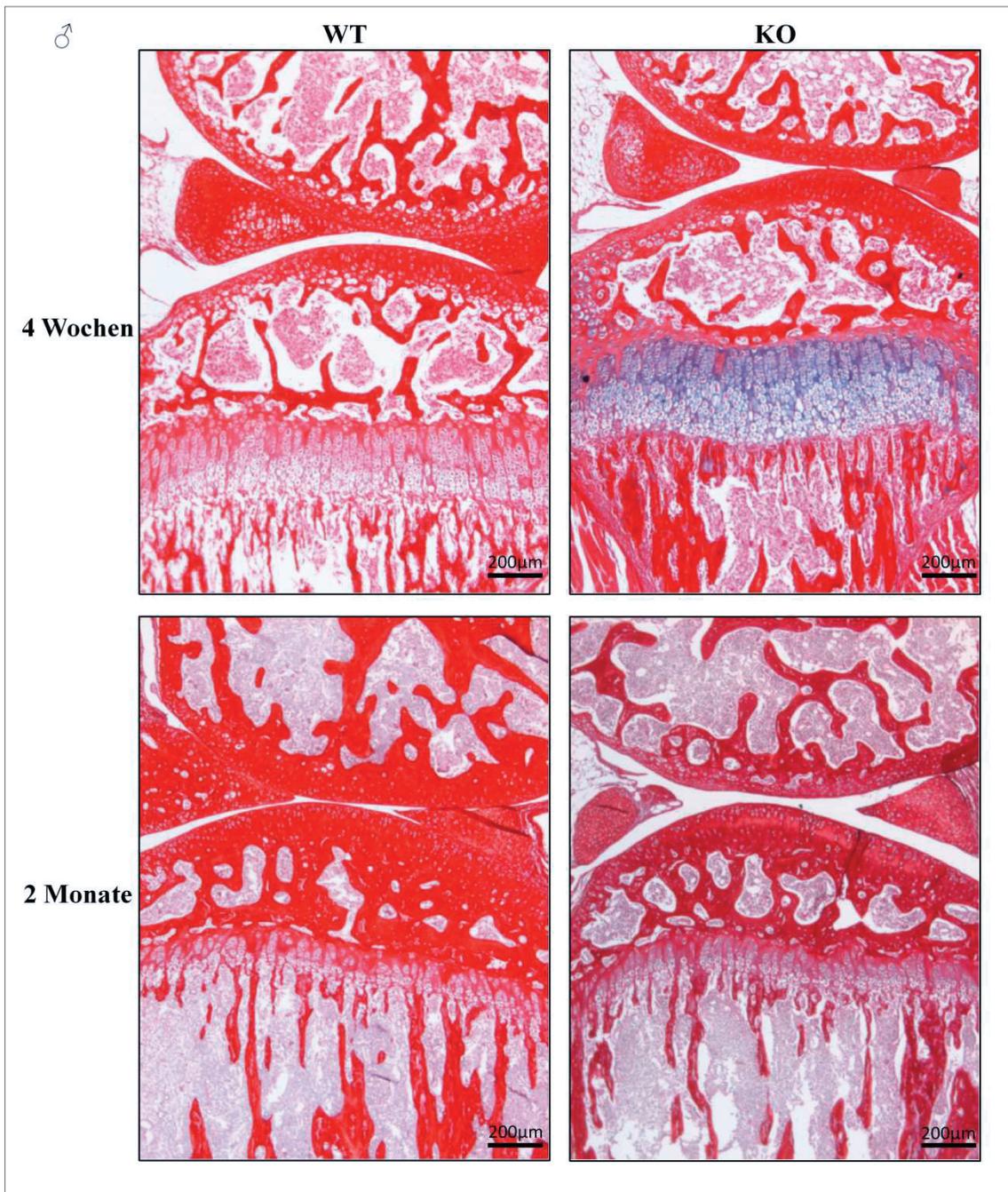


Abb. 3.21 **Histologische Analyse von Wachstumsfugen von männlichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien.** Paraffin-eingebettete Hinterbeine von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren im Alter von 7 Tagen, 12 Tagen, 4 Wochen und 2 Monaten wurden Alzianblau und Siriusrot gefärbt.



Fortsetzung Abb. 3.21 **Histologische Analyse von Wachstumsfugen von männlichen WT- und ERp57^{cart-/-}-Tibien.**

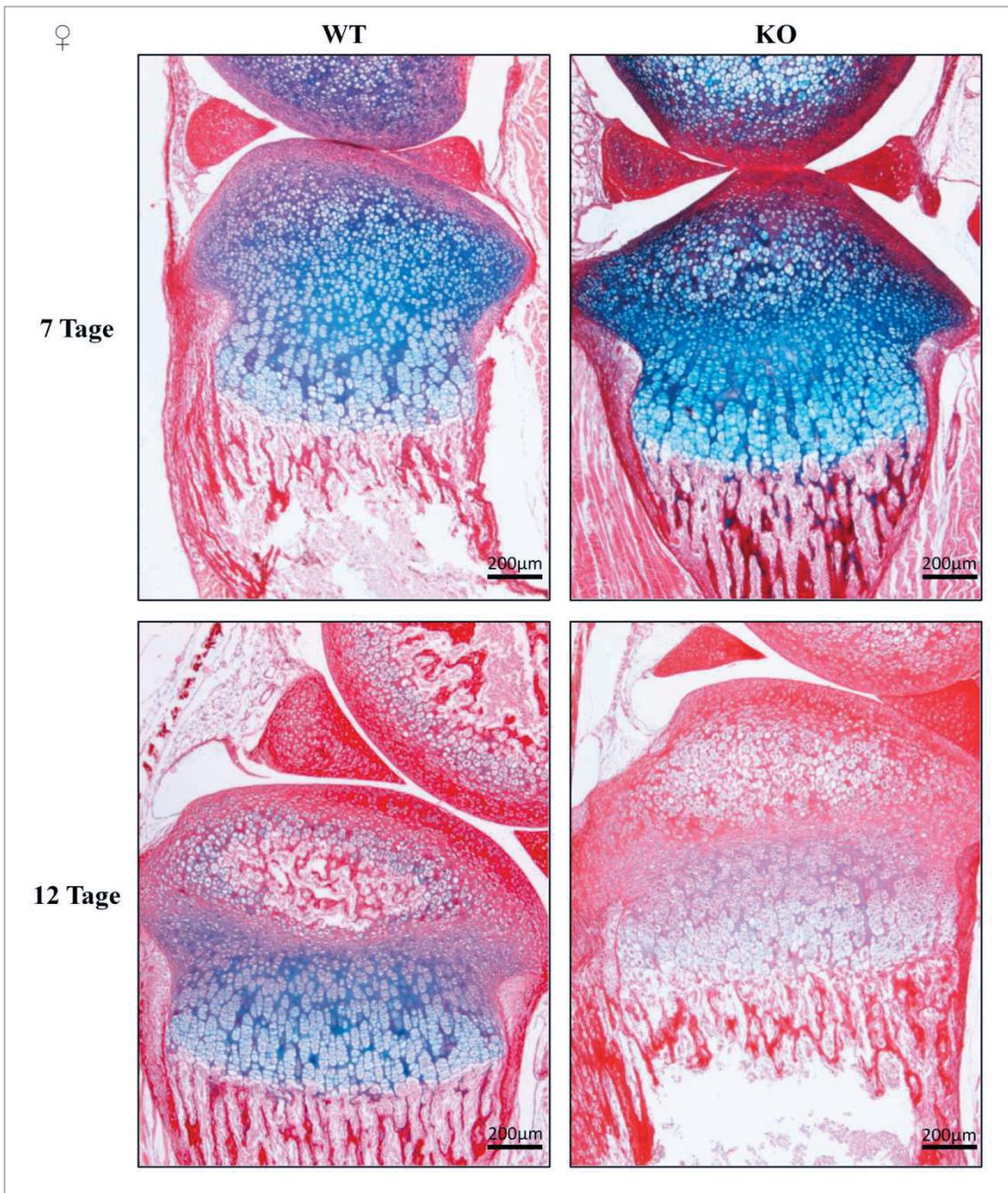
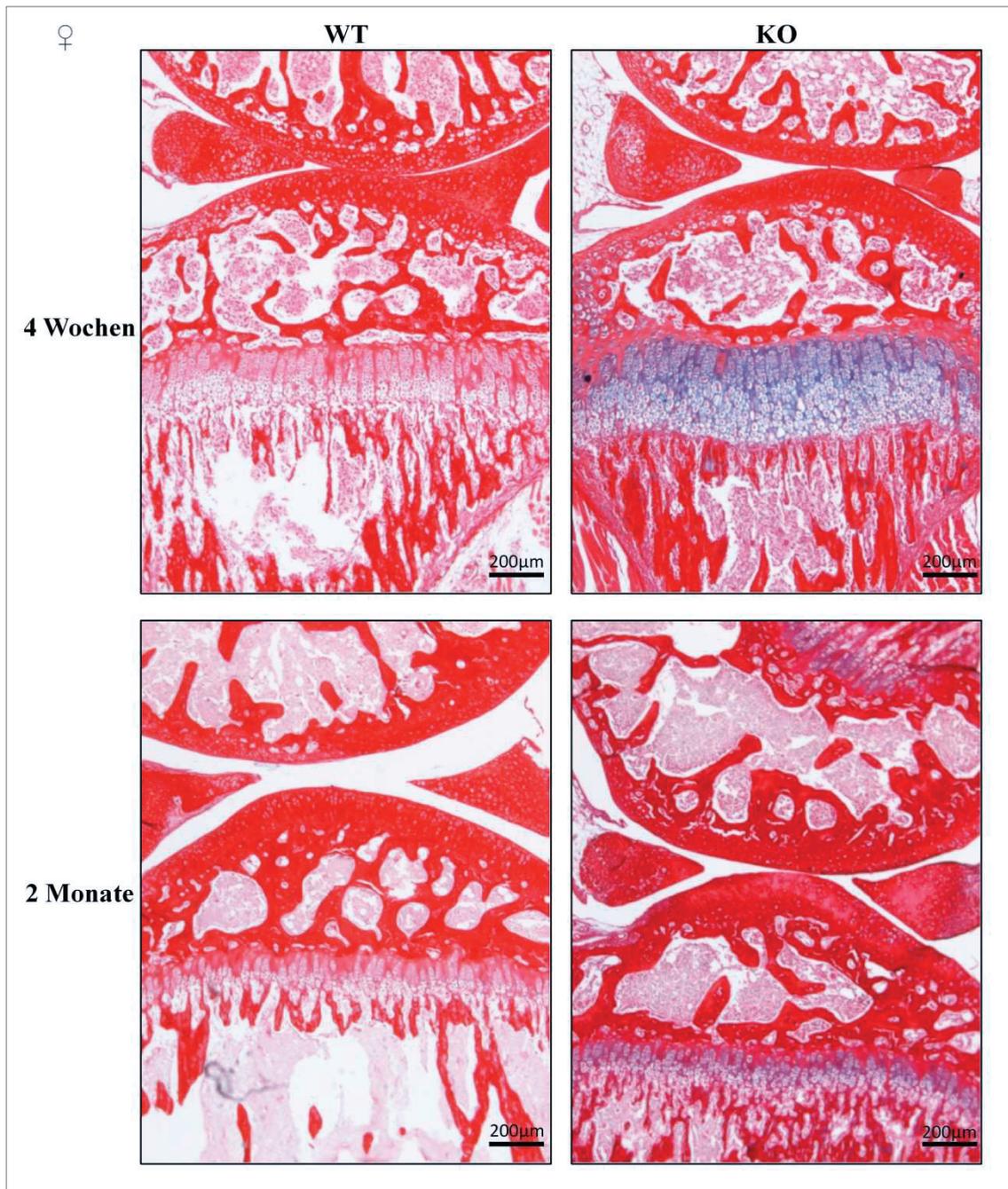


Abb. 3.22 **Histologische Analyse von Wachstumsfugen von weiblichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien.** Paraffin-eingebettete Hinterbeine von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren im Alter von 7 Tagen, 12 Tagen, 4 Wochen und 2 Monaten wurden Alzianblau und Siriusrot gefärbt.



Fortsetzung Abb. 3.22 **Histologische Analyse von Wachstumsfugen von weiblichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien.**

Mikroskopisch lassen sich im Alter von 4 Wochen bei männlichen ERp57^{cart/-}-Tieren deutlich breitere Wachstumsfugen als den WT-Tieren beobachten (Abb. 3.21). Dieser Unterschied ist bei den weiblichen Tieren ebenfalls zu erkennen (Abb. 3.22). Im Alter von 7 und 12 Tagen sowie 2 Monaten lassen sich keine Unterschiede zwischen den WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren in der Wachstumsfugenbreite, weder bei den Männchen (Abb. 3.21) noch den Weibchen (Abb. 3.22) erkennen.

Zur genaueren Analyse wurden die Längen der Wachstumsfugen, von den Chondrozyten der Ruhezone ausgehend bis zu den am weitesten hypertrophen Chondrozyten, mittels ImageJ 1.43u ausgemessen und statistisch ausgewertet.

Im Alter von 4 Wochen sind die Wachstumsfugen der männlichen ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse signifikant länger, als die der WT-Mäuse. Auch die weiblichen ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere zeigen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant ($p=0,06$) längere Wachstumsfuge als die weiblichen WT. Im Alter von 7 und 12 Tagen, sowie im Alter von 2 Monaten konnte weder bei den weiblichen noch männlichen Tieren ein Unterschied zwischen der Länge der Wachstumsfuge von WT und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren gefunden werden (Abb. 3.23).

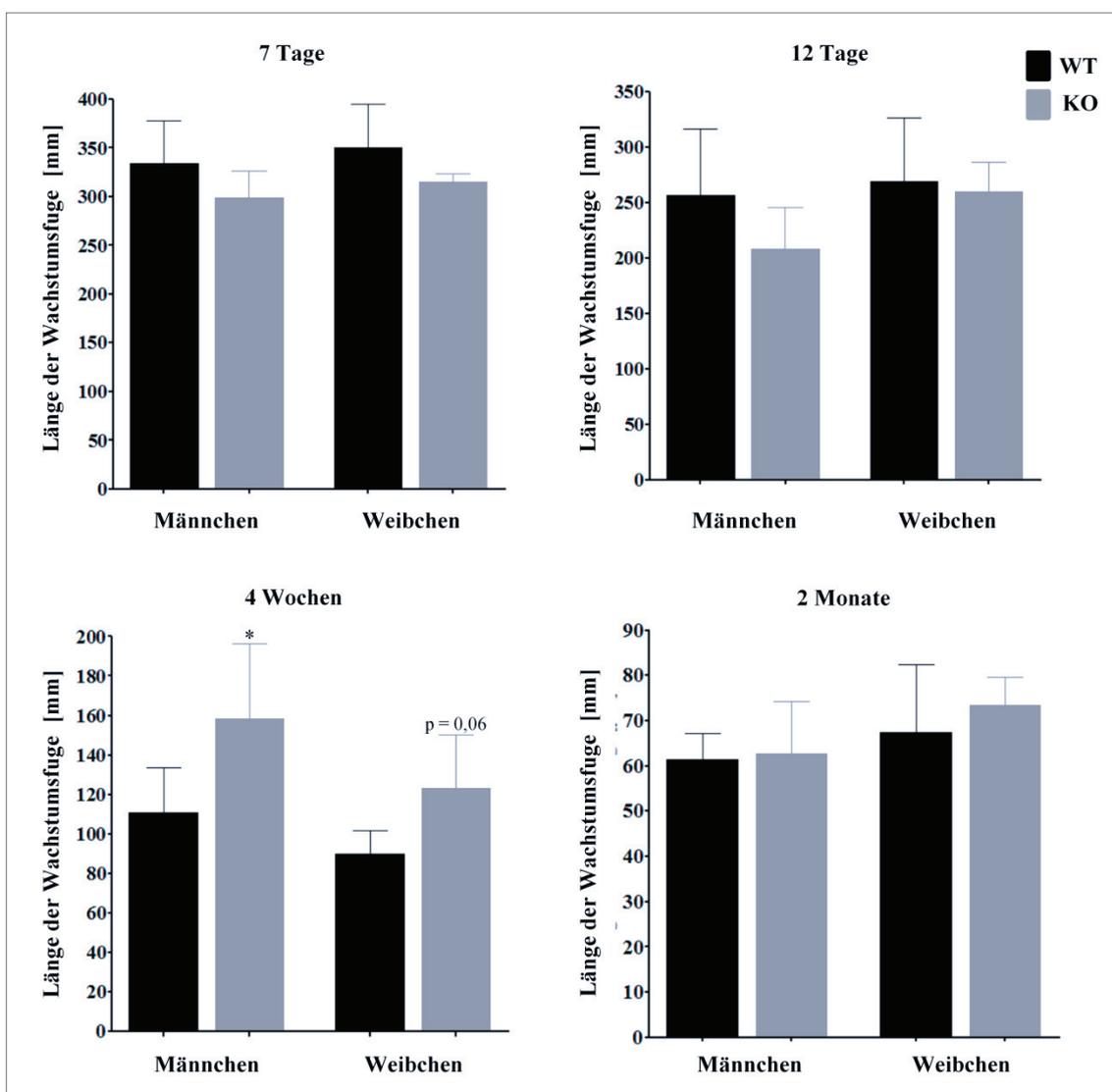


Abb. 3.23 Länge der Wachstumsfuge von WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tibien. Die Wachstumsfugen der Alzianblau/Siriusrot gefärbten Hinterbeine wurden mittels ImageJ 1.43u ausgemessen. $n \geq 3$; *: $p < 0,05$ (2.10).

Neben den unterschiedlichen Wachstumsfugenbreiten konnte eine stärkere Blaufärbung in den ERp57^{cart/-}-Tieren im Alter von 4 Wochen und 2 Monaten im Vergleich zu den WT-Tieren, sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Tieren gefunden werden.

Sowohl die Zellverteilung innerhalb der einzelnen Zonen der Wachstumsfuge, als auch die Säulenbildung und die Zellordnung innerhalb der Säulen scheinen in den ERp57^{cart/-}-Tieren nicht verändert zu sein.

Es fiel bei der Analyse der Wachstumsfugen ein Unterschied in den WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren bezüglich des sekundären Ossifikationszentrums auf. Alle untersuchten WT-Tiere zeigten im Alter von 12 Tagen ein sekundäres Ossifikationszentrum wohingegen die analysierten ERp57^{cart/-}-Tiere dies nur teilweise schon ausgebildet hatten (Abb. 3.24). Im Alter von vier Wochen hatten alle analysierten Tiere ein sekundäres Ossifikationszentrum.

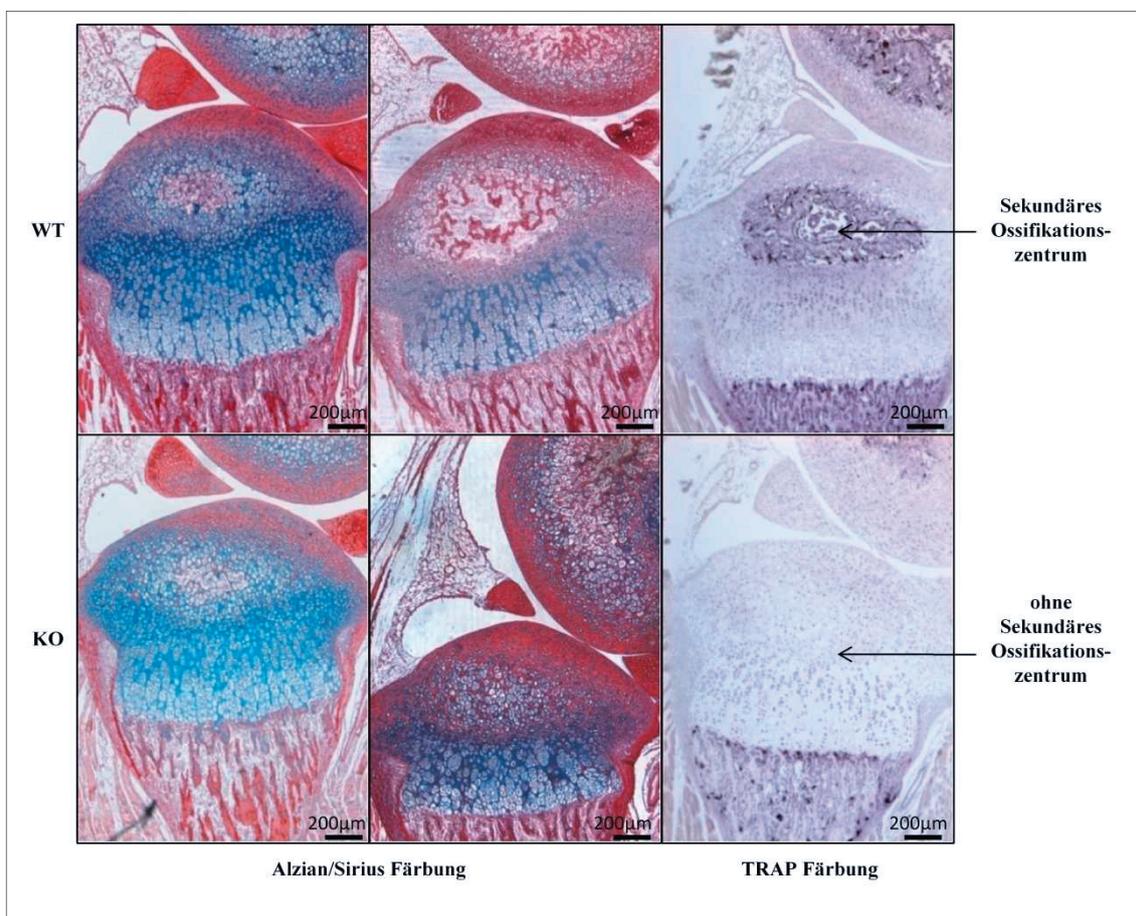


Abb. 3.24 Analyse des sekundären Ossifikationszentrums von WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien. Repräsentative exemplarische Darstellung von 12 Tage alten WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien nach Alzian/Sirius-Färbung bzw. nach TRAP (Tartratesistente Saure Phosphatase)-Färbung.

All diese Ergebnisse der Alzianblau/Siriusrot-gefärbten Paraffinschnitte der unterschiedlichen Altersstadien deuten auf ein verzögertes Wachstum der ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere hin, das sich im Alter von 4 Wochen am deutlichsten zeigt, jedoch im Alter von 2 Monaten wieder aufgeholt werden kann.

3.2.8 Analyse der hypertrophen Zone von WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen

In der Literatur wurde beschrieben (Dreier *et al.*, 2008), dass *in vitro* in primären Hühnerchondrozytenkulturen die Differenzierung dieser Zellen von ERp57 und 1,25-(OH)₂ Vit D₃ abhängig ist. Die Induktion der Hypertrophie dieser Zellen kann mittels 1,25-(OH)₂ Vit D₃ verzögert werden. Blockierung des ERp57 mit Hilfe eines Antikörpers führt trotz Zugabe von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ zu einer Induktion der Hypertrophie. Aufgrund dieser Ergebnisse und der veränderten Wachstumsfuge der ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere wurde die hypertrophe Zone innerhalb der Wachstumsfugen von WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren unterschiedlicher Altersstadien (7 Tage, 12 Tage, 4 Wochen und 2 Monate) mittels eines Antikörpers gegen den Hypertrophie-Marker Kollagen X gefärbt (2.5.4). Kollagen X kommt im Knorpel nur in der hypertrophen Zone vor, so dass es sich als Hypertrophie-Marker eignet.

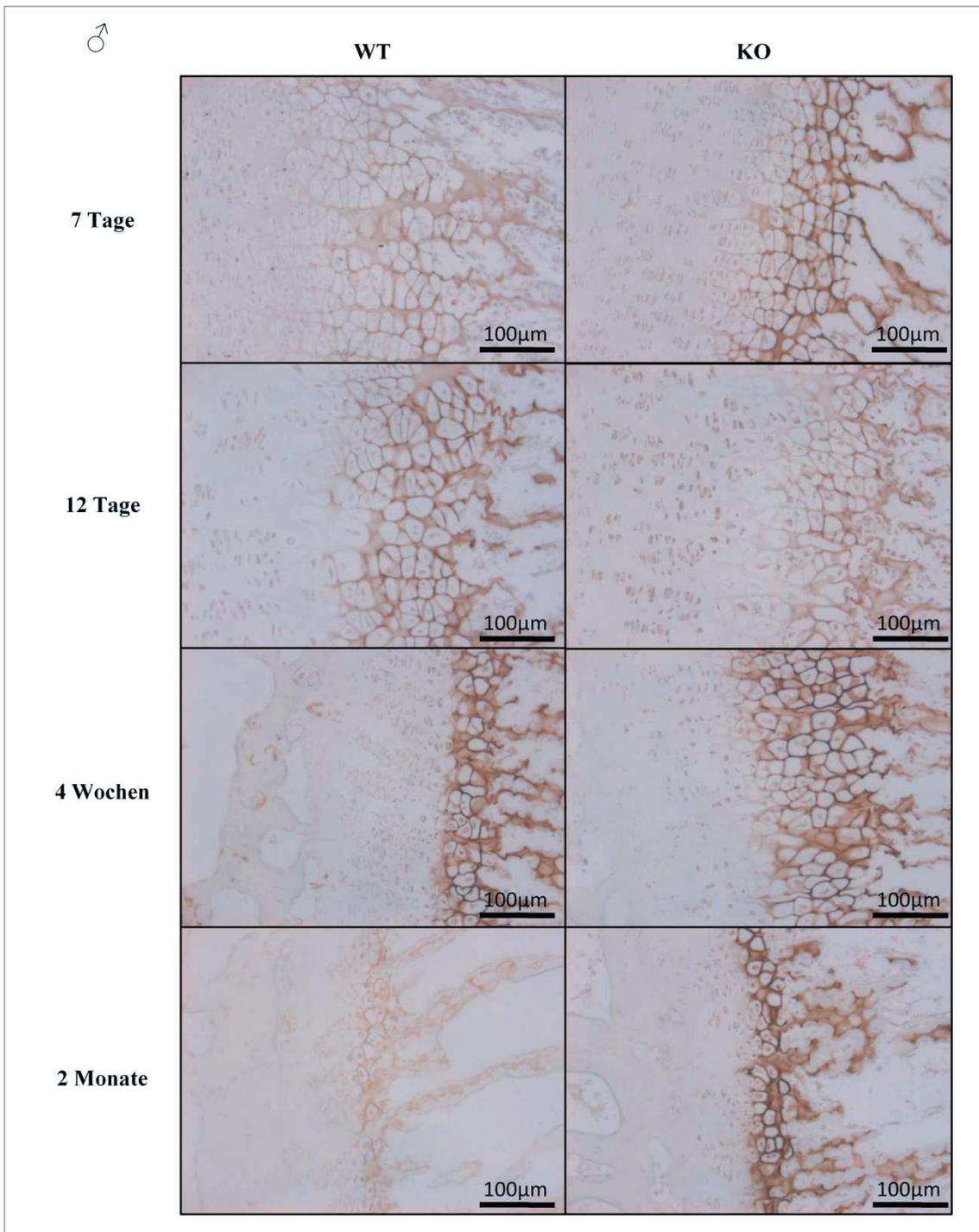


Abb. 3.25 **Immunhistologische Analyse der hypertrophen Zone der Wachstumsfugen von männlichen WT- und ERp57^{cart}-/-Tibien.** Hinterbeinschnitte von WT- und ERp57^{cart}-/-Tieren unterschiedlichen Alters wurden mit einem Anti-Kollagen X- Antikörper und einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper gefärbt.

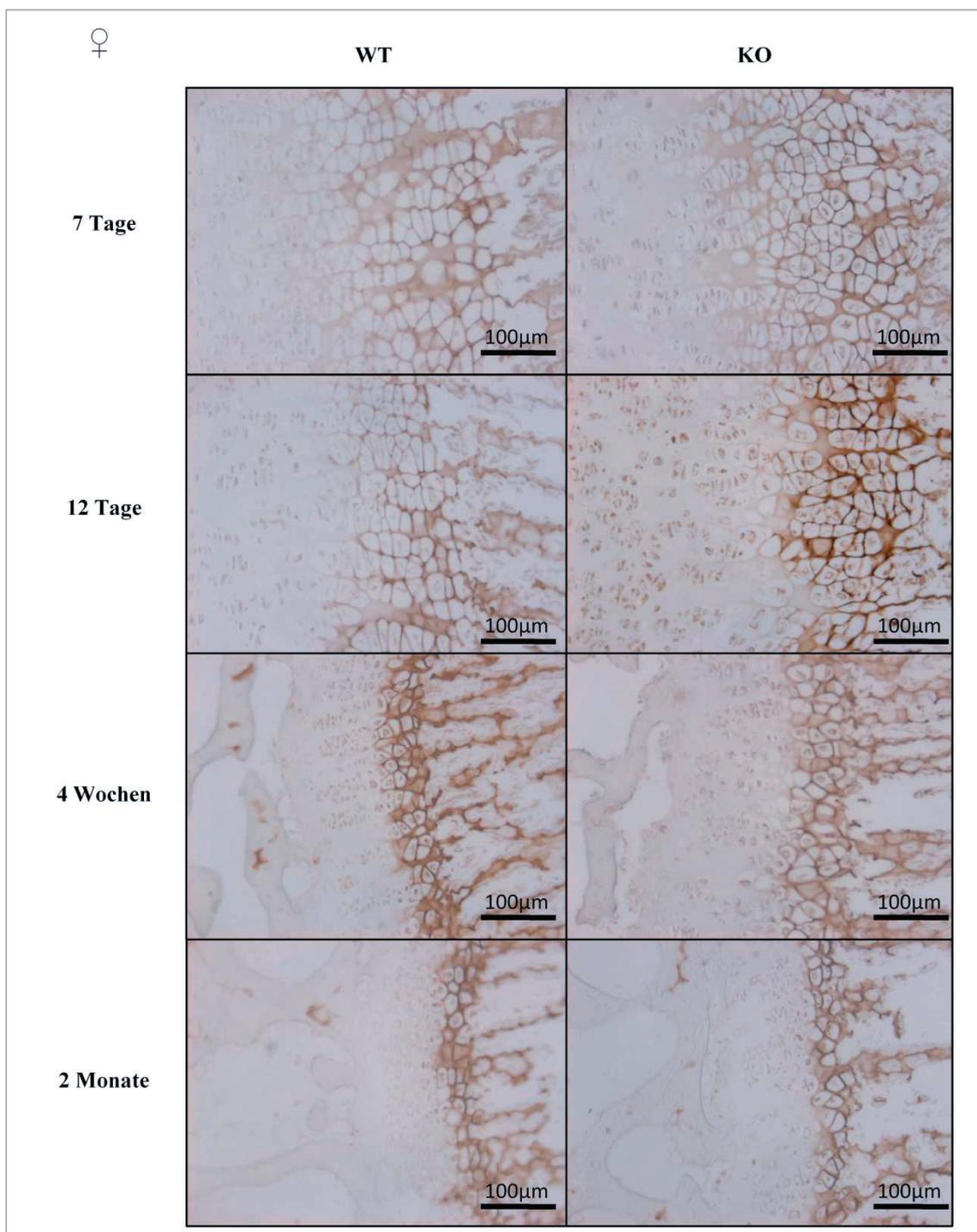


Abb. 3.26 **Immunhistologische Analyse der hypertrophen Zone der Wachstumsfugen von weiblichen WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien.** Hinterbeinschnitte von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren unterschiedlichen Alters wurden mit einem Anti-Kollagen X- Antikörper und einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper gefärbt.

Mikroskopisch lassen sich im Alter von 4 Wochen bei den Männchen (Abb. 3.25) größere hypertrophe Zonen in den ERp57^{cart/-}-Tieren, im Vergleich zu den WT-Tieren erkennen.

Dieser Unterschied ist bei den 4 Wochen alten Weibchen (Abb. 3.26) und den anderen Altersstufen nur minimal. Zur genauen Bestimmung der Länge der hypertrophen Zone wurden diese mittels ImageJ 1.43u ausgemessen und statistisch ausgewertet. Im Alter von 4 Wochen ist die hypertrophe Zone der Wachstumsfuge von männlichen ERp57^{cart/-}-Tieren signifikant länger als die der WT-Tiere. Dieser Unterschied lässt sich bei den weiblichen Tieren nicht finden. Im Alter von 7 und 12 Tagen, sowie 2 Monaten lassen sich in der Länge der Wachstumsfuge sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Tieren (Abb. 3.27) zwischen WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren keine Größenunterschiede feststellen.

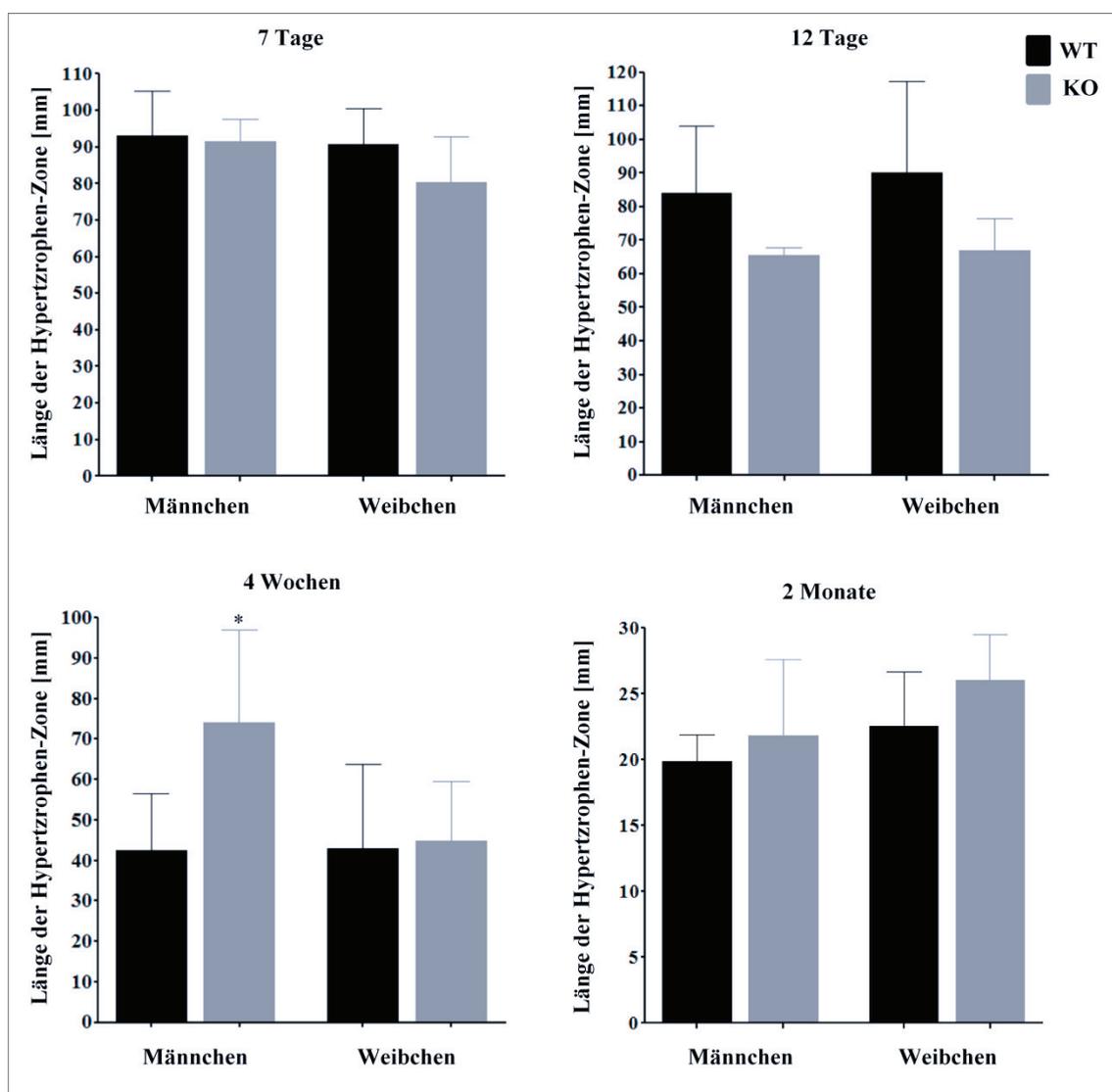


Abb. 3.27 Länge der hypertrophen Zone von WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien. Die Kollagen 10 gefärbten hypertrophen Zonen von WT- und ERp57^{cart/-}-Hinterbeinen wurden mittels ImageJ 1.43u ausgemessen. n≥3; *: p<0,05 (2.10).

3.2.9 Analyse der Proliferation der Zellen in der Wachstumsfuge von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Die unterschiedliche Länge der Wachstumsfuge und der nur tendenzielle Unterschied in der hypertrophen Zone kann unter anderem mit einer vermehrten Proliferation der Zellen oberhalb der hypertrophen Zone erklärt werden. Um dies zu untersuchen, wurden in einem zuvor definierten Bereich alle auf den Schnitten sichtbaren Zellen der Wachstumsfuge oberhalb der Kollagen X-Färbung (2.5.4.) von 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren gezählt.

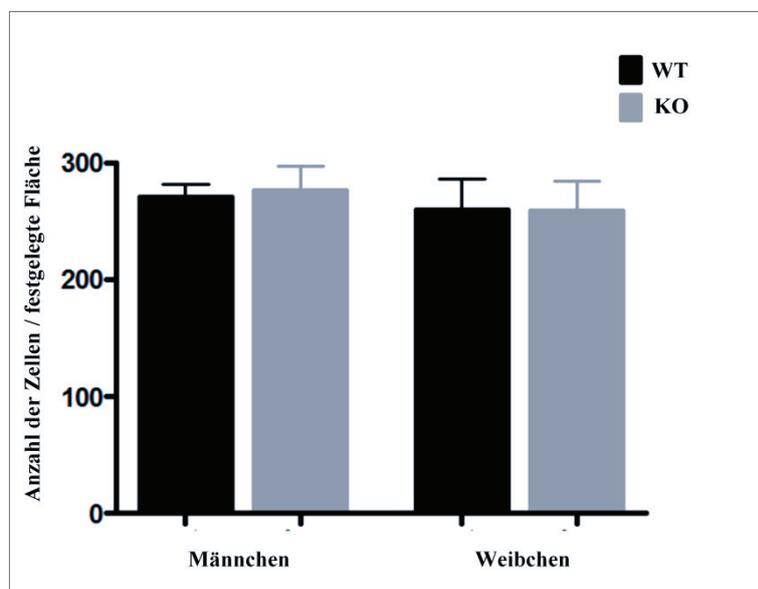


Abb. 3.28 **Bestimmung der Zellen oberhalb der hypertrophen Zone von 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien.** In den Kollagen X gefärbten Schnitten wurden alle Chondrozyten der Ruhe- und proliferativen Zone gezählt. n_≥3 (2.10).

Es konnten sowohl bei den 4 Wochen alten männlichen als auch weiblichen Tieren keine Unterschiede in der Anzahl der proliferativen Zellen oberhalb der Kollagen X-positiven hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge beobachtet werden (Abb. 3.28).

3.2.10 Analyse der Osteoklasten von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Da die unterschiedliche Länge der Wachstumsfuge und der nur tendenzielle Unterschied in der hypertrophen Zone nicht aufgrund einer vermehrten Proliferation der Zellen oberhalb der hypertrophen Zone erklärt werden kann, kann diese auch auf Grund einer verzögerten Umbaurate des Knorpels in Knochen zustanden kommen.

Um dies zu untersuchen wurde eine Färbung der Osteoklasten innerhalb der Tibien von WT- und ERp57^{cart-/-}-Tieren verschiedenen Alters mittels TRAP (Tartratresistente Saure Phosphatase) – Färbung durchgeführt.

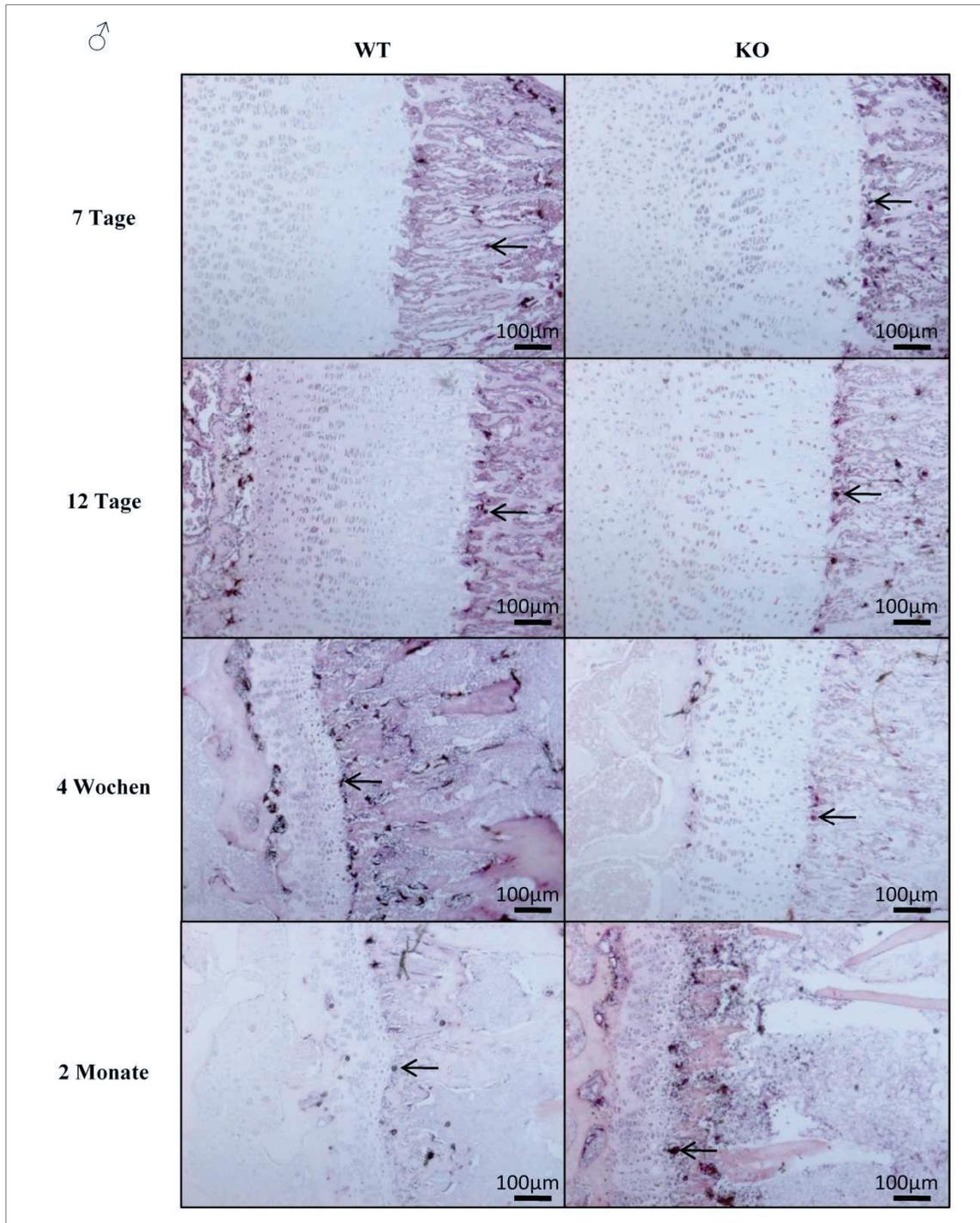


Abb. 3.29 TRAP-Färbung von männlichen WT- und ERp57^{cart-/-}-Tibien. Schnitte von WT- und ERp57^{cart-/-}-Tibien wurden mit dem Acid Phosphatase, Leukocyte-Kits der Firma Sigma Aldrich gefärbt. Pfeile zeigen Beispiele für positiv-gefärbte Zellen (←).

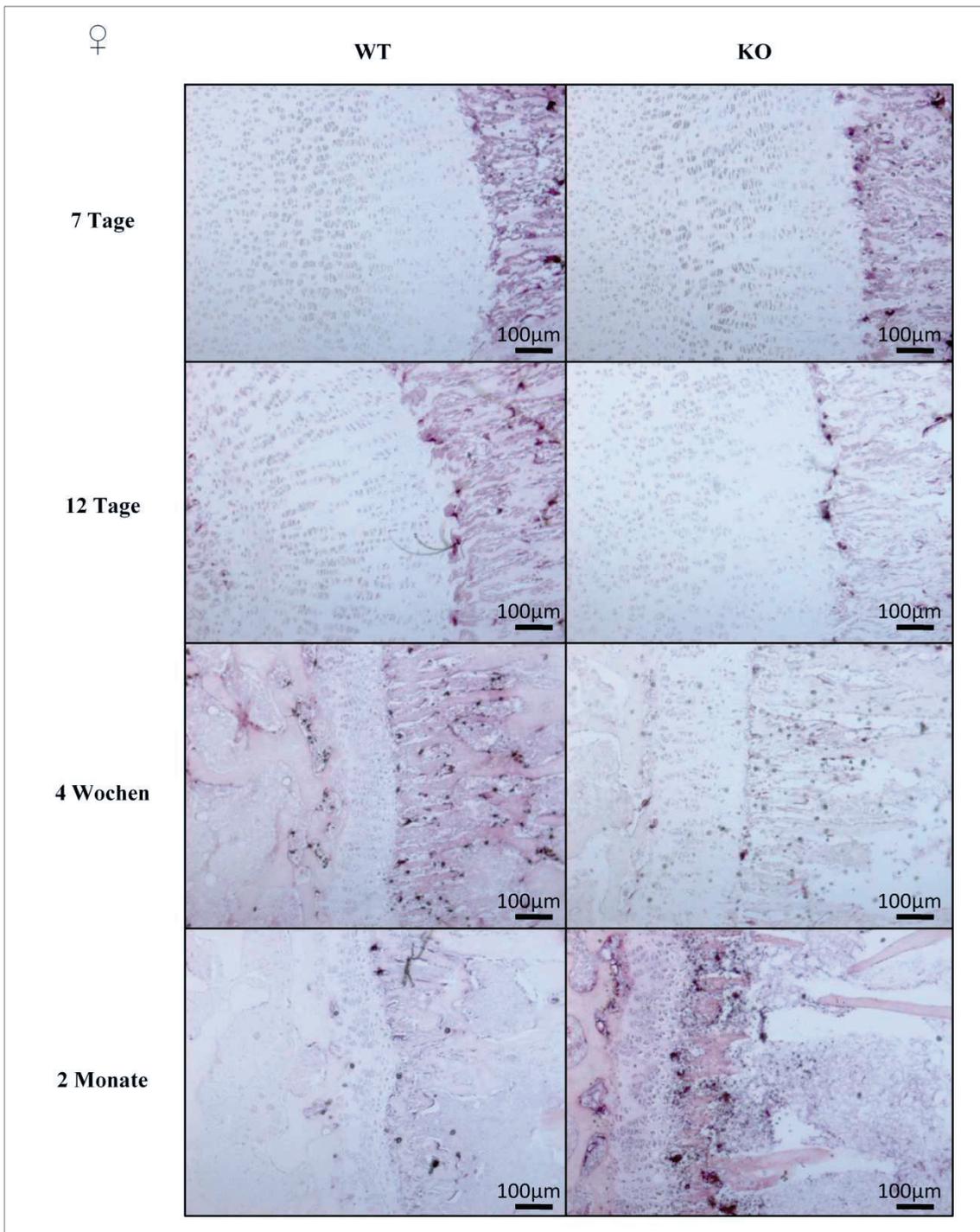


Abb. 3.30 **TRAP-Färbung von weiblichen WT- und ERp57^{cart}-/-Tibien.** Schnitte von WT- und ERp57^{cart}-/-Tibien wurden mit dem Acid Phosphatase, Leukocyte-Kits der Firma Sigma Aldrich gefärbt.

Im Alter von 4 Wochen lassen sich mehr TRAP-positive Zellen bei den WT- als bei den ERp57^{cart}-/-Männchen (Abb. 3.29) finden, wohingegen im Alter von 2 Monaten sich dieses Ergebnis auszugleichen bzw. umzukehren scheint.

Wie bei den männlichen Tieren haben die 4 Wochen alten ERp57^{cart^{-/-}}-Weibchen weniger, und im Alter von 2 Monaten mehr, positiv gefärbte Zellen als die WT-Weibchen (Abb. 3.30). Mikroskopisch lassen sich bei beiden Geschlechtern den WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren im Alter von 7 und 12 Tagen keine Unterschiede in der TRAP-Färbung erkennen.

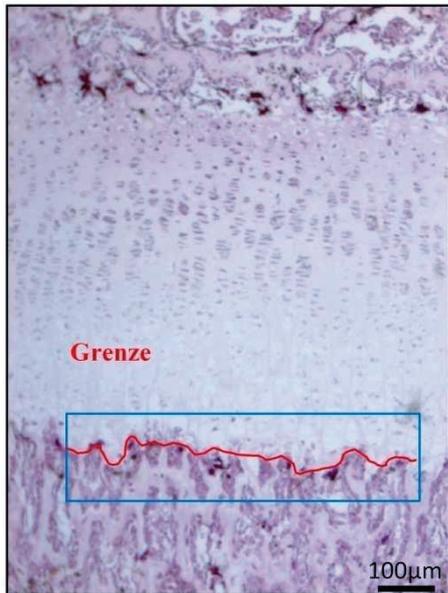


Abb. 3.31 **Bestimmung der TRAP-Positiven Zellen.** Nach der TRAP-Färbung wurden die positiven Zellen am Übergang zwischen Trabekel und hypertrophen Chondrozyten (Grenze) des eingegrenzten Rechtecks gezählt.

Zur Auswertung der gefärbten Schnitte wurden die positiven Zellen am Übergang der hypertrophen Chondrozyten zum Trabekel (Grenze) innerhalb eines zuvor eingegrenzten Bereiches gezählt (Abb. 3.31).

Es konnten gleich viele Osteoklasten in WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen beider Geschlechter im Alter von 7 und 12 Tagen an der Grenze gefunden werden (Abb.3.32). Im Alter von 4 Wochen war die Anzahl der Osteoklasten bei den ERp57^{cart^{-/-}}-Männchen gegenüber den WT-Männchen im Grenzbereich signifikant reduziert (Abb.3.32). Bei den weiblichen Tieren ließ sich ein tendenzieller Unterschied in den Osteoklasten an der Grenze finden (Abb. 3.32). Im Alter von 2 Monaten scheint dieser Unterschied aufgehoben, sogar leicht umgekehrt zu sein. Hier haben sowohl die weiblichen als auch die männlichen ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere tendentiell mehr Osteoklasten als die vergleichbaren WT-Tiere. Diese Ergebnisse sprechen für ein verzögertes Knochenwachstum in den Mäusen und erklären möglicherweise wieso die Maus im Alter von 2 Monaten keinen Phänotypen mehr aufweist.

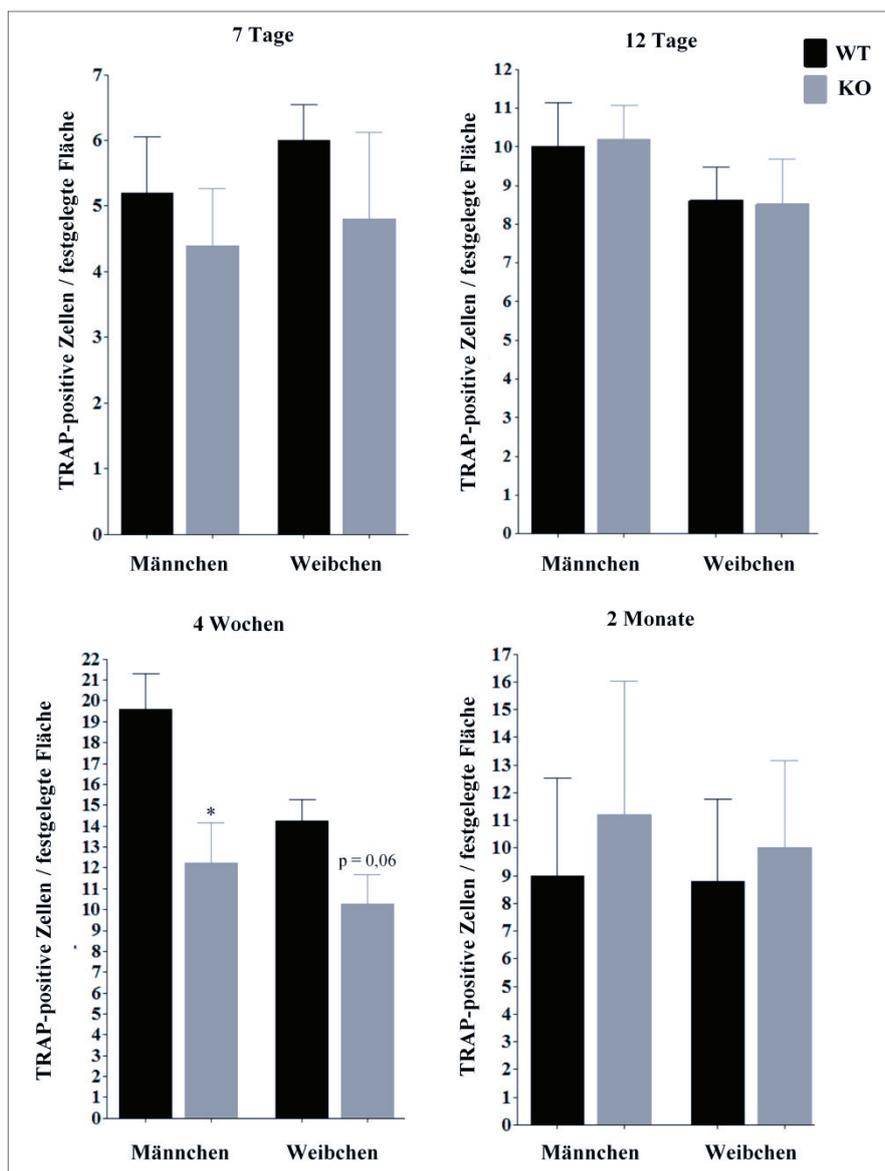


Abb. 3.32 Bestimmung der TRAP-Positiven Zellen von WT- und ERp57^{cart/-}-Tibien. In den TRAP-gefärbten Schnitten wurden alle positiven Zellen am Übergang der hypertrophen Chondrozyten zum Trabekel (Grenze) gezählt (s. Abb. 3.29). n ≥ 4; *: p < 0,05 (2.10).

3.2.11 Analyse der Mineralisierung der Tibien von WT- und ERp57^{cart/-}-Mäusen

Sowohl Osteoblasten, als auch Osteoklasten spielen in der Knochensynthese eine wichtige Rolle. Da die Veränderung der Osteoklastenzahlen zu einer Veränderung der Mineralisierung der Knochen führen, wurde die Mineralisierung der Knochen von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren mittels von Kossa-Färbung näher analysiert. Hierfür wurden Hinterbeine von WT- und ERp57^{cart/-}-Tieren nach der Entnahme Paraformaldehyd fixiert und anschließend ohne zu entkalken, mittels des Technovit®9100-Kits von Heraeus eingebettet.

Diese eingebetteten Hartgewebe wurden in 5µm Schnitte geschnitten und anschließend nach von Kossa gefärbt (2.5.7). Hierbei werden Kalzium-haltige, und somit mineralisierte, Strukturen mittels Silbernitrat schwarz gefärbt. Als Gegenfärbung wurde eine Safranin O-Färbung genutzt, bei der die Zellkerne und Glykosaminoglykan-reiche Matrix rot gefärbt wurden.

Die von Kossa-gefärbten Tibien der 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere lassen sich bei den männlichen und weiblichen Tieren, mikroskopisch nicht unterscheiden. Sowohl die Länge, als auch die Anzahl der Trabekel scheint zwischen WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren unverändert (Abb. 3.33).

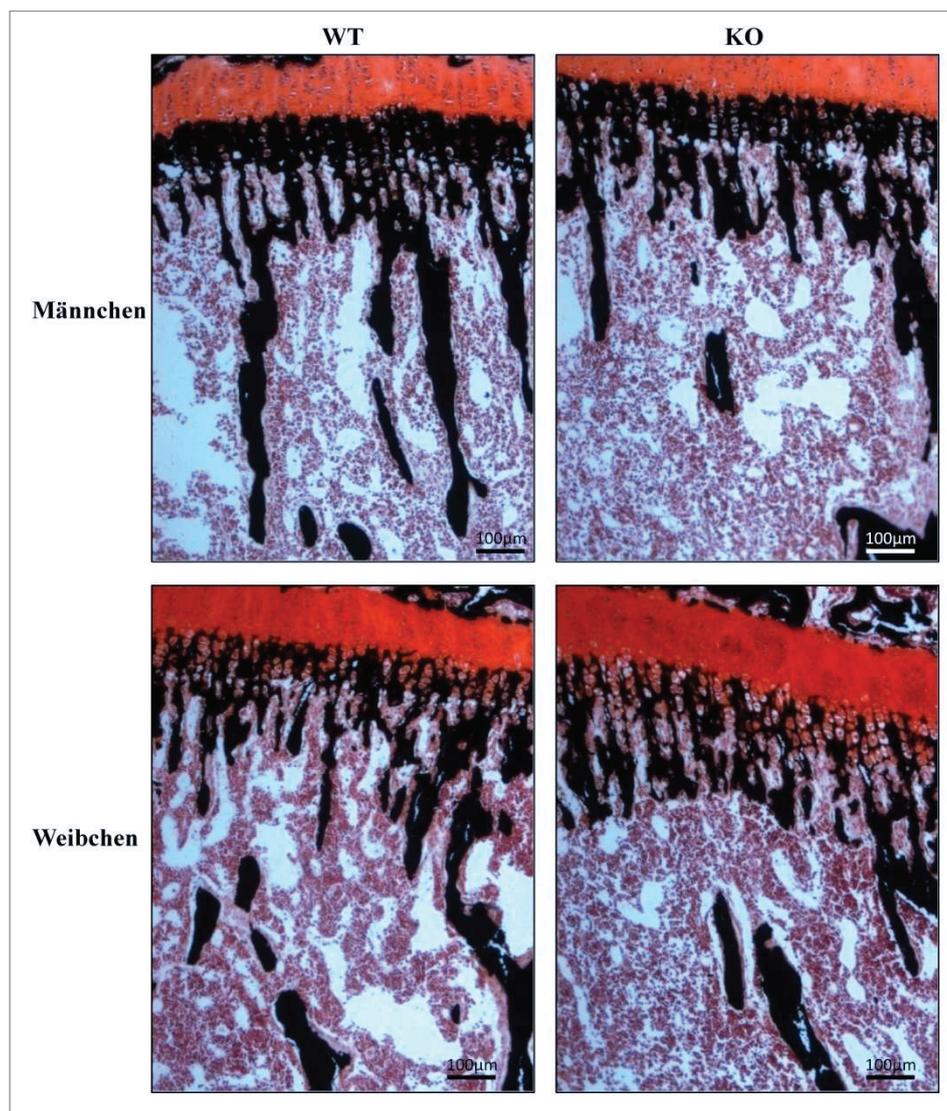


Abb. 3.33 Von Kossa-Färbung von männlichen und weiblichen WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tibien. Die Kalzifizierung von 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Hinterbeinen wurde mittels von Kossa-Färbung schwarz gefärbt.

Mittels des Computerprogrammes ImageProPlus5 der Firma Media Cybernetics wurden die von Kossa-gefärbten Tibien der 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere auf die mineralisierte Trabekel-Fläche hin untersucht. Hierfür wurde der prozentuale Anteil der Fläche der kalzifizierten und somit schwarz gefärbten Trabekel an einem zuvor festgelegten Ausschnitt bestimmt.

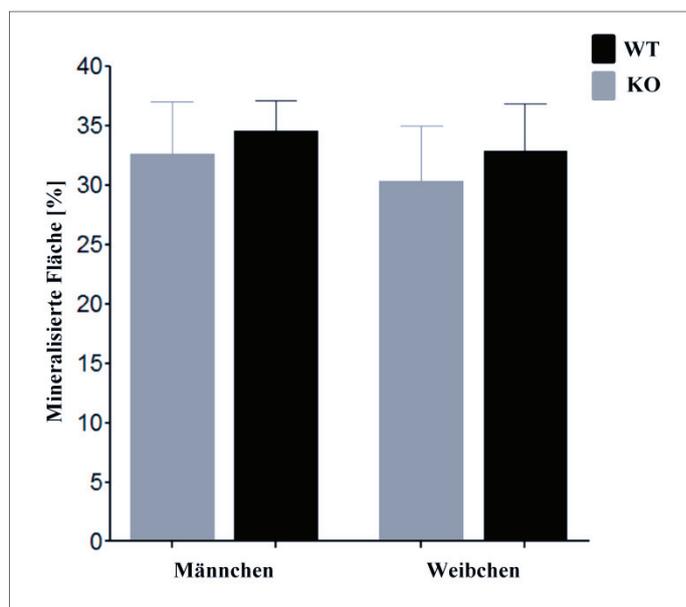


Abb. 3.34 **Bestimmung der mineralisierten Trabekel-Fläche von 4 Wochen alten WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tibien.** Mittels des Computerprogrammes ImageProPlus5 wurden von Kossa-gefärbten Schnitten die Fläche der gefärbten Trabekel bestimmt und auf dem zuvor festgelegten Ausschnitt abgeglichen. n_≥3 (2.10).

Es konnten sowohl bei den 4 Wochen alten männlichen als auch weiblichen Tieren keine Unterschiede in der Mineralisierung der Trabekel in den Tibien beobachtet werden (Abb. 3.34).

3.2.12 pQCT-Analyse von WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen

Neben der von Kossa-Färbung kann auch die pQCT-Analyse Aufschluss über den Grad der Mineralisierung von Knochen geben. Hierfür wurde von 2 Monate alten Mäusen der linke Femur frei präpariert und mittels pQCT-Analyse betrachtet (Abb. 3.35). Diese Untersuchung wurde von Frau Niehoff vom Institut für Biomechanik und Orthopädie an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt (2.9).

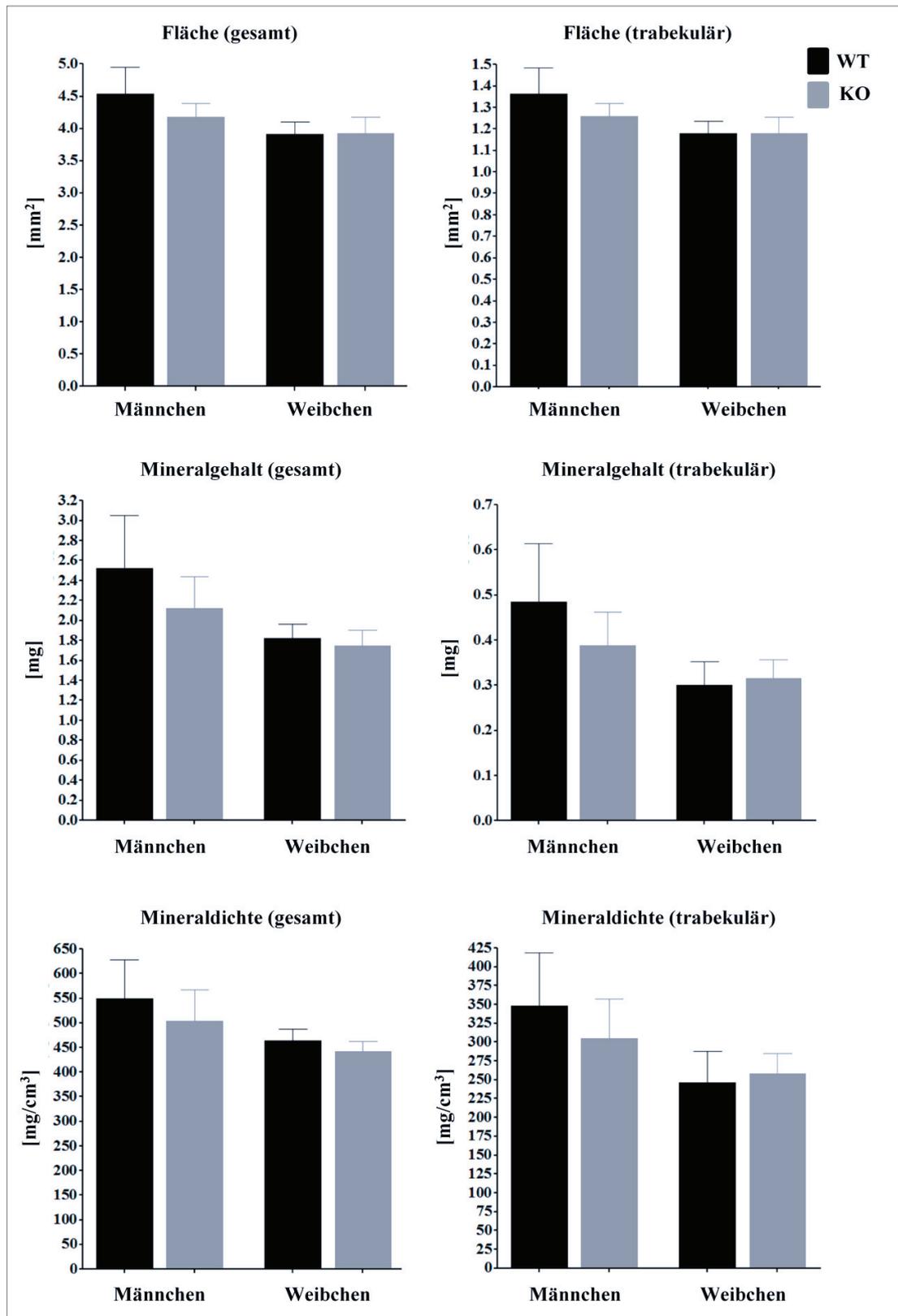


Abb. 3.35 pQCT-Analyse der WT- und $ERp57^{cart-/-}$ -Femura. Die entnommenen Femura wurden mit dem XCT Research M scanner (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) durchgeführt. Der linke Femur wurde an der distalen Metaphyse (15%, 17,5% und 20% der Gesamtknochenlänge vom distalen Gelenk ausgehend) und am Mittelschaft (50% der Gesamtknochenlänge) gescannt. $n \geq 4$ (2.10).

Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse der pQCT-Analyse. In der gesamten Fläche der Knochen als auch in der Fläche der Trabekel lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren, weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren erkennen. Auch der Mineralgehalt und die Mineraldichte des Gesamtknochens bzw. der Trabekel ist zwischen WT und ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren nicht signifikant unterschiedlich. Es fällt jedoch auf, dass bei den männlichen Tieren sowohl die Fläche, der Mineralgehalt als auch die Mineraldichte der Knochen und der Trabekel der WT-Tiere tendenziell größer ist als bei ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren. Bei einer größeren Anzahl an untersuchten Tieren könnten diese Unterschiede evtl. signifikant werden.

Zusammenfassend lässt sich über die *in vivo*-Ergebnisse folgendes sagen:

1. Die Generierung einer knorpel-spezifischen ERp57 knockout-Maus war erfolgreich. Die Tiere sind lebensfähig und fertil. Die ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse scheinen in der Regel kleiner zu sein als die WT-Mäuse. Im Alter von 4 Wochen ist der Unterschied zwischen ERp57^{cart^{-/-}}- und WT-Tieren am meisten ausgeprägt. Männliche Tiere zeigen insgesamt einen stärkeren Phänotyp als weibliche Tiere.

2. Das Gewicht sowie die Länge verschiedener Knochen der ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere sind signifikant im Alter von 4 Wochen reduziert gegenüber den WT-Tieren. Die Wachstumsfugen der 4 Wochen alten männlichen ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere sowie die hypertrophen Zonen innerhalb dieser Wachstumsfugen sind signifikant länger als die der WT-Tiere. Ein Grund hierfür scheint ein später einsetzender Umbau der späten hypertrophen Zone durch Osteoklasten zu sein. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei den ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren der Beginn der Bildung des sekundären Ossifikationszentrums später einsetzt als bei den WT-Tieren. Diese Unterschiede lassen sich, wenn auch weniger stark ausgeprägt, bei den weiblichen Tieren ebenfalls finden.

Diese Ergebnisse deuten auf ein verzögertes Knochenwachstum in den knorpel-spezifischen ERp57 knockout-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen hin. Aufgrund des starken Phänotyps im Alter von 4 Wochen lässt sich vermuten, dass dies entweder an dem Ende des Säugens oder dem pubertären Wachstumsschub liegen könnte.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die spezielle Rolle von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung besser zu verstehen. Deshalb ist die Rolle von ERp57 sowohl *in vitro* mittels Chondrozytenkulturen als auch *in vivo* mit Hilfe von knorpel-spezifischen ERp57 knockout (ERp57^{cart^{-/-}}) Mäusen untersucht worden. Für die *in vitro* Untersuchungen wurde das embryonale Hühnersternum verwendet, da im Sternum Chondrozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorhanden sind. Es wurden die Zellen des kranialen Sternum Bereiches verwendet, welche bereits im Ei hypertroph werden (Lu *et al.*, 1993). In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ERp57 in der Hühnerchondrozytendifferenzierung eine wichtige Rolle spielt (Dreier *et al.*, 2008). IGF-I-stimulierte kraniale Chondrozyten produzieren Cysteinproteasen, welche die Chondrozytendifferenzierung positiv beeinflussen. Inhibierung der Cysteinproteasen mittels des nicht membrangängigen Inhibitors E-64, führt zur Inhibition der IGF-I-induzierten Differenzierung der Chondrozyten. Es konnte gezeigt werden, dass ein Faktor, der von diesen Cysteinproteasen beeinflusst wird, das sich auf der Zelloberfläche (aussen) befindende ERp57 ist, welches nach IGF-I-Stimulation durch Cysteinproteasen von der Zelloberfläche der Chondrozyten entfernt wird. Auch Blockierung des ERp57 mittels eines blockierenden Antikörpers führt zur Differenzierung der Chondrozyten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 1,25-(OH)₂ Vit D₃, jedoch nicht von 24,25-(OH)₂ Vit D₃ bei IGF-I-Stimulation der Chondrozyten zur Inhibition der Chondrozytendifferenzierung führt (Dreier *et al.*, 2008). Aus diesen Ergebnissen folgt, dass Cysteinproteasen ERp57 von der Zelloberfläche entfernen, das dort, falls vorhanden, die Vitamin D vermittelte Inhibition der Differenzierung bewirkt. Aufgrund dieser Ergebnisse kam die Frage auf, ob ERp57 auch in löslicher oder Matrixvesikel-assoziiierter Form von der Zelle abgegeben wird, um die Differenzierungsblockade zu entfernen.

In der Literatur ist beschrieben worden, dass sich nach gezielter Sortierung die molekulare Zusammensetzung von Matrixvesikel von derjenigen der Mutterzellen unterscheiden kann (Peress *et al.*, 1974). So enthalten Matrixvesikel zum Beispiel hohe Konzentrationen an Kalzium und Phosphat sowie alkalischer Phosphatase (Ali *et al.*, 1970), welche für die Mineralisierung wichtig sind. Deshalb könnte auch ERp57 gezielt über Matrixvesikel von der Chondrozytenoberfläche wegtransportiert werden.

Damit könnte durch Sequenzierung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ die Verzögerung der Chondrozytendifferenzierung durch 1,25-(OH)₂ Vit D₃ aufgehoben werden. Dieser Fragestellung sollte zunächst durch unterschiedliche Annäherungsweisen nachgegangen werden.

4.1 *In vitro* Untersuchungen

4.1.1 Die untergeordnete Rolle von ERp57 in Matrixvesikel-assoziiierter Form

In dieser Arbeit konnte, wie für hypertrophe Chondrozyten des Rippenknorpels von Ratten bereits beschrieben (Nemere *et al.*, 1998), ERp57 zunächst auf bzw. in Matrixvesikeln identifiziert werden, so dass die Möglichkeit eines gezielten Abtransports des ERp57 von der Zelloberfläche der Chondrozyten als möglicher Prozess in Frage kam (Abb. 3.3). Da jedoch der Anteil des löslichen ERp57 im verbliebenen Zellüberstand nach Matrixvesikelfällung größer erschien (Abb. 3.4), wurde daraufhin das ERp57-Vorkommen der einzelnen Lokalisationen (Zelle, Zellüberstand und Matrixvesikel) quantifiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich nur ein sehr geringer Anteil des Gesamt-ERp57 in Matrixvesikeln finden lässt (Abb. 3.5), welcher sich zudem weder von löslichem ERp57 im Überstand noch von zellulärem ERp57 bzgl. Struktur und Prozessierung unterscheidet (Abb. 3.6). Somit ist davon auszugehen, dass ERp57, welches Matrixvesikel-assoziiert in die Umgebung abgegeben wird, für die Aufhebung der Inhibition der Chondrozytendifferenzierung durch Vitamin D nur eine unwesentliche Rolle spielen kann.

Dennoch scheint ERp57 kein Zufallsprodukt in den Matrixvesikeln zu sein, was man aufgrund der geringen Menge in Matrixvesikeln annehmen könnte. Für ERp57 auf Matrixvesikeln wird in der Literatur eine wichtige Rolle beschrieben. Es soll für die nicht-genomische Aktivierung von PLA₂ nach Bindung von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ an ERp57 und die anschließende Destabilisierung der Membran über Lysophospholipide verantwortlich sein, woraus eine Freisetzung von MMPs resultiert (Schwartz *et al.*, 2005; Boyan *et al.*, 2006).

Diese Ergebnisse sind jedoch auf Grund der Kulturbedingungen von Boyan und Schwartz (1.3.2.7) kritisch zu betrachten. Diese und andere Arbeitsgruppen bei ihren *in vitro* Experimenten mit Serum-haltigen Medien.

Wie schon in Abschnitt 1.3.2.7 erwähnt, kann Serum nachweislich viele Stoffwechselwege *in vitro* beeinflussen, namentlich auch die Differenzierung der Chondrozyten, die hier Gegenstand der Untersuchungen ist (Bruckner *et al.*, 1989). Auch ist nicht klar, in welchen Konzentrationen welche Vitamin D-Metaboliten und Vitamin D-Inhibitoren im Serum enthalten sind und möglicherweise die Experimente in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen.

Zudem ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente aufgrund der Nutzung von unterschiedlichen Tierarten (Ratte, Maus und Huhn), Geweben (Rippenknorpel, Hüftköpfe und Sterna), Alter der Gewebe und Kulturbedingungen (Monolayer, Suspensionskultur in und auf Agarose) bescheiden.

4.1.2 ERp57 wird zur Differenzierung von Chondrozyten *in vitro* benötigt

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten aus Hühnersterna in Kultur, denen ERp57 aufgrund von Inaktivierung der mRNA von ERp57 mittels siRNA fehlt, unter Stimulation mit IGF-I weniger stark als Kontrollzellen ohne siRNA-Behandlung differenzieren. Ein möglicher Grund für die Inhibition der Differenzierung bei fehlendem ERp57 könnte ausgelöster ER-Stress sein. Da ERp57 als Chaperon eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung spielt (1.3.2.6), könnte ein Fehlen von ERp57 im ER der Chondrozyten zu ungefalteten oder missgefalteten Proteinen führen, welche wiederum ER-Stress auslösen können (Kozutsumi *et al.*, 1988; Kohno *et al.*, 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die beiden wichtigen ER-Stress Marker BIP und Hsp90 in den Chondrozyten nach ERp57 Inaktivierung durch siRNA gleich stark wie in den Kontrollzellen exprimiert werden (Abb. 3.10), so dass ER-Stress als Grund für die Inhibition der Differenzierung wenig wahrscheinlich ist.

In unserem Labor wurde früher jedoch festgestellt, dass ERp57 die Differenzierung von kranialen Chondrozyten inhibiert (Dreier *et al.*, 2008). Dies steht nun im Widerspruch zu den hier erhaltenen siRNA-Inaktivierungs-Daten. Eine mögliche Erklärung dafür lässt sich unter Umständen in den untersuchten Zeitpunkten finden. Die Differenzierung der Zellen nach ERp57 Inaktivierung mittels siRNA wurde am 3. Tag in Kultur nach der Inaktivierung durchgeführt, wohingegen Dreier *et al.*, ihre Zellen 14 Tage kultivierten, um anschließend die Differenzierung zu untersuchen. Zudem könnte ERp57, wie es zum Beispiel für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (*fibroblast growth factor 2*, FGF-2) der Fall ist, unterschiedliche Rollen in der Differenzierung von Chondrozyten einnehmen, je nach Ausgangs-Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen.

Für FGF-2 konnte zum einen gezeigt werden, dass dieser Faktor die Hypertrophie von Chondrozyten in Kultur unterbindet (Kato & Iwamoto, 1990) und die Bindung von FGF-2 an hypertrophe Chondrozyten vermindert ist (Iwamoto *et al.*, 1991). Auf der anderen Seite agiert FGF-2 indirekt als Aktivator der Hypertrophie von Chondrozyten (Klagsbrun, 1991; Bi *et al.*, 1999). Dieser Widerspruch konnte über den Differenzierungsgrad der Zellen geklärt werden. FGF-2 ist ein negativer Regulator der Chondrozytendifferenzierung zu frühen Zeitpunkten, stimuliert diese aber, wenn die Chondrozyten einen gewissen Differenzierungsgrad erreicht haben (Babarina *et al.*, 2001). Vergleichbar ist die Wirkung von Hedgehog Proteinen, die in früheren Stadien die Hypertrophie der Zellen unterbinden, in prä-hypertrophen Zellen aber die Hypertrophie beschleunigen (Vortkamp *et al.*, 1996; Mak *et al.*, 2008). Ähnliches könnte bei ERp57 ebenfalls der Fall sein.

Zusammenfassend lässt sich über die *in vitro* Daten sagen, dass bei der Chondrozytendifferenzierung Matrixvesikel für die Entfernung von ERp57 von der Zelloberfläche kaum eine Rolle spielen. Zudem scheint sich ERp57 je nach bereits erreichtem Differenzierungsgrad sowohl an der Spätdifferenzierung der Chondrozyten, als auch an deren Inhibition zu beteiligen.

Da die Rolle von ERp57 in der enchondralen Differenzierung *in vivo* ohnehin weiteren, komplexeren Einflüssen unterliegt, sollte der ERp57-Signalweg *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden Mäuse mit einem knorpel-spezifischen ERp57-Knockout generiert.

4.2 *In vivo* Untersuchungen

4.2.1 Allgemein

Die Chondrozyten-spezifische Inaktivierung des ERp57Gens erfolgte mit Hilfe des Cre/*loxP*-Systems. Dabei wurde ein Mausstamm, in welchem die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Kollagen 2a1-Promotors exprimiert wird (Sakai *et al.*, 2001) mit Mäusen verpaart, in welchem Exone des ERp57-Gens von loxP-Boxen flankiert werden. Somit sind nur diejenigen Zellen ERp57-negativ, in welchen der Kollagen II-Promotor geeignet aktiv ist. Für Knorpelzellen ist dies der Fall. Mäuse mit einer Chondrozyten-spezifischen Inaktivierung des ERp57Gens waren lebensfähig und fertil, zudem zeigten sie phänotypische Veränderungen. Sie wiesen ein vermindertes Gewicht (Abb. 3.17), eine verminderte Körpergröße (Abb. 3.16 & 3.18) und verkürzte Knochen auf (Abb. 3.19 & 3.20).

Histologisch ließen sich Veränderungen in der Länge der Wachstumsfuge der Tibia (Abb. 3.21 - 3.23), dem zeitlichen Ablauf der Entwicklung des sekundären Ossifikationszentrums (Abb. 3.24), der Länge der hypertrophen Zone der Tibia (Abb. 3.25 - 3.27), und in der Anzahl der Osteoklasten an der Grenze zwischen hypertropher Zone und Trabekel finden (Abb. 3.29- 3.32). In der Mineralisierung der Knochen ließen sich jedoch weder histologisch (Abb. 3.33 & 3.34) noch mit Hilfe von pQCT-Analysen (Abb. 3.35) Unterschiede zu den WT-Tieren finden, d.h. es entsteht kein rachitischer Phänotyp.

4.2.2 Die knorpel-spezifische ERp57 Inaktivierung führt zu einem starken Wachstumsfugen-Phänotyp im Alter von 4 Wochen

Auffallend in den *in vivo* Analysen ist die Tatsache, dass der Phänotyp der ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere erst im Alter von 4 Wochen am deutlichsten ausgeprägt ist. Zudem können im Alter von 2 Monaten diese Unterschiede zwischen ERp57^{cart^{-/-}}-und WT-Tieren kaum mehr gefunden werden.

Zunächst ist zu betrachten, was sich im Alter von ca. 4 Wochen bei den Mäusen verändert und so einen Grund für das Auftreten des Phänotyps darstellen könnte. Mäuse werden bis zu einem Alter von 3 Wochen von ihren Müttern gesäugt und dann entwöhnt. Dies bedeutet eine Umstellung von der reichhaltigen flüssigen Muttermilch auf feste Nahrung und somit eine Veränderung sowohl in der aufgenommenen Vitamin D Konzentration, als auch in der Kalzium-Konzentration.

Vitamin D ist bei der Aufnahme von Kalzium im Darm ein regulierender Faktor. Der intestinale Kalziumtransport besteht aus einem passiven, Konzentrationsgradienten-abhängigen parazellulären und einem aktiven ATP-abhängigen transzellulären Kalziumtransport (Hoenderop *et al.*, 2005). Letzterer wird hauptsächlich durch 1,25-(OH)₂ Vit D₃ reguliert und somit führt eine verminderte Vitamin D- und Kalzium-Konzentration in der Nahrung zu einer verminderten Kalzium-Aufnahme im Darm.

Zudem verändert sich der Hormonhaushalt der Tiere in diesem Alter. Sie durchlaufen die Pubertät und werden geschlechtsreif. Diese beiden kritischen Phasen sind bekannt dafür, einen Einfluss auf das Wachstum der Mäuse auszuüben und Störungen in beiden Bereichen können mögliche Ursachen für einen Wachstumsphänotypen sein.

4.2.2.1 Die Rolle der Nahrungsumstellung in der Entwicklung der knorpel-spezifischen ERp57-Mäuse

Zunächst soll die Nahrungsumstellung näher beleuchtet werden und ein Vergleich mit anderen Mauslinien gezogen werden, die eine Veränderung der Vitamin D-Signalwege aufweisen. Sowohl von den VDR-knockout Mäusen, welchen der klassische Vitamin D Rezeptor (VDR) fehlt, als auch den CYP27B1-knockout Mäusen, die Vitamin D nicht in Position 1 hydroxylieren können, ist bekannt, dass auch sie erst nach dem Ende des Säugens ihren Phänotypen entwickeln (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002). Diese Tiere sind rachitisch, manifest durch verkürzte Knochen aufgrund von vergrößerten Wachstumsfugen und verminderte Mineralisierung der Knochen. Eine hierfür in der Literatur beschriebene Ursache ist bei den VDR-Mäusen, dass VDR in neugeborenen Mäusen im Darm in nur sehr geringem Ausmaß vorkommt. In Ratten konnte gezeigt werden, dass während des Säugens der Tiere, die intestinale Kalziumaufnahme via eines 1,25-(OH)₂ Vit D₃-unabhängigen Mechanismus geschieht (Dostal & Toverud, 1984). Zudem konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass erst eine Woche nach dem Entwöhnen die Mengen an VDR im Darm zunehmen (Halloran & DeLuca, 1981; Bouillon *et al.*, 2008). Dies könnte die Erklärung dafür sein, wieso in den Tieren erst im Verlauf der Zeit die 1,25-(OH)₂ Vit D₃-abhängige Kalziumaufnahme immer stärker von der 1,25-(OH)₂ Vit D₃-unabhängigen Kalziumaufnahme ersetzt wird.

Es konnte beschrieben werden, dass bei den VDR- und den CYP27B1-knockout Mäusen der Phänotyp mittels Nahrungsumstellung aufgehoben werden kann (Amling *et al.*, 1999; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2005). Hierfür wird eine Kalzium- und Laktose-reiche Nahrung benötigt (Amling *et al.*, 1999; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2005).

Die Kalziumaufnahme im Darm, wie zuvor in diesem Abschnitt beschrieben, ist Vitamin D abhängig. Diese ist in den VDR- und den CYP27B1-knockout Mäusen reduziert, jedoch kann mit Hilfe einer Kalziumreicheren Nahrung mehr Kalzium von den VDR- und den CYP27B1-knockout Mäusen aufgenommen werden (Li *et al.*, 1998a; Amling *et al.*, 1999; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Hoenderop *et al.*, 2002; Dardenne *et al.*, 2003a; Dardenne *et al.*, 2003b; Rowling *et al.*, 2007).

Grund hierfür scheint zu sein, dass die Kalzium-Konzentrationsgradienten-abhängige, parazelluläre und 1,25-(OH)₂ Vit D₃-unabhängige Kalziumaufnahme im Darm im Falle einer Kalzium-reicheren Ernährung immer wichtiger wird. Im Gegenzug dazu werden Gene der aktiven Kalziumtransporter, des ATP-abhängigen transzellulären 1,25-(OH)₂ Vit D₃-abhängigen Kalziumtransports durch einen noch unbekanntem Mechanismus herunterreguliert (Li *et al.*, 1998b; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Bolt *et al.*, 2005). Somit ist anschließend auch in den Knochen eine erhöhte Menge an Kalzium zu finden, welche den rachitischen Phänotypen aufheben kann.

Die Beobachtung, dass Kalziumzufuhr die Vitamin-D abhängige Rachitis beeinflusst, stimmt mit früheren Beobachtungen in Menschen überein. Hier konnte gezeigt werden, dass Kalziuminfusionen zu einer Heilung der Rachitis bei Patienten mit einer 1,25-(OH)₂ Vit D₃ Resistenz, einer sogenannten Vitamin-D unabhängigen Typ II Rachitis, führt (Balsan *et al.*, 1986; Hochberg *et al.*, 1992).

Somit scheint die VDR-abhängige Aktivität von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ für das normale Wachstum der langen Knochen und deren Wachstumsfugen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, sondern die beeinträchtigten Mineralionen und speziell die gestörte Phosphat Homeostase ist der primäre Grund für die Rachitis in den Tieren (Krohn *et al.*, 2003; Kovacs *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu den VDR- und den CYP27B1-knockout Mäusen kommt es in den hier untersuchten ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen nicht zur Aufhebung des Phänotyps. Der Grund hierfür könnte sein, dass die ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse im Gegensatz zu den VDR- und den CYP27B1-knockout Mäusen keinen konstitutiven knockout haben und somit die 1,25-(OH)₂ Vit D₃-abhängige Kalziumaufnahme im Darm in den ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen nicht gestört ist.

Da in den ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen der Wachstums-Phänotyp der langen Knochen im Alter von 2 Monaten nahezu ausgeheilt ist, ist davon auszugehen, dass der Grund für die Ausprägung des Phänotyps wahrscheinlich nicht auf der Nahrungsumstellung der Tiere beruht.

Die Darm-spezifische ERp57 knockout Maus wurde von Nemere *et al.* generiert und untersucht. Diese Gruppe konnte zeigen, dass die Kalziumaufnahme im Darm von Mäusen ERp57-abhängig und VDR-unabhängig ist (Nemere *et al.*, 2010; Nemere *et al.*, 2012).

Dies steht allerdings im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Mizwicki & Norman, 2009) und den zuvor beschriebenen Daten der VDR-knockout Mäuse. Vermutlich ist wie in Ratten (Nemere, 2005) ein Mechanismus operativ, der sowohl ERp57- als auch VDR-abhängig ist. Beide Rezeptoren könnten in synergistischer Weise am Kalzium-Transport beteiligt sein.

4.2.2.2 Die Rolle der Sexualhormone in der Entwicklung der knorpel-spezifischen ERp57-Mäuse

Die Pubertät wird als ein physiologischer und entwicklungsorientierter Prozess in Richtung sexuelle Reife definiert. Sie wird unter anderem durch neuroendokrine Ereignisse initiiert, welche die Freisetzung des Gonadotropin-Releasing Hormons (GnRH) aus dem Hypothalamus aktiviert und somit Veränderungen in der Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse verursacht. Diese GnRH Neuronen, welche die Pubertät initiieren und die Fertilität in allen Säugetierarten erhalten (Colledge *et al.*, 2010), entwickeln sich in Mäusen ab E11.5 und erreichen ab E16.5 dieselbe räumliche Verteilung im Hypothalamus wie in erwachsenen Tieren (Livne *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Freisetzung kommt es unter anderem zur Produktion von Gonadotropinen, dem luteinisierenden Hormon und dem Follikel-stimulierendem Hormon in der Hypophyse und, dadurch bedingt, den Sexualhormonen, welche von den Gonaden produziert werden (Colledge *et al.*, 2010). Wie im Menschen, produzieren auch männliche Mäuse in den Gonaden vermehrt Testosteron und weibliche Mäuse vermehrt Östrogen.

Die Sexualhormone beeinflussen das epiphysäre Wachstum sowohl über die Regulierung der hypophysären Wachstumshormonproduktion (Mauras *et al.*, 1996), als auch durch direkten Einfluss auf die Chondrozyten (Carrascosa *et al.*, 1990) via deren Androgen-Rezeptoren (Ben-Hur *et al.*, 1997). Androgen-induziertes, Wachstumshormon-unabhängiges pubertäres Wachstum wurde sowohl in Kindern mit einer Wachstumshormon-Defizienz beschrieben (Carrascosa *et al.*, 1990) als auch in Wachstumshormonrezeptor-defizienten Laron-Syndrom Patienten (Laron *et al.*, 1980). Man vermutet, dass Androgene das Knorpelwachstum über die lokale IGF-I Synthese regulieren (Keenan *et al.*, 1993).

In vivo konnte gezeigt werden, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ in hoher Dosis in urämischen Ratten zur Inhibition des Wachstumshormon-induzierten longitudinalen Wachstums führt (Sanchez *et al.*, 1998; Kuizon *et al.*, 1998).

Verbindungen zwischen 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und Androgenen in der Regulation des enchondralen Wachstums konnten auch *in vitro* gezeigt werden (Benya & Shaffer, 1982; Somjen *et al.*, 1991). In kultivierten Chondrozyten verstärkt die Vorbehandlung mit 1,25-(OH)₂ Vit D₃ oder mit Dihydrotestosteron (DHT) die Proliferationskapazität (Benya & Shaffer, 1982). Der Grund hierfür scheint zu sein, dass sowohl 1,25-(OH)₂ Vit D₃ als auch DHT einzeln das Chondrozytenwachstum via Stimulation der IGF-I Synthese stimulieren. Dieser proliferative Effekt kann bei gleichzeitiger Zugabe von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT *in vitro* nicht mehr gefunden werden (Krohn *et al.*, 2003). Der Grund hierfür ist vermutlich, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT gegenläufig die Chondrozytenproliferation beeinflussen, indem hohe IGF-I Konzentrationen ausgeschüttet werden (Krohn *et al.*, 2003). Da der proliferative Effekt von IGF-I in Knorpel nicht linear konzentrationsabhängig ist, wirkt eine hohe Konzentration von IGF-I, inhibierend auf die Proliferation (Maor *et al.*, 1993; Klaus *et al.*, 1998). Um auszuschließen, dass der Grund für die gegenseitige Inhibition von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT nicht in der Herunter-Regulierung der gegenseitigen Rezeptoren liegt, untersuchte die Gruppe um Krohn die mRNA-Level des VDR, des Androgen-Rezeptors und des IGF-I Rezeptors. Diese waren jedoch nach gleichzeitiger Gabe von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT hochreguliert. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl 1,25-(OH)₂ Vit D₃ als auch DHT die Androgen-Rezeptor Expression in Osteoblasten (Takeuchi *et al.*, 1994; Kasperk *et al.*, 1997) stimulieren, wohingegen nur 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und nicht DHT die Expression von VDR hochregulieren (Klaus *et al.*, 1998; Krohn *et al.*, 2003). Die Expression des IGF-I Rezeptors wird von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT ebenfalls hochreguliert. Das bedeutet, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT mittels IGF-I die Proliferation beeinflussen.

Nicht nur die Proliferation von Chondrozyten *in vitro*, auch deren Differenzierung wird durch 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT beeinflusst (Blanchard *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1994; Klaus *et al.*, 1998; Kuizon *et al.*, 1998; Krohn *et al.*, 2003). Wie 1,25-(OH)₂ Vit D₃, stimuliert auch DHT die Expression von Kollagen X in kultivierten Chondrozyten, wohingegen die Expression von Kollagen II kaum stimuliert wird. Inkubation von Chondrozyten mit beiden Hormonen führte zu noch stärkerer Kollagen X und gleichbleibender Kollagen II Expression (Krohn *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen von Dreier *et al.*, 2008. Hier konnte gezeigt werden, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ bei einer Konzentration von 10⁻⁶-10⁻⁷M die Differenzierung von kranialen Hühnersternumchondrozyten in Kultur hemmen.

Erklären lassen sich diese Unterschiede zum einen über die Unterschiede in den verwendeten Chondrozyten: epiphysäre Chondrozyten aus adulten Ratten versus kraniale embryonale Hühnersternumchondrozyten und dem unterschiedlichen Readout: mRNA-Expression versus Proteinlevel. Die Kulturbedingungen, Serum-freie Agarose-Kultur, waren ansonsten gleich. Zudem unterstützt dieses Ergebnis auch die hier aufgestellte Hypothese, dass ERp57 und 1,25-(OH)₂ Vit D₃ zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien und in unterschiedlichen Konzentrationen, sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken können. (4.1.2)

Sowohl die Kalzifizierung, als auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden durch 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT einzeln, und in Kombination synergistisch verstärkt. Dies alles deutet darauf hin, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ und DHT einzeln die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten stimulieren und die Kombination beider Hormone die Stimulation der Differenzierung verstärken, wohingegen die Proliferation inhibiert wird (Itagane *et al.*, 1991; Klaus *et al.*, 1998).

Auch im Menschen ist bekannt, dass 1,25-(OH)₂ Vit D₃ im pubertären Wachstumsschub benötigt wird. In einer Studie wurden Patienten mit einer Pseudo-Vitamin D Rachitis, einer seltenen Erkrankung, welche durch eine Mutation im CYP27B1-Gen hervorgerufen wird und zu einer Unfähigkeit der Produktion von 1,25-(OH)₂ Vit D₃ führt, 1,25-(OH)₂ Vit D₃ als Therapie gegeben (Fu *et al.*, 1997). Erhielten die Patienten die Therapie vor dem Einsetzen der Pubertät bzw. des Wachstumsschubes, so erreichten sie eine normale Körpergröße.

Östrogen ist wie Testosteron und 1,25-(OH)₂ Vit D₃ ein Hormon, dessen Einfluss auf den Knochen bereits beschrieben wurde (Albright, 1940; Lindsay *et al.*, 1976). Östrogen-Mangel wurde schon 1940 als Ursache für den Verlust von Knochenmasse bei Frauen beschrieben (Albright, 1940). Es ist aber mittlerweile bekannt, dass Östrogen nicht nur bei Frauen, sondern auch bei Männern einer der stärksten Regulatoren des Knochenmetabolismus ist (Falahati-Nini *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 2008; Khosla *et al.*, 2011). Östrogen ist sowohl als Aktivator des Knochenaufbaus, als auch als Inhibitor des Knochenabbaus beschrieben worden (Lufkin *et al.*, 1992; Garnero *et al.*, 1996; Hannon *et al.*, 1998). In der Literatur wurde ferner beschrieben, dass die Proteindisulfidisomerase (PDI), ein Protein mit großer Homologie zu ERp57, als ein möglicher Rezeptor für Östrogen und die Thyroidhormone dient (Primm & Gilbert, 2001). Es bleibt zu untersuchen, ob ERp57 auch direkt in den Östrogen-Signalweg eingreifen kann.

4.2.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung des Wachstumsfugen-Phänotyp in den ERp57^{cart/-}-Tieren

Neben dem stark ausgeprägten Phänotyp im Alter von 4 Wochen bei den ERp57^{cart/-}-Tieren, konnte gezeigt werden, dass männliche Tiere insgesamt einen stärkeren Phänotyp aufweisen als die weiblichen. Auch hierfür spielen die Sexualhormone vermutlich eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass für den Wachstumsschub in der Pubertät bei Mädchen hauptsächlich Östrogene und bei Jungen hauptsächlich Androgene verantwortlich sind (Karimian & Savendahl, 2011). Zudem tritt der pubertäre Wachstumsschub bei Mädchen früher ein als bei Jungen (Sovio *et al.*, 2009; Busscher *et al.*, 2011). Diese Tatsache könnte dafür sprechen, dass aufgrund des gewählten Untersuchungszeitpunktes ein stärkerer Phänotyp bei den männlichen Tieren gefunden wurde. Für die weiblichen ERp57^{cart/-}-Tiere wäre womöglich bei einem früheren Untersuchungszeitpunkt ein ebenfalls stärkerer Unterschied zwischen den ERp57^{cart/-}- und den Kontroll-Tieren gefunden worden. Für diese Theorie spricht, dass im Alter von 2 Monaten bei den weiblichen Tieren der Gewichtsunterschied kaum mehr vorhanden ist, bei den männlichen Tieren dieser noch signifikant ist (Abb 3.17). Jedoch ist der Gewichtsunterschied bei den weiblichen ERp57^{cart/-}-Tieren im Vergleich zu den Kontrollweibchen geringer als bei den männlichen Tieren, so dass der Unterschiede nach 2 Monaten zwischen weiblichen ERp57^{cart/-}-Tieren und den Kontrollweibchen allein auf Grund dessen entstehen könnte und keine Ursache im zeitlichen Verlauf des pubertäre Wachstumsschub hat.

Die Möglichkeit dass die Pubertät und nicht das Ende des Säugens ein Grund für die starke Ausprägung im Alter von mehr als 3 Wochen ist, wurde bei den VDR-Mäusen verworfen, da die Serumspiegel von Testosteron und Östrogen in VDR-knockout Mäusen im Alter von 6 Monaten normal sind (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002). Es bleibt zu untersuchen, ob Testosteron bzw. Östrogen in ERp57^{cart/-}-Tieren in normalen Konzentrationen vorliegen. Sollte dies der Fall sein stellen wir folgende Hypothese auf: die männlichen ERp57^{cart/-}-Tieren haben einen verstärkten Phänotyp aufgrund des Fehlen von ERp57 und das der fehlenden Möglichkeit der schnellen Antwort auf Östrogen Die weiblichen ERp57^{cart/-}-Mäuse können das Fehlen des ERp57 mit dem schnellen Signalweg via 17 β -Östradiol und dessen Rezeptor zumindest zum Teil kompensieren. Dadurch haben die weiblichen ERp57^{cart/-}-Mäuse einen schwächeren Phänotyp.

Zusammenfassend lässt sich über die *in vivo* Daten sagen, dass alle Ergebnisse auf ein verzögertes Knochenwachstum in den knorpel-spezifischen ERp57 knockout-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen hin deuten.

Der Grund für das Auftreten des starken Phänotyps bei 4 Wochen alten Tieren, insbesondere bei männlichen Tieren, liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Funktion von Östrogen und Testosteron in der Chondrozytendifferenzierung. Zudem können die weiblichen ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse im Gegensatz zu den männlichen ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen vermutlich das Fehlen des ERp57 mit dem schnellen Signalweg via 17β-Östradiol und dessen Rezeptor kompensieren. Das Ende des Säugens der Mäuse scheint als Grund für das Auftreten des starken Phänotyps bei 4 Wochen alten Tieren unwahrscheinlich, da der Phänotyp im Alter von 2 Monaten nur noch abgeschwächt vorhanden ist und kein rachitischer Phänotyp verbleibt.

4.2.3 Vergleich VDR-, CYP27B1- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse

Da das 1,25-(OH)₂ Vit D₃ sowohl an ERp57, als auch an VDR bindet, ist ein Vergleich der ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse mit den verschiedenen VDR- Mauslinien angebracht. Auch bei einer fehlenden 25-OH-1α-Hydroxylase kommt es zu einem ähnlichen Phänotypen wie in den VDR- und ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen, da der aktivste Vitamin D Metabolit, das 1,25-(OH)₂ Vit D₃ nicht gebildet werden kann. Aufgrund der vielen verschiedenen VDR- und CYP27B1-Mäuse und deren unterschiedlichen Phänotypen sollen diese in unterschiedlichen Abschnitten der Diskussion miteinander verglichen werden.

4.2.3.1 Konstitutiver VDR- und CYP27B1-knockout in Mäusen

Die unterschiedlichen VDR-knockout Mauslinien (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002), sowie die 25-OH-1α-Hydroxylase (CYP27B1) knockout Maus (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001), zeigen einen ähnlichen Phänotypen.

Zunächst sind alle Tiere bei der Geburt vital und entwickeln sich normal, solange sie gesäugt werden.

Nach dem Entwöhnen ist im Alter von 3–4 Wochen sowohl bei den VDR-knockout Mauslinien (Yoshizawa *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Van Cromphaut *et al.*, 2001; Erben *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2005), als auch bei der CYP27B1-knockout Maus (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001) wie auch bei den hier untersuchten ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen das longitudinale Wachstum der langen Knochen vermindert. Sowohl die VDR- (Donohue & Demay, 2002) als auch die CYP27B1-knockout Tiere (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001) zeigen einen klassischen rachitischen Phänotypen mit verbreiteter Wachstumsfuge.

Unterschiedlich zu den ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen ist, dass die untersuchten VDR- (Li *et al.*, 1998a; Amling *et al.*, 1999; Van Cromphaut *et al.*, 2001) und CYP27B1-knockout Mäuse (Hoenderop *et al.*, 2002; Dardenne *et al.*, 2003a; Dardenne *et al.*, 2003b; Rowling *et al.*, 2007) ihren Phänotyp auch im Alter erhalten und dieser nur durch eine Umstellung auf Kalzium- und Phosphatreiche Ernährung aufgehoben werden kann.

4.2.3.2 Knorpel-spezifischer VDR- und CYP27B1-knockout, sowie knorpel-spezifische Überexpression von CYP27B1 in Mäusen

Neben den konstitutiven VDR- und CYP27B1-knockout Mäusen wurden auch knorpel-spezifische VDR- (VDR^{-/-}cre-) und CYP27B1-knockout Mäuse (CYP27B1cre^{-/-}-Mäuse) sowie eine knorpel-spezifisch transgene CYP27B1-überexprimierende Maus (CYP27B1^{tg}) generiert (Masuyama *et al.*, 2006; Naja *et al.*, 2009).

Sowohl die knorpel-spezifischen VDR^{-/-}cre-Tiere (Masuyama *et al.*, 2006) als auch die knorpel-spezifischen CYP27B1cre^{-/-}-Tiere und die knorpel-spezifisch CYP27B1-überexprimierende Maus (Naja *et al.*, 2009) zeigen ähnliche Phänotypen wie die in dieser Arbeit untersuchten ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse. Im Alter von E15.5 zeigen die CYP27B1cre^{-/-}-Mäuse gegenüber den Kontrolltieren eine signifikant größere hypertrophe Zone, wobei die Proliferation der Chondrozyten unverändert war. Im Alter von 2 Tagen waren die hypertrophe Zone der CYP27B1cre^{-/-}-Mäuse und der Kontrolltiere vergleichbar groß. Bei den CYP27B1^{tg}-Tieren zeigte sich der zu den CYP27B1cre^{-/-}-Tieren entgegengesetzte Phänotyp. Die CYP27B1^{tg}-Tiere haben im Alter von E14.5 eine kleinere hypertrophe Zone als die Kontrolltiere (Dardenne *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu entwickeln die VDR^{-/-}cre-Tiere keinen Wachstumsphänotyp (Masuyama *et al.*, 2006) an den untersuchten Zeitpunkten.

Die knorpel-spezifischen VDR^{-/-cre}-Tiere zeigen wie die in dieser Arbeit untersuchten knorpel-spezifischen ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse einen Phänotypen in der Anzahl der Osteoklasten, welcher in diesen Tieren zu bestimmten Zeitpunkten gegenüber den untersuchten WT-Tieren vermindert ist (Masuyama *et al.*, 2006).

Auch die knorpel-spezifischen CYP27B1^{cre^{-/-}}-Tiere zeigen eine verminderte Anzahl an Osteoklasten, welche auf eine verminderte RANKL-Expression auf den Chondrozyten zurück zu führen ist (Naja *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu den konstitutiven knockout Tieren ließen sich sowohl in den VDR^{-/-cre}-, den CYP27B1^{cre^{-/-}}- und den CYP27B1^{tg}-Tieren die Phänotypen wie bei den ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren zu späteren Zeitpunkten nicht mehr finden (Dardenne *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2001; Naja *et al.*, 2009).

Zusammenfassend lässt sich über die verglichenen Tiere folgendes sagen: Bei allen konstitutiven knockout Tieren bleibt der rachitische Phänotyp im Alter erhalten. Dies ist bei den knorpel-spezifischen Tieren nicht der Fall. Hier handelt es sich nur um einen vorübergehenden Phänotypen. Daraus folgt, dass der Phänotyp bei den konstitutiven Tieren nicht auf die Chondrozytenbeteiligung zurückzuführen ist, sondern auf Änderungen in anderen Geweben wie z.B. den Darm, wo die verminderte Kalzium-Aufnahme zum Phänotypen im Skelettsystem führt.

4.2.3.3 Osteoklastogenese

Ein Grund für den Wachstumsfugenphänotyp, und somit den gesamten Phänotyp der ERp57^{cart^{-/-}}-Maus, scheint ein später einsetzender Umbau der späten hypertrophen Zone durch Osteoklasten zu sein.

Osteoklasten differenzieren aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Dieser Prozess geschieht an der Stelle, an welcher der Knochen abgebaut wird, und wird sowohl von osteotropen Hormonen als auch lokal produzierten Faktoren reguliert (Takahashi *et al.*, 1988; Udagawa *et al.*, 1989; Suda *et al.*, 1992; Suda *et al.*, 1995). Diese Faktoren werden unterteilt in VDR vermittelte Signale (via 1,25-(OH)₂ Vit D₃), Proteinkinase A vermittelte Signale (via PTH und PGE₂) und Glykoprotein 130 (gp130)-vermittelte Signale (via IL-6 und IL-11) (Takahashi *et al.*, 1988; Udagawa *et al.*, 1989; Yamashita *et al.*, 1990; Suda *et al.*, 1992; Suda *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 1998b).

Diese Signale werden jedoch nicht direkt an die Osteoklasten vermittelt, sondern über Osteoblasten an Osteoklasten weitergeleitet (Nakashima *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011).

Dies geschieht mittels des auf der Membran der Osteoblasten, Osteocyten und hypertrophen Chondrozyten gebundenen RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) (Yoshida *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1991; Hattersley *et al.*, 1991; Kodama *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1993).

Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass der Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), welcher von den Osteoblasten produziert wird, essentiell für die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen ist (Yasuda *et al.*, 1998a; Simonet *et al.*, 1997) (Abb.4.1).

Von Yasuda *et al.* konnte 1998 zudem gezeigt werden, dass eine Inhibition von RANK-Ligand (RANKL) zu einer verminderten Osteoklastogenese führt. Zudem zeigten Mäuse, die den RANKL-Inhibitor Osteoprotegerin überexprimieren, einen unterdrückten Knochenabbau, welcher mit einer abnormal gesteigerten Entwicklung von Osteoklasten in Zusammenhang gebracht werden kann (Wolbach & Hegstedt, 1952; Howlett, 1980; Pechak *et al.*, 1986).

Osteoblasten wiederum entstehen entweder wie Chondrozyten direkt aus mesenchymalen Stammzellen (Crelin & Koch, 1967; Galotto *et al.*, 1994; Roach, 1997; Zerega *et al.*, 1999) oder aber durch Metaplasie aus hypertrophen Chondrozyten (Sakai *et al.*, 2001).

In der Arbeit von Sakai *et al.* konnte mittels Verpaarung der *Col2a1-Cre*-Maus mit der *Rosa-26*-Maus in den Osteoblasten der primären Spongiosa die Produktion der Cre-Rekombinase nachgewiesen werden (Poli *et al.*, 1994; Grey *et al.*, 1999). Somit haben auch die Osteoblasten, neben den hypertrophen Chondrozyten der ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse, kein ERp57 auf der Zelloberfläche, wodurch ihnen einer der möglichen Vitamin D-bindenden Faktoren fehlt, welche die Expression des RANKL in Osteoblasten fördern. Dadurch ist es möglich, dass die Aktivierung von Osteoklastenvorläufern zur Osteoklastogenese via RANKL und RANK gestört ist.

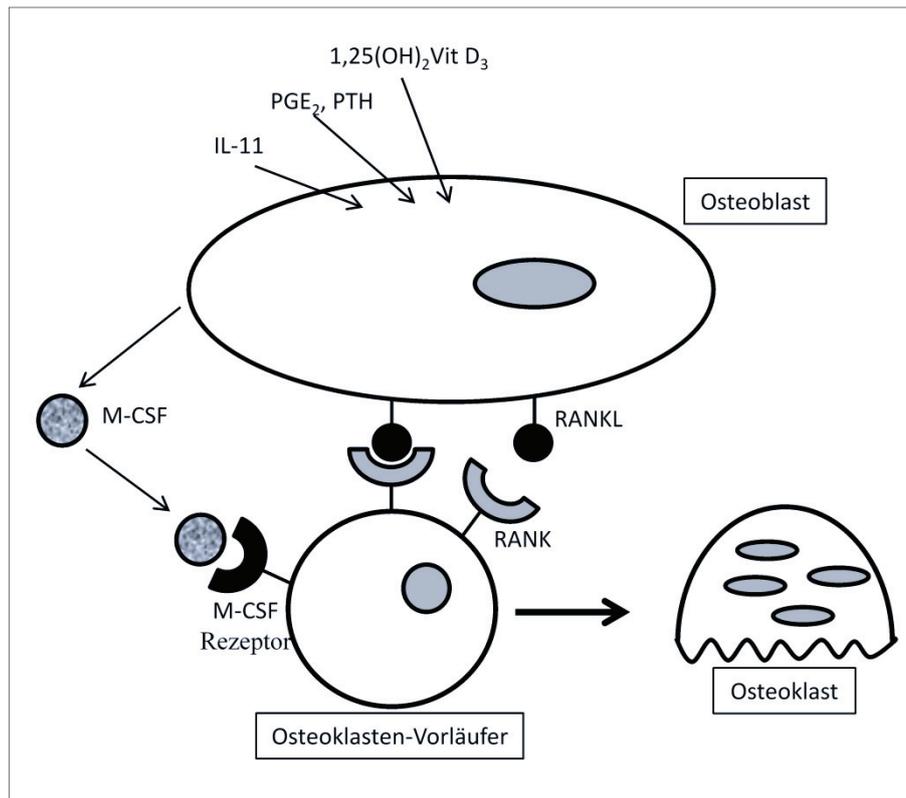


Abb. 4.1 **Osteoblasten regulierte Differenzierung von Osteoklasten.** Osteoblasten werden durch drei verschiedene Signale, 1,25-(OH)₂ Vit D₃, PTH/PGE₂ und IL-11 induziert die Expression von RANK-Ligand (RANKL) auf ihrer Zelloberfläche zu erhöhen. RANKL vermittelt ein Signal zur Osteoklastogenese an RANK auf der Zelloberfläche der Osteoklasten-Vorläuferzelle. Zur Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzelle zum Osteoklasten bedarf es zusätzlich der Stimulation der Osteoklasten-Vorläuferzelle via des Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF), welches ebenfalls vom Osteoblasten produziert wird. Verändert nach Yasuda *et al.*, 1998.

In der Literatur sind verschiedene 1,25-(OH)₂ Vit D₃ abhängige und unabhängige Signalwege, welche die Expression von RANKL auf der Osteoblastenzelloberfläche erhöhen, bekannt. Von diesen weiß man, dass diese bei Inaktivierung ihrer Rezeptoren im Mausmodell die Osteoklastogenese negativ beeinflussen können.

Die Cytokine Interleukin-6 (IL-6) und -11 (IL-11) binden auf der Zelloberfläche von Osteoblasten an ihre Liganden-spezifischen Rezeptoren, die IL-6- und IL-11-Rezeptoren. Mäusen, denen der IL-11 Rezeptor fehlt, haben verminderte Osteoklastenzahlen gegenüber den Kontrolltieren (Galea *et al.*, 2011; Genetos *et al.*, 2011).

Adulte IL-6 knockout Mäuse zeigen eine normale Anzahl von Osteoklasten, was darauf hindeutet, dass dieses Cytokin zwar eine Rolle in der Osteoklastogenese spielen könnte, jedoch andere Faktoren für IL-6 im Falle der Induktion der Osteoblasten kompensieren können (Sims *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass die einzelnen Glykoproteine 130 (gp130)-vermittelten Signalwege, via IL-6 und IL-11, unterschiedlich ersetzbare Rollen in der Aktivierung der Osteoklastogenese einnehmen.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) signalisiert laut Literatur über die G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren EP2 und EP4 auf Osteoblasten (Li *et al.*, 2000; Miyaura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002a). Es konnten wie bei der IL-11R knockout Maus auch bei den EP4- und EP2-knockout Mäusen gezeigt werden, dass ein Fehler dieser Rezeptoren zur verminderten Osteoklastogenese führt (Li *et al.*, 2000; Miyaura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002a).

Die EP4-knockout Mäuse zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine signifikante Reduktion der RANKL Expression und weniger Osteoklasten (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2002b). Auch die EP2-knockout Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotypen, welcher jedoch weniger schwerwiegend war als der Phänotyp der EP4-knockout Mäuse (Amling *et al.*, 1999).

Neben ERp57 könnte auch VDR für die Bindung von 1,25-(OH)₂Vit D₃ an der Oberfläche der Osteoblasten verantwortlich sein oder sie könnten zusammen funktionieren. Hierfür spricht, dass auch der Chondrozyten-spezifische knockout von VDR (VDR^{-/-cre}) zu einem Osteoklasten-Mangel führt.

Für die vier verschiedenen VDR-knockout Mäuse sind kaum Phänotypen bzgl. der Osteoklastogenese beschrieben worden. Bei den von Li *et al.* erzeugten Tieren von 1997 konnte eine vermehrte Anzahl von Osteoblasten, jedoch keine Veränderung in der Anzahl der Osteoklasten gefunden werden (Holtrop *et al.*, 1986). Ratten jedoch, welchen VDR fehlte, zeigten verminderte Osteoklastenzahlen und Osteoklastenaktivität (Masuyama *et al.*, 2006).

Die knorpel-spezifischen VDR^{-/-cre}-Mäuse zeigen gegenüber ihren Kontrolltieren signifikante Verminderung der Osteoklastenzahlen, wobei die Zahl und Funktion der Osteoblasten unverändert war. Masuyama *et al.* erklärten dies 2006 unter anderem mit einer verringerten RANKL-Expression, welche zu verminderten Osteoklastenzahlen führt.

Vitamin D-Signalwege sind für die Osteoklastogenese wichtig, da auch die konstitutive CYP27B1-knockout Maus (Naja *et al.*, 2009) und die knorpel-spezifischen CYP27B1^{cre^{-/-}}-und CYP27B1^{tg}-Mäuse (Panda *et al.*, 2001) Veränderungen in der Anzahl der Osteoklasten zeigen.

Die CYP27B1^{cre^{-/-}}-Tiere zeigten im Alter von E15.5 signifikant breitere hypertrophe Zonen gegenüber den WT-Tieren, auf Grund von verminderter Osteoklasten-Rekrutierung und nicht auf Grund von verstärkter Proliferation. Im Alter von 2 Tagen konnte dieser Unterschied nicht mehr gefunden werden. Die CYP27B1^{tg}-Mäuse zeigten im Alter von E15.5 den gegenläufigen Phänotypen zu den CYP27B1^{cre^{-/-}}-Tieren und auch bei diesen Tieren konnte im Alter von 2 Tagen kein Unterschied mehr gefunden werden (Panda *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Veränderung der Aktivierung der Osteoblasten via VDR vermittelter Signale (via 1,25-(OH)₂Vit D₃), Proteinkinase A vermittelter Signale (via PTH und PGE₂) und gp130-vermittelter Signale (via IL-6 und IL-11) zu einer Verminderung der RANKL-Expression führen kann.

Diese Veränderung geht mit einer verminderten Anzahl von Osteoklasten und somit einem verminderten Knochenumbau einher. Zudem zeigen die Daten der VDR^{-/-} cre-Maus, dass eine Veränderung der Chondrozyten zu einer veränderten Osteoklastenzahl führen kann, wie es auch die ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse aufweisen. Somit ist es möglich, dass die Osteoklasten der ERp57^{cart^{-/-}}-Mäuse via Osteoblasten nur vermindert oder gar nicht aktiviert werden können. Dies führt zu einer Verzögerung der Osteoklastogenese.

Da im Alter von 8 Wochen in den ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren Osteoklasten zu finden sind, werden diese wahrscheinlich verzögert produziert. Bei einer gänzlich gestörten Osteoklastogenese durch Osteoblasten aus hypertrophen Chondrozyten könnten die dann eingewanderten Osteoblasten jedoch aus dem Knochenmark stammen. Da diese Knochenmarks-generierten Osteoblasten wegen ihres Ursprung cre-Rekombinase negativ sind, tragen sie ERp57 auf ihrer Zelloberfläche und können somit auf Grund von Signalen via 1,25-(OH)₂ Vit D₃ Osteoklasten bilden.

Beide Lösungsansätze könnten wiederum die Erklärung dafür sein warum der Umbau der späten hypertrophen Zone durch Osteoklasten möglich, wenn auch verspätet ist.

Die Zusammenfassend lässt sich über die *in vivo* Daten der unterschiedlichen Mäuse im Vergleich zu den ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren sagen, dass alle Ergebnisse auf ein verzögertes Knochenwachstum in den knorpel-spezifischen ERp57 knockout-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen hin deuten. Dies scheint, aufgrund der verminderten Anzahl der Osteoklasten der Fall zu sein. Der Ursprung dieser verminderten Anzahl liegt vermutlich im zumindest zeitweiligen Fehlen des ERp57 auf der Oberfläche der Osteoblasten, welche gar nicht oder nur vermindert die Osteoklastogenese aktivieren können.

4.3 Ausblick

Zur genaueren Bestimmung der molekularen Eigenschaften von ERp57 in der Chondrozytendifferenzierung und zur Klärung der noch offenen Fragen dieser Arbeit wären folgende Experimente möglich:

Zur Klärung der Hypothese, dass die verminderte Osteoklasten Anzahl vermutlich eine Folge des Fehlens des ERp57 auf der Oberfläche der Osteoblasten ist, könnten histologische Untersuchungen von ERp57^{cart^{-/-}}-Mäusen im Alter von 4 Wochen und 2 Monaten hilfreich sein. In diesen Altersstufen konnten in den TRAP-Färbungen die Osteoklastenunterschiede gefunden werden.

Mit Hilfe von RANKL-Färbungen könnte nachgewiesen werden, dass auf der Oberfläche der ERp57^{cart^{-/-}}-Osteoblasten der RANKL im Gegensatz zu den WT-Osteoblasten fehlt. Dies wäre ein indirektes Indiz für einen Zusammenhang zwischen ERp57-vermittelter Vitamin D-Wirkung und der Osteoklastenreifung über RANK/RANKL und ein direktes Argument dafür, dass ERp57 etwas mit der Vitamin D induzierten RANKL-Expression zu tun hat.

Um sicher zu gehen, dass der starke Phänotyp in 4 Wochen alten ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren nicht aufgrund des Endes des Säugens auftritt, könnte ERp57^{cart^{-/-}}-Tiere direkt nach dem Ende des Säugens kalziumreich ernährt werden, wie dies bei VDR- und den CYP27B1-knockout Tieren durchgeführt wurde (Krohn *et al.*, 2003). Führt diese Nahrungsumstellung im Vergleich zur Standardnahrung zu einem nicht Vorhandensein des Phänotyps, so könnte das Ende des Säugens der Tiere ein bzw. der Grund für den starken Phänotyp in 4 Wochen alten ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren sein.

Zur Klärung der Frage ob die Pubertät bzw. eine Veränderung in den Sexualhormonen als Ursache für den starken Phänotyp in 4 Wochen alten ERp57^{cart^{-/-}}-Tieren insbesondere bei männlichen Tieren in Frage kommt, sollte die Rolle von Testosteron und ERp57 *in vitro* mit Hilfe von Chondrozyten aus ERp57^{cart^{-/-}}- und WT-Tieren untersucht werden. Hierfür könnten die Chondrozyten, ähnlich wie von Krohn *et al.*, 2003, mit DTH, Östrogen und 1,25-(OH)₂ Vit D₃ sowie einer Kombination aus einem Sexualhormon und 1,25-(OH)₂ Vit D₃ zusammen mit IGF-I zur Differenzierung stimuliert werden. Die Differenzierung der Zellen könnte anschließend mittels der Expression von Kollagen II und X auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Sexualhormone auf den Phänotypen der ERp57^{cart-/-}-Tiere zu bestimmen, wäre die Untersuchung der ERp57^{cart-/-}- und WT-Tieren nach einer Ovariectomie bzw. Orchiectomie. Diese müsste vor der Pubertät durchgeführt werden um zu bestimmen, wie sich der Phänotyp der ERp57^{cart-/-}-Tiere ohne den pubertären Wachstumsschub ausprägt.

5 Literaturverzeichnis

Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, & Baron J (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* **143**, 1851-1857.

Akisaka T & Gay CV (1985). The plasma membrane and matrix vesicles of mouse growth plate chondrocytes during differentiation as revealed in freeze-fracture replicas. *Am J Anat* **173**, 269-286.

al-Aqeel A, Ozand P, Sobki S, Sewairi W, & Marx S (1993). The combined use of intravenous and oral calcium for the treatment of vitamin D dependent rickets type II (VDDRII). *Clin Endocrinol (Oxf)* **39**, 229-237.

Albright F. Post-menopausal osteoporosis. 55[Trans. Assoc. Am. Physicians], 298-305. 1940.
Ref Type: Generic

Ali SY, Sajdera SW, & Anderson HC (1970). Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1513-1520.

Alvarez J, Balbin M, Santos F, Fernandez M, Ferrando S, & Lopez JM (2000). Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res* **15**, 82-94.

Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, & Demay MB (1999). Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* **140**, 4982-4987.

Anderson HC (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* **41**, 59-72.

Anderson HC, Garimella R, & Tague SE (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* **10**, 822-837.

Anderson HC & Reynolds JJ (1973). Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Dev Biol* **34**, 211-227.

Babarina AV, Mollers U, Bittner K, Vischer P, & Bruckner P (2001). Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell-derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro. *Matrix Biol* **20**, 205-213.

Balsan S, Garabedian M, Larchet M, Gorski AM, Cournot G, Tau C, Bourdeau A, Silve C, & Ricour C (1986). Long-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* **77**, 1661-1667.

Baron R & Hesse E (2012). Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 311-325.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, & Cheah KS (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* **16**, 174-178.

Ben-Hur H, Thole HH, Mashiah A, Insler V, Berman V, Shezen E, Elias D, Zuckerman A, & Ornoy A (1997). Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcif Tissue Int* **60**, 520-526.

Benya PD & Shaffer JD (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215-224.

Bernard GW (1972). Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J Ultrastruct Res* **41**, 1-17.

BESSEY OA, LOWRY OH, & BROCK MJ (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* **164**, 321-329.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, & De CB (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**, 85-89.

Bikle DD (2007). What is new in vitamin D: 2006-2007. *Curr Opin Rheumatol* **19**, 383-388.

Blanchard O, Tsagris L, Rappaport R, Duval-Beaupere G, & Corvol M (1991). Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 711-716.

Bohme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH, & Bruckner P (1992). Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J Cell Biol* **116**, 1035-1042.

- Boivin G, Mesguich P, Pike JW, Bouillon R, Meunier PJ, Haussler MR, Dubois PM, & Morel G (1987). Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria. *Bone Miner* **3**, 125-136.
- Bolt MJ, Cao LP, Kong J, Sitrin MD, & Li YC (2005). Vitamin D receptor is required for dietary calcium-induced repression of calbindin-D_{9k} expression in mice. *J Nutr Biochem* **16**, 286-290.
- Bonucci E (1970). Fine structure of epiphyseal cartilage in experimental scurvy. *J Pathol* **102**, 219-227.
- Borg TK, Runyan R, & Wuthier RE (1981). A freeze-fracture study of avian epiphyseal cartilage differentiation. *Anat Rec* **199**, 449-457.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van EE, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, & Demay M (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* **29**, 726-776.
- Boyan BD, Dean DD, Sylvia VL, & Schwartz Z (2003). Steroid hormone action in musculoskeletal cells involves membrane receptor and nuclear receptor mechanisms. *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**, 130-135.
- Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, & Schwartz Z (2002). Membrane mediated signaling mechanisms are used differentially by metabolites of vitamin D(3) in musculoskeletal cells. *Steroids* **67**, 421-427.
- Boyan BD, Wang L, Wong KL, Jo H, & Schwartz Z (2006). Plasma membrane requirements for 1 α ,25(OH)₂D₃ dependent PKC signaling in chondrocytes and osteoblasts. *Steroids* **71**, 286-290.
- Brinckerhoff CE & Matrisian LM (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 207-214.
- Brochhausen C, Lehmann M, Halstenberg S, Meurer A, Klaus G, & Kirkpatrick CJ (2009). Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J Tissue Eng Regen Med* **3**, 416-429.
- Bruckner P, Horler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, & Spycher MA (1989). Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J Cell Biol* **109**, 2537-2545.

- Bruckner P & van der Rest M (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* **28**, 378-384.
- Busscher I, Kingma I, Wapstra FH, Bulstra SK, Verkerke GJ, & Veldhuizen AG (2011). The value of shoe size for prediction of the timing of the pubertal growth spurt. *Scoliosis* **6**, 1.
- Cancedda R, Descalzi CF, & Castagnola P (1995). Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* **159**, 265-358.
- Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-650.
- Carrascosa A, Audi L, Ferrandez MA, & Ballabriga A (1990). Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **70**, 134-140.
- Castagnola P, Moro G, scalzi-Cancedda F, & Cancedda R (1986). Type X collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J Cell Biol* **102**, 2310-2317.
- Cecil RNA & Anderson HC. Freeze-fracture studies of matrix vesicle calcification in epiphyseal growth plate. 1[*Metab Bone Dis Relat Res*], 89-97. 1978.
Ref Type: Generic
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, & Russell DW (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7711-7715.
- Chung UI (2004). Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J* **51**, 19-24.
- Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, & Dempster DW (1988). Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology* **122**, 1224-1230.
- Colledge WH, Mei H, & d'Anglemon dT, X (2010). Mouse models to study the central regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 12-20.
- Coon HG (1966). Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 66-73.
- Crelin ES & Koch WE (1967). An autoradiographic study of chondrocyte transformation into chondroclasts and osteocytes during bone formation in vitro. *Anat Rec* **158**, 473-483.

- Crivellato E (2011). The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol* **55**, 365-375.
- D'Angelo M & Pacifici M (1997). Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum-free agarose cultures: a TGF-beta independent process. *J Bone Miner Res* **12**, 1368-1377.
- Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, & St-Arnaud R (2001). Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* **142**, 3135-3141.
- Dardenne O, Prud'homme J, Hacking SA, Glorieux FH, & St-Arnaud R (2003a). Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (CYP27B1). *Bone* **32**, 332-340.
- Dardenne O, Prudhomme J, Hacking SA, Glorieux FH, & St-Arnaud R (2003b). Rescue of the pseudo-vitamin D deficiency rickets phenotype of CYP27B1-deficient mice by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D3: biochemical, histomorphometric, and biomechanical analyses. *J Bone Miner Res* **18**, 637-643.
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, & Dallal GE (1997). Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* **337**, 670-676.
- DeLuca HF (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* **80**, 1689S-1696S.
- Demay MB, Gerardi JM, DeLuca HF, & Kronenberg HM (1990). DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 369-373.
- Donohue MM & Demay MB (2002). Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* **143**, 3691-3694.
- Dostal LA & Toverud SU (1984). Effect of vitamin D3 on duodenal calcium absorption in vivo during early development. *Am J Physiol* **246**, G528-G534.
- Dozin B, Quarto R, Campanile G, & Cancedda R (1992). In vitro differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid. *Eur J Cell Biol* **58**, 390-394.
- Dreier R (2010). Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* **12**, 216.

- Dreier R, Gunther BK, Mainz T, Nemere I, & Bruckner P (2008). Terminal differentiation of chick embryo chondrocytes requires shedding of a cell surface protein that binds 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* **283**, 1104-1112.
- Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G, Adamski J, & Balling R (2002). Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* **16**, 1524-1537.
- Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, & McGrath JJ (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* **29**, 21-30.
- Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, & Khosla S (2000). Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* **106**, 1553-1560.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, & Chambon P (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 752-757.
- Feil S, Valtcheva N, & Feil R (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol* **530**, 343-363.
- Ferguson C, Alpern E, Miclau T, & Helms JA (1999). Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* **87**, 57-66.
- Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, & Helms JA (1998). Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci* **857**, 33-42.
- Ferrara N & van der Pluijm T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4-25.
- Ferrari DM & Soling HD (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* **339** (Pt 1), 1-10.
- Fraser DR & Kodicek E (1970). Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* **228**, 764-766.
- Frost HM & Jee WS (1994). Perspectives: a vital biomechanical model of the endochondral ossification mechanism. *Anat Rec* **240**, 435-446.

Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, & Portale AA (1997). Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol* **11**, 1961-1970.

Galea GL, Sunter A, Meakin LB, Zaman G, Sugiyama T, Lanyon LE, & Price JS (2011). Sost down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4. *FEBS Lett* **585**, 2450-2454.

Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda FD, Bianco P, & Cancedda R (1994). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Miner Res* **9**, 1239-1249.

Garbi N, Tanaka S, Momburg F, & Hammerling GJ (2006). Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol* **7**, 93-102.

Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, & Delmas PD (1996). Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* **11**, 337-349.

Genetos DC, Yellowley CE, & Loots GG (2011). Prostaglandin E2 signals through PTGER2 to regulate sclerostin expression. *PLoS One* **6**, e17772.

Genge BR, Sauer GR, Wu LN, McLean FM, & Wuthier RE (1988). Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. *J Biol Chem* **263**, 18513-18519.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, & Ferrara N (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5**, 623-628.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, & Einhorn TA (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* **88**, 873-884.

Gibson GJ & Flint MH (1985). Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol* **101**, 277-284.

Goldring MB, Tsuchimochi K, & Ijiri K (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**, 33-44.

Grey A, Mitnick MA, Masiukiewicz U, Sun BH, Rudikoff S, Jilka RL, Manolagas SC, & Insogna K (1999). A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* **140**, 4683-4690.

Gunther R, Srinivasan M, Haugejorden S, Green M, Ehbrecht IM, & Kuntzel H (1993). Functional replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* Trg1/Pdi1 protein by members of the mammalian protein disulfide isomerase family. *J Biol Chem* **268**, 7728-7732.

Halloran BP & DeLuca HF (1981). Appearance of the intestinal cytosolic receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ during neonatal development in the rat. *J Biol Chem* **256**, 7338-7342.

Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, & Eastell R (1998). Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* **13**, 1124-1133.

Harvey N, Dennison E, & Cooper C (2010). Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 99-105.

Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, & Chambers TJ (1991). Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 526-531.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, & Jurutka PW (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* **13**, 325-349.

Heinegard D & Oldberg A (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* **3**, 2042-2051.

Hochberg Z, Tiosano D, & Even L (1992). Calcium therapy for calcitriol-resistant rickets. *J Pediatr* **121**, 803-808.

Hoenderop JG, Dardenne O, Van AM, Van Der Kemp AW, Van Os CH, Arnaud R, & Bindels RJ (2002). Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J* **16**, 1398-1406.

Hoenderop JG, Nilius B, & Bindels RJ (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* **85**, 373-422.

Holtrop ME (1972). The ultrastructure of the epiphyseal plate. II. The hypertrophic chondrocyte. *Calcif Tissue Res* **9**, 140-151.

- Holtrop ME, Cox KA, Carnes DL, & Holick MF (1986). Effects of serum calcium and phosphorus on skeletal mineralization in vitamin D-deficient rats. *Am J Physiol* **251**, E234-E240.
- Howlett CR (1980). The fine structure of the proximal growth plate and metaphysis of the avian tibia: endochondral osteogenesis. *J Anat* **130**, 745-768.
- Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, & De CB (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 160-165.
- Hunter GK (1987). An ion-exchange mechanism of cartilage calcification. *Connect Tissue Res* **16**, 111-120.
- Hunziker EB (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* **28**, 505-519.
- Hunziker EB, Schenk RK, & Cruz-Orive LM (1987). Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am* **69**, 162-173.
- Itagane Y, Inada H, Fujita K, & Isshiki G (1991). Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes. *Endocrinology* **128**, 1419-1424.
- Iwamoto M, Golden EB, Adams SL, Noji S, & Pacifici M (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp Cell Res* **205**, 213-224.
- Iwamoto M, Kitagaki J, Tamamura Y, Gentili C, Koyama E, Enomoto H, Komori T, Pacifici M, & Enomoto-Iwamoto M (2003). Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 6-15.
- Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, & Kato Y (1991). Reduction of basic fibroblasts growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem* **266**, 461-467.
- Jikko A, Aoba T, Murakami H, Takano Y, Iwamoto M, & Kato Y (1993). Characterization of the mineralization process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Dev Biol* **156**, 372-380.
- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, & Kumar R (1996). Ontogeny of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in fetal rat bone. *J Bone Miner Res* **11**, 56-61.

Jones G (2007). Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial* **20**, 316-324.

Karimian E & Savendahl L (2011). Estrogen signaling in growth plate cartilage. *Endocr Dev* **21**, 42-51.

Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, & McMahon AP (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* **127**, 543-548.

Karsenty G, Lacour B, Ulmann A, Pierandrei E, & Drueke T (1985). Early effects of vitamin D metabolites on phosphate fluxes in isolated rat enterocytes. *Am J Physiol* **248**, G40-G45.

Kasperk C, Helmboldt A, Borcsok I, Heuthe S, Cloos O, Niethard F, & Ziegler R (1997). Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell populations. *Calcif Tissue Int* **61**, 464-473.

Kato Y & Iwamoto M (1990). Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* **265**, 5903-5909.

Keenan BS, Richards GE, Ponder SW, Dallas JS, Nagamani M, & Smith ER (1993). Androgen-stimulated pubertal growth: the effects of testosterone and dihydrotestosterone on growth hormone and insulin-like growth factor-I in the treatment of short stature and delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **76**, 996-1001.

Khosla S, Amin S, & Orwoll E (2008). Osteoporosis in men. *Endocr Rev* **29**, 441-464.

Khosla S, Melton LJ, III, & Riggs BL (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res* **26**, 441-451.

Kirsch T & von der MK (1991). Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. *Eur J Biochem* **196**, 575-580.

Klagsbrun M (1991). Regulators of angiogenesis: stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. *J Cell Biochem* **47**, 199-200.

Klaus G, Weber L, Rodriguez J, Fernandez P, Klein T, Grulich-Henn J, Hugel U, Ritz E, & Mehls P (1998). Interaction of IGF-I and 1 α , 25(OH)2D3 on receptor expression and growth stimulation in rat growth plate chondrocytes. *Kidney Int* **53**, 1152-1161.

Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, & Kronenberg HM (2002). PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* **129**, 2977-2986.

Kodama H, Nose M, Niida S, & Yamasaki A (1991). Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* **173**, 1291-1294.

Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, & Mori K (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **13**, 877-890.

Kovacs CS, Woodland ML, Fudge NJ, & Friel JK (2005). The vitamin D receptor is not required for fetal mineral homeostasis or for the regulation of placental calcium transfer in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E133-E144.

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, & Sambrook J (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**, 462-464.

Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, & Schaefer F (2003). 1,25(OH)2D3 and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* **73**, 400-410.

Kronenberg HM (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336.

Kuizon BD, Goodman WG, Juppner H, Boechat I, Nelson P, Gales B, & Salusky IB (1998). Diminished linear growth during intermittent calcitriol therapy in children undergoing CCPD. *Kidney Int* **53**, 205-211.

Kular J, Tickner J, Chim SM, & Xu J (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Langston GG, Swain LD, Schwartz Z, Del TF, Gomez R, & Boyan BD (1990). Effect of 1,25(OH)2D3 and 24,25(OH)2D3 on calcium ion fluxes in costochondral chondrocyte cultures. *Calcif Tissue Int* **47**, 230-236.

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, bou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, & Kronenberg HM (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273**, 663-666.

Laron Z, Sarel R, & Pertzalan A (1980). Puberty in Laron type dwarfism. *Eur J Pediatr* **134**, 79-83.

Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, & Roy AK (1998). A rapid and reliable PCR-based assay for gene transmission and sex determination in newborn transgenic mice. *Transgenic Res* **7**, 319-320.

Leboy PS, Shapiro IM, Uschmann BD, Oshima O, & Lin D (1988). Gene expression in mineralizing chick epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* **263**, 8515-8520.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, & De CB (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**, 2336-2346.

Lewinson D & Silbermann M (1992). Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat Rec* **233**, 504-514.

Li X, Okada Y, Pilbeam CC, Lorenzo JA, Kennedy CR, Breyer RM, & Raisz LG (2000). Knockout of the murine prostaglandin EP2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **141**, 2054-2061.

Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, & Raisz LG (2002a). Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone* **30**, 567-573.

Li X, Tomita M, Pilbeam CC, Breyer RM, & Raisz LG (2002b). Prostaglandin receptor EP2 mediates PGE2 stimulated hypercalcemia in mice in vivo. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **67**, 173-180.

Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, & Demay MB (1998a). Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* **139**, 4391-4396.

Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, & Demay MB (1997). Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9831-9835.

- Li YC, Pirro AE, & Demay MB (1998b). Analysis of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. *Endocrinology* **139**, 847-851.
- Lindquist JA, Jensen ON, Mann M, & Hammerling GJ (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J* **17**, 2186-2195.
- Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald EB, Anderson JB, & Clarke AC (1976). Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet* **1**, 1038-1041.
- Livne I, Gibson MJ, & Silverman AJ (1993). Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. *Dev Biol* **159**, 643-656.
- Löffler & Petrides. Biochemie & Pathobiochemie. 2003.
Ref Type: Generic
- Lu VP, Iwamoto M, Fanning P, Pacifici M, & Olsen BR (1993). Multiple negative elements in a gene that codes for an extracellular matrix protein, collagen X, restrict expression to hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* **121**, 1173-1179.
- Lufkin EG, Wahner HW, O'Fallon WM, Hodgson SF, Kotowicz MA, Lane AW, Judd HL, Caplan RH, & Riggs BL (1992). Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Ann Intern Med* **117**, 1-9.
- Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, & Yang Y (2008). Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* **135**, 1947-1956.
- Maor G, Hochberg Z, & Silbermann M (1993). Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. *Acta Endocrinol (Copenh)* **128**, 56-64.
- Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van LR, Maes C, Carmeliet P, Bouillon R, & Carmeliet G (2006). Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest* **116**, 3150-3159.
- Matsumoto T, Fontaine O, & Rasmussen H (1981). Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on phospholipid metabolism in chick duodenal mucosal cell. Relationship to its mechanism of action. *J Biol Chem* **256**, 3354-3360.

Mattot V, Raes MB, Henriët P, Eeckhout Y, Stehelin D, Vandenbunder B, & Desbiens X (1995). Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J Cell Sci* **108** (Pt 2), 529-535.

Mauras N, Rogol AD, Haymond MW, & Veldhuis JD (1996). Sex steroids, growth hormone, insulin-like growth factor-1: neuroendocrine and metabolic regulation in puberty. *Horm Res* **45**, 74-80.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, & Bruckner P (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol* **108**, 191-197.

Miller WL & Portale AA (2000). Vitamin D 1 alpha-hydroxylase. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 315-319.

Miyaura C, Inada M, Suzawa T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, & Suda T (2000). Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. *J Biol Chem* **275**, 19819-19823.

Mizwicki MT & Norman AW (2009). The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* **2**, re4.

Molinari M & Helenius A (1999). Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**, 90-93.

Morales TI (2007). Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 861-871.

Naja RP, Dardenne O, Arabian A, & St AR (2009). Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in growth plate development. *Endocrinology* **150**, 4024-4032.

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, & Takayanagi H (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* **17**, 1231-1234.

Narbaitz R, Stumpf WE, Sar M, Huang S, & DeLuca HF (1983). Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* **35**, 177-182.

- Nemere I (1999). 24,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses the rapid actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone on calcium transport in chick intestine. *J Bone Miner Res* **14**, 1543-1549.
- Nemere I (1996). Apparent nonnuclear regulation of intestinal phosphate transport: effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₃, and 25-hydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* **137**, 2254-2261.
- Nemere I (2005). The 1,25D₃-MARRS protein: contribution to steroid stimulated calcium uptake in chicks and rats. *Steroids* **70**, 455-457.
- Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, & Norman AW (1994). Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* **269**, 23750-23756.
- Nemere I, Garbi N, Hammerling G, & Hintze KJ (2012). Role of the 1,25D(3)-MARRS receptor in the 1,25(OH)(2)D(3)-stimulated uptake of calcium and phosphate in intestinal cells. *Steroids* **77**, 897-902.
- Nemere I, Garbi N, Hammerling GJ, & Khanal RC (2010). Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D₃-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *J Biol Chem* **285**, 31859-31866.
- Nemere I, Ray R, & McManus W (2000). Immunochemical studies on the putative plasmalemmal receptor for 1, 25(OH)(2)D(3). I. Chick intestine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E1104-E1114.
- Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, & Farach-Carson MC (2004). Identification and characterization of 1,25D₃-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D₃-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* **89-90**, 281-285.
- Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, & Boyan BD (1998). Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Miner Res* **13**, 1353-1359.
- Nemere I & Szego CM (1981). Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine: II. Analyses of additivity, contribution of calcium, and modulatory influence of indomethacin. *Endocrinology* **109**, 2180-2187.

Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, & Koopman P (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* **183**, 108-121.

Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, & High S (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* **10**, 2573-2582.

Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, & High S (1997). Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**, 86-88.

Olsen BR, Reginato AM, & Wang W (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 191-220.

Osdoby P & Caplan AI (1981). First bone formation in the developing chick limb. *Dev Biol* **86**, 147-156.

Ovchinnikov DA, Deng JM, Ogunrinu G, & Behringer RR (2000). Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis* **26**, 145-146.

Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, & Goltzman D (2001). Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7498-7503.

Pechak DG, Kujawa MJ, & Caplan AI (1986). Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs. *Bone* **7**, 459-472.

Peress NS, Anderson HC, & Sajdera SW (1974). The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif Tissue Res* **14**, 275-281.

Pettifor JM & Prentice A (2011). The role of vitamin D in paediatric bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**, 573-584.

Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, & Costantini F (1994). Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* **13**, 1189-1196.

PRADER A, ILLIG R, & HEIERLI E (1961). [An unusual form of primary vitamin D-resistant rickets with hypocalcemia and autosomal-dominant hereditary transmission: hereditary pseudo-deficiency rickets]. *Helv Paediatr Acta* **16**, 452-468.

- Primm TP & Gilbert HF (2001). Hormone binding by protein disulfide isomerase, a high capacity hormone reservoir of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**, 281-286.
- Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, & Guzman NA (1979). The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med* **301**, 13-23.
- Quarto R, Campanile G, Cancedda R, & Dozin B (1992). Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J Cell Biol* **119**, 989-995.
- Ralphs JR & Ali SY. Histochemical localization of alkaline phosphatase in rabbit distal ulnar growth plate. 424[*Elsevier Science Pub*]. 1986.
Ref Type: Generic
- Rasmussen H, Matsumoto T, Fontaine O, & Goodman DB (1982). Role of changes in membrane lipid structure in the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Fed Proc* **41**, 72-77.
- Rassow J., Hauser K., Netzker R., & Deutzmann R. Biochemie. 2008.
Ref Type: Generic
- Reginato AM, Lash JW, & Jimenez SA (1986a). Expression of type X collagen mRNA levels in embryonic chick sternum during development. *Biochem Biophys Res Commun* **137**, 1125-1132.
- Reginato AM, Lash JW, & Jimenez SA (1986b). Biosynthetic expression of type X collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J Biol Chem* **261**, 2897-2904.
- Roach HI (1997). New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res* **12**, 795-805.
- Rowling MJ, Gliniak C, Welsh J, & Fleet JC (2007). High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *J Nutr* **137**, 2608-2615.
- Rutsch F & Terkeltaub R (2003). Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 302-310.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, & Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

- Sakai K, Hiripi L, Glumoff V, Brandau O, Eerola R, Vuorio E, Bosze Z, Fassler R, & Aszodi A (2001). Stage- and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biol* **19**, 761-767.
- Salle BL, Rauch F, Travers R, Bouvier R, & Glorieux FH (2002). Human fetal bone development: histomorphometric evaluation of the proximal femoral metaphysis. *Bone* **30**, 823-828.
- Sanchez CP, Salusky IB, Kuizon BD, Abdella P, Juppner H, & Goodman WG (1998). Growth of long bones in renal failure: roles of hyperparathyroidism, growth hormone and calcitriol. *Kidney Int* **54**, 1879-1887.
- Sandberg M & Vuorio E (1987). Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. *J Cell Biol* **104**, 1077-1084.
- Schipani E & Provot S (2003). PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 352-362.
- Schmid TM & Linsenmayer TF (1985a). Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* **100**, 598-605.
- Schmid TM & Linsenmayer TF (1985b). Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Dev Biol* **107**, 373-381.
- Schwartz Z, Graham EJ, Wang L, Lossdorfer S, Gay I, Johnson-Pais TL, Carnes DL, Sylvia VL, & Boyan BD (2005). Phospholipase A2 activating protein (PLAA) is required for 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ signaling in growth plate chondrocytes. *J Cell Physiol* **203**, 54-70.
- Schwartz Z, Nasatzky E, Ornoy A, Brooks BP, Soskolne WA, & Boyan BD (1994). Gender-specific, maturation-dependent effects of testosterone on chondrocytes in culture. *Endocrinology* **134**, 1640-1647.
- Schwartz Z, Schlader DL, Swain LD, & Boyan BD (1988). Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ and 24,25-dihydroxyvitamin D $_3$ on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A $_2$ specific activities. *Endocrinology* **123**, 2878-2884.
- Schwartz Z, Swain LD, Ramirez V, & Boyan BD (1990). Regulation of arachidonic acid turnover by 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ and 24,25-(OH) $_2$ D $_3$ in growth zone and resting zone chondrocyte cultures. *Biochim Biophys Acta* **1027**, 278-286.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G,

Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, & Boyle WJ (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319.

Sims NA, Jenkins BJ, Nakamura A, Quinn JM, Li R, Gillespie MT, Ernst M, Robb L, & Martin TJ (2005). Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* **20**, 1093-1102.

Somjen D, Weisman Y, Mor Z, Harell A, & Kaye AM (1991). Regulation of proliferation of rat cartilage and bone by sex steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 717-723.

Sovio U, Bennett AJ, Millwood IY, Molitor J, O'Reilly PF, Timpson NJ, Kaakinen M, Laitinen J, Haukka J, Pillas D, Tzoulaki I, Molitor J, Hoggart C, Coin LJ, Whittaker J, Pouta A, Hartikainen AL, Freimer NB, Widen E, Peltonen L, Elliott P, McCarthy MI, & Jarvelin MR (2009). Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern Finland birth cohort 1966. *PLoS Genet* **5**, e1000409.

St-Arnaud R (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **473**, 225-230.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, & McMahon AP (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **13**, 2072-2086.

Stevenson S, Hunziker EB, Herrmann W, & Schenk RK (1990). Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *J Orthop Res* **8**, 132-135.

Stubbs JR & Wetmore JB (2011). Does it matter how parathyroid hormone levels are suppressed in secondary hyperparathyroidism? *Semin Dial* **24**, 298-306.

Stumpf WE, Sar M, Clark SA, & DeLuca HF (1982). Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* **215**, 1403-1405.

Suda T, Takahashi N, & Martin TJ (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* **13**, 66-80.

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, & Takahashi N (1995). Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* **17**, 87S-91S.

Swain LD, Schwartz Z, & Boyan BD (1992). 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ regulation of arachidonic acid turnover in chondrocyte cultures is cell maturation-specific and may involve direct effects on phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* **1136**, 45-51.

Swain LD, Schwartz Z, Caulfield K, Brooks BP, & Boyan BD (1993). Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ is dependent on cell maturation. *Bone* **14**, 609-617.

Sylvia VL, Schwartz Z, Curry DB, Chang Z, Dean DD, & Boyan BD (1998). 1,25(OH)₂D₃ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-dependent pathways involving phospholipase A₂ and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *J Bone Miner Res* **13**, 559-569.

Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R, & Boyan BD (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D₃ metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol* **157**, 271-278.

Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, & Suda T (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600-2602.

Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Isogai Y, & Suda T (1991). Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. *Endocrinology* **128**, 1792-1796.

Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K, Kato S, Matsumoto T, & Fujita T (1999). Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* **140**, 1005-1008.

Takeuchi M, Kakushi H, & Tohkin M (1994). Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 905-911.

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, & Suda T (1993). Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* **91**, 257-263.

Tsonis PA (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates chondrogenesis of the chick limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol* **143**, 130-134.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, Martin TJ, & Suda T (1989). The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* **125**, 1805-1813.

Underwood JL & DeLuca HF (1984). Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* **246**, E493-E498.

Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van HE, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, & Carmeliet G (2001). Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13324-13329.

von der Mark K, von der Mark H, & Gay S (1976). Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localization of type I and type II collagen during long bone development. *Dev Biol* **53**, 153-170.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, & Tabin CJ (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613-622.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, & Werb Z (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411-422.

Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, Constable MJ, Nicholson GC, Zhang JG, Nicola NA, Gillespie MT, Martin TJ, & Sims NA (2010). Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* **120**, 582-592.

Wang Y, Chen J, Lee CS, Nizkorodov A, Riemenschneider K, Martin D, Hyzy S, Schwartz Z, & Boyan BD (2010). Disruption of *Pdia3* gene results in bone abnormality and affects 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-induced rapid activation of PKC. *J Steroid Biochem Mol Biol* **121**, 257-260.

Weissen-Plenz G, Nitschke Y, & Rutsch F (2008). Mechanisms of arterial calcification: spotlight on the inhibitors. *Adv Clin Chem* **46**, 263-293.

Wolbach SB & Hegstedt DM (1952). Endochondral bone growth in the chick. *AMA Arch Pathol* **54**, 1-12.

Wolpert L (1981). Cellular basis of skeletal growth during development. *Br Med Bull* **37**, 215-219.

Wong M & Carter DR (1990). A theoretical model of endochondral ossification and bone architectural construction in long bone ontogeny. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 523-532.

- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, & Koopman P (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* **9**, 15-20.
- Wu LN, Genge BR, Lloyd GC, & Wuthier RE (1991). Collagen-binding proteins in collagenase-released matrix vesicles from cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen. *J Biol Chem* **266**, 1195-1203.
- Wu LN, Sauer GR, Genge BR, & Wuthier RE (1989). Induction of mineral deposition by primary cultures of chicken growth plate chondrocytes in ascorbate-containing media. Evidence of an association between matrix vesicles and collagen. *J Biol Chem* **264**, 21346-21355.
- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, & O'Brien CA (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* **17**, 1235-1241.
- Yamashita T, Asano K, Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Martin TJ, & Suda T (1990). Cloning of an osteoblastic cell line involved in the formation of osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* **145**, 587-595.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, & Higashio K (1998a). Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, 1329-1337.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, & Suda T (1998b). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3597-3602.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, & Nishikawa S (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* **345**, 442-444.
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, & Kato S (1997). Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* **16**, 391-396.

Zerega B, Cermelli S, Bianco P, Cancedda R, & Cancedda FD (1999). Parathyroid hormone [PTH(1-34)] and parathyroid hormone-related protein [PTHrP(1-34)] promote reversion of hypertrophic chondrocytes to a prehypertrophic proliferating phenotype and prevent terminal differentiation of osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **14**, 1281-1289.

Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, & O'Keefe RJ (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* **118**, 429-438.

6 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei

...Herrn Professor Dr. Peter Bruckner für die Möglichkeit danken, die Dissertation in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, und für seine hilfreiche Unterstützung.

...Herrn Martin Professor Dr. Bähler für die Übernahme der externen Betreuung durch den Fachbereich Biologie.

...Dr. Rita Dreier für die Betreuung während der Doktorarbeit, für die vielen Tipps & Tricks, die positive Motivation, viele hilfreiche Diskussionen – einfach für deine Unterstützung.

...Dr. N. Garbi aus Heidelberg und Dr. A. Aszodi aus München für die Bereitstellung der Mäuse, Dr. A. Niehoff aus Köln für die Analyse der Femura im pQCT.

...meine Kollegen in der dritten Etage: für all die Hilfe und die tolle Zusammenarbeit. Besonderen Dank an * Marianne für die Hilfe nicht nur zu Anfang meiner Arbeit und für die Ehrlichkeit über die ganze Zeit * Ulrike die mich gerade zum Ende sehr unterstützt hat, so dass ich auch mit wachsendem Bauch noch alles schaffen konnte.

...Tobi, Isa und Adaobi, danke ihr drei für die tolle Zeit zusammen im Labor, ohne euch hätte ich das nicht geschafft! Wir sind jetzt leider keine Kollegen mehr, aber die Freundschaft zu euch nimmt mir niemand!

...Sandra und Birgit, die mir am Anfang meiner Dr. Arbeit zur Seite standen.

...Carla, Katharina, Jeannine schön, dass es auch über die dritte Etage hinaus so tolle Menschen gibt die einen unterstützen und mit denen man sehr gerne befreundet ist!

...bei meiner Familie für die tolle Unterstützung zu jeder Zeit, man kann sich einfach keine bessere Familie wünschen!

...meinem Mann – dafür, dass du immer für mich da warst und bist, mich aufgemuntert und ermutigt hast und mich einfach so liebst wie ich bin.

