

Aus dem  
Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner

Proteasen sind essentielle Faktoren in der Kontrolle der  
Spätdifferenzierung von Chondrozyten während der Knochenbildung

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Mainz, Tom  
Berlin  
2010



Aus dem  
Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner

Proteasen sind essentielle Faktoren in der Kontrolle der  
Spätdifferenzierung von Chondrozyten während der Knochenbildung

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Mainz, Tom  
Berlin  
2010

GEDRUCKT MIT DER GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT

DEKAN: UNIV.-PROF. DR. MED. WILHELM SCHMITZ

1. BERICHTERSTATTER: UNIV.-PROF.DR.PHIL.PETER BRUCKNER
2. BERICHTERSTATTER: PROF.UDO STRATMANN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 20.05.2010

Aus dem  
Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie  
Direktor: Univ.-Prof.Dr.Phil.Peter Bruckner

Referent: Univ.-Prof.Dr.Phil.Peter Bruckner  
Koreferent: Prof. Dr. U. Stratmann

## ZUSAMMENFASSUNG

### Proteasen sind essentielle Faktoren in der Kontrolle der Spätdifferenzierung von Chondrozyten während der Knochenbildung

Tom Mainz

Während der endochondralen Ossifikation wird Knorpelgewebe aus einer Anlage aus Knorpel gebildet. Diesem Ersatz des einen Gewebetyps durch einen anderen geht eine Reihe von Prozessen voraus, die als Chondrozytenspätdifferenzierung bezeichnet werden. Diese Prozesse sind in der epiphysären Wachstumsfuge zu beobachten, wo die säulenartig geordneten Chondrozyten sequenziell unterschiedliche Reifungsstadien durchlaufen. Die Spätdifferenzierung beginnt mit der Proliferation kleiner, metabolisch wenig aktiver Ruhechondrozyten. Nach einigen Teilungszyklen dieser Zellen wird die Proliferation beendet und ihr Volumen vergrößert sich. Diese hypertrophen Chondrozyten sind, neben ihren morphologischen Merkmalen, durch die Synthese spezifischer Differenzierungsmarker, vor allem Kollagen X und ALP, gekennzeichnet. Die Zellen bilden aktiv eine spezielle Matrix (Extrazelluläre Matrix), nach deren Calcifizierung die Vaskularisierung des Knorpels mit anschließendem Ersatz durch Knochen erfolgt.

Während die Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation in der Wachstumsfuge teilweise über Jahre erfolgt, ist sie im Hühnersternum zeitlich und räumlich begrenzt. Chondrozyten des kranialen Teils, dessen Verknöcherung noch in ovo beginnt und innerhalb der ersten Lebensmonate vollendet wird, proliferieren und werden bereits während der embryonalen Entwicklung hypertroph. Die Zellen des kaudalen Teils, der bei juvenilen Tieren knorpelig ist und erst später durch Knochen ersetzt wird, behalten hingegen über längere Zeit den Ruhechondrozytenphänotyp bei. Somit repräsentiert das kraniale Sternum die Spätdifferenzierung mit anschließender Ossifikation und das kaudale Sternum die blockierte Spätdifferenzierung.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die negativ kontrollierte Hypertrophieblockade von kranialen Chondrozyten durch Proteasen an verschiedenen Checkpoints modifiziert, bzw. aufgehoben wird. Diese Proteasen können nach Stimulation mit IGF-I, Insulin oder Thyroxin von den Chondrozyten selbst synthetisiert werden, wobei die Stimulation durch T4 stärker zu sein scheint als durch IGF-I oder Insulin. Durch die ubiquitären Eigenschaften von Proteasen sind sie in der Lage in nahezu allen vorher beschriebenen Regulationsmechanismen in der Wachstumsfuge eine modifizierende Rolle einzunehmen. Noch ist nicht bekannt auf welche Mechanismen bzw. Strukturen genau die Proteasen einwirken.

Bei der Osteoarthrose findet pathologischer Weise ebenfalls eine Deblockade der Spätdifferenzierung statt, die eine Degeneration der Knorpeligen Anteile der Gelenke zur Folge hat. Somit sollten Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Deblockade, physiologisch bei der enchondralen Ossifikation, pathologisch bei der Osteoarthrose, Aufschlüsse über das Krankheitsbild der Osteoarthrose liefern.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2010

# INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel 1	Einleitung	Seite 6
1.1	Knorpel: Bedeutung und Entwicklung während der Ossifikation	Seite 6
1.2	Mesenchymale Stammzellen	Seite 7
1.3	Knochenentwicklung	Seite 8
1.3.1	Desmale Ossifikation	Seite 8
1.3.2	Chondrale Ossifikation	Seite 9
1.3.3	Perichondrale Ossifikation	Seite 9
1.3.4	Enchondrale Ossifikation	Seite 9
1.4	Wachstumsfuge: Regulation und Entwicklung	Seite 11
1.4.1	Die Wachstumsfuge im Allgemeinen	Seite 11
1.4.2	Strukturelle Organisation der Wachstumsfuge	Seite 12
1.5	Proteine der Extrazellulären Matrix (ECM) der Wachstumsfuge	Seite 13
1.5.1	Kollagen	Seite 14
1.5.2	MMPs	Seite 15
1.5.3	Stoffwechsel und Turnover der Kollagene und Proteoglykane	Seite 15
1.5.4	Wachstumsfaktoren	Seite 16
1.6	Hormonelle Regulation der Wachstumsfuge	Seite 16
1.6.1	Das GH-IGF-I-System	Seite 16
1.6.1.1	Hypothesen über die Wirkung von GH und IGF-I auf das longitudinale Wachstum	Seite 17
1.6.2	Schilddrüsen-Hormone	Seite 18
1.6.3	Weitere hormonelle Regulationsmechanismen	Seite 20
1.7	Lokale Regulation der Wachstumsfuge	Seite 21
1.7.1	Indian Hedgehog (Ihh)	Seite 22
1.7.2	PTH-related Peptide (PTHrP)	Seite 23
1.7.3	Fibroblast growth factors (FGF)	Seite 24
1.7.4	Bone morphogenic proteins( BMP) / Transforming growth factor TGF- $\beta$	Seite 25
1.7.5	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Seite 25

1.7.6	Vitamin D	Seite 26
1.8	Osteoarthrose	Seite 28
Kapitel 2	Fragestellung dieser Arbeit	Seite 29
Kapitel 3	Material & Methoden	Seite 29
3.1	Verwendete Lösungen & Reagenzien	Seite 30
3.2	Zellkultur	Seite 31
3.3	Bestimmung der Zellzahl	Seite 32
3.4	Kollagenpräparation aus Kulturmedien	Seite 33
3.5	SDS-Page	Seite 33
3.6	Autoradiographie	Seite 33
3.7	Bestimmung der alkalischen Phosphatase	Seite 34
Kapitel 4	Ergebnisse	Seite 34
4.1	Beeinflussung der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch Proteaseninhibitoren	Seite 34
4.2	Unterschiede zwischen den Stimulationsmechanismen bei Insulin und Thyroxin	Seite 37
4.3	Auswirkungen von verschiedenen Konzentrationen der Proteasen- Inhibitoren auf die Kollagen-X-Synthese	Seite 40
4.4	Zeitliche Zusammenhänge zwischen Wachstumsstimulanzen und Proteasen	Seite 42
Kapitel 5	Diskussion	Seite 44
Kapitel 6	Zusammenfassung	Seite 50



### 1.1 KNORPEL: BEDEUTUNG UND ENTWICKLUNG WÄHREND DER ENCHONDRALEN OSSIFIKATION

---

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben. Er besteht aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und der charakteristischen Extrazellulären Matrix (EZM). Von anderen Bindegeweben unterscheidet sich Knorpel durch seine Festigkeit, vom Knochen dadurch, dass Knorpel nur aus organischem Material besteht. Knorpel ist daher schneidbar. Er hat die Eigenschaft, bei Druck und Zug verformbar zu sein und beim Nachlassen dieser Kräfte in seine Ursprungsform zurückzukehren. Man spricht dabei auch von Druckelastizität. Die Oberfläche von Knorpel ist in der Regel glatt.

Knorpel vermag somit Gewicht zu tragen. Übertroffen wird er darin nur vom Knochen.

In Gelenken begünstigt Knorpel das Gleiten der Skeletteile gegeneinander (permanenter Knorpel). Darüber hinaus ist Knorpel in der Entwicklungsphase Vorläufer von Knochen die durch chondrale Ossifikation entstehen (Ersatzknorpel); später ist er auch für das Wachstum von Röhrenknochen wichtig.

Knorpelzellen liegen in einer territorialen Matrix. Sie synthetisieren und enthalten die Matrix. Ein Chondrozyt kann definiert werden als eine Zelle, die in eine Knorpelmatrix eingebettet ist. Traditionell kann Knorpel eingeteilt werden in hyalinen Knorpel, elastischen Knorpel und Faserknorpel. Diese Einteilung beruht auf seinem morphologischen und histologischen Erscheinungsbild sowie auf seiner Entwicklungsgeschichte. Vom Interesse bei dieser Arbeit ist vorrangig die Differenzierung von Chondrozyten des hyalinen Knorpels.

Im Körper wird hyaliner Knorpel auf den Gelenkflächen, in einer kleiner Zahl von Knochen, die während des gesamten Lebens des Säugers knorpelig bleiben (permanenter Knorpel) und in den anfänglichen Knorpelmodellen von Wirbelsäule, Becken, und Extremitäten, die während der Embryogenese gebildet werden und nachträglich durch Knochen ersetzt werden, gefunden. Dieser Knorpeltyp persistiert nach der Geburt bis zur sexuellen Reife in der Wachstumsfuge von langen Knochen.

Der Entwicklung von knorpeligen Anlagen geht die Vermehrung einer kleinen Anzahl von mesenchymalen Stammzellen voraus. Ihre Vermehrung, Differenzierung und die

Bildung eines homogenen Gewebes wie Knorpel hängt sowohl von ihrem genetischen Potenzial (Master und Kontrollgene) als auch von ihrer lokalen Mikroregulation (parakrine und autokrine Regulation) ab.

## 1.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN

---

Chondrozyten entwickeln sich aus multipotenten mesenchymalen Zellen.

Vorläuferzellen wurden geklont und es konnte gezeigt werden, dass sie fähig sind, sich *in vitro* zu verschiedenen mesenchymalen Phänotypen zu differenzieren (Caplan, 1991). Der Differenzierungsprozess umfasst vier definierte Schritte: 1. Proliferation, 2. Wachstumsstopp vor der Differenzierung, 3. reversible nicht abgeschlossene Differenzierung, 4. abschließende Differenzierung, verbunden mit dem unwiderruflichen Verlust an Vermehrungspotential.

In den frühen Stadien der Entwicklung ist der Chondrozyten-Phänotyp instabil. Verschiedene Forschungsgruppen haben gezeigt, dass die Zellen unter bestimmten Bedingungen wie Monolayerkultur, die Synthese der extrazellulären Makromoleküle umschalten. Sie schalten die Produktion von Knorpelspezifischen Proteoglykanen und Typ II Kollagen auf die Produktion von Typ I Kollagen, welches charakteristisch für Knorpelvorläuferzellen ist, um (Coon, 1966; Mayne et al., 1976; Muller et al., 1977).

Kulturen, die mit Chondrozyten angereichert waren, konnten aus dem Knochenmark von ausgewachsenen Kaninchen gewonnen werden (Robinson et al., 1993). Pluripotente mesenchymale Stammzellen wurden auch innerhalb des Gewebes von Skelettmuskeln, Fett, Knorpel und Knochen gefunden. Werden Zellklone, die indifferent von allen Geweben gewonnen wurden, mit Dexamethason kultiviert, differenzieren sie in einer Zeit- und Konzentrationsabhängigen Art und Weise zu Muskel-, Fett-, Knorpel- und Knochen-Phänotypen (Young et al., 1993). Die Entwicklung von Chondrozyten konnte auch von Stammzellen aus beginnen, die aus dem Periost gewonnen wurden. Kultivierte Zellen aus dem Periost von Hühnerknochen zeigten einen undifferenzierten Phänotyp. Als sie zuerst *in vitro* in einem Monolayer unterhalten wurden, anschließend in nackte, Schilddrüsenlose Mäuse implantiert wurden, offenbarten Sie jedoch das Potential zur Bildung von Knorpel und Knochen (Nakahara et al., 1990). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass undifferenzierte mesenchymale Zellen mit Knorpelgenetischem Potenzial in verschiedenen Geweben und Regionen des Körpers vorkommen.

### 1.3 KNOCHENENTWICKLUNG

---

Knochen entsteht entweder desmal oder chondral.

Bei der desmalen Ossifikation geht Knochen unmittelbar aus dem Mesenchym vor; deswegen wird diese Art der Knochenbildung auch als direkte Knochenbildung bezeichnet. Der so entstandene Knochen ist Bindegewebsknochen (Deckknochen).

Bei der chondralen Ossifikation entsteht zunächst ein Knorpelmodell, das schrittweise umgewandelt und durch Knochen ersetzt wird. Diese Art der Knochenbildung ist eine indirekte Knochenbildung. Es ist bislang nicht geklärt, wo die für die Knochenbildung verantwortlichen Osteoblasten herkommen. Es gilt jedoch als gesichert, dass die Vaskularisierung des Knorpels eine notwendige Voraussetzung für die Ossifikation ist. In beiden Fällen, bei der desmalen wie auch bei der chondralen Ossifikation ist das zunächst gebildete Knochengewebe unreif (primär). Es besteht aus Geflechtknochen. Dieser wird jedoch wieder abgebaut (resorbiert) und durch (reifen) Lamellenknochen ersetzt. Beim Lamellenknochen handelt es sich daher um Ersatzknochen.

#### 1.3.1 DESMALE OSSIFIKATION

---

Die desmale Ossifikation ist die häufigste Art der Knochenbildung. So entstehen z.B. die perichondralen Knochenmanschetten aller Röhrenknochen nach diesem Modus und auch der Knochen auf der Oberfläche von Knorpelresten während der chondralen Ossifikation sowie bei der Knochenbruchheilung wird desmal gebildet. Die Entstehung ganzer Knochen allein durch desmale Ossifikation ist allerdings selten und auf einige Schädelknochen bzw. Teile davon beschränkt, nämlich Os frontale, Os parietale, Teile der Ossa temporalia, occipitale, mandibulare, maxillare. Postnatal erfolgt die Verknöcherung der Fontanellen desmal.

Die Mechanismen der desmalen Ossifikation sind für diese Arbeit von eher geringer Bedeutung und sollen hier nicht weiter beschrieben werden.

### 1.3.2 CHONDRALE OSSIFIKATION

---

Die chondrale Ossifikation geht von Knochenmodellen aus hyalinem Knorpel aus. Die Form des Modells entspricht in etwa der des zu bildenden Knochens, ist jedoch vergleichsweise plump und weist keine Details auf. Grundsätzlich spielen sich während der chondralen Ossifikation, zeitlich etwas gegeneinander versetzt, 2 Vorgänge ab, nämlich

- perichondrale Ossifikation (Ossificatio perichondralis)
- enchondrale Ossifikation (Ossificatio enchondralis).

Dann folgen Umbauvorgänge, bei denen aus Geflechtknochen über verschiedene Zwischenstufen Lamellenknochen wird.

Bei der perichondralen Ossifikation handelt es sich um eine desmale Knochenbildung an der Oberfläche des Schaftteils des Knorpelmodells. Bei der enchondralen Ossifikation wird vorhandener Knorpel abgebaut und durch Knochen ersetzt.

### 1.3.3 PERICHONDRALE OSSIFIKATION

---

Diese Knochenneubildung geht vom Perichondrium aus, wird dann aber von dem nun als Periost zu bezeichnenden osteogenen Gewebe weitergeführt. Schließlich ist der Knorpelschaft ringsum von einer recht unregelmäßig gestalteten Manschette aus Geflechtknochen umgeben. Diese Knochenmanschette reicht bis in das Übergangsgebiet zwischen Diaphyse und Epiphysen.

### 1.3.4 ENCHONDRALE OSSIFIKATION

---

Die enchondrale Ossifikation schreitet mit der Ausbildung eines primären Ossifikationszentrums in der Diaphyse und eines sekundären Ossifikationszentrums in der Epiphyse voran. Zwischen der Epiphyse und der Diaphyse liegt die Wachstumsfuge (Blumer et al., 2008)

Hormonelle und lokale Regulationsmechanismen (Kapitel 1.6 und 1.7) führen dazu, dass die Chondrozyten der Wachstumsfuge anfangen, die umgebende Grundsubstanz zu resorbieren. Dadurch vergrößern sich sowohl die Höhlen, in denen die Knorpelzellen liegen, als auch die Knorpelzellen selbst. Die Knorpelzellen hypertrophieren. Knorpel

dieses Zustandes wird als Blasenknorpel bezeichnet. In weiterer Folge kommt es zur Degeneration der Knorpelzellen und damit zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Ernährung der Knorpelgrundsubstanz. Die Folge ist das Auftreten von Calciumniederschlägen in der Knorpelgrundsubstanz, d.h. eine Verkalkung des Knorpels.

An der Oberfläche der perichondralen Knochenmanschette (siehe perichondrale Ossifikation) werden bald Osteoklasten tätig. Diese bauen die neugebildete Knochensubstanz in umschriebenen Bezirken ab, sodass Löcher in der Knochenmanschette entstehen. In diese wachsen aus dem Periost, induziert durch die Hypoxie im Knorpelgewebe, Blutgefäße zusammen mit undifferenzierten Mesenchymzellen ein und gelangen in den geschädigten Knorpel unter der Knochenmanschette.

Diese Neovaskularisierung des Knorpelmodells ist eine Grundvoraussetzung für die enchondrale Ossifikation. Dieser Vorgang erfordert eine Exkavation der Knorpelmatrix die daraufhin durch Knochenmatrix ersetzt wird. Es entstehen Kanäle in der Knorpelmatrix, die den Blutgefäßen ermöglichen einzuwachsen. Mesenchymale Zellen in den Knorpelkanälen exprimieren Knochen-relevante Proteine und transformieren in Osteozyten (Blumer et al., 2008).

Teilweise wird also Knorpelgrundsubstanz resorbiert, durch Knochensubstanz ersetzt, und teilweise wird auf der Oberfläche von verkalkter Knorpelgrundsubstanz Knochen neu gebildet.

## 1.4 WACHSTUMSFUGE: REGULATION UND ENTWICKLUNG

---

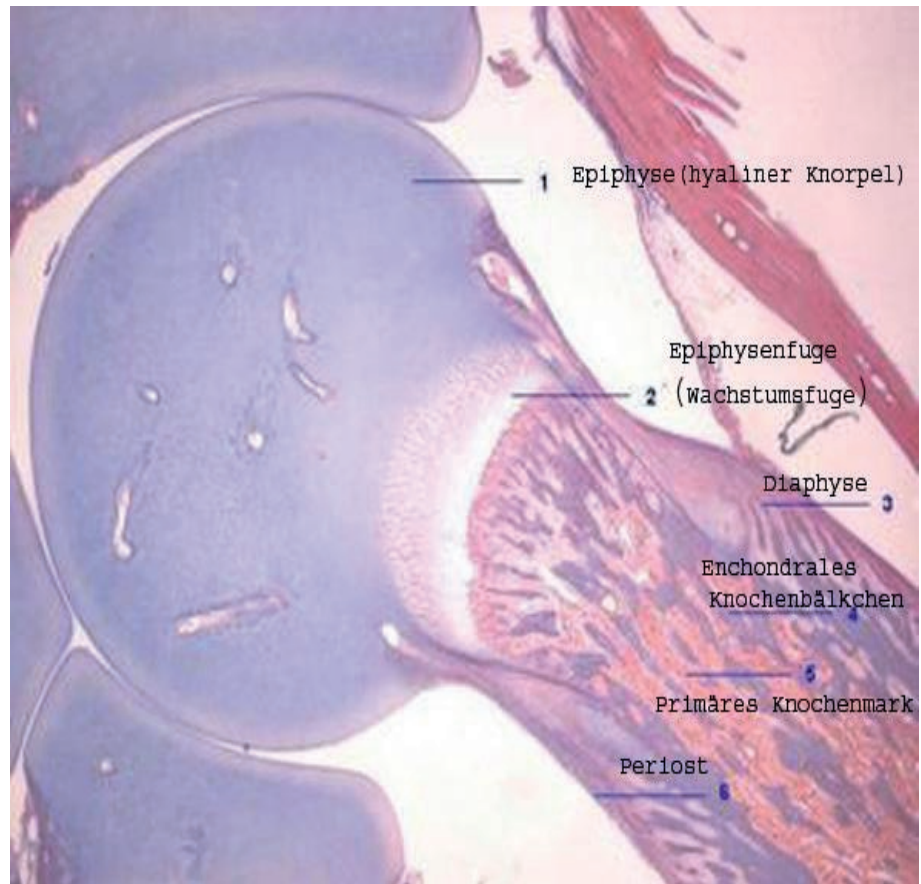


ABB.1 :

[WWW.KGU.DE:80/ZMORPH/HISTOPATHO/HISTO3/DATA/GEWEBE/DE/022\\_A.H](http://WWW.KGU.DE:80/ZMORPH/HISTOPATHO/HISTO3/DATA/GEWEBE/DE/022_A.H)  
TML

---

### 1.4.1 DIE WACHSTUMSFUGE IM ALLGEMEINEN

---

Die Wachstumsfuge ist eine streng organisierte Knorpelstruktur, die zwischen der Epiphyse und der Diaphyse am distalen Ende von langen Knochen liegt. Sie wird daher auch als Metaphyse bezeichnet. Das Längenwachstum dieser Knochen erfolgt nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation. In der Wachstumsfuge sind die Chondrozyten säulenartig je nach Differenzierungsgrad in verschiedenen Zonen angeordnet (Hunziker, 1994).

##### **Reservezone:**

An dem Ende der Wachstumsfuge, welches an der Grenze zur Epiphyse liegt, enthält die Reservezone die ruhenden Chondrozyten. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der säulenartigen Orientierung und Anordnung der darunter liegenden Chondrozyten und somit beim unidirektionalen Wachstum. Vermittelt wird diese Funktion vermutlich durch die Sekretion eines Orientierungsfaktors (Abad et al., 2002) und darüber hinaus durch Zell-Matrix-Wechselwirkungen (Aszodi et al., 2003).

##### **Proliferationszone:**

Unter Einfluss eines unbekanntes Auslösers treten die Ruhechondrozyten in die so genannte Proliferationszone ein. In dieser matrixreichen Zone fangen die ursprünglich abgeflachten Zellen an, sich in vertikaler Richtung zu teilen und sich in der typischen säulenartigen Formation anzuordnen. Sie beginnen eine bedeutende Menge an extrazellulären Matrix-(ECM)-Proteinen zu synthetisieren, die essenziell für die Struktur der ECM der Wachstumsfuge sind.

##### **Übergangszone:**

Zu einem vorgegebenen Zeitpunkt entweder bestimmt durch eine Anzahl von Zellteilungen oder durch die Änderung der Sensibilität für einem bestimmten lokalen Wachstumsfaktor (z.B. PTHrP) verlieren die Chondrozyten der Proliferationszone ihre Fähigkeit, sich zu teilen und gehen in einen prähypertrophen Zustand über, der durch eine Größenzunahme gekennzeichnet ist (Gafni et al., 2001; Minina et al., 2002)

##### **Hypertrophiezone:**

Hier sind die Zellen in ihrer Gestalt rundlich und sie sezernieren eine große Menge an ECM. Dieses Stadium ist gekennzeichnet von einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies ist notwendig für die hohe Produktion von Matrixvesikeln, kleine Abschnürungen der Zellmembran, die von den Chondrozyten abgegeben werden (Anderson, 2003; Wang and Kirsch, 2002). Sie enthalten große Mengen an Annexinen, die die Aufnahme von Kalzium in die Vesikel ermöglichen (Kirsch et al., 2000a; Wang et al., 2003).

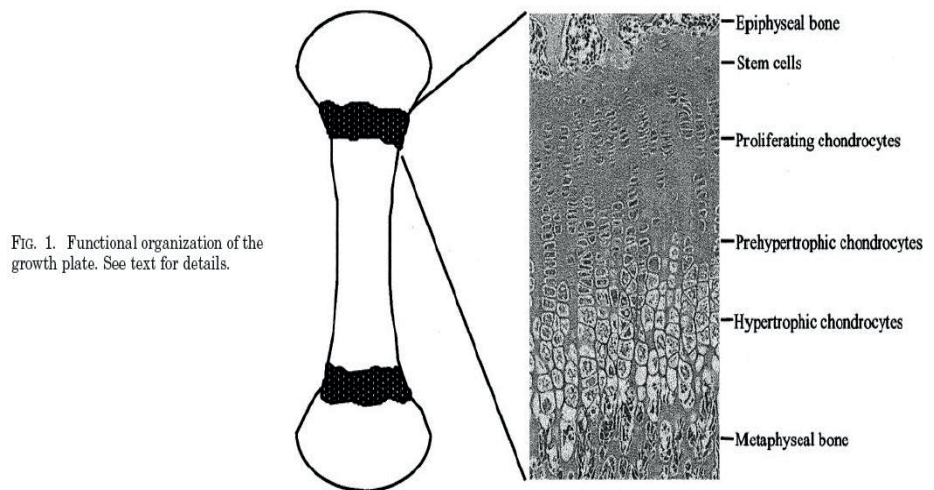


FIG. 1. Functional organization of the growth plate. See text for details.

**ABB. 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTIONELLEN ORGANISATION DER WACHSTUMSFUGE (VAN DER EERDEN ET AL., 2003)**

Die entstehende Hypoxie ist verantwortlich für die Expremierung von VEGF, welche sowohl über einen HIF-1-alpha (hypoxia-inducible factor alpha)abhängigen und unabhängigen Mechanismus reguliert wird. VEGF führt zur Einsprossung von Blutgefäße aus der darunter liegenden Spongiosa (Schipani *et al.*, 2001). Nach und nach sterben die hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose ab und hinterlassen ein Gerüst für die Formation von neuem Knochen, welcher von Osteoblasten gebildet wird (Siehe Peri- und Enchondrale Ossifikation).

**1.5 PROTEINE DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX (ECM) DER WACHSTUMSFUGE**

Die Chondrozyten sind in einer sie umgebenden Matrix eingebettet, welche die Chondrozyten unterstützend versorgt und aus ECM-Molekülen, ECM-umbauenden Enzymen und verschiedenen Wachstumsfaktoren besteht.



### 1.5.1 KOLLAGEN

Kollagenfasern spielen eine dominante Rolle bei der Aufrechterhaltung der biologischen und strukturellen Einheit bzw. Integrität von verschiedenen Geweben wie Knochen, Haut, Sehnen, Blutgefäßen und Knorpel.

Die Familie der Kollagene ist hauptsächlich zusammengesetzt aus fibrillären Kollagenen und Kollagenen mit globulären Domänen. Bis jetzt wurden 44 Gene für 26 verschiedene Kollagentypen identifiziert.

Die meisten Kollagene sind mit verschiedenen Proteinen der ECM (z.B. Aggrecan) oder mit anderen Kollagenen verbunden und bilden somit ein Netzwerk in der ECM.

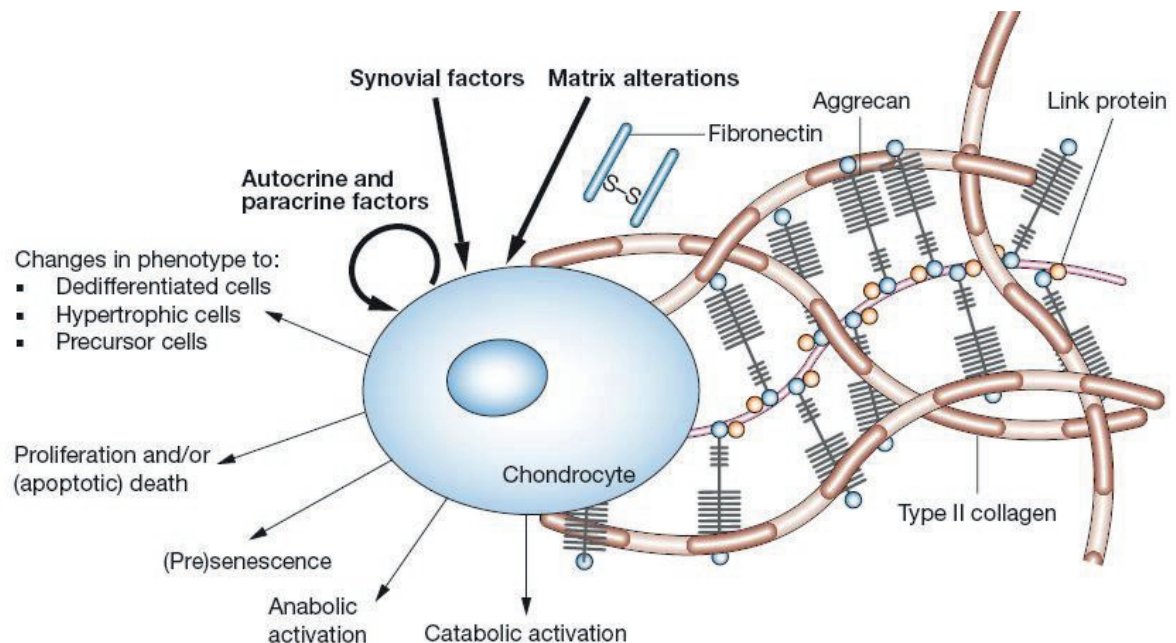


ABB. 2 : SCHEMA DER ZELLBIOLOGIE DER OSTEOATHRITIS (AIGNER ET AL., 2007)

Die Polypeptidstruktur jedes Kollagentyps wird von 3  $\alpha$ -Ketten gebildet. Diese Ketten sind entweder alle drei identisch (Homotrimer) oder nur 2 Ketten (zweimal  $\alpha 1$ ) sind identisch und die letzte ist verschieden (ein Mal  $\alpha 2$ ). Man spricht dann von einem Heterotrimer. Die  $\alpha$ -Ketten sind charakteristisch für jeden Kollagentyp. Sie werden entsprechend dem Kollagentyp nummeriert. So ist bei Kollagen Typ III die Struktur :  $\alpha 1(\text{III})_3$ , es ist also ein Homotrimer, bei Kollagen I :  $\alpha 1(\text{I})_3$ , ebenfalls ein Homotrimer und bei Kollagen II :  $\alpha 1(\text{I})_2 \alpha 2(\text{I})$  handelt es sich um ein Heterotrimer (Kolacna et al., 2007).

Die Synthese der Kollagene beginnt im Endoplasmatischen Retikulum mit der Bildung einer inaktiven Vorstufe, dem sogenannten Pro-Kollagen, bevor sie durch Proteolyse des Pro-Peptides in ihre aktive Form überführt und in die ECM transportiert werden (Kolacna et al., 2007)

Am häufigsten sind die Kollagene I, II und III in der ECM vertreten (Teo et al., 2006).

In der Wachstumsfuge und somit bei der Chondrozytendifferenzierung sind darüber hinaus die Kollagene IX, X und XI von Bedeutung. Vornehmlich in der Proliferationszone, Übergangszone und Hypertrophen Zone, wobei in der hypertrophen Zone von der Produktion von Kollagen II auf die Produktion von Kollagen X umgeschaltet wird. Kollagen X ist somit ein spezifischer Marker für die Hypertrophie von Chondrozyten. Kollagen XI ist immer vergesellschaftet mit Kollagen II.

#### 1.5.2 MMPs

---

Des Weiteren gibt es in der ECM eine Reihe von Enzymen, die am ständigen Umbau der Matrix beteiligt sind. Zu diesen Enzymen gehören die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) und ihre Inhibitoren (TIMP). Sie spielen eine wichtige Rolle beim Umbau und der Degradation der ECM und sind darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der Integrität der Matrix beteiligt sowie der Initialisierung der Angiogenese (Ortega et al., 2003; Werb, 1997). Mäuse mit einem Mangel an z.B. MMP-9 zeigen anormale Vaskularisierung der Wachstumsfuge und Formation der Knochen (Gerber et al., 1999), wohingegen Zerstörung von TIMP-1 bei Mäusen eine gesteigerte Invasionsfähigkeit durch die Basalmembran von primitiven Mesenchymzellen (Vorläuferzellen der Chondrozyten) in vitro hervorruft (Alexander and Werb, 1992). Darüber hinaus hat sich MMP-13 (Kollagenase-3) als essenziell für das Remodeling der ECM in der Übergangszone der Wachstumsfuge herausgestellt (Wu et al., 2002). Hemmung von MMP-13 hemmt die Degradation von Kollagen II welches ubiquitär in der Wachstumsfuge vorkommt und die Expression von Kollagen X unterdrückt, welches wiederum das Haupt-Kollagen der Hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge ist (Wu et al., 2002).

#### 1.5.3 STOFFWECHSEL UND TURNOVER DER KOLLAGENE UND PROTEOGLYKANE

---

Der Turnover aller Moleküle der ECM und somit auch von den Kollagenen und Proteoglykanen ist im Knorpelgewebe sehr langsam (Kolacna et al., 2007). Die

Synthese dieser Proteine steht überwiegend unter dem Einfluss von vielen Wachstumsfaktoren, Katecholaminen und Zytokinen. Ihr Abbau hingegen steht unter dem Einfluss von MMPs. Sie spalten entweder die Moleküle verschiedener Kollagentypen oder anderer Moleküle der ECM in sehr präzise definierte Fragmente oder die MMPs spalten lediglich vorher gebildete Fragmente ab (Vanhoutte et al., 2006).

#### 1.5.4 WACHSTUMSFAKTOREN

---

Die ECM ist ebenfalls ein Reservoir von verschiedenen Wachstumsfaktoren, welche ausgeschüttet werden und die Funktion der Chondrozyten beeinflussen könnten, wenn die ECM abgebaut wird. Außerdem könnte die ECM die Diffusionsfähigkeit verschiedener Wachstumsfaktoren, einschließlich FGF (fibroblast growth factor) und Hedgehogs kontrollieren (lokale Regulation, siehe 1.6).

Die Rolle der Extrazellulären Matrix ist bedeutungsvoll für die Integrität von Knorpel und für das normale Längenwachstum. Aber die Interaktionen zwischen Kollagen, MMPs, Integrinen und der Menge an Wachstumsfaktoren in der ECM ist weitestgehend unbekannt.

#### 1.6 HORMONELLE REGULATION DER WACHSTUMSFUGE

---

Die hauptverantwortlichen systemischen Hormone beim Längenwachstum während der Kindheit sind Wachstumshormon (GH) und IGF-I (Insulin like growth factor), Thyroidhormone (T4 und T3) und Glukokortikoide (GC), wohingegen während der Pubertät die Geschlechtshormone (Androgene und Östrogene) einen herausragenden Einfluss haben.

##### 1.6.1 DAS GH-IGF-I-SYSTEM

---

Für das Knochenwachstum in dem Zeitraum vor der Geburt, so wird angenommen, zeichnen sich in erster Linie IGF-I und -II verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass IGF-I effektiv in einer Konzentration von 25 ng/ml sowohl das klonale Wachstum von fetalen Chondrozyten als auch adulten Chondrozyten stimuliert. GH hingegen beeinflusste weder das Wachstum bei fetalen noch bei adulten Chondrozyten (Vetter et al., 1986). Bei kongenitalem Defizit an GH ist die Körperlänge bei der Geburt nur leicht vermindert, wohingegen bei einem Jungen mit kongenitalem

Defizit an IGF die Körperlänge deutlich reduziert ist (Woods et al., 1996). Nach der Geburt ist GH ein wichtiger Modulator des longitudinalen Knochenwachstums und scheint, zusammen mit IGF-I, der zentrale Schlüsselfaktor der Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumsfugen-Achse zu sein. Dieses Zusammenspiel im GH-IGF-I-System verdeutlichen auch Untersuchungen an Hypophysektomierten Ratten. Hier wurde u.a. deutlich, dass auf der einen Seite IGF's die Auswirkungen, die GH auf das Wachstum hat, vermitteln und auf der anderen Seite GH wiederum diese Vermittlung mittels IGF-Carier-Proteinen moduliert (Zapf et al., 1985).

Die GH-Sekretion der Hypophyse wird streng kontrolliert von der Aktivität von GH-releasing-hormon, GHRH, (Stimulator) und Somatostatin (Inhibitor), die beide vom Hypothalamus ausgeschüttet werden (Root and Root, 2002). GH wird in einer pulsierenden Art und Weise vom Hypothalamus abgegeben, welche bei Jungen regulärer aber mit höheren Peaks ist, wohingegen bei Mädchen die Ausschüttung hormonell bedingt insgesamt unregelmäßig ist (Veldhuis, 1998). Ein Hypophysen-Adenom in der Kindheit oder im Erwachsenenalter führt zu einer erhöhten Ausschüttung von GH, was zu einer Vergrößerung der Hypophyse respektive zu einer Akromegalie führt (Daughaday, 1992; Ezzat, 1997). Anders herum führen Defekte in den GH-sezernierenden Zellen, der Synthese bzw. Ausschüttung von GH an sich oder GH-Desensibilität, sei es durch Defekte am Rezeptor oder IGF-I-Löschung, zu einer starken skelettalen Unterentwicklung (Pfaffle et al., 1993; Rosenfeld et al., 2000; Savage et al., 2001; Wit et al., 1989; Woods and Savage, 1996).

#### 1.6.1.1 HYPOTHESEN ÜBER DIE WIRKUNG VON GH UND IGF-I AUF DAS LONGITUDINALE WACHSTUM

---

GH wirkt auf sein Zielgewebe entweder direkt oder mittels zweier Zwischenstufen: IGF-I und IGF-II. Ihr Name beruht auf der Ähnlichkeit mit dem Hormon Insulin in seiner Struktur und seiner Aktivität. Während IGF-II essentiell für das normale Wachstum von Embryos ist (DeChiara et al., 1991), ist IGF-I ein Ligand mit ununterbrochener Funktion während der Entwicklung und im Erwachsenenalter (Liu et al., 1993).

Es herrscht keine Einigkeit darüber, ob beide IGFs eine einheitliche und vergleichbare Rolle bei der Regulation von Knochenwachstum spielen (Le Roith et al., 2001).

Gemäß der Somatomedin-Hypothese von Salmon und Daughaday (Salmon and Daughaday, 1957) stimuliert GH die IGF-I-Synthese in der Leber, welches dann wiederum die Proliferation der Chondrozyten in der Wachstumsfuge aktiviert und somit zum longitudinalen Wachstum führt. In den 80er Jahren erschienen Studien, die diese Theorie in Frage stellten, da sich zeigte, dass direkt in die Tibia appliziertes GH das Wachstum stimulierte, während die kontralaterale Tibia (Kontrolle) keinerlei erhöhtes Wachstum zeigte (Isaksson et al., 1982). Diese Ergebnisse von Isaksson und Mitarbeitern wurden unterstützt von zwei weiteren Studien an Ratten, die ein gesteigertes Wachstum in der Tibia zeigten, nachdem lokal GH und IGF-I direkt in die Wachstumsfuge injiziert wurde, und im Vergleich zur Tibia der anderen Seite, bei der die Injektion Vehikel vermittelt durchgeführt wurde, weniger gesteigertes Wachstum aufwies (Russell and Spencer, 1985; Schlechter et al., 1986). Interessanter Weise wurde gezeigt, dass lokale Injektion von GH bei Ratten die Anzahl der Chondrozyten erhöhte, die IGF-I synthetisieren (Nilsson et al., 1986). Darüber hinaus wurde angenommen, dass neben GH ebenfalls IGF-I fähig ist, die Stammzellen der Wachstumsfuge zu stimulieren, wenngleich der Effekt schwächer ausgeprägt ist (Hunziker et al., 1994; Ohlsson et al., 1992b). Unterstützend für die direkte Wirkungsweise von GH auf die Wachstumsfuge, wurden GH-Rezeptoren (GHR) auf Chondrozyten der Wachstumsfuge bei Ratten und Menschen gefunden (Barnard et al., 1988; Werther et al., 1993). Interessanter Weise stellte sich heraus, dass das Auftreten von GHR und GHBP (Bindeprotein für GH) in der Wachstumsfuge reguliert wird von GH, T3, T4 und Dexamethason (GC), welche somit alle das Wachstum beeinflussen (Gevers et al., 2002). Aus IGF-I-Defizienz beim Menschen und Mäusen resultiert u.a. ein Zwergwuchs. Die Behandlung mit GH hat hingegen keinen Effekt auf das Längenwachstum und das Körpergewicht bei IGF-I-Defizienz (Liu and LeRoith, 1999; Woods et al., 1996). Weitere Untersuchungen an knock-out Mäusen zeigten, dass IGF-I die Hauptdeterminante für embryonales und post-natales Wachstum ist und die Expression von IGF-I in der post-natalen Periode von GH moduliert wird (Liu and LeRoith, 1999; Lupu et al., 2001; Zhou et al., 1997).

#### 1.6.2 SCHILDDRÜSEN-HORMONE

---

Neben GH sind T3 und zu einem geringeren Anteil seine Vorstufe T4 von großer Wichtigkeit für die normale Reifung von Knochen (Stevens and Williams, 1999). Sowohl kongenitaler Hypothyreodismus als auch T3-Defizienz sind vergesellschaftet mit verlangsamtem Wachstum bei Nagetieren und bei Menschen (Ohlsson et al., 1993;

Schlesinger et al., 1973). Hyperthyreodismus verursacht zwar eine gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit bei Kindern, führt aber auch zu einer verfrühten Fusion der Wachstumsfuge und somit zu einer kurzen Statur (Rivkees et al., 1988; Segni et al., 1999).

Zu den indirekten Effekten von Schilddrüsen-Hormonen auf das Längenwachstum, z.B. durch Beeinflussung der GH-Sekretion (Gothe et al., 1999; Ohlsson et al., 1993), kommt ein zumindest teilweise direkter Effekt, weil Schilddrüsenhormon-Rezeptoren (TR  $\beta$  und TR $\alpha$ 1) bei den Stammzellen der Ruhezone und bei frühen, proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsfugen von Ratten und Menschen gefunden wurden (Abu et al., 1997; Robson et al., 2000).

T3 scheint die Rekrutierung von Stammzellen aus der Ruhezone in die Proliferationszone zu stimulieren (Burch and Van Wyk, 1987; Lewinson et al., 1994; Wakita et al., 1998).

Sein Vorläufer T4 scheint eine stimulierende Rolle bei beiden Prozessen, der Chondrozyten-Differenzierung und –Proliferation, zu spielen (Smeets and van Buul-Offers, 1986). Darüber hinaus scheint T4 die Synthese von Kollagen-II und –X, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Hypertrophie der Chondrozyten einzuleiten (Okubo and Reddi, 2003),(Bohme et al., 1992) was Ergebnisse aus früheren Arbeiten bestätigt (Cancedda et al., 1995).

Neben der Beeinflussung der Sekretion von GH interagieren Schilddrüsen-Hormone mit dem GH-IGF-System auf der Ebene der Wachstumsfuge. T3 fördert die Proliferation von Chondrozyten von Hühnerembryonen indem es die Synthese von IGF-I-mRNA verstärkt. Auch in Chondrozyten-Kulturen aus der Epiphyse von Ratten stimulierte T3 die Synthese von IGF-I-mRNA (Burch and Van Wyk, 1987; Ohlsson et al., 1992a). Zusätzlich wurde gezeigt, dass T3/T4 in vivo die GHR-Expression in Wachstumsfugen bei Ratten beeinflussen (Gevers et al., 2002).

Zusammenfassend nehmen Schilddrüsen-Hormone in Chondrozyten, die TRs (Rezeptoren für Schilddrüsen-Hormone) tragen, Einfluss auf die Proliferation der Wachstumsfuge, ihre Differenzierung und die vaskuläre Invasion. Ein Teil dieser Einflussnahme wird durch die lokale Modulation des GH- und/oder IGF-I-Systems vermittelt.

### 1.6.3 WEITERE HORMONELLE REGULATIONSMECHANISMEN

---

Folgende hormonelle Regulationsmechanismen stehen nicht im direkten Zusammenhang mit dieser Arbeit und sollen hier nur marginal beschrieben werden:

#### GLUCOCORTICOIDE (GC):

---

Einige Studien haben gezeigt, dass es einen Rezeptor für GC auf Knochenzellen und Chondrozyten von Ratten, (Silvestrini et al., 1999) und in der menschlichen Wachstumsfuge, besonders auf hypertrophen Chondrozyten, gibt. Dies führt zu der Annahme, dass GC einen direkten Einfluss auf die Wachstumsfuge haben (Abu et al., 2000). Und zwar in der Weise, dass sie das Wachstum unterdrücken, indem sie die GH-IGF-I-System auf verschiedenen Ebenen modifizieren.

Offensichtlich bewirken GC eine Wachstumsverzögerung. Nicht nur über einen direkten Einfluss mittels ihres Rezeptors, sondern ebenfalls indirekt über die Einflussnahme auf andere wachstumsmodifizierende Signalwege (van der Eerden et al., 2003).

#### ÖSTROGENE (E) :

---

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass Sexualhormone wichtig für das Längenwachstum, vor allem während der Pubertät, sind. Bei Jungen und Mädchen ist Östrogen eine Hauptdeterminante in Bezug auf Längenwachstum und Knochenqualität (Juul, 2001).

#### ANDROGENE (A) :

---

Trotz der herausragenden Rolle von Östrogen, als primärer Modulator des pubertären Wachstums, spielen Androgene eine spezifische Rolle. So können Sie ebenfalls auf direktem Wege, mittels eines spezifischen Rezeptors (AR), Prozesse in der Wachstumsfuge beeinflussen.

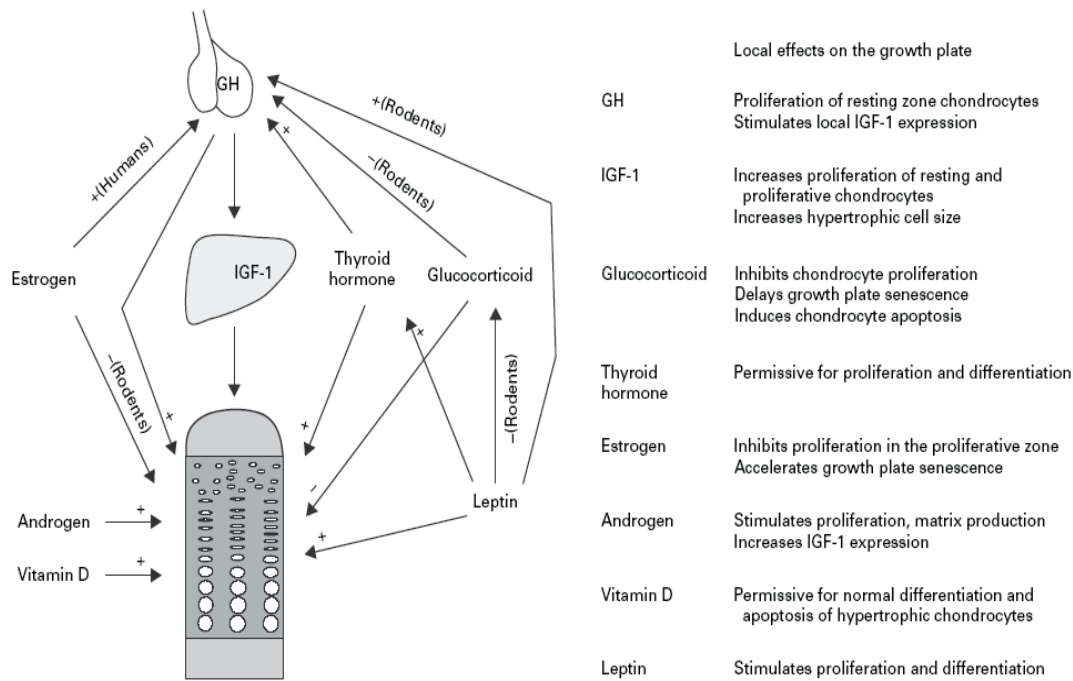


ABB.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SYSTEMISCHEN REGULATION DER WACHSTUMSFUGE (NILSSON ET AL., 2005)

### 1.7 LOKALE REGULATION DER WACHSTUMSFUGE

Neue Einblicke in die lokale Regulation der Chondrozyten-Aktivität in der Wachstumsfuge zeigen eine signifikante Bedeutung verschiedener Wachstumsfaktoren für die Wachstumsregulation in der Wachstumsfuge von Embryonen u.a. von Mäusen (Übersichtsarbeit: (Kronenberg, 2003). Neben IGF-I sind die wichtigsten identifizierten Wachstumsfaktoren, die das Längenwachstum lokal beeinflussen Indian Hedgehog (Ihh), PTHrP, FGFs, bone morphogenetic proteins (BMPs) und vascular endothelial growth factor (VEGF).



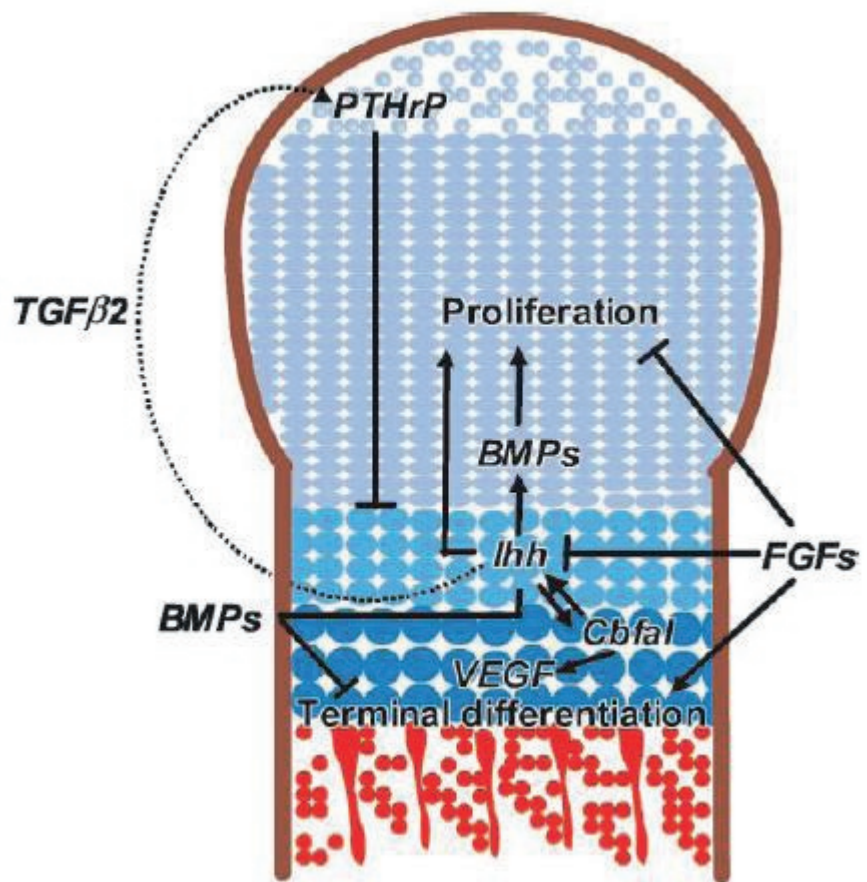


ABB.4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LOKALEN REGULATIONSMECHANISMEN IN DER WACHSTUMSFUGE (VAN DER EERDEN ET AL., 2003)

### 1.7.1 INDIAN HEDGEHOG (IHH)

Wirbeltiere koordinieren Zellproliferation und – differenzierung mittels Zell-Zell-Signalwegen. Auch bei der Reparatur und Regeneration von Erwachsenengewebe spielen diese Signalwege eine Rolle.

Die Familienmitglieder der Hedgehog-Familie sind Signalmoleküle, die Schlüsselrollen bei vielen Entwicklungsprozessen einnehmen (Huangfu and Anderson, 2006). Auch bei Chondrozyten bzw. deren Differenzierung und Proliferation kommen diese Signalwege zum Tragen. Bei Wirbeltieren handelt es sich bei allen Mitgliedern der Familie der Hedgehogs (Indian Hedgehog [Ihh], Desert Hedgehog [Dhh] und Sonic Hedgehog [Shh])

immer um den gleichen Signalweg: Zwei multi-pass-transmembrane Proteine, Smoothened (Smo) und Patched1 (Ptch1) binden auf der Zellmembran ein Signalmolekül in Form von einem Hedgehog-Protein (Lum and Beachy, 2004). Die z.Zt. vorherrschende Modellvorstellung geht davon aus, dass in der Abwesenheit des Liganden Hh Ptch1 die Signalwirkung von Smo hemmt. Bindet nun Hh an Ptch1, so wird die Hemmung von Smo aufgehoben und die nun folgende Signalkaskade von Smo bewirkt unmittelbar eine intrazelluläre Aktivierung der Transkription u.a. von Ptch1 selber (Goodrich et al., 1996). Da es sowohl eine Negativ-Kontrolle als auch ein Transkriptions-Ziel darstellt könnte man Ptch1 sozusagen als „Hüter“ der Signalaktivität sowohl bei der embryonalen Entwicklung als auch der Gewebs-Homöostase von Erwachsenen betrachten (Day and Yang, 2008). Ihh-Signale werden für die Differenzierung von Osteoblasten während der enchondralen Ossifikation benötigt (Mak et al., 2006) und spielen auch für die Differenzierung von Chondrozyten eine entscheidende Rolle.

Die Produktion von Ihh geht von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten aus. Ihh kann die Proliferation von Chondrozyten sowohl direkt über seinen Rezeptor Ptch1, welcher im Knorpelgewebe vorkommt (Vortkamp et al., 1996), als auch indirekt durch die Induktion von molekularen Zwischenstufen im Perichondrium beeinflussen, wo die Zellen ebenfalls Ptch1 exprimieren. Zum Beispiel bewirkt die Aktivierung des Hh-Pathways ein Hochregulieren des PTHrPs (s.u.) im Perichondrium, welches auf seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche von prähypertrophen Chondrozyten wirkt und so die Hypertrophie inhibiert (Vortkamp et al., 1998). Ob Ihh nun direkt oder indirekt wirkt, ist noch nicht geklärt.

### 1.7.2 PTH-RELATED PEPTIDE (PTHrP)

---

Die entscheidende Rolle von PTHrP und dem PTH/PTHrP-Rezeptor bei der embryonalen Knochen-Formierung und dem Längenwachstum wurde in einer Anzahl von Studien entdeckt. Basierend auf diesen Studien proklamierten Vortkamp et al und Lanske et al (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996) ein Modell für einen lokal wirkenden Wachstums-hemmenden negativen Rückkoppelungs-Mechanismus, welcher den PTHrP-Spiegel in der Wachstumsfuge reguliert. Dieses Modell besagt, dass Ihh von Chondrozyten exprimiert wird, die im Übergang von einem proliferativen in einen hypertrophen Zustand sind. Ihh aktiviert angrenzende Chondrozyten und diffundiert zum lateralen Perichondrium, wo es an seinen Rezeptor (Ptch1) binden kann. Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus wird die PTHrP-Produktion im periartikulären Perichondrium stimuliert. Daraufhin diffundiert PTHrP in die

prähypertrophe Zone, wo eine hohe Anzahl an PTH / PTHrP-Rezeptoren produziert werden und verhindert die Differenzierung von proliferierenden Chondrozyten zu Zellen, die Ihh synthetisieren können (Abb. 4).

### 1.7.3 FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFs)

---

Die Familie der FGFs umfasst nicht weniger als 22 Mitglieder, die mit wenigstens vier Rezeptoren (FGFR) interagieren. Sie sind Hauptregulatoren der embryonalen Knochenentwicklung (Ornitz and Marie, 2002; Szebenyi and Fallon, 1999). Sowohl FGF-1 und -2 als auch FGFR-1, -2 und -3 werden von Chondrozyten exprimiert (Jingushi et al., 1995; Leach et al., 1997; Peters et al., 1993; Peters et al., 1992).

Untersuchungen mit knock-out-Mäusen führten zu der Vermutung, dass FGF-18 die Chondrogenese und Osteogenese mittels FGFR-3, respektive -2, koordiniert (Liu et al., 2002). Zusätzlich scheint FGF-18 als ein physiologischer Ligand für FGFR-3 in der Wachstumsfuge zu fungieren.

Mancilla et al. (Mancilla et al., 1998) untersuchten die Effekte von FGF-2 auf die Chondrozytendifferenzierung und fanden drei Wachstums-hemmende Mechanismen für FGF-2 : verminderte Proliferation bei Chondrozyten in der Wachstumsfuge, verminderte zelluläre Hypertrophie und bei hohen Konzentrationen eine verminderte Sekretion von Knorpelmatrix.

Um mögliche Interaktionen zwischen der Signalwirkung von FGF und dem Ihh/PTHrP-Feedback-Loop zu untersuchen wurden Experimente an Mäusen mit thanatophorer Dysplasie mit folgenden Ergebnissen durchgeführt: ein bei diesen Mäusen aktivierter FGFR-3 ging einher mit herunter geregelten Spiegeln an Ihh und PTHrP mRNA. Interessanter Weise hemmte FGF in embryonalen Mittelfußknochen von den Mäusen mit thanatophoren Dysplasie die Proliferation von Chondrozyten durch Herunterregulierung der Ihh-Sekretion. Darüber hinaus hemmen Signale von FGF und PTHrP unabhängig voneinander die Differenzierung von Chondrozyten. Daraus wurde geschlossen, dass FGFR-3 und PTHrP/Ihh-Signale durch zwei sich ergänzende, parallele Pfade agieren, die beide überlappende und unterschiedliche Funktionen während des Längenwachstums vermitteln (Chen et al., 2001). In einer neueren Studie von Minina et al. (Minina et al., 2002) wurde herausgefunden, dass die Signale von FGF und BMP antagonistisch sowohl bei der Regulation der Proliferation von Chondrozyten als auch bei der Ihh-Expression und der Differention zur Hypertrophie agieren. Die Balance

zwischen diesen beiden Prozessen stimmt die Geschwindigkeit des Differenzierungsprozesses mit der Proliferationsrate ab.

#### 1.7.4 BMP (BONE MORPHOGENETIC PROTEINS) / TGF- $\beta$ (TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta$ )

---

Die Familie der BMPs setzt sich aus wenigstens 15 Mitgliedern zusammen, die alle auch einen Teil der übergeordneten Familie der TGF- $\beta$ s darstellen. Ursprünglich wurden BMPs als Stimulatoren des Knochenwachstums identifiziert. Neuerdings gilt allerdings als gesichert, dass BMPs darüber hinaus wichtige Regulatoren für Wachstum, Differenzierung und Morphogenese während der embryonalen Phase darstellen (Reddi, 2001).

Während der Entwicklung der Knorpelanlagen für Gliedmaßen wurden BMP-2, -4 und -7 im Perichondrium entdeckt, wohingegen BMP-6 in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten gefunden wurde (Grimsrud et al., 1999; Haaijman et al., 1999; Jones et al., 1991; Lyons et al., 1989; Lyons et al., 1990; Macias et al., 1997). Zusätzlich wurde BMP-7 in prähypertrophen Chondrozyten bei Sterna von Hühnerembryonen und in proliferierenden Chondrozyten in Mittelfußknochen von Mäusen gefunden (Grimsrud et al., 1999; Haaijman et al., 1999).

BMP-Signale werden durch zwei Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren vermittelt, Typ I und Typ II-Rezeptoren. 3 Typ I-Rezeptoren binden BMP-Liganden: Typ IA und Typ IB (BMPR-IA bzw. ALK-3 und BMPR-IB bzw. ALK-6) und Typ IA-Aktivin-Rezeptor (ActR-IA bzw. ALK-2) (Macias-Silva et al., 1998). Darüber hinaus wurde ebenfalls 3 Typ-II-Rezeptoren gefunden: Typ-II-BMP-Rezeptor (BMPR-II) und Typ II und II-B-Aktivin-Rezeptoren (ActR-II und ActR-II-B) (Rosenzweig et al., 1995). Während BMPR-IA, -IB und -II spezifisch für BMPs sind, sind ActR-IA, -II und -IIB ebenfalls Rezeptoren für Aktivin. Diese Rezeptoren sind in verschiedenen Geweben anzutreffen.

Typ I und Typ II BMP-Rezeptoren sind beide unerlässlich für die Signalübertragung. Nachdem der Ligand gebunden worden ist, bilden sie einen heterotetramer-aktivierten Komplex (Moustakas and Heldin, 2002).

Das Substrat von dem Typ-I-Rezeptor beinhaltet eine Proteinfamilie namens Smad-Proteine, die eine zentrale Rolle bei der Verschaltung des BMP-Signals vom Rezeptor zu den Zielgenen im Nukleus spielt (Cao and Chen, 2005).

#### 1.7.5 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

---

VEGF ist ein Chemoattraktor und einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für Endothelzellen (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Während der Hypertrophie der

Chondrozyten kalzifiziert die sie umgebende Matrix. Es wäre möglich, dass dies ist ein Trigger für das Einwandern von Blutgefäßen aus dem darunterliegenden Metaphysenknochen ist und dieser Invasion die Expression von VEGF in den hypertrophen Chondrozyten vorausgeht (Gerber et al., 1999; Haigh et al., 2000). Inaktivierung von VEGF durch die systemische Kontrolle eines löslichen Rezeptors bei einer 24 Tage alten Maus unterdrückte die Einwanderung von Blutgefäßen und die Entstehung von Knochentrabekeln begleitet von einer erhöhten Breite der Zone der Hypertrophie (Gerber et al., 1999). Außerdem wurde die Rekrutierung von Chondroklasten, die MMP-9 exprimieren und die Resorption von Chondrozyten im Stadium ihrer Spätdifferenzierung inhibiert (Gerber et al., 1999).

Diese Daten deuten darauf hin, dass VEGF und MMP-9 Schlüsselfaktoren bei der Chondrozytenspätdifferenzierung, Vaskularisation, und der Apoptose mit nachträglichem Ersatz durch Knochen sind (Gerber and Ferrara, 2000; Gerber et al., 1999; Vu et al., 1998).

Das Auftreten von VEGF wird als sowohl abhängig als auch unabhängig von HIF-1 $\alpha$  beschrieben (Schipani et al., 2001).

Es wurde auch gezeigt, dass Cbfa1/Runx2, ein Mitglied der Runt-Familie, in hypertrophen Chondrozyten expremiert wird (Takeda et al., 2001). Hier scheint ein Loop zu existieren, bei dem Cbfa1 und Ihh sich gegenseitig regulieren (Karsenty and Wagner, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cbfa1 ein Rolle beim Auftreten von VEGF in Chondrozyten der Wachstumsfuge spielt (Zelzer et al., 2001).

Diese Daten deuten auf eine Verbindung zwischen Ihh und VEGF bei der Regulierung der Geschwindigkeit von Hypertrophie und Spätdifferenzierung von Chondrozyten der Wachstumsfuge hin.

#### 1.7.6 VITAMIN D

---

Vitamin D, auch genannt Cholecalciferol, kurz CalcioI, ist ein physiologisch im menschlichen Körper vorkommendes, und somit nicht-essentielles Vitamin. Die D-Vitamine Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) entstehen aus ihren Provitaminen Ergosterol bzw. 7-Dehydrocholesterin durch eine durch die UV-Strahlung des Lichtes katalysierte Spaltung des Ringes B des Steranskeletts. Calciferole kommen in großen Mengen in Meerestischen (Lebertran) vor. Daneben existieren auch erhebliche Mengen an Vitamin D in Milchprodukten, Eiern und Speisepilzen. Ergosterol stammt aus Hefen oder verschiedenen Pflanzen. 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D<sub>3</sub>) kann im Gegensatz dazu im Organismus (hier im Speziellen in der Leber) aus Squalen synthetisiert werden. Somit sind die Calciferole im eigentlichen Sinne keine Vitamine sondern könnten auch zu den Hormonen gezählt werden.

Das in der Haut abgelagerte Provitamin D<sub>3</sub> wird durch UV-Licht in das Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt. Zum Beispiel ist ein Vitamin D-Mangel bei Naturvölkern mit spärlicher Bekleidung, und einem Leben vorwiegend im Freien, weitestgehend unbekannt.

Cholecalciferol stellt nun aber auch noch nicht die biologisch aktive Form der D-Vitamine dar, sondern wird noch in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert. Darauf gelangt es auf dem Blutwege in die Nieren, wo es erneut hydroxyliert wird, nämlich an der Position 1. Das Produkt, 1,25-Dihydroxycholecalciferol, stellt nun schließlich die biologisch aktive Form des Vitamin Ds dar.

Vitamin D spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung des Calcium-Spiegels im Blut und dem Knochenaufbau. Angesichts der Bedeutung der Calciferole für die Regulation der extrazellulären Calciumkonzentration unterliegt die Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol (biologisch aktive Form des Vitamin D) einer sehr genauen Regulation.

Während die hepatische Bildung von 25-Hydroxycholecalciferol lediglich durch eine einfache Produkthemmung gesteuert wird, ist die Regulation des für die 1,25-Dihydroxycholecalciferolbildung benötigten renalen Enzymkomplex: Durch Calcium wird es gehemmt. Somit wird die für die intestinale Calciumresorption benötigte Verbindung nur dann gebildet, wenn ein echter Calciumbedarf des Organismus vorliegt. Im Gegensatz dazu stimuliert Parathormon die Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol, was auf eine Hemmung der tubulären Phosphatreabsorption und sukzessive zum Absinken der tubulären Phosphatkonzentration führt. Durch dieses Absinken wird die renale Hydroxylase aktiviert, und somit die Synthese von 1,25-Hydroxycholecalciferol angeregt. (s.o.)

(Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage).

Ein Vitamin D-Mangel manifestiert sich bei heranwachsenden Säugetieren durch eine Abnormität des Skelettes, die als Rachitis bezeichnet wird. Sie ist bekannteste D-Hypovitaminose, die durch eine schwere Mineralisationsstörung des Skelettsystems gekennzeichnet ist. Durch einen Calciferolmangel kommt es zu einem Erliegen der intestinalen Calciumresorption. Darüber hinaus ist die Hypertrophiezone in der Wachstumsfuge verbreitert und die Mineralisation defekt (Dean et al., 2001). Bei Mäusen mit einem defizienten Vitamin D-Rezeptor zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier tritt eine verminderte Apoptose bei hypertrophen Chondrozyten am Säulenende der Metaphyse auf und eine verzögerte Invasion von Blutgefäßen und Knochenzellen ist zu beobachten (Donohue and Demay, 2002). Da man die Rachitis auch bei Menschen und Mäusen mit einem Defizit an Phosphat antrifft, wird angenommen, dass das verminderte extrazelluläre Phosphat womöglich eine Schlüsselrolle bei der Rachitis

spielt. Und in der Tat kann eine mineralreiche Diät die Wachstumsfuge von Vitamin D-defizienten und Vitamin D-resistenten Tieren normalisieren (Amling et al., 1999; Underwood et al., 1984).

Vitamin D-Hormone modulieren die Differenzierung und die Proliferation von Chondrozyten in der Wachstumsfuge, sowohl durch den klassischen nukleären Vitamin D-Rezeptor als auch durch MARRS (membrane associated rapid response steroid receptor) (Boyan et al., 2003). Dieses Protein wird auch ERp57/GRp58/ERp60 genannt, ist an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran verankert und hemmt die Spätdifferenzierung von Chondrozyten, wenn es 1,25 Dihydroxycholecalciferol bindet (Dreier et al., 2008).

## 1.8 OSTEOARTHROSE

---

Anders als beim hyalinen Knorpel in den Wachstumsfugen findet man im permanenten Gelenkknorpel in erster Linie Ruhechondrozyten. Diese sind für die Aufrechterhaltung der Integrität und Funktion des Knorpels verantwortlich. Gelenkknorpel hat eine zähelastische Konsistenz und kann somit für eine reibungsfreie Bewegung der tragenden Gelenke sorgen. Voraussetzung hierfür ist eine Hemmung der Chondrozytenspätdifferenzierung. Tritt trotzdem eine intensive Spätdifferenzierung im Gelenkknorpel auf, so ist dies pathologisch und führt zum klinischen Bild der Knorpeldegeneration (Osteoarthrose, OA). Im osteoarthrotischen Knorpel findet man sowohl Proliferation von Chondrozyten in sogenannten „Brutkapseln“ sowie Spätdifferenzierung, die sich durch die biochemischen Marker für die Hypertrophie belegen lässt (Kirsch et al., 2000b; Pullig et al., 2000; von der Mark et al., 1992).

Osteoarthrose ist charakterisiert durch eine progressive Knorpeldegeneration, sekundäre Entzündung der Synovialmembran, Bildung von Osteophyten, sowie eine Zunahme der subchondralen Knochenmasse (Dieppe and Lohmander, 2005). Diese Zunahme könnte durch den funktionellen Verlust der Mechanismen zur Inhibition der

Chondrozytenspätdifferenzierung ein Pathomechanismus der OA im Gelenkknorpel begründet sein (Drissi et al., 2005).

Auch bei der Knorpeldegeneration während einer rheumatischen Arthritis, die durch eine chronische Systemerkrankung des Bindegewebes gekennzeichnet ist, die vorwiegend die Gelenke befällt, während bei einer Osteoarthritis nur die Gelenke betroffen sind, sind sowohl autokrine als auch parakrine Signalnetzwerke von besonderer Bedeutung, welche durch die Chondrozyten selbst moduliert werden können. So reagieren die Chondrozyten auf Zytokine und Wachstumsfaktoren des Synoviums und einwandernder Entzündungszellen, die den Katabolismus im Knorpel vor allem durch IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  fördern (Dayer, 1991). IL-1 $\beta$ , das auch selber von den Chondrozyten produziert werden kann und deshalb auch als Katabolin bezeichnet wird, fördert die chondrozytäre Synthese und Aktivierung der matrixabbauenden Aggrecanase ADAM-TS 4 (Tortorella et al., 2000) sowie der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und -2 (Murphy and Hembry, 1992) und inhibiert die Synthese der TIMPs (Sandell and Aigner, 2001). Die Entzündungszellen produzieren u.a. die analogen Isoenzyme MMP-8 und -9 und tragen somit auch direkt zum Knorpelkatabolismus bei.

MMP-9 wird als stabiles, inaktives Zymogen (pro-MMP-9) sezerniert und wird proteolytisch in die aktive Form konvertiert. Makrophagen exprimieren intensiv pro-MMP-9 wohingegen Chondrozyten nicht in Lage sind dieses Protein zu bilden.

Allerdings sind die Chondrozyten bei der OA mitnichten unbeteiligt. Auf der einen Seite können sie destruktive Enzyme eigenständig produzieren, auf der anderen Seite können sie die von Entzündungszellen oder Zellen aus dem umgebenden Gewebe synthetisierten Zymogene aktivieren. Normale Gelenkschondrozyten besitzen diese proteolytischen Aktivierungseigenschaften nicht (Dreier et al., 2004).

## **KAPITEL 2**

## **FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT**

---

Die Chondrozytenspätdifferenzierung wird an verschiedenen Checkpoints von löslichen Faktoren negativ kontrolliert. Die Überwindung dieser Hypertrophieblockade ist bei der enchondralen Knochenentwicklung wichtig. Deren Aufrechterhaltung ist möglicherweise auch für die Verhinderung von Arthrose, d.h. der pathologischen Degeneration von hyalinem Gelenkknorpel von Bedeutung.

Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF-I und T4 können die Hypertrophieblockade bei zur Spätdifferenzierung kompetenten Zellen ausschalten. Solche Zellen finden sich z.B. im kranialen Drittel der Sterna von 17 Tage alten Hühnerembryonen. Dies äußert sich



neben den veränderten morphologischen Eigenschaften auch in der Expression spezifischer Hypertrophiemarker wie Kollagen X und Alkalische Phosphatase.

In dieser Arbeit wurde erstens an kranialen Chondrozyten untersucht, ob und wie Proteasen die Hypertrophie vermitteln und darüber hinaus, ob diese Proteasen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren von den Chondrozyten selbst synthetisiert werden.

Zweitens wollten wir herausfinden, ob die Mechanismen bei der Überwindung der negativ kontrollierten Hypertrophieblockade mittels der o.g. Wachstumsfaktoren gleich, ähnlich oder verschieden im Vergleich miteinander sind.

Drittens wurden die Chronologie der Einflussfaktoren und ihre notwendigen Konzentrationen betrachtet.

## KAPITEL 3

## MATERIAL & METHODEN

---

### 3.1 VERWENDETE LÖSUNGEN & REAGENZIEN

---

Krebs-Ringer Puffer: 15,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 111,2 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 13 mM Glucose, pH 7,4

DMEM (4,5 g/ml Glucose), Gibco

Ascorbinsäure, Merck

β-Aminopropionitril, Sigma

L-Cysteinhydrochlorid, Sigma

Natriumpyruvat, Merck

Nieder- und Hochtemperaturagarose, FMC BioProducts

L-Thyroxin, Fluka

Insulin

IGF-I

Chymotrypsin, Serva

Papain, Boehringer Mannheim

Plasmin, Sigma

Thrombin, Sigma  
14C-Prolin, NEN  
Pepsin, Serva  
Aprotinin, Sigma  
Chemolumineszenzsystem ECL plus, Amersham  
Lumasafe Plus, Luma-LSC  
WST-1, Boehringer Mannheim  
 $\beta$ -Counter, Beckmann

### 3.2 ZELLKULTUR

---

#### ISOLIERUNG VON CHONDROZYTEN

---

Chondrozyten werden aus Sterna von 17 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen. Die Sterna wurden heraus präpariert, die Gewebereste entfernt, anschließend 3x in Krebspuffer gewaschen und in drei Teile zerschnitten (kaudal, mittel und kranial). Die kranialen Sternateile über Nacht bei 37°C mit 1-1,5 mg/ml Kollagenase von *C. histolyticum* (Clostridiopeptidase B) in DMEM mit 1mM Cystein verdaut.

Die Zellen wurden anschließend im Verdaumedium resuspendiert und die Zellsuspension durch Swinex-Filter, mit 3 Schichten Nylongewebe mit einer Porengröße von 100  $\mu$ m, in 50 ml Röhrchen filtriert. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal mit jeweils 40 ml Ca-freiem DMEM gewaschen, abzentrifugiert (mit 600g, 5 Min, RT), in DMEM aufgenommen und gezählt. Darauf folgend wurde eine Zellsuspension von 4x10<sup>6</sup> Zellen/ml in DMEM vorbereitet

#### AGAROSSESUSPENSIONSKULTUR

---

Für Agarosesuspensionskulturen wurden gleiche Volumina von 2% Niedertemperaturagarose und 2fach konzentriertem DMEM gemischt und mit 120  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Aminopropionitril, 2mM Cystein und 2 mM Pyruvat supplementiert. Dieser Ansatz wurde zu einem gleichen Volumen der vorbereiteten Zellsuspension gegeben,

so dass eine Zellsuspension mit  $4 \times 10^6$  Zellen/ml in 0,5%-Agarose mit 60  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -Aminopropionitril, 1 mM Cystein und 1 mM Pyruvat in DMEM entstand.

700  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 2% Agarose (bei niedriger Temperatur schmelzend) vermischt und auf mit 0,7 ml 1%-high-melting Agarose in Aqua dest (autoklaviert) vorbeschichtete 35 mm Kulturschalen gegeben. Die Schalen wurden für 15 Min. auf einem Wärmetisch gestellt, um die Zellen auf die untere zellfreie Agaroseschicht sedimentieren zu lassen. Dies erleichtert die spätere mikroskopische Beobachtung der Kulturen. Nachdem die Zellen auf eine Ebene gesunken waren, wurden die Schalen für 15 Min. in den Kühlschrank gestellt, damit sich die Agarose verfestigt. Pro Schale wurde am 2. Tag 1 ml Medium mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Ascorbinsäure, 60  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -Aminopropionitril, 1mM Cystein und 1 mM Pyruvat (Zusätze) zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 2-3 Tage fand ein Medienwechsel statt.

Nach erforderlicher Kulturdauer (hier 14 Tage) wurde den Kulturen 14C-Prolin (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) in frischem Medium zugegeben und die Zellen 24 Stunden metabolisch markiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Kulturen bei -20°C getrennt eingefroren.

### 3.3 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

---

Hierzu wurde ein Gemisch aus jeweils 80  $\mu\text{l}$  DMEM (ohne Ca) und 20  $\mu\text{l}$  Zellsuspension hergestellt und somit eine Verdünnung von 1:5 erreicht. Aus diesem Gemisch wurden 20  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 20  $\mu\text{l}$  Trypanblau vermischt. Die daraus entstandene Verdünnung betrug nun 1:10.

1 ml dieser Verdünnung wurde in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei handelt es sich um eine etwa 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit einer um einen definierten Betrag vertieften Mittelfläche auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Die Gesamtzahl in allen 4 Großquadraten der Zählkammer wurde gemittelt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde zu dem Kammerfaktor (10.000) addiert und mit dem Verdünnungsfaktor (x10) multipliziert. So erhielten wir die Zellzahl für 1 ml Suspension. Nach Umrechnung auf die Gesamtzahl der Zellen in Suspension wurde die Zellsuspension so auf die Kulturschalen aufgeteilt, dass jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen in einer Schale vorlagen.

### 3.4 KOLLAGENPRÄPARATION AUS KULTURMEDIEN

---

Zu 1 ml Kulturmedium wurde 100 µl Pepsinlösung (10 mg/ml Pepsin in 1 M HCl) gegeben. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl 1 M Tris (ungepuffert) wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH oder 1 M HCl auf 7,4 eingestellt, um das Pepsin irreversibel zu inaktivieren. Durch Einstellung von  $[Na^+]$  auf 4,5 M durch Zugabe entsprechender Mengen von festem NaCl wurden die Kollagene über Nacht gefällt und danach abzentrifugiert (14000 rpm, 20 Min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 3 Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Nach erneutem Abzentrifugieren (14000 rpm, 20 Min, 4°C) wurde das Pellet in 70 µl Probenpuffer aufgenommen und für mindestens 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Um gleiche Mengen der radioaktiv markierten Kollagene aufzutragen, wurde die Radioaktivität der Proben bestimmt. Dafür wurde 2 µl der Probe in 100 µl H<sub>2</sub>O in Scintillationröhrchen gelöst und mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit Lumasafe plus vermischt. Die cpm-Werte wurden mit einem β-Counter (Beckmann) bestimmt. Es wurde nach Möglichkeit 1500-2000 cpm pro Bahn aufgetragen.

### 3.5 SDS-PAGE

---

Kollagene wurden in Vertikalgelen -mit einer Acryl/Bisacrylamid-Gradienten von 4,5-15% (Sammelgel 4,5%) aufgetrennt. Puffer, Lösungen und Elektrophoresebedingungen für die SDS-PAGE sind in Laemmli (1970) beschrieben. Abweichend dazu wurde folgender Probenpuffer verwendet: 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 mit 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,8 M Harnstoff, 0,001% (w/v) Bromphenolblau. Als Reduktionsmittel wurde 3% (v/v) β-Mercaptoethanol zugesetzt.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit 0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250 in 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure gefärbt und mit 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, und anschließend mit 10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

### 3.6 AUTORADIOGRAPHIE

---

Die Gele wurden für die Autoradiographie in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert (3x20 Min.) und 3 Stunden in 20% (w/v) Diphenyloxazol in DMSO inkubiert.

Anschließend wurden die Gele 45 Min. gewässert und im Gelrockner (Biorad) getrocknet. Zur Detektion wurden Röntgenfilme bei -80°C 7 bis 14 Tage auf den Gelen exponiert.

### 3.7 BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

---

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in Kulturmedien ,modifiziert nach Bessey et al. (1946), bestimmt. 50 µl Medium wurde mit 450 µl 0,2% p-Nitrophenylphosphat in 1 M Diethanolamin-HCl, pH 9,8, 30 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl 2 M NaOH/0,2 mM EDTA gestoppt und die Extinktion bei 405 nm bestimmt.

## KAPITEL 4

## ERGEBNISSE

---

### 4.1 BEEINFLUSSUNG DER HYPERTROPHIE KRANIALER CHONDROZYTEN DURCH PROTEASEINHIBITOREN (IN ABWESENHEIT VON ENDOTHELZELLEN)

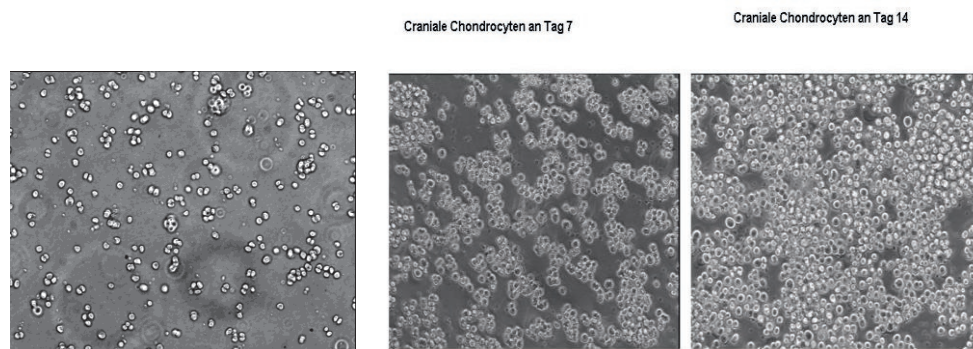
---

In der Vorarbeiten (Bittner et al, 1997) wurde unter anderem gezeigt, dass bei kaudalen Chondrozyten Endothelproteasen aus Aortenendothelzellen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zur Induktion der Hypertrophie führen und somit die negativ kontrollierte Chondrocytenspätdifferenzierung deblockiert werden kann. Diese Hypertrophieblockade konnte bei kaudalen Chondrozyten auch ohne Endothelzellen durch alleinige Zugabe von Proteasen (Plasmin, Papain und Chymotrypsin) und Wachstumsfaktoren (Thyroxin) überwunden werden (Babarina et al., 2001).

Um dies an kranialen Chondrozyten zu untersuchen, wurden kraniale Chondrozyten aus den Sterna von Hühnerembryonen isoliert, in Agarose eingebettet und mit

serumfreien Kulturmedium (DMEM) kultiviert. Diese Chondrozytenkulturen wurden von Tag 1 bis 14 mit Wachstumsfaktoren (hier Insulin und IGF) stimuliert.

Sollten die kranialen Chondrozyten ebenfalls eine Deblockade der Spätdifferenzierung zeigen, so müssten sie zwischen Tag 10 und 12 mit der Kollagen-X-Synthese, einem Marker für Hypertrophie, beginnen.



**ABB.5 MIKROFOTOGRAFIE KRANIALER CHONDROZYTEN AN TAG 1,7 UND AN TAG 14. DEUTLICH ZU ERKENNEN SIND DIE QUANTITATIVEN UND MORPHOLOGISCHEN UNTERSCHIEDE. DIE ZELLEN SIND UNTER EINFLUSS VON INSULIN, IGF-1 UND T4 VON TAG 1 ZU 14 PROLIFERIERT UND HYPERTROPHIERT.**

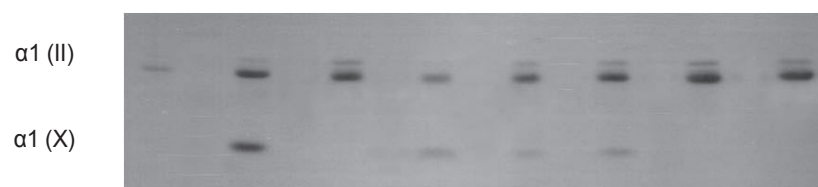
Den Kulturen wurden während der gesamten Versuchsdauer (Tag 1 – 14) unterschiedliche Proteaseinhibitoren hinzugegeben, die verschiedene Protease-Klassen inhibieren, um herauszufinden, ob Proteasen bei der hypertrophen Differenzierung beteiligt sind.

Um Kollagen nachweisen zu können wurden an Tag 14 die Zellen mit <sup>14</sup>C-Prolin markiert, das in Kollagen eingebaut wird. Zuerst wurde Medium abgenommen und anschließend zentrifugiert (bei 14.000 U / Min. für 15 Minuten bei 4 °C). Dann wurde Pepsin (10 mg / ml in 1 M HCl) zugefügt und die Proben 2 h bei Raumtemperatur gemixt. Um die Proben zu neutralisieren, wurde 70 µl 1 M Tris zugegeben und anschließend wurden sie mit 1 M NaOH auf pH-Wert 7 gebracht.

Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4 °C gemixt. Am nächsten Tag wurden die Proben wieder bei 14.000 U/min. und 4° C 30 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das übrige Pellet wurde in 100 µl

Aqua dest. Aufgenommen. Nun wurden 300 µl eiskaltes Ethanol hinzugefügt und die Proben so mindestens 1 h lang bei -20°C inkubiert. Es folgte darauf eine erneute Zentrifugation mit 14.000 U/min bei 4°C für 30 min. Der Überstand wurde danach wiederum abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde getrocknet, in Probenpuffer aufgenommen und anschließend 3-5 Minuten gekocht bevor eine SDS-Page (4-15 %) mit anschließender Autoradiographie zur Darstellung des markierten Kollagens durchgeführt wurde.

DMEM	+	+	+	+	+	+	+	+
IGF		+	+	+	+	+	+	+
Proteaseinhibitor			MMP-Inhib.	ED-TA	Apro-tinin	Pep-statin	Leu-peptin	E-64



**ABB.6 FLUOROGRAMM DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE (SDS-PAGE).**  
 ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II (A1 (II)) UND KOLLAGEN X (A1 (X)). ALLEN ANSÄTZEN WERDEN IGF ALS STIMULANS ZUGEgeben. IN DEM ERSTEN KONTROLLANSATZ IST ZUSEHEN, DASS KEINE INHIBITION DER KOLLAGEN-X-SYNTHESE STATTFINDET UND SOMIT DIE HYPERTROPHIEBLOCKADE AUFGEHOBEN WIRD. BEI ZUGABE VON MMP-INHIBITOR FINDET KEINE KOLLAGEN-X-SYNTHESE STATT. EINE SCHWACHE KOLLAGEN-X-SYNTHESE ABER AUCH EINE SCHWACHE KOLLAGEN-II-SYNTHESE ZEIGT DER ANSATZ MIT EDTA. BEI APROTININ IST EINE SCHWACHE BANDE KOLLAGEN-X ZU ERKENNEN. DAS GLEICHE ERGEBNIS ZEIGT DER ANSATZ MIT PEPSTATIN. BEI LEUPEPTIN UND E-64 SIND KEINE KOLLAGEN-X-SYNTHESEN AUFGETRETEN. BEI ALLEN ANSÄTZEN SIND KOLLAGEN-II-SYNTHESEN ZU ERKENNEN.

Es wurde deutlich, dass Proteasen bei der Überwindung der Hypertrophieblockade der kranialen Chondrozyten eine Rolle spielen müssen, da unter der Zugabe von

Proteaseinhibitoren eine Hypertrophie ausblieb. Weiterhin mussten diese Proteasen von den Chondrozyten selbst synthetisiert worden sein, da keinerlei Proteasen oder Proteasenproduzierende Zellen außer den Chondrozyten selbst anwesend waren, und auch keine Proteasen in die Proben gegeben wurden.

Da wir in diesem Versuch Proteaseinhibitoren für verschiedene Klassen von Proteasen verwendeten, konnte gezeigt werden, dass MMP-Inhibitor- (15  $\mu$ M, inhibiert MMP's), Aprotinin (5  $\mu$ g/ml, inhibiert Serinproteasen), Pepstatin (1  $\mu$ g/ml, inhibiert Aspartatproteasen), Leupeptin (2  $\mu$ g/ml, inhibiert Serin- und Thiolproteasen) und E-64 (5  $\mu$ g/ml, inhibiert Cysteinproteasen) eine Kollagen-X-Synthese verhindern, während in den EDTA-Ansätzen eine Inhibition nicht deutlich zu sehen war.

#### 4.2 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN STIMULATIONSMECHANISMEN BEI INSULIN UND THYROXIN (T4)

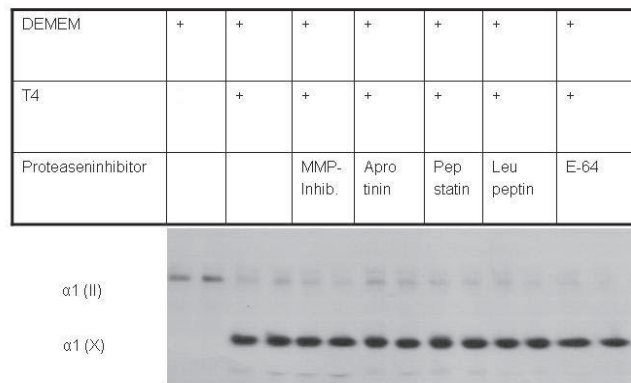
---

Da nun davon ausgegangen werden konnte, dass Proteasen, die eine entscheidende Rolle bei der Überwindung der Hypertrophieblockade spielen, von den kranialen Chondrozyten nach Stimulation durch die Wachstumsfaktoren Insulin und IGF-I synthetisiert worden sind, sollte nun untersucht werden, ob Unterschiede zu der Stimulation mit Thyroxin bestehen. Hierzu wurden den Zellkulturen identische Proteaseinhibitoren aber Thyroxin als Stimulans hinzugefügt. Die Ergebnisse wurden mit denen aus den Versuchen mit Insulin und IGF-I verglichen. Der Versuchsablauf war identisch mit dem Versuchsablauf im vorangegangenen Versuch.

Es erfolgte zusätzlich eine Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Kulturmedien nach den Tagen 10 und 14.



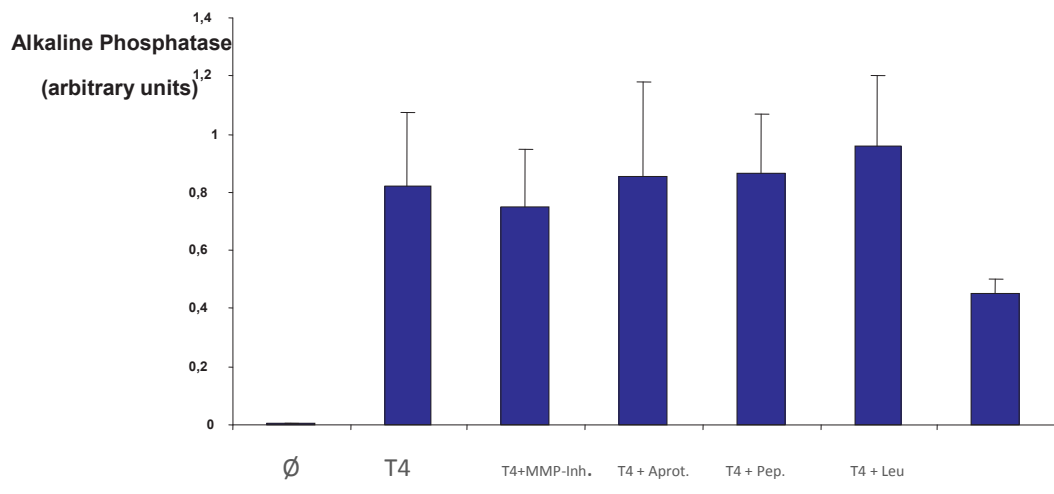
*THYROXIN (T4)*



**ABB.7 (MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON RITA DREIER): FLOUROGRAMM DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE. ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II (A1 (II)) UND KOLLAGEN X (A1 (X)). AUFFÄLLIG IST DIE SCHWACHE KOLLAGEN-II-SYNTHESE BEI T4- STIMULATION, WOBEI DIE SYNTHESE IN DEN KONTROLLANSÄTZEN AM STÄRKSTEN IST. DIE KOLLAGEN-X-SYNTHESE WIRD IN KEINEM VERSUCHSANSATZ BLOCKIERT, AUßER IM KONTROLLANSATZ.**

Wie zu sehen ist, war erstens die Kollagen-II-Synthese in den Ansätzen, die mit T4 stimuliert wurden, deutlich schwächer als in den Ansätzen, in denen IGF-I oder Insulin verwendet wurden. Zweitens konnte die Kollagen-X-Synthese mit keiner der zugesetzten Proteaseninhibitoren bzw. mit den hier verwendeten Konzentrationen gehemmt werden. Somit lässt sich vermuten, dass bei Stimulation mit T4 die Mechanismen, die zur Kollagen-X-Synthese führen, entweder nicht durch die gleichen Proteasen wie bei der Verwendung von IGF-I oder Insulin erfolgt oder deutlich höhere Konzentrationen notwendig sind, um eine Inhibition zu erreichen.

### AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE:



**ABB.8 (MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON RITA DREIER): AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 14 TÄGIGER STIMULATION MIT THYROXIN UND VERSCHIEDENEN PROTEASE-INHIBITOREN (MMP-INHIBITOR, APROTININ, PEPSTATIN, LEUPEPTIN UND E-64. DIE KONTROLLANSÄTZE OHNE T4 ZEIGEN KEINE AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE. DIE ANDEREN ANSÄTZE ZEIGEN EINE ÄHNLICH HOHE AKTIVITÄT MIT AUSNAHME VON E-64, WO EINE DEUTLICH ERNIEDRIGTE AKTIVITÄT AUFTRAT.**

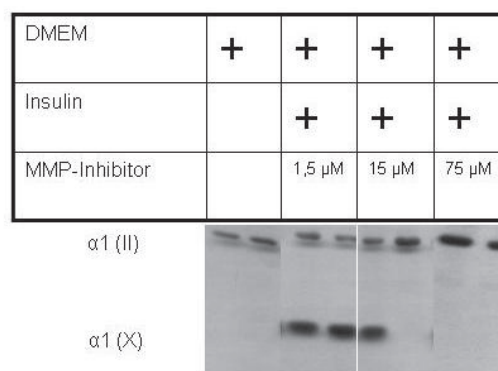
Es wird deutlich, dass Unterschiede zwischen einer Stimulation mit T4 und Insulin bzw. IGF bestehen. Bei der Stimulation mit den hier verwendeten Konzentrationen an Insulin bzw. IGF konnte weniger Aktivität der alkalischen Phosphatase festgestellt werden. Anders bei der Stimulation mit T4, wo sich eine deutliche Aktivität einstellte. Dieser Unterschied wird auch deutlich, bei der Kollagen-II-Synthese. Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass bei Insulin-Stimulation mittels Proteaseinhibitoren eine Kollagen-X-Synthese unterdrückt wird, während bei T4-Stimulation eine Kollagen-X-Synthese trotz Inhibition der Proteasen stattfindet.

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase zeigte, dass die kranialen Chondrozyten nach Tag 14 alkalische Phosphatase synthetisieren. Wie schon vorher bekannt, ist dies neben der Synthese von Kollagen X ein Indiz für Hypertrophie. In den Versuchen, in

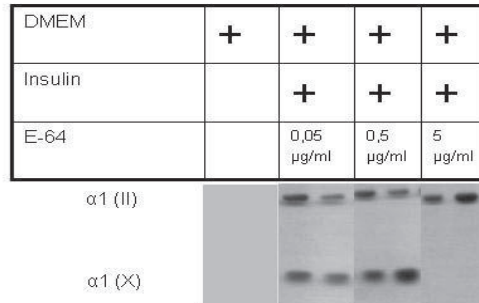
denen wir Insulin bzw. IGF als Wachstumsfaktor verwendeten, konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase festgestellt werden. Auch dies deutet auf einen Unterschied in den Stimulationsmechanismen oder in der Stärke der Hypertrophie zwischen Ansätzen mit Thyroxin und Insulin hin.

#### 4.3 AUSWIRKUNGEN VON VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN DER PROTEASEINHIBITOREN AUF DIE KOLLAGEN-X-SYNTHESE

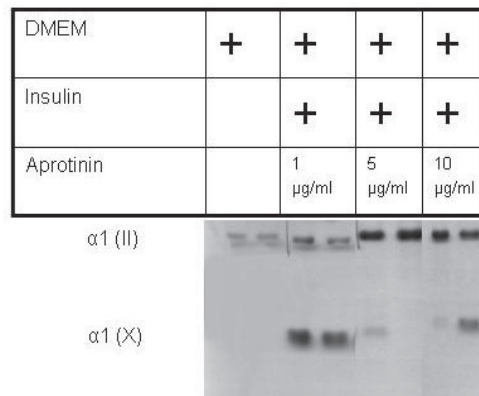
Da in den vorausgegangenen Versuchen die Kollagen-X-Expression bei ähnlichen Kulturbedingungen Schwankungen unterworfen war, soll hier nun untersucht werden inwieweit verschiedene Konzentrationen von Proteaseninhibitoren (MMP-Inhibitor, E-64 und Aprotinin) die Kollagen-X-Synthese beeinflussen. Die Konzentrationen betragen 1,5 bis 75  $\mu\text{M}$  MMP-Inhibitor, 0,05 bis 5  $\mu\text{g/ml}$  E-64 und 1 bis 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin. Als Wachstumsfaktor wurde Insulin verwendet.



**ABB.9 (MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON RITA DREIER): FLUOROGRAMM EINES SDS-PAGE-GELS DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE. ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II ( $\alpha 1 (II)$ ) UND KOLLAGEN X ( $\alpha 1 (X)$ ) BEI EINER STIMULATION MIT INSULIN. DIE MMP-INHIBITOR-KONZENTRATIONEN LIEGEN ZWISCHEN 1,5 UND 75  $\mu\text{M}$ . EINE KOLLAGEN-X-SYNTHESE WIRD ERST BEI 75  $\mu\text{M}$  BLOCKIERT. IN ALLEN ANSÄTZEN FINDET EINE PRODUKTION VON KOLLAGEN II STATT.**



**ABB.10 (MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON RITA DREIER): FLUOROGRAMM EINES SDS-PAGE-GELS DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE. ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II (A1 (II)) UND KOLLAGEN X (A1 (X)) BEI EINER STIMULATION MIT INSULIN. DIE E-64-KONZENTRATIONEN LIEGEN ZWISCHEN 0,05 UND 5 µG/ML. EINE KOLLAGEN-X-SYNTHESE BLEIBT AB EINER KONZENTRATION VON 5 µG/ML AUS. IN DEN NIEDRIGEREN KONZENTRATIONEN FINDET EINE SYNTHESE VON KOLLAGEN X STATT. IN ALLEN ANSÄTZEN ZEIGT SICH EINE KOLLAGEN-II-SYNTHESE.**



**ABB.11 (MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON RITA DREIER): FLUOROGRAMM EINES SDS-PAGE-GELS DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE. ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II (A1 (II)) UND KOLLAGEN X (A1 (X)) BEI EINER STIMULATION MIT INSULIN. DIE APROTININ-KONZENTRATIONEN LIEGEN ZWISCHEN 1 UND 10 µG/ML. EINE KOLLAGEN-X-SYNTHESE FINDET BEI EINER KONZENTRATION VON 1 µG/ML STATT. BEI 5 µG/ML ZEIGT EIN VERSUCHSANSATZ EINE SCHWACHE UND DER ANDERE ANSATZ KEINE SYNTHESE VON KOLLAGEN X. LIEGT DIE**

KONZENTRATION BEI 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SO SIEHT MAN IN EINEM ANSATZ EINE DEUTLICHE UND IN DEM ANDEREN ANSATZ EINE SCHWACHE KOLLAGEN-X-SYNTHESE. KOLLAGEN II WIRD AUCH HIER IN ALLEN ANSÄTZEN DETEKTIERT.

Bei MMP-Inhibitor, E-64 und Aprotinin ist ein Effekt der Konzentration auf die Kollagen-X-Synthese zu sehen. MMP-Inhibitor inhibiert die Kollagen-X-Synthese ab einer Konzentration von  $> 75 \mu\text{M}$ , E-64 ab einer Konzentration ab  $> 5 \mu\text{g}/\text{ml}$  und Aprotinin ab Konzentrationen von  $> 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Bei niedrigeren Konzentrationen wird die Kollagen-X-Synthese nicht inhibiert.

#### 4.4 ZEITLICHE ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN WACHSTUMSSTIMULANZIEN UND PROTEASEN.

---

Nun stellte sich die Frage nach den zeitlichen Zusammenhängen. Untersucht wurde in welcher Reihenfolge Wachstumsfaktor und Protease wirken müssen, um eine Kollagen-X-Synthese herbeizuführen. Es sollte herausgefunden werden, ob der Wachstumsfaktor zur Synthese der Proteasen führt, oder noch ein zusätzlicher Faktor produziert wird, der dann durch die Proteasen modifiziert wird, bevor die Hypertrophieblockade überwunden wird. Sollte die Wirkung der Wachstumsfaktoren die Synthese eines solchen löslichen Faktors oder eines Rezeptors einschließen, so können Proteasen alleine keine Hypertrophie auslösen.


































	Tag 1-7	Tag 1-14	Tag 9-14	Col II Col X
Insulin				
				
				
Trypsin				
				
Thrombin				
				
Chymotrypsin				
				
Insulin + Trypsin				
				
Insulin + Thrombin				
				
Insulin + Chymotrypsin				
				

ABB.12: FLUOROGRAMM DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSANSÄTZE. ZU SEHEN SIND DIE BANDEN DES RADIOAKTIV-MARKIERTEN KOLLAGEN II (A1 (II)) UND KOLLAGEN X (A1 (X)). ZUR STIMULATION WURDE INSULIN ZUGESETZT. SETZTEN WIR IN DEN TAGEN 1-7 ODER 1-14 INSULIN EIN, SO ZEIGT SICH EINE KOLLAGEN X-SYNTHESE UND EIN SCHWACHE KOLLAGEN II-SYNTHESE. WÄHLTEN WIR TAG 9-14 ZUR GABE VON INSULIN LÄSST SICH EINE DEUTLICHE KOLLAGEN II- UND EINE SCHWACHE KOLLAGEN X- SYNTHESE SEHEN. BEI ALLEN ANSÄTZEN, IN DENEN NUR PROTEASE UND KEIN INSULIN EINGESETZT WURDEN, BLEIBT EINE KOLLAGEN X-SYNTHESE AUS UND EINE KOLLAGEN II-SYNTHESE FINDET STATT.

Es stellt sich heraus, dass eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren (hier: Insulin) zwingend notwendig ist, um eine Hypertrophie und somit eine Kollagen-X-Synthese der kranialen Chondrozyten zu bewirken. Da die alleinige Applikation von Proteasen

keine Hypertrophie induziert wird zusätzlich deutlich, dass die Synthese von Proteasen alleine nicht zu einer Aufhebung der Hypertrophieblockade führt.

## KAPITEL 5 DISKUSSION

---

Die Faktoren, die die Chondrozytenspätdifferenzierung beeinflussen, werden sowohl von den Zellen umliegender Gewebe, als auch von Chondrozyten selbst produziert (Tschan et al, 1993); Vortkamp et al, 1996; Hartmann und Tabin, 2000).

In voran gegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass sowohl kaudale Chondrozyten in Monokultur als auch in Cokultur mit kranialen Zellen nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren (T4, Insulin und IGF-I) keinerlei Hypertrophie zeigten.

In dieser Arbeit sollten nun mittels Monokulturen von kranialen Chondrozyten die Differenzierungsmechanismen untersucht werden

Wie schon vorher bekannt war, wird die negative Kontrolle der kranialen Chondrozyten in Monokultur in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie Thyroxin, Insulin und IGF-I überwunden (Bittner et al.).

Dies bestätigte die Aussage von Bohme et al., dass kaudale Chondrozyten über sekretierte Signale die Hypertrophie der kranialen Zellen unterdrücken können. Es soll nun weiter untersucht werden, wie diese Hemmung vermittelt wird.

Die verwendeten Wachstumsfaktoren Insulin, IGF-I und Thyroxin entfalten ihre Wirkung auf unterschiedlichen Signalwegen und mittels verschiedener Mechanismen.

Es ist nicht vollständig geklärt, ob die Thyroidhormone in die Zelle durch passive Diffusion durch die Membran oder durch einen energieabhängigen Prozess aufgenommen werden und ob T3 und T4 gleiche Transportwege teilen (Ichikawa and Hashizume, 1995). In der Zelle binden die Thyroidhormone an den nukleären Thyroidhormonreceptor (TR).

Diese Rezeptoren sind Ligand-abhängige Transkriptionsfaktoren, die Differenzierung und Entwicklung durch Interaktion mit cis-Elementen der Zielgene beeinflussen. Sie

enthalten DNA- und Liganden-Bindungsdomänen, wobei die erste hoch konserviert ist. Die Rezeptoren binden an DNA als Homo- und Heterodimere.

Insulin und IGF-I binden an Zellmembranrezeptoren, die große Ähnlichkeit miteinander haben. Es handelt sich um Tetramere aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die  $\alpha$ -Untereinheiten sind für die Bindung des Hormons verantwortlich und die  $\beta$ -Untereinheiten besitzen Tyrosinkinasen, die nach der Hormonbindung eine Autophosphorylierung der Tyrosindomänen des Rezeptors durchführen.

Der Rezeptor ist somit ein integrales Membranprotein, das über eine ligandenaktivierte, intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne verfügt. Über eine intrazelluläre Transduktionskaskade wird durch Modifizierung der Transkription eine Steigerung der Syntheserate verschiedener Proteine bewirkt.

Somit wird deutlich, dass die Wachstumsfaktoren eine Steigerung des Zellstoffwechsels und der Synthese von verschiedenen Proteinen auf unterschiedliche Weise induzieren können.

Um zu untersuchen, wie die Wirkung der Wachstumsfaktoren vermittelt wird, setzten wir in den Versuchsansätzen verschiedene Protease-Inhibitoren ein, mit denen wir eine hohe Bandbreite an Substraten abdeckten. Wir wollten wissen, ob Proteasen die Modifizierung der Hypertrophieblockade vermitteln. Es ließ sich feststellen, dass die Kontrollkulturen ohne Inhibitoren eine deutliche Hypertrophie zeigten, wohingegen beim Zusatz von verschiedenen Proteaseinhibitoren die Überwindung der Hypertrophieblockade ausblieb. Zwar wurde in diesen Kulturen eine signifikante Veränderung in Zellzahl (Proliferation) und Morphologie (Hypertrophie) festgestellt (Abb. 5), die typischen Markerproteine für eine Hypertrophie wie ALP und Kollagen-X waren jedoch nicht nachweisbar.

Somit bleibt festzuhalten, dass die Überwindung der negativen Kontrolle, bei der Stimulation der kranialen Chondrozyten mittels Wachstumsfaktoren Insulin und IGF-I, wahrscheinlich durch Proteasen vermittelt wird. Dies wäre zusätzlich ein Erklärungsansatz, wie kaudale Chondrozyten in Kokultur mit kranialen Zellen deren Hypertrophie blockieren können.

Folgende Wege, wie Proteasen in den Differenzierungsprozess eingreifen können, sind möglich:

- Lösliche Faktoren der Negativkontrolle werden proteolytisch degradiert
- Wachstumsfaktoren, die in latenter Form sekretiert werden, werden durch Prozessierung aktiviert (Pieck et al, 1999).



- Faktorbindende Proteine werden proteolytisch eliminiert und dadurch die Faktoren für die Zellen zugänglich gemacht (Martell-Pelletier et al, 1998; Powers et al, 2000)
- Die Rezeptoren werden proteolytisch abgebaut und damit die Reaktion auf entsprechende Faktoren verändert (Rose-John und Heinrich, 1994)
- Die Rezeptoren werden durch proteolytische Modifizierung aktiviert (Coughlin, 1999)
- Die proteolytische Modifizierung der ECM beeinflusst den Differenzierungsprozess über Plasmamembranrezeptoren zu den ECM-Molekülen (Werb, 1997).

Zur Frage, woher die Proteasen stammen, kann festgehalten werden, dass diese modifizierenden Enzyme nur von den Chondrozyten selbst synthetisiert worden sein konnten, da es sich um Monokulturen derselben handelte. Denkbar wäre eine parakrine Stimulation durch benachbarte Zellen bzw. durch Syntheseprodukte dieser, oder eine autokrine Stimulation durch Stimulation über Zellprodukte der stimulierten Zelle selbst.

Zugabe von Insulin bzw. IGF-I führen in den Versuchen zu einer Hypertrophie der kranialen Chondrozyten. Parameter zur Identifizierung der Hypertrophie waren neben morphologischen Eigenschaften auch die Synthese von Kollagen X und ALP. Während die ALP-Synthese in den Versuchen gar nicht oder nur schwach verifiziert werden konnte, stellte sich bei der Zugabe von IGF-I und Insulin mehrheitlich eine Synthese des Markers Kollagen X und somit eine Überwindung der Hypertrophieblockade ein.

Demgegenüber war jedoch deutlich erkennbar, dass ein Unterschied zwischen der Stimulation mit T4 und der Stimulation mit Insulin bzw. IGF-I bestand. Dieser Unterschied wurde an folgendem Merkmal deutlich:

- Die Ansätze mit T4 und Proteaseninhibitoren zeigen im Gegensatz zu IGF-I und Insulin eine Hypertrophie der Zellen.

Entweder wird die Hypertrophie im Falle einer Stimulation durch T4 nicht durch Proteasen vermittelt, es wurden nicht die „passenden“ Inhibitoren verwendet oder die Konzentration der Proteaseinhibitoren war zu schwach, weil T4 die Hypertrophie der Zellen stärker induziert als Insulin und IGF-I und die Konzentrationen der Proteaseinhibitoren nicht ausreichten, um den Mechanismus zu hemmen.

Da als Zwischenergebnis festgehalten werden kann, dass die Deblockade und somit die Hypertrophie von IGF-I- und Insulinstimulierten Zellen durch Proteasen vermittelt wird, sollten nun die Mechanismen genauer spezifiziert werden. IGF und Insulin sind anabole Hormone und induzieren nicht nur die Synthese von Proteasen, sondern können darüber hinaus die Synthese von diversen anderen Signalstoffen und Rezeptoren einleiten. Wir wollten wissen, ob die Wachstumsfaktoren lediglich über die Synthese von Proteasen eine Hypertrophie bewirken oder noch zusätzliche Faktoren synthetisiert werden müssen damit die Hypertrophieblockade aufgehoben wird. Denkbare Möglichkeiten wären die Synthese eines Rezeptors oder die Synthese eines löslichen Faktors, der durch die Proteasen modifiziert werden.

Es zeigte sich in den zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuchen, dass alleinige Zugabe von Proteasen keine Deblockade der kranialen Chondrozyten bewirkt. Es muss immer der Wachstumsfaktor vorhanden sein damit die Hypertrophie der Chondrozyten eingeleitet wird. Dabei ist es unerheblich, ob zuerst der Wachstumsfaktor und dann die Proteasen zugesetzt werden oder umgekehrt. Somit ist anzunehmen, dass nicht alleine die Proteasen für die Modifizierung von Nöten sind, sondern dass darüber hinaus ebenfalls ein zweiter Faktor in Form eines Rezeptors oder löslichen Faktors synthetisiert werden muss, der dann von den Proteasen modifiziert werden muss um eine Deblockade der Zellen einzuleiten.

Auf welchen Ebenen der Regulation der Wachstumsfuge könnten diese eher grundsätzlichen Mechanismen nun greifen? Da wir mit IGF, Insulin und T4 die systemisch, hormonellen Faktoren den Proben selbst und direkt zugesetzt haben soll im Folgenden die Einflussmöglichkeiten der Proteasen auf Ebene der lokalen Regulation der Wachstumsfuge betrachtet werden.

## INDIAN HEDGEHOG (IHH)

Wie bereits unter 1.6.1 beschrieben binden Ihh an einem Rezeptor (Ptc), wodurch ein membranständiges Protein (Smo) aktiviert wird, dass eine intrinsische, intrazelluläre Aktivität hat, die wiederum von Ptc in Abwesenheit von Ihh gehemmt wird. Indian Hedgehog wird auf prähypertrophen Chondrozyten in fetalen langen Knochen von Hühnern und Mäusen expremiert. Ektopische Expression von Ihh in langen Knochen von Hühnern blockiert die Chondrozyten-Differenzierung. Die Regulation der Proliferation durch Ihh ist unabhängig von PTHrP und somit ist Ihh ein Koordinator der enchondralen Ossifikation, der die Proliferation und die Differenzierung reguliert und darüber hinaus die Chondrogenese und Osteogenese verbindet.

Proteasen können in dieser Kaskade nun wie folgt eingreifen: Ihh könnte durch eine Proteolyse verändert und inaktiviert bzw. aktiviert werden. Des Weiteren könnte der

Ptc modifiziert werden was sich auf extrazelluläre Mechanismen auswirken würde. Ebenfalls das Smo könnte direkt durch Proteasen beeinflusst werden.

## PTH-RELATED PEPTIDE (PTHrP)

Nach dem Modell von Vortkamp et al von einem lokal wirkenden Wachstumshemmenden Feedback-Loop, welcher den PTHrP-Level in der Wachstumsfuge reguliert (Kap. 1.6.2), wird angenommen, dass Ihh von Chondrozyten expremiert wird, die im Übergang von einem proliferativen in einen hypertrophen Zustand sind. Durch einen unbekanntem Mechanismus wird durch Ihh die PTHrP-Produktion im periartikulärem Perichondrium stimuliert. Daraufhin diffundiert PTHrP in die prähypertrophe Zone, wo eine hohe Anzahl an PTH/PTHrP-Rezeptoren produziert wird und verhindert so die Differenzierung von proliferierenden Chondrozyten zu Zellen, die Ihh synthetisieren können. Es spielen wahrscheinlich Zwischenprodukte eine Rolle bei den Signalwegen zwischen Ihh und PTHrP und umgekehrt.

Proteasen könnten diese Rolle übernehmen bzw. diese Zwischenprodukte modifizieren. Auch könnten lokal die PTH/PTHrP-Rezeptoren proteolytisch verändert werden und somit die Zielstruktur für diesen Feedback-Loop inaktiviert werden. Selbstverständlich können Ihh und PTHrP ebenfalls modifiziert werden, da es sich um Proteine handelt. Also ist es auch hier möglich, dass Proteasen ein Ziel vorfinden, da viele Bestandteile dieses Systems Proteine darstellen und somit potenzielle Angriffspunkte für die Proteasen darstellen. Ein Eingriff in dieses Gleichgewicht könnte durchaus eine gesteigerte Spätdifferenzierung der Chondrozyten zur Folge haben.

## FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFs)

Die 22 Mitglieder der Familie der FGFs interagieren mit wenigstens vier Rezeptoren (FGFR). Sowohl FGF-1 und FGF-2 als auch FGFR-1, -2 und -3 werden von Chondrozyten expremiert.

FGF-18 scheint darüber hinaus die Chondrogenese und die Osteogenese mittels FGFR-3 bzw. -2 zu koordinieren. Zusätzlich scheint FGF-18 als ein physiologischer Ligand für FGFR-3 in der Wachstumsfuge zu fungieren. Ein bei Mäusen mit thanatophoren Dysplasie aktivierter FGFR-3 ging einher mit Herunter geregelten Spiegeln an Ihh- und PTHrP-mRNA. FGF hemmte bei embryonalen Mittelfußknochen von diesen Wildtyp-Mäusen die Proliferation von Chondrozyten durch Herunterregelung der Ihh-Sekretion.

In allen diesen Prozessen gibt es mögliche Angriffspunkte für Proteasen. So könnten die Proteasen FGF und / oder FGFR-3 modifizieren um somit die Differenzierungsprozesse beeinflussen

## **BMP (BONE MORPHOGENETIC PROTEINS) / TGF- $\beta$ (TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta$ )**

Diese Familie setzt sich aus 15 Mitgliedern zusammen, die alle auch ein Teil der übergeordneten Familie der TGF- $\beta$ s darstellen. Während der Entwicklung der Knorpelanlagen für Gliedmaßen wurden im Perichondrium BMP-2, -4 und -7 entdeckt. Die Wirkung von BMPs wird durch zwei Typ-I-Rezeptoren (BMPR-IA und -IB) und dem BMPR-II-Rezeptor vermittelt. Ihre Rolle ist wahrscheinlich die eines möglichen Vermittlers bei dem Wachstumsverzögernden Feedback-Loop, an dem Ihh und PTHrP beteiligt sind und welche auf para-/autokrine Mechanismen beruht. Darüber hinaus kann BMP unabhängig vom Ihh/PTHrP-Pfad die Differenzierung von Chondrozyten hemmen. Mögliche Interaktionsstellen für die Proteasen sind hier die BMPs selber bzw. ihrer Rezeptoren.

Wie durch diese Aufzählung deutlich wird, könnten Proteasen mannigfaltig in das lokale Gleichgewicht der Wachstumsfuge eingreifen.

Da auf der lokalen Ebene dieser Regulation Proteine als lösliche Faktoren oder als Rezeptoren eine Rolle spielen, muss nun in weiteren Versuchen untersucht werden, wo und wie genau die Proteasen ihren modifizierenden Einfluss bei der Regulation der Chondrogenese ausüben. Dass sie einen Einfluss haben ist als Ergebnis dieser Arbeit festzuhalten. Des Weiteren stellte sich die Erkenntnis heraus, dass die Wirkung von den systemischen Wachstumsfaktoren IGF-I bzw. Insulin auf einem anderen Mechanismus beruhen als bei T4 oder andere Konzentrationen benötigt werden. Auch hier werden weiterführende Versuche Aufschluss über den Hintergrund bringen müssen.

## VITAMIN D

Vielversprechend zeigten sich nachfolgende, von Rita Dreier durchgeführte Versuche, die einen Membran gebundenen Rezeptor als Ziel der Modifizierung durch Proteasen ausmachten:

Den 1, 25 D3 MARRS-Rezeptor. Dies ist ein Steroidbindendes Protein, das an der äußeren Plasmamembran verankert ist und die Spätdifferenzierung von Chondrozyten hemmt, nachdem es Vitamin D gebunden hat.

Das Seco-Steroid 1, 25 Dihydroxyvitamin D3 ist somit ein essentieller Regulator der Knochenentwicklung, des Wachstums und Remodeling von Knochen (Norman and Hurwitz, 1993). Vitamin-D-Hormone verändern die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten der Wachstumsfuge auf zwei verschiedenen Wegen. Erstens durch genomische Mechanismen auf dem klassischen Weg mittels Vitamin-D-Rezeptor (nVDR) und zweitens durch unmittelbare, nicht-genomische Mechanismen, die mit der Membran verbunden sind (MARRS)(Boyan et al., 2003).

Unter dem Einfluss von IGF I wird der 1,25 D3 MARRS-Rezeptor in 2 Fragmente gespalten. Dieser Prozess wird außer Kraft gesetzt und die Hypertrophie induziert, wenn E-64 oder Cystatin C gegenwärtig sind (Dreier et al., 2008).

Proteasen könnten nun den 1,25 D3 MARRS-Rezeptor proteolytisch verändern, sodass die Hemmung der Chondrozyten in ihrer späten Differenzierung aufgehoben wird. Dies würde erklären, warum die Induktion der Hypertrophie durch die Spaltung des 1,25 D3 MARRS-Rezeptors durch die Proteaseinhibitoren E-64 und Cystatin C außer Kraft gesetzt wird.

### KAPITEL 6 ZUSAMMENFASSUNG

Während der enchondralen Ossifikation wird Knorpelgewebe aus einer knorpeligen Anlage gebildet. Diesem Ersetzen von einem Gewebetyp durch den anderen geht eine Reihe von Prozessen voraus, die als Chondrozytenspätdifferenzierung bezeichnet wird. Sie beginnt mit Induktion der Proliferation kleiner, metabolisch wenig aktiver Ruhechondrozyten. Nach einigen Teilungszyklen dieser Zellen wird die Proliferation beendet und ihr Volumen vergrößert sich. Diese hypertrophen Chondrozyten sind neben morphologischen Merkmalen durch die Synthese spezifischer Differenzierungsmarker, vor allem Kollagen X und ALP, gekennzeichnet. Die Zellen bilden aktiv eine spezielle Matrix, nach deren Calcifizierung die Vaskularisierung des Knorpels mit anschließendem Ersetzen durch Knochen erfolgt. Diese Prozesse können

deutlich in der epiphysären Wachstumsfuge beobachtet werden, wo die säulenartig geordneten Chondrozyten sequenziell unterschiedliche Reifungsstadien darstellen.

Während die Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation in der Wachstumsfuge teilweise über Jahre erfolgt, ist sie im Hühnersternum zeitlich und räumlich begrenzt. Chondrozyten des kranialen Teils, dessen Verknöcherung noch in ovo beginnt und innerhalb der ersten Lebensmonate vollendet wird, proliferieren und werden bereits während der embryonalen Entwicklung hypertroph. Die Zellen des kaudalen Teils, der bei juvenilen Tieren knorpelig ist und erst später durch Knochen ersetzt wird, behalten hingegen über längere Zeit den Ruhechondrozytenphänotyp bei. Somit repräsentiert das kraniale Sternum die Spätdifferenzierung mit anschließender Ossifikation und das kaudale Sternum die blockierte Spätdifferenzierung

Die Chondrozytenspätdifferenzierung wird sowohl durch lösliche Faktoren als auch durch die ECM beeinflusst. Eine ausbalancierte Wirkung verschiedener Regulationsmechanismen gewährleistet die sukzessive Progression von Chondrozyten durch die Differenzierungsphasen.

Die allgemeine Annahme dabei ist, dass die Spätdifferenzierung bei jedem Chondrozyten vorprogrammiert ist. Der Beginn der Differenzierung sowie der Übergang zwischen den Differenzierungsphasen werden durch die Wirkung äußerer Faktoren blockiert oder verzögert. Somit ist die Chondrozytenspätdifferenzierung ein negativ regulierter Prozess.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die negativ kontrollierte Hypertrophieblockade von kranialen Chondrozyten durch Proteasen an verschiedenen Checkpoints modifiziert, bzw. aufgehoben wird. Diese Proteasen können nach Stimulation mit IGF-I, Insulin oder Thyroxin von den Chondrozyten selbst synthetisiert werden, wobei die Stimulation durch T4 stärker zu sein scheint als durch IGF-I oder Insulin. Durch die ubiquitären Eigenschaften von Proteasen sind sie in der Lage in nahezu allen vorher beschriebenen Regulationsmechanismen in der Wachstumsfuge eine modifizierende Rolle einzunehmen. Noch ist nicht bekannt auf welche Mechanismen bzw. Strukturen genau die Proteasen einwirken.

Bei der Osteoarthrose findet pathologischer Weise ebenfalls eine Deblockade der Spätdifferenzierung statt, die eine Degeneration der Knorpeligen Anteile der Gelenke zufolge hat. Somit sollten Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Deblockade, physiologisch bei der enchondralen Ossifikation, pathologisch bei der Osteoarthrose, Aufschlüsse über das Krankheitsbild der Osteoarthrose liefern.

## Quellen

- Abad, V., Meyers, J. L., Weise, M., Gafni, R. I., Barnes, K. M., Nilsson, O., Bacher, J. D. and Baron, J. (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143, 1851-7.
- Abu, E. O., Bord, S., Horner, A., Chatterjee, V. K. and Compston, J. E. (1997). The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone* 21, 137-42.
- Abu, E. O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J. T. and Compston, J. E. (2000). The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 883-9.
- Aigner, T., Soder, S., Gebhard, P. M., McAlinden, A. and Haag, J. (2007). Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 391-9.
- Alexander, C. M. and Werb, Z. (1992). Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J Cell Biol* 118, 727-39.
- Amling, M., Priemel, M., Holzmann, T., Chapin, K., Rueger, J. M., Baron, R. and Demay, M. B. (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, 4982-7.
- Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 5, 222-6.
- Babarina, A. V., Mollers, U., Bittner, K., Vischer, P. and 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, 205-13.
- Barnard, R., Haynes, K. M., Werther, G. A. and Waters, M. J. (1988). The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology* 122, 2562-9.
- Blumer, M. J., Longato, S. and Fritsch, H. (2008). Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone. *Ann Anat* 190, 305-15.
- Bohme, K., Conscience-Egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K. H. and 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, 1035-42.
- Boyan, B. D., Dean, D. D., Sylvia, V. L. and Schwartz, Z. (2003). Steroid hormone action in musculoskeletal cells involves membrane receptor and nuclear receptor mechanisms. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1, 130-5.
- Burch, W. M. and Van Wyk, J. J. (1987). Triiodothyronine stimulates cartilage growth and maturation by different mechanisms. *Am J Physiol* 252, E176-82.
- Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F. and Castagnola, P. (1995). Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159, 265-358.
- Cao, X. and Chen, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 357, 1-8.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-50.
- Chen, L., Li, C., Qiao, W., Xu, X. and Deng, C. (2001). A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates lh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet* 10, 457-65.
- Coon, H. G. (1966). Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 66-73.
- Daughaday, W. H. (1992). Pituitary gigantism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21, 633-47.
- Day, T. F. and Yang, Y. (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1, 19-24.
- Dayer, J. M. (1991). Chronic inflammatory joint diseases: natural inhibitors of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha. *J Rheumatol Suppl* 27, 71-5.

- Dean, D. D., Boyan, B. D., Schwart, Z., Muniz, O. E., Carreno, M. R., Maeda, S. and Howell, D. S. (2001). Effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* 14, 311-23.
- DeChiara, T. M., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849-59.
- Dieppe, P. A. and Lohmander, L. S. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365, 965-73.
- Donohue, M. M. and Demay, M. B. (2002). Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* 143, 3691-4.
- Dreier, R., Grassel, S., Fuchs, S., Schaumburger, J. and Bruckner, P. (2004). Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res* 297, 303-12.
- Dreier, R., Gunther, B. K., Mainz, T., Nemere, I. and 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, 1104-12.
- Drissi, H., Zuscik, M., Rosier, R. and O'Keefe, R. (2005). Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol Aspects Med* 26, 169-79.
- Ezzat, S. (1997). Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26, 703-23.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.
- Gafni, R. I., Weise, M., Robrecht, D. T., Meyers, J. L., Barnes, K. M., De-Levi, S. and Baron, J. (2001). Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res* 50, 618-23.
- Gerber, H. P. and Ferrara, N. (2000). Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10, 223-8.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-8.
- Gevers, E. F., van der Eerden, B. C., Karperien, M., Raap, A. K., Robinson, I. C. and Wit, J. M. (2002). Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17, 1408-19.
- Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A. and Scott, M. P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 10, 301-12.
- Gothe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J. M., Barros, A. C., Ohlsson, C., Vennstrom, B. and Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 13, 1329-41.
- Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D'Souza, M., Puzas, J. E., Reynolds, P. R., Rosier, R. N. and O'Keefe, R. J. (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 14, 475-82.
- Haaijman, A., Karperien, M., Lanske, B., Hendriks, J., Lowik, C. W., Bronckers, A. L. and Burger, E. H. (1999). Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide. *Bone* 25, 397-404.
- Haigh, J. J., Gerber, H. P., Ferrara, N. and Wagner, E. F. (2000). Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 127, 1445-53.
- Huangfu, D. and Anderson, K. V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133, 3-14.
- Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 28, 505-19.
- Hunziker, E. B., Wagner, J. and Zapf, J. (1994). Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J Clin Invest* 93, 1078-86.



- Ichikawa, K. and Hashizume, K. (1995). Thyroid hormone action in the cell. *Endocr J* 42, 131-40.
- Isaksson, O. G., Jansson, J. O. and Gause, I. A. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216, 1237-9.
- Jingushi, S., Scully, S. P., Joyce, M. E., Sugioka, Y. and Bolander, M. E. (1995). Transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factors in rat growth plate. *J Orthop Res* 13, 761-8.
- Jones, C. M., Lyons, K. M. and Hogan, B. L. (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 111, 531-42.
- Juul, A. (2001). The effects of oestrogens on linear bone growth. *Hum Reprod Update* 7, 303-13.
- Karsenty, G. and Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2, 389-406.
- Kirsch, T., Harrison, G., Golub, E. E. and Nah, H. D. (2000a). The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275, 35577-83.
- Kirsch, T., Swoboda, B. and Nah, H. (2000b). Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 294-302.
- Kolacna, L., Bakesova, J., Varga, F., Kostakova, E., Planka, L., Necas, A., Lukas, D., Amler, E. and Pelouch, V. (2007). Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiol Res* 56 Suppl 1, S51-60.
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-6.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C. et al. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273, 663-6.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L. and Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22, 53-74.
- Leach, R. M., Jr., Sokol, C. and McMurtry, J. P. (1997). Immunolocalization of basic fibroblast growth factor in porcine epiphyseal growth plate. *Domest Anim Endocrinol* 14, 129-32.
- Lewinson, D., Bialik, G. M. and Hochberg, Z. (1994). Differential effects of hypothyroidism on the cartilage and the osteogenic process in the mandibular condyle: recovery by growth hormone and thyroxine. *Endocrinology* 135, 1504-10.
- Liu, J. L. and LeRoith, D. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* 140, 5178-84.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Liu, Z., Xu, J., Colvin, J. S. and Ornitz, D. M. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 16, 859-69.
- Lum, L. and Beachy, P. A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304, 1755-9.
- Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V. and Efstratiadis, A. (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 229, 141-62.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* 3, 1657-68.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 109, 833-44.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M. and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273, 25628-36.
- Macias, D., Ganam, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124, 1109-17.

- Mak, K. K., Chen, M. H., Day, T. F., Chuang, P. T. and Yang, Y. (2006). Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* 133, 3695-707.
- Mancilla, E. E., De Luca, F., Uyeda, J. A., Czerwiec, F. S. and Baron, J. (1998). Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* 139, 2900-4.
- Mayne, R., Vail, M. S. and Miller, E. J. (1976). The effect of embryo extract on the types of collagen synthesized by cultured chick chondrocytes. *Dev Biol* 54, 230-40.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. and Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3, 439-49.
- Moustakas, A. and Heldin, C. H. (2002). From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 16, 1867-71.
- Muller, P. K., Lemmen, C., Gay, S., Gauss, V. and Kuhn, K. (1977). Immunochemical and biochemical study of collagen synthesis by chondrocytes in culture. *Exp Cell Res* 108, 47-55.
- Murphy, G. and Hembry, R. M. (1992). Proteinases in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 32, 61-4.
- Nakahara, H., Bruder, S. P., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. (1990). In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res*, 223-32.
- Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Dahlstrom, A., Skottner, A. and Isaksson, O. G. (1986). Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 233, 571-4.
- Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M. and Baron, J. (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 64, 157-65.
- Norman, A. W. and Hurwitz, S. (1993). The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. *J Nutr* 123, 310-6.
- Ohlsson, C., Isgaard, J., Tornell, J., Nilsson, A., Isaksson, O. G. and Lindahl, A. (1993). Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr Suppl* 82 Suppl 391, 33-40; discussion 41.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O., Bentham, J. and Lindahl, A. (1992a). Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J Endocrinol* 135, 115-23.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O. and Lindahl, A. (1992b). Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9826-30.
- Okubo, Y. and Reddi, A. H. (2003). Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 186-90.
- Ornitz, D. M. and Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16, 1446-65.
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D. and Werb, Z. (2003). How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995, 109-16.
- Peters, K., Ornitz, D., Werner, S. and Williams, L. (1993). Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol* 155, 423-30.
- Peters, K. G., Werner, S., Chen, G. and Williams, L. T. (1992). Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114, 233-43.
- Pfaffle, R. W., Parks, J. S., Brown, M. R. and Heimann, G. (1993). Pit-1 and pituitary function. *J Pediatr Endocrinol* 6, 229-33.
- Pullig, O., Weseloh, G., Ronneberger, D., Kakonen, S. and Swoboda, B. (2000). Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int* 67, 230-40.
- Reddi, A. H. (2001). Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S1-6.
- Rivkees, S. A., Bode, H. H. and Crawford, J. D. (1988). Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N Engl J Med* 318, 599-602.

- Robinson, D., Efrat, M., Mendes, D. G., Halperin, N. and Nevo, Z. (1993). Implants composed of carbon fiber mesh and bone-marrow-derived, chondrocyte-enriched cultures for joint surface reconstruction. *Bull Hosp Jt Dis* 53, 75-82.
- Robson, H., Siebler, T., Stevens, D. A., Shalet, S. M. and Williams, G. R. (2000). Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 141, 3887-97.
- Root, A. W. and Root, M. J. (2002). Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2, 27-52.
- Rosenfeld, R., Allen, D. B., MacGillivray, M. H., Alter, C., Saenger, P., Anhalt, H., Hintz, R. and Katz, H. P. (2000). Growth hormone use in pediatric growth hormone deficiency and other pediatric growth disorders. *Am J Manag Care* 6, S805-16.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7632-6.
- Russell, S. M. and Spencer, E. M. (1985). Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 116, 2563-7.
- Salmon, W. D., Jr. and Daughaday, W. H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49, 825-36.
- Sandell, L. J. and Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3, 107-13.
- Savage, M. O., Burren, C. P., Blair, J. C., Woods, K. A., Metherell, L., Clark, A. J. and Camacho-Hubner, C. (2001). Growth hormone insensitivity: pathophysiology, diagnosis, clinical variation and future perspectives. *Horm Res* 55 Suppl 2, 32-5.
- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M. and Johnson, R. S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15, 2865-76.
- Schlechter, N. L., Russell, S. M., Greenberg, S., Spencer, E. M. and Nicoll, C. S. (1986). A direct growth effect of growth hormone in rat hindlimb shown by arterial infusion. *Am J Physiol* 250, E231-5.
- Schlesinger, S., MacGillivray, M. H. and Munschauer, R. W. (1973). Acceleration of growth and bone maturation in childhood thyrotoxicosis. *J Pediatr* 83, 233-6.
- Segni, M., Leonardi, E., Mazzoncini, B., Pucarelli, I. and Pasquino, A. M. (1999). Special features of Graves' disease in early childhood. *Thyroid* 9, 871-7.
- Silvestrini, G., Mocetti, P., Ballanti, P., Di Grezia, R. and Bonucci, E. (1999). Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat. *Endocr Res* 25, 117-28.
- Smeets, T. and van Buul-Offers, S. (1986). Influence of growth hormone and thyroxine on cell kinetics in the proximal tibial growth plate of Snell dwarf mice. *Cell Tissue Kinet* 19, 161-70.
- Stevens, D. A. and Williams, G. R. (1999). Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Mol Cell Endocrinol* 151, 195-204.
- Szebenyi, G. and Fallon, J. F. (1999). Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 185, 45-106.
- Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducy, P. and Karsenty, G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15, 467-81.
- Teo, W. E., He, W. and Ramakrishna, S. (2006). Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix. *Biotechnol J* 1, 918-29.
- Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R. Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T. and Arner, E. (2000). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 275, 25791-7.
- Underwood, J. L., Phelps, M. E. and DeLuca, H. F. (1984). Complex carbohydrate diets are not capable of maintaining normal plasma calcium and phosphorus levels in vitamin D-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2352-3.
- van der Eerden, B. C., Karperien, M. and Wit, J. M. (2003). Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24, 782-801.

- Vanhoutte, D., Schellings, M., Pinto, Y. and Heymans, S. (2006). Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 69, 604-13.
- Veldhuis, J. D. (1998). Neuroendocrine control of pulsatile growth hormone release in the human: relationship with gender. *Growth Horm IGF Res* 8 Suppl B, 49-59.
- Vetter, U., Zapf, J., Heit, W., Helbing, G., Heinze, E., Froesch, E. R. and Teller, W. M. (1986). Human fetal and adult chondrocytes. Effect of insulinlike growth factors I and II, insulin, and growth hormone on clonal growth. *J Clin Invest* 77, 1903-8.
- von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Gluckert, K. and Stoss, H. (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* 35, 806-11.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-22.
- Vortkamp, A., Pathi, S., Peretti, G. M., Caruso, E. M., Zaleske, D. J. and Tabin, C. J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 71, 65-76.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M. and Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-22.
- Wakita, R., Izumi, T. and Itoman, M. (1998). Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. *Cell Tissue Res* 293, 357-64.
- Wang, W. and Kirsch, T. (2002). Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J Cell Biol* 157, 1061-9.
- Wang, W., Xu, J. and Kirsch, T. (2003). Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 3762-9.
- Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-42.
- Werther, G. A., Haynes, K., Edmonson, S., Oakes, S., Buchanan, C. J., Herington, A. C. and Waters, M. J. (1993). Identification of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes. *Acta Paediatr Suppl* 82 Suppl 391, 50-3.
- Wit, J. M., Drayer, N. M., Jansen, M., Walenkamp, M. J., Hackeng, W. H., Thijssen, J. H. and Van den Brande, J. L. (1989). Total deficiency of growth hormone and prolactin, and partial deficiency of thyroid stimulating hormone in two Dutch families: a new variant of hereditary pituitary deficiency. *Horm Res* 32, 170-7.
- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Savage, M. O. and Clark, A. J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335, 1363-7.
- Woods, K. A. and Savage, M. O. (1996). Laron syndrome: typical and atypical forms. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10, 371-87.
- Wu, C. W., Tchetina, E. V., Mwale, F., Hasty, K., Pidoux, I., Reiner, A., Chen, J., Van Wart, H. E. and Poole, A. R. (2002). Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res* 17, 639-51.
- Young, H. E., Ceballos, E. M., Smith, J. C., Mancini, M. L., Wright, R. P., Ragan, B. L., Bushell, I. and Lucas, P. A. (1993). Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A, 723-36.
- Zapf, J., Schoenle, E. and Froesch, E. R. (1985). In vivo effects of the insulin-like growth factors (IGFs) in the hypophysectomized rat: comparison with human growth hormone and the possible role of the specific IGF carrier proteins. *Ciba Found Symp* 116, 169-87.
- Zelzer, E., Glotzer, D. J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S. and Olsen, B. R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 106, 97-106.
- Zhou, Y., Xu, B. C., Maheshwari, H. G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T. E. et al. (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13215-20.

# TOM MAINZ

## PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

- Familienstand: Ledig
- Nationalität: Deutsch
- Alter: 38 Jahre
- Geburtsdatum : 25. September 1971
- Geburtsort: Berlin-Kaulsdorf
- Eltern: Klaus Albert Mainz, Helga Rheinfeld-Sweering

## AUSBILDUNG

---

1976-1982	Grundschule Bookholzberg
1982-1984	Orientierungsstufe Bookholzberg
1984-1987	Gymnasium Ganderkesee
1987-1990	Gymnasium Warendorf
1990-1993	Ausbildung zum Pferdewirt in Böbs
1995-1998	Overberg-Kolleg Münster
Seit 1998	Studium der Zahnmedizin in Münster
2007	Approbation als Zahnarzt

## ERSATZDIENST

---

1999-2000	Zivildienst beim Malteser Behindertenfahrdienst in Münster
-----------	--

## BERUFLICHER WERDEGANG

August 2007	Assistententätigkeit in Amelsbüren
Januar 2009	Assistententätigkeit in Bremen
Oktober 2009	Übernahme der mütterlichen Praxis



