

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

Rolle von Syndecan-4 bei der Chondrozytendifferenzierung

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Ewa Hanna Olszewska

aus Koscierzyna, Polen

-2011-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1.Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. P. Bruckner

2.Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Th. Pap

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Peter Bruckner

Referent: Univ.-Prof. Dr. P. Bruckner

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Th. Pap

ZUSAMMENFASSUNG

Rolle von Syndecan-4 bei der Chondrozytendifferenzierung

Ewa Hanna Olszewska

Syndecan-4 gehört zu den Heparansulfat-Proteoglykanen und wird in Epithelzellen, Endothelzellen, Fettzellen, Fibroblasten sowie Neuronalgewebe exprimiert. Während der embryonalen Knochenentwicklung kann dieses Proteoglykan auch in der Wachstumsfuge beobachtet werden (Echtermeyer, unpubliziert). Bei an Osteoarthritis erkrankten Patienten wird dieses Proteoglykan im Gelenkknorpel verstärkt exprimiert und hat eine die Knorpeldegradation fördernde Wirkung. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Syndecan-4 auf die Chondrozytendifferenzierung *in vitro* und in Tibia-Organokulturen untersucht. Die Stimulation von Syndecan-4-Knockout- und Wildtyp-Maus-Knorpelzellen und Tibien mit Insulin, IGF-I und Thyroxin führte zu der Erkenntnis, dass Syndecan-4-Knockout-Maus-Chondrozyten unter dem Einfluss *in vitro* stärker proliferieren. Die Annahme, dass die Thyroxin-induzierte hypertrophe Differenzierung (Synthese von Kollagen Typ X) in Syndecan-4-defizienten Chondrozyten gegenüber Wildtyp-Chondrozyten verzögert ist, konnte nicht bestätigt werden. Das Fehlen von Syndecan-4 wird von anderen Komponenten der extrazellulären Matrix zum Teil kompensiert. Unter dem Einfluss von Thyroxin und FKS ist die Kompensation beeinträchtigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Rolle von Syndecan-4 bei der Chondrozytendifferenzierung

im:

Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Münster

unter Anleitung von:

Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Bruckner

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Bielefeld, 26.10.2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Syndecan-4 Knockout Maus	6
1.2 Das Knochengewebe.....	8
1.2.1 Ossifikation	8
1.2.1.1 Desmale Ossifikation	9
1.2.1.2 Chondrale Ossifikation	10
1.3 Der Knorpel.....	13
1.3.1 Fötaler Knorpel.....	14
1.3.2 Hyaliner Knorpel	14
1.3.3 Elastischer Knorpel.....	15
1.3.4 Faserknorpel	16
1.4 Extrazelluläre Matrix	16
1.4.1 Kollagene	18
1.4.1.1 Kollagen Typ II	21
1.4.1.2 Kollagen Typ X	21
1.4.2 Hyaluronsäure.....	21
1.4.3 Proteoglykane	22
1.4.3.1 Die Syndecanfamilie	25
1.4.3.1.1 Syndecan-4	27
1.5 Einfluss löslicher Faktoren auf die Chondrozytendifferenzierung.....	30
1.5.1 Insulin.....	34
1.5.2 Insulin-like growth factor.....	34
1.5.3 Thyroxin	35
2 Fragestellung der Arbeit.....	36
3 Materialien und Methoden.....	37
3.1 Material	38
3.1.1 Allgemeine Materialien.....	38
3.1.2 Geräte	39
3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Chondrozyten-Zellkulturen aus Knorpel von Wildtyp- und Syndecan-4 Knockout-Mäusen.....	40
3.2.1.1 Die Chondrozyten- Zellkulturen.....	40
3.2.1.1.1 Präparation der Mausbrustkörbe.....	40
3.2.1.2 Die Vorbereitung der Zell-Suspension	41

3.2.1.2.1	Die Agarosekultur der Chondrozyten (modifiziert nach Benya und Shaffer, 1982).....	42
3.2.1.3	Die Chondrozytenkultivierung	43
3.2.2	Die Tibia-Organ-Kulturen.....	44
3.2.2.1	Präparation der Maustibien	44
3.2.2.2	Kultivierung der Tibien.....	44
3.2.3	Bestimmung der alkalischen Phosphatase	45
3.2.4	Metabolische Markierung	45
3.2.5	Die Kollagenpräparation aus Agarose und Medien (24 Well Kulturschale) ..	46
3.2.6	Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.2.7	Fluorographie	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Einfluss löslicher Faktoren auf die Spätdifferenzierung der Chondrozyten ...	50
4.2	Einfluss löslicher Faktoren auf das Tibiawachstum.	59
4.2.1	Gesamtlängenänderung der Wt und Syn4 ^{-/-} Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.	61
4.2.2	Tibiakopflängenänderung der Wt und Syn4 ^{-/-} Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.	63
4.2.3	Tibiakopfbreiteänderung der Wt und Syn4 ^{-/-} Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.	65
4.3	Die Zusammenfassung der Ergebnisse.	67
5	Diskussion	68
5.1	Einfluss löslicher Faktoren auf die Spätdifferenzierung der Chondrozyten ...	69
5.2	Einfluss löslicher Faktoren auf das Tibiawachstum	72
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	73
7	Literaturverzeichnis	75
8	Lebenslauf	79
9	Danksagung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : Genom der Syn-4-Knockout-Maus.....	6
Abb. 2 : Syn-4-Promotorabhängige Beta-Galaktosidase Aktivität	7
Abb. 3 : Desmale Ossifikation	9
Abb. 4 : Enchondrale Ossifikation	10
Abb. 5 : Chondrale Ossifikation	11
Abb. 6 : Epiphysenfuge eines menschlichen Fetus.....	13
Abb. 7 : Hyaliner Knorpel	15
Abb. 8 : Elastischer Knorpel.....	15
Abb. 9 : Faserknorpel,	16
Abb. 10: Produktion der extrazellulären Matrix des Knorpels.....	17
Abb. 11: Kollagenmolekül in einer Fibrille.....	19
Abb. 12: Schematische Darstellung der Aggregate des Proteoglykans Aggrecan mit Hyaluronsäure.....	22
Abb. 13: Aufbau von Proteoglykanen.....	23
Abb. 14: Transmembranen Proteoglykane	23
Abb. 15: Die Syndecanfamilie	25
Abb. 16: Aufbau von Syndecanen	26
Abb. 17: Grundaufbau von Syn-4	28
Abb. 18: Syndecan-4-vermittelte Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren.....	29
Abb. 19: Expression von Syn-4 in der Wachstumsfuge während Embryonalentwicklung	30
Abb. 20: Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch die Interaktion von PTHrP, Ihh, BMPs und FGFs.....	32
Abb. 21: Regulation der Wachstumsfuge und der enchondraler Ossifikation	33
Abb. 22: Darstellung der untersuchten Kulturen	37
Abb. 23: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4-\-Chondrozyten.....	50
Abb. 24: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistener Kollagene	51
Abb. 25: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4-\-Chondrozyten.....	52
Abb. 26: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistener Kollagene	53
Abb. 27: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4-\-Chondrozyten.....	54
Abb. 28: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistener Kollagene	54
Abb. 29: Zellkultur der Wildtyp und Syn4-/- Chondrozyten, unstimuliert.....	56
Abb. 30: Zellkultur der Wildtyp und Syn4-/- Chondrozyten, stimuliert mit Insulin	56
Abb. 31: Zellkultur der Wildtyp und Syn4-/- Chondrozyten, stimuliert mit IGF-I.....	57

Abb. 32: Zellkultur der Wildtyp und Syn4 ^{-/-} Chondrozyten, stimuliert mit Thyroxin ..	57
Abb. 33: Zellzuwachsrate unter dem Einfluss verschiedener löslicher Faktoren.....	58
Abb. 34: Prozentuelle Zellzuwachsrate unter dem Einfluss verschiedener löslicher Faktoren	59
Abb. 35: Photographische Darstellung der Syndecan4 Knockout- und der Wildtyp- Maus Tibien.....	60
Abb. 36: Darstellung der Tibiaabmessungen.....	60
Abb. 37: Gesamtlängenänderung der Wildtyp-Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	61
Abb. 38: Gesamtlängenänderung der Syn4 ^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	62
Abb. 39: Prozentuelle Gesamtlängenänderung der Wildtyp und Syn4 ^{-/-} Maus- Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	62
Abb. 40: Kopflängenänderung der Wildtyp- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	63
Abb. 41: Kopflängenänderung der Syn4 ^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	64
Abb. 42: Prozentuelle Tibiakopflängeänderung der Wildtyp und Syn4 ^{-/-} Maus- Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	64
Abb. 43: Tibiakopflängenänderung der Wildtyp- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	65
Abb. 44: Tibiakopfbreiteänderung der Syn4 ^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	66
Abb. 45: Prozentuelle Tibiakopfbreitenänderung der Wildtyp und Syn4 ^{-/-} Maus- Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.....	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ossifikationsarten.....	9
Tab. 2: Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knochens und Knorpels	18
Tab. 3: Kollagen-Typen (Auswahl)	20
Tab. 4: Proteoglykane.....	24
Tab. 5: Verhältnis von Kollagen X zu II nach Auswertung mit Image Quant	55

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammonium-Persulfat
Aufl.	Auflage
bp	Basenpaare
BMP	Bone Morphogenetic Protein
°C	Grad Celsius
Coll	Collagen
CS	Chondroitinsulfat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et. al.</i>	und andere
FAK	fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	FGF Rezeptor
FKS	Fötales Kälberserum
GAG	Glycosaminoglycan
Gly	Glykane
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HS	Heparansulfat
IGF	Insulin-Like Growth Factor
Ihh	Indian hedgehog
kDa	Kilodalton
KS	Keratansulfat

M	Molar
mA	Milliampère
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PIP ₂	Phosphatidylinositol
PKC- α	Proteinkinase C- α
PTHrP	Parathormon-related-peptide
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Syn-4	Syndecan-4
Syn-4-/-	Syndecan-4-Knockout-Maus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF	Transforming growth factor
TGF- β	Transforming growth factor- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Ammonium-Persulfat
T ₄	Thyroxin
u.a.	und andere
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen zu Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen

1 Einleitung

1.1 Syndecan-4 Knockout Maus

Um eine Funktion von im Körper vorkommenden Proteinen oder Proteoglykanen genauer zu untersuchen, werden Mäuse gezüchtet, deren Genom sich durch das Fehlen von entsprechenden Kodierungssequenzen auszeichnet. Auch für das Syndecan-4, das zu der Familie der Heparan-sulfat Proteoglykane gehört (genaueres Kapitel 1.4.3), wurde eine Syndecan-4 Knockout-Maus durch die Benutzung einer LacZ-Knock-in-Strategie durch homologe Rekombination generiert. Hierfür wurden die Syndecan-4 kodierenden Exone 2, 3 und 4 ausgetauscht und durch Gene für Beta-Galaktosidase und Neomycin-Resistenz ersetzt (Abb.1). Durch C57/BL6 Rückkreuzung generierte Syndecan-4 Knockout-Mäuse reproduzieren und entwickeln sich normal und weisen äußerlich keine Anomalien im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen auf (Echtermeyer *et. al.*, 2001).

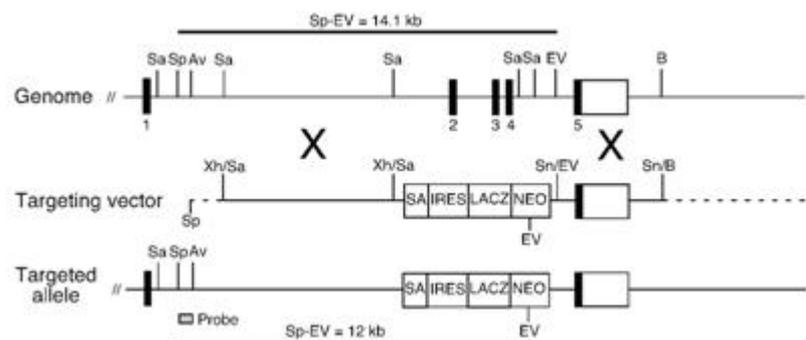


Abb. 1 : Genom der Syn-4-Knockout-Maus

Ihr Entwicklungs- und Reproduktionsverhalten zeigt keinen Unterschied zu den Wild-Typ Mäusen. Nach Wundsetzung zeigt sich hingegen ein Unterschied in der Heilung. Die Syndecan-4-defizienten Mäuse zeigen eine verlangsamte Wundheilung zwischen dem dritten und dem sechsten Tag nach Wundsetzung. Das Granulationsgewebe und die Wundrandkontraktion sind weniger ausgeprägt. Nach sieben Tagen ist kein Unterschied mehr in der Granulationsgewebeformung vorhanden. Nach neun Tagen ist die Wundrandkontraktion von Wt- und Syn-4 ^{-/-} Mäusen gleich (Echtermeyer *et. al.*, 2001). Des

Weiteren ist auf zellulärer Ebene eine reduzierte Migrationsfähigkeit der Fibroblasten bei den Syn-4 Knockout Mäusen zu finden (Echtermeyer *et. al.*, 2001). Wie aus Abbildung 2 zu entnehmen, zeigen die Syndecan-4 Knockout-Mäuse eine Syn-4-Promotorabhängige Beta-Galaktosidase-Aktivität in den Wachstumsfugen der Extremitäten, die bei den Wild-Typ Mäusen nicht nachweisbar ist.



Abb. 2 : Syn-4-Promotorabhängige Beta-Galaktosidase Aktivität

[Echtermeyer, unpubliziert]

In proliferativen Chondrozyten und in Kollagen X produzierenden Zellen der hypertrophen Zone kann eine verstärkte Syn4 Produktion beobachtet werden (Echtermeyer, unpubliziert). Dieses führte zu der Annahme, dass Syndecan 4 eine Rolle in der Knochenentwicklung spielen könnte.

1.2 Das Knochengewebe

Knochengewebe gehört zu den höchst spezialisierten Bindegeweben. Bestehend aus einer komplexen Matrix, die mit Kalziumsalzen angereichert ist, übernimmt es eine Stütz- und Skelettfunktion. Als Grundbaustein des Bewegungsapparates verfügt es über eine hohe Druck- und Zugfestigkeit. Die hohe Stoffumsatzrate wird durch die gute Durchblutung und die ständigen Umbauvorgänge gewährleistet, die vielfältigen hormonellen, nutritiven und metabolischen Einflüssen unterliegt. Dieses Gewebe ist aus zwei Grundphasen aufgebaut, einer mineralischen Phase mit Kalziumsalzen und einer organischen Matrix, die überwiegend aus Kollagen vom Typ I besteht (Welsch; Lehrbuch Histologie).

Die Knochenmatrix übernimmt alle wesentlichen Funktionen des Knochens. Sie besteht aus:

- ca. 35% organischem Material, was wesentlich aus Kollagen Typ I besteht. Weitere, von Osteoblasten produzierte Bestandteile, sind Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Knochensialoprotein, Thrombospondin, u.v.a.
- ca. 65% anorganischen Salzen, vorwiegend Hydroxylapatitkristallen $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$.
(Welsch; Lehrbuch Histologie)

1.2.1 Ossifikation

Das Knochengewebe wird, wie in Tab. 1 zu sehen, in zwei verschiedenen Prozessen gebildet, der desmalen und der chondralen Ossifikation, (Welsch; Lehrbuch Histologie).

	<u>Desmale Ossifikation</u>	<u>Chondrale Ossifikation</u>
Knochenart	flache Schädelknochen, Klavikula	Extremitätenknochen, Wirbel
Zellen	Mesenchymzellen	Mesenchymzellen, Chondrozyten
Art der Knochenbildung	direkt, Osteoblasten	indirekt, Ersatz des Knorpels durch Knochen

Tab. 1: Ossifikationsarten

[modifiziert nach Welsch; Lehrbuch Histologie]

1.2.1.1 Desmale Ossifikation

Infolge einer direkten Knochenbildung lagern sich Mesenchymzellen an den gefäßreichen „Ossifikationspunkten“ an und differenzieren zu Osteoblasten, die die Fähigkeit besitzen, Matrixproteine zu sezernieren. Nach Verkalkung entsteht ein parallel zu den Gefäßen verlaufendes Trabekelgeflecht, siehe Abb.3. Diese Vorgänge finden in den flachen Schädelknochen und in der Klavikula statt (Welsch; Lehrbuch Histologie).

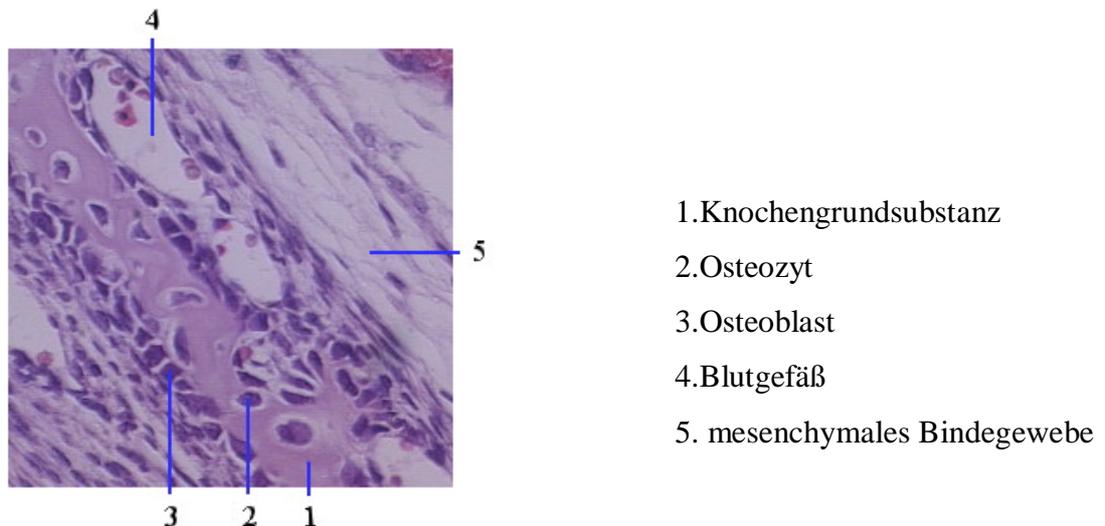


Abb. 3 : Desmale Ossifikation

(Ratte, 18. Fetaltag, HE, 31,25x)

<http://www.anatomie.net/histowebatlas/n-82.htm>

1.2.1.2 Chondrale Ossifikation

Die indirekte Knochenbildung erfolgt in zwei Prozessen:

- perichondrale Ossifikation, in der ausgehend vom Periost durch direkte Verknöcherung die äußere Knochenmanschette gebildet wird.
- enchondrale Ossifikation, in der das sich im Inneren befindliche Knorpelgewebe indirekt zum Knochen umgebaut wird.

In diesem Prozess, der ab dem 5. Fetalmonat in den Extremitätenknochen und den Wirbeln verläuft, durchlaufen die Knorpelzellen (Abb.4 A) eine Differenzierungskaskade von Ruhechondrozyten, über proliferative Chondrozyten, bis zu hypertrophen Chondrozyten (Abb.4 C).

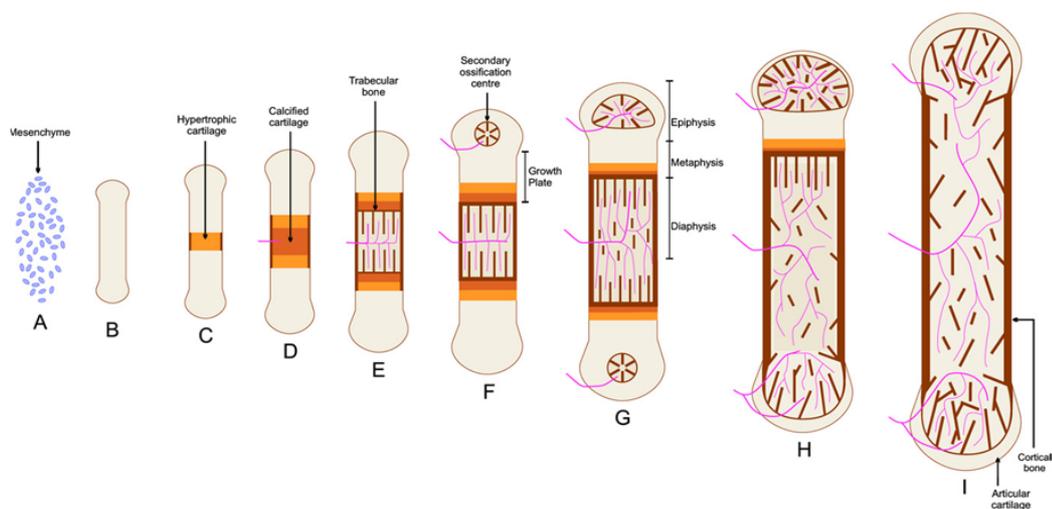
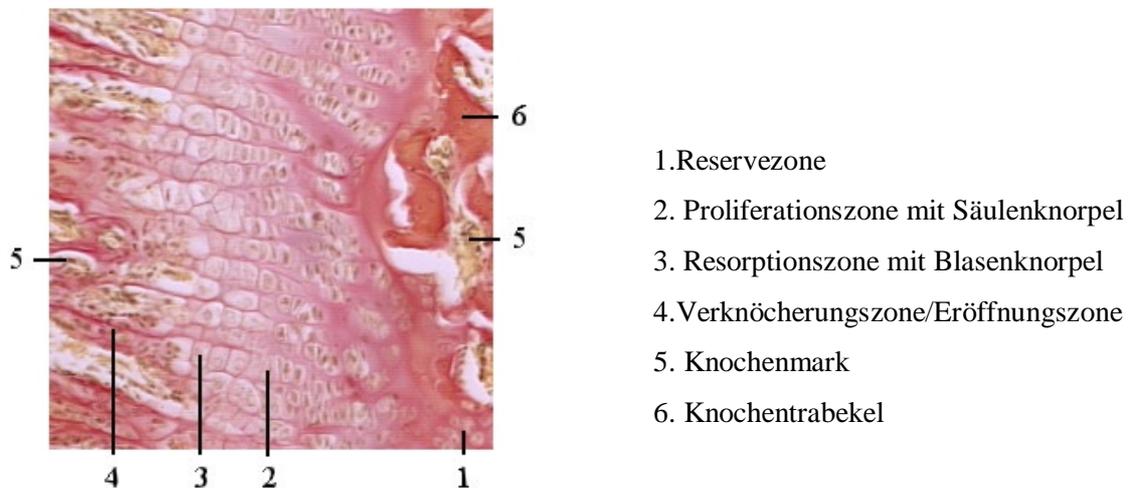


Abb. 4 : Enchondrale Ossifikation

[Wilson *et. al.*, 2008]

Nach Einsprossung eines Gefäßes in die Diaphyse (Schaft) folgt eine Resorption durch Chondroklasten. In dieser Phase kommt es zur Verkalkung (Abb.4 D) der durch Klastenenzyme aufgetriebenen Chondrozyten, die hier auch als Blasenknorpel bezeichnet werden. Die Mesenchymzellen differenzieren neben Chondroklasten auch zu Osteoblasten, die an der Grenze zwischen Diaphyse (Abb.4 G) und Blasenknorpel eine Ossifikationszone bilden und Osteoid ausscheiden. An den Epiphysen (Enden) verläuft dieser Prozess erst nach der Geburt, deswegen werden diese Zonen auch als ruhender Knorpel bezeichnet (Welsch; Lehrbuch Histologie).



1. Reservezone
2. Proliferationszone mit Säulenknorpel
3. Resorptionszone mit Blasenknorpel
4. Verknöcherungszone/Eröffnungszone
5. Knochenmark
6. Knochentrabekel

Abb. 5 : Chondrale Ossifikation

Kniegelenk (Ratte, ElHvG, 12,5x)

<http://www.anatomie.net/histoweatlas/n-82.htm>

In dem in Abbildung 5 dargestellten histologischen Präparat sind die oben beschriebenen und in Abbildung 4 schematisch dargestellten Zonen sehr gut sichtbar. Dieses Präparat, das von einer erwachsenen Ratte stammt, zeigt das Voranschreiten des Längenwachstum des Knochen, wobei die Epiphyse (rechts) keine große Reservezone aus Knorpel mehr enthält, sondern schon verknöchert ist. Das sekundäre Ossifikationszentrum ist auf der rechten Seite zu erkennen.

Wie man aus der Abbildung 5 entnehmen kann, sind in der Epiphysenfuge verschiedene Zonen sichtbar (Cancedda *et. al.*, 2000 und van der Eerden *et. al.*, 2003):

- Die Reservezone mit ruhenden Knorpelzellen. In der Ruhezone befinden sich keine Blutgefäße und es erfolgt kein Wachstum. Die hier sich befindlichen Chondrozyten produzieren Kollagen II, IX, XI und das Knorpelproteoglycan Aggrecan.

- Die Proliferationszone mit hoher Chondrozytenteilungsrate. Die Chondrozyten bilden hier die charakteristische Säulenordnung. Deshalb wird diese Zone auch als Säulenknorpel bezeichnet. Die Knorpelzellen dieser Zone produzieren die gleichen Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix wie in der Reservezone, Kollagen II, IX, XI und das Knorpelproteoglycan Aggrecan.

- Die Resorptionszone, die aus großen, runden, hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. Diese produzieren alkalische Phosphatase und Kollagen X. Außerdem werden die extrazellulären Proteine VEGF und Osteopontin, und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Cbfa-1 (Runx-2) produziert.

- Abschließend die Verknöcherungszone in der der Knorpel verkalkt.

Die Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt aus der Epiphysenfuge. Die drei für das Wachstum wichtigsten Zonen (Säulenknorpel, Blasenknorpel und Verknöcherungszone), in denen Proliferation und Apoptose des Knorpels, bzw. die Verknöcherung stattfinden, sind in der Abb. 6A dargestellt. In der Verknöcherungszone der Epiphysenfuge gehen die Knorpelzellen zu Grunde und lassen Knorpelsubstanz zurück (Abb.6B oben). Auf die Oberfläche der Knorpelreste wandern Osteoblasten (Pfeilköpfe), die Geflechtknochen (rot) produzieren, ein (Abb.6B). Die Chondroblasten (Stern) bauen Knorpelreste ab (Abb.6B).

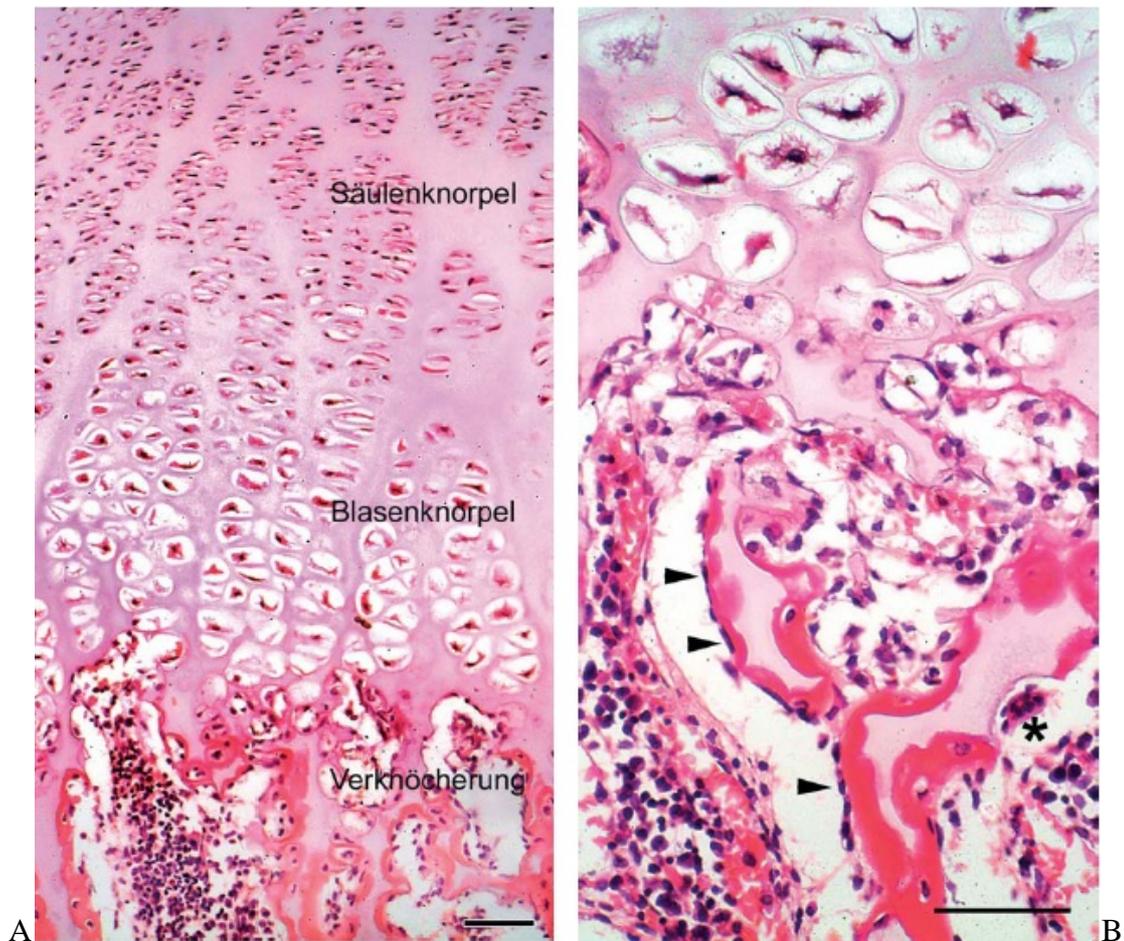


Abb. 6 : Epiphysenfuge eines menschlichen Fetus

A Längsschnitt durch verschiedene Zonen der Epiphysenfuge

B Vergrößerung aus der Verknöcherungszone der Epiphysenfuge eines Fingerknochens

Balken = 100 µm, HE-Färbung [Junqueira, Histologie]

1.3 Der Knorpel

In Zügen der enchondralen Ossifikation wird durch die indirekte Knochenbildung das Knorpelgewebe durch eine Reihe verschiedener Differenzierungsvorgänge zu Knochen umgebaut. Deswegen spielt der Knorpel für diese Arbeit eine übergeordnete Rolle. Wie das Knochengewebe gehört auch der Knorpel zum Bindegewebe mit einer Stützfunktion. Seine Eigenschaften werden im Wesentlichen durch die interfibrilläre Grundsubstanz, die extrazelluläre Matrix, bestimmt. Dieses sich aus Mesenchym entwickelnde Gewebe ist sehr fest und elastisch verformbar, deswegen spielt es vor allem in der emb-

ryonalen Skelettentwicklung eine übergeordnete Rolle. Das Knorpelgewebe weist keine Nerven und Gefäße auf. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion aus Perichondrium, einer den Knorpel bedeckenden Bindegewebshaut. Die rundlich-ovalen Knorpelzellen werden Chondrozyten genannt und produzieren je nach Art eine charakteristische extrazelluläre Matrix (Welsch, Lehrbuch Histologie).

So können wir verschiedene Knorpelformen unterscheiden:

- fötaler Knorpel
- hyaliner Knorpel
- elastischer Knorpel
- Faserknorpel

1.3.1 Fötaler Knorpel

Zwischen den rundlichen oder sternförmigen und chondronfreien Knorpelzellen können Blutgefäße vorkommen (Welsch, Lehrbuch Histologie).

1.3.2 Hyaliner Knorpel

Die am häufigsten vorkommende Knorpelart weist eine milchglasartig-bläuliche Färbung auf und kann im Gelenkknorpel, Rippenknorpel, Synchronosen, in der Epiphysefuge, Trachea und in den Bronchien u.a. gefunden werden. Im histologischen Präparat wird ein charakteristischer Aufbau aus Territorien und Interterritorien sichtbar. Das Territorium besteht aus zwei bis sechs Chondrozyten, die von einem basophilen Knorpelhof umgeben sind, was auf einen hohen Proteoglykangehalt zurückzuführen ist. Die interterritoriale Matrix enthält Typ-II-haltige-Kollagenfibrillen, die durch einen Proteoglykan-Mantel aus Chondroitinsulfat „maskiert“ sind. Deswegen und aufgrund ihrer Größe sind sie im Lichtmikroskop nicht sichtbar. Im Elektronenmikroskop oder Polarisationsmikroskop sind die 15-45 nm dicken, meist parallel zur Oberfläche verlaufenden Fibrillen gut sichtbar (Welsch, Lehrbuch Histologie).

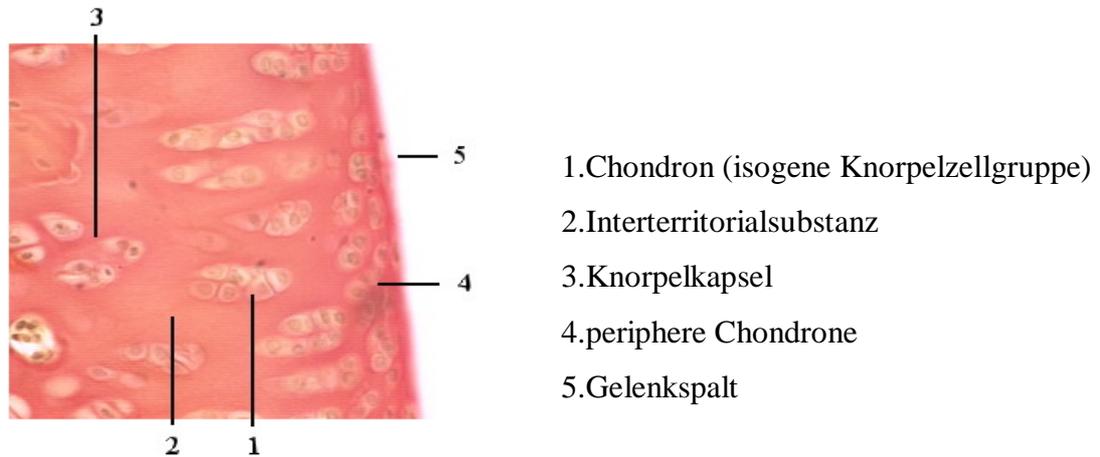


Abb. 7 : Hyaliner Knorpel

Kniegelenk (Ratte, ElHvG, 31,25x)

<http://www.anatomie.net/histowebatlas/n-82.htm>

1.3.3 Elastischer Knorpel

Diese Knorpelart weist eine gelbliche Farbe auf und kommt vor allem im Ohr (Ohrmuschel, Tuba auditiva, äußerer Gehörgang), der Epiglottis, in den kleinen Bronchien und im Kehlkopf vor. Im Gegensatz zu hyalinem Knorpel sind die Chondrone kleiner und meistens in Reihe angeordnet, siehe Abb.8. In der interterritorialen Matrix treten auch elastische Fasern auf, was dieser Knorpelart die enorme Elastizität verleiht (Welsch, Lehrbuch Histologie).

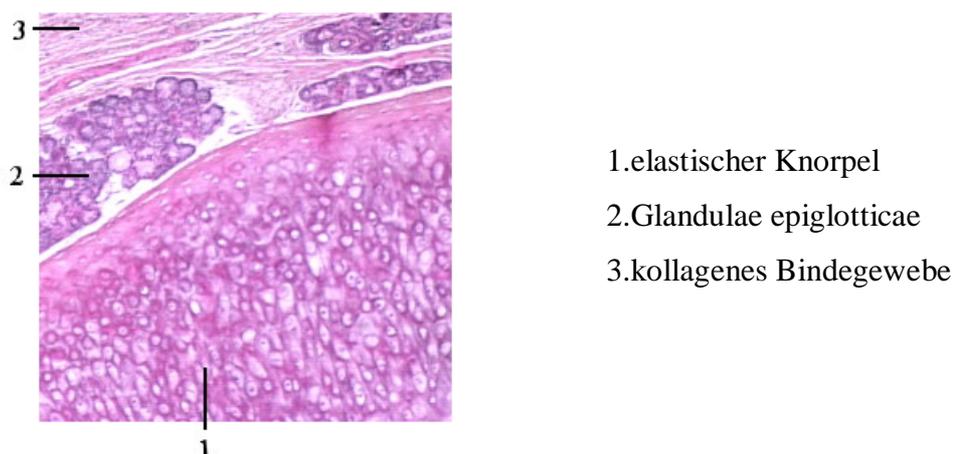


Abb. 8 : Elastischer Knorpel

Epiglottis (Mensch, HE, 31,25x)

<http://www.anatomie.net/histowebatlas/n-82.htm>

1.3.4 Faserknorpel

In dieser Knorpelart, die in der Symphysis pubica, in den Disci und Menisci und im Anulus fibrosus der Bandscheibe zu finden ist, liegen die Chondrozyten weit auseinander und weisen seltener einen basophilen Hof auf, siehe Abb. 9. Der Gehalt an Chondroitinsulfat ist sehr niedrig, was als Folge die „Maskierung“ aufhebt. Neben Typ-II-Kollagen kommen auch Bündel von Typ-I-Kollagen vor (Welsch; Lehrbuch Histologie).

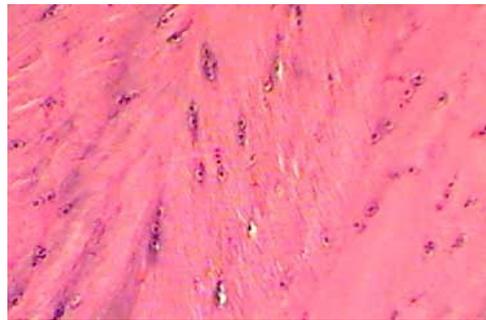


Abb. 9 : Faserknorpel,

Discus intervertebralis (Mensch, HE, 165x)

http://localhost.ruhr.de/~mcm/mcm/micro/d/bild_histo_knorpel.htm

1.4 Extrazelluläre Matrix

Die von Zellen ausgeschiedene und sie umgebende Zwischensubstanz wird extrazelluläre Matrix genannt. Sie wird von verschiedenen Molekülen wie Kollagenen, Proteoglykanen, Elastin, nichtkollagenen Glycoproteinen und Wasser, deren Zusammensetzung je nach Gewebeart variiert, gebildet. Außer Bindegewebszellen wie Chondrozyten, Chondroblasten, Fibrozyten, Fibroblasten, Osteozyten und Osteoblasten besitzen auch Epithel- und Endothelzellen die Fähigkeit, Komponenten der extrazellulären Matrix zu produzieren und zu sezernieren (Abb.10). Die Komponenten für die Knorpelbildung werden im Chondroblasten/ -zyten produziert und gelangen durch Sekretion in den extrazellulären Raum. Dank intermolekularer Affinität lagern sie sich zu einem geordneten System zusammen (Löffler, Biochemie und Pathobiochemie).

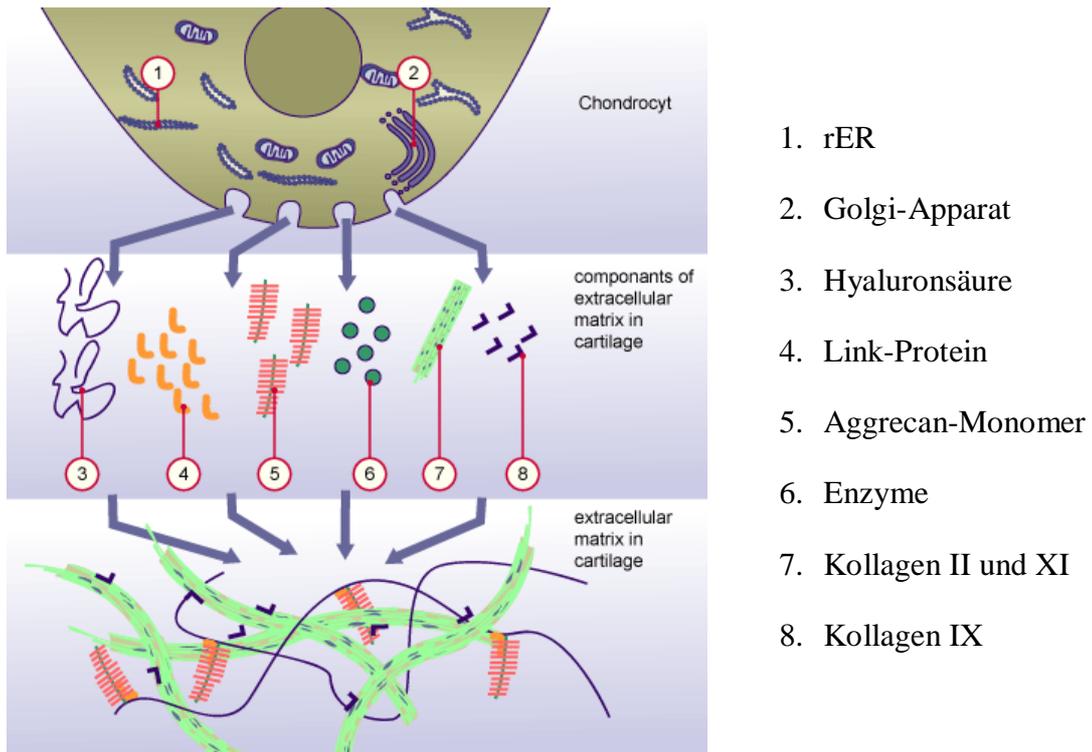


Abb. 10: Produktion der extrazellulären Matrix des Knorpels

www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knorpel/images/ezm_knorpel_comp3.gif

Abhängig von Gewebetyp unterscheidet sich auch die Zusammensetzung der Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Tabelle 2 vergleicht die Komponenten, die die extrazelluläre Matrix von Knochen und Knorpel bilden. Die extrazelluläre Matrix von Knorpel ist vor allem reich an Kollagen Typ II und dem Proteoglykan Aggrecan. Die enorme Belastbarkeit von diesem Gewebe ist auf ein komplexes Netzwerk von Aggrecan, Hyaluronsäure und Kollagenfasern zurückzuführen (Wilson *et. al.*, 2008). Des Weiteren beinhaltet dieses Faserwerk viele andere Proteine wie Decorin, Fibromodulin, Lumican, die eine Rolle in der Architektur und Funktion sowie Zell-Matrix Interaktionen spielen.

Knochen	Kollagen Typ I Kollagen Typ VI Proteoglykane Osteonektin, Osteokalzin, Osteopontin α_2 -Glykoprotein, Sialoproteine
Knorpel	Kollagen Typ II Kollagen Typ VI Kollagen Typ IX Kollagen Typ XI Proteoglykane (Aggrecan, Hyaluron, Decotin, Fibromodulin, Lumican) Fibronectin

Tab. 2: Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knochens und Knorpels

[modifiziert nach Welsch; Lehrbuch Histologie; Guilak *et. al.*, 2006; Wilson *et. al.*, 2008]

1.4.1 Kollagene

Kollagene, die 25% des Gesamtkörperproteinanteils des Menschen einnehmen, sind Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Sie verleihen vor allem dem Knorpel, den Sehnen und dem Knochen die hohe Zugfestigkeit und mechanische Stabilität. Der Grundaufbau der fibrillären Kollagene, die den Kollagenhauptbestandteil (ca. 90% aller Kollagene) des Bindegewebes von Haut, Knorpel, Knochen, Sehnen und Bändern ausmachen, ist in allen Geweben gleich. Dieser besteht aus einer Tropokollagen-tripelhelix mit einer Aminosäuresequenz Gly-X-Y, wobei häufig X für Prolin und Y für Hydroxyprolin steht (Abb.11). Zu dieser Gruppe gehören Kollagen I, II, III, V und XI (Löffler, Biochemie und Pathobiochemie).

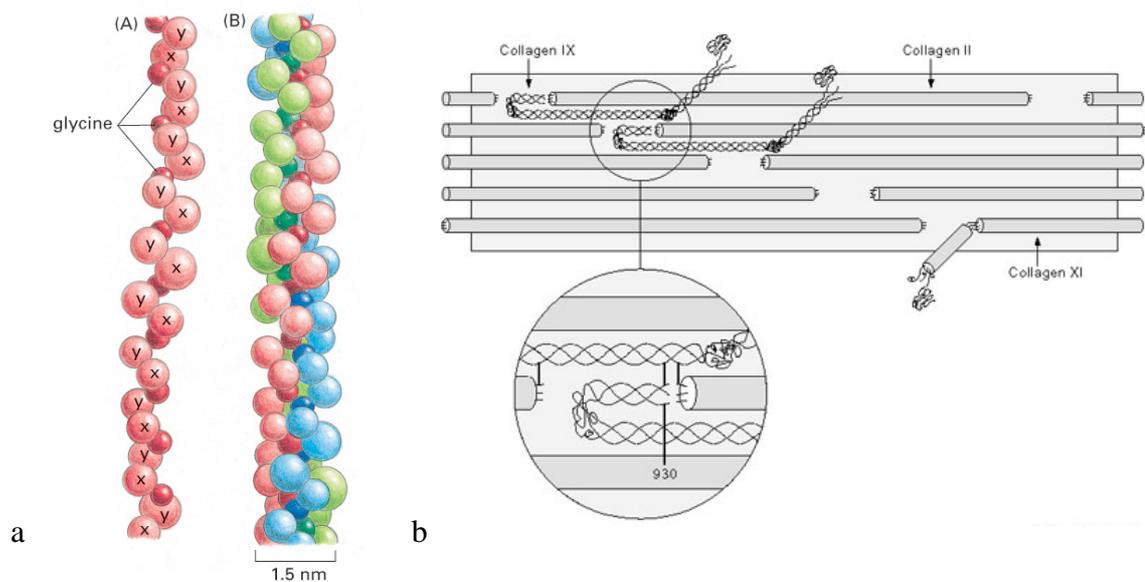


Figure 19-43. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Abb. 11: Kollagenmolekül in einer Fibrille

a: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Kollagenfibrille [Alberts; Molecular Biology of the cell]

b: Schematische Darstellung des Aufbaus des Kollagen IX [http://arthritis-research.com/content/4/1/30/figure/F2]

Die nichtfibrillären Kollagene zeichnen sich im Gegensatz dazu durch tripelhelikale Segmente unterschiedlicher Länge mit Unterbrechungen aus nichttripelhelikalen Abschnitten mit verschiedenen nichtkollagenen Domänen aus. Dazu gehört neben Kollagen Typ IV auch Typ VII, X, XIII und XVII. Die bis zum heutigen Zeitpunkt untersuchten Kollagene sind mit Anordnung der Fibrillen und Lokalisation im menschlichen Körper in der Tabelle 3 aufgeführt. Da in der Differenzierungskaskade die Chondrozyten in Zügen der enchondralen Ossifikation abhängig von ihrem Differenzierungszustand Kollagen Typ II und Typ X produzieren, spielen die beiden für diese Arbeit die größte Rolle (Löffler, Biochemie und Pathobiochemie).

Typ	Polypeptidketten	Merkmale	Lokalisation
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	Quergestreifte Fibrillen	Haut, Knochen, Sehnen, Bänder
II	$\alpha 1(II)$	Quergestreifte Fibrillen	Knorpel, Glaskörper
III	$\alpha 1(III)$	Quergestreifte Fibrillen	Dehnbare Gewebe wie Haut und Gefäße
IV	$\alpha 1(IV)- \alpha 6(IV)$	Netzwerk	Basalmembran
V	$\alpha 1(V)- \alpha 4(V)$	Fibrillen (mit Typ I)	Haut, Cornea
VI	$\alpha 1(VI)- \alpha 3(VI)$	Mikrofibrillen	Ubiquitär
VII	$\alpha 1(VII)$	Verankerungs-Fibrillen	Dermo-epidermale Junktion
VIII	$\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII)$	Hexagonales Netzwerk	Gefäßwand
IX	$\alpha 1(IX)- \alpha 3(IX)$	Fibrillen-assoziiert	Assoziiert mit Typ II
X	$\alpha 1(X)$	Hexagonales Netzwerk	Hypertrophierender Knorpel
XI	$\alpha 1(XI)- \alpha 3(XI)$	Fibrillen (mit Typ II)	Knorpel
XII	$\alpha 1(XII)$	Fibrillen-assoziiert	Assoziiert mit Typ I
XIII	$\alpha 1(XIII)$	Transmembrankollagen	Epidermis und Dermis
XIV	$\alpha 1(XIV)$	Fibrillen-assoziiert	Assoziiert mit Typ I
XV	$\alpha 1(XV)$		Basalmembran-Zone
XVI	$\alpha 1(XVI)$	Mikrofibrillen	Ubiquitär
XVII	$\alpha 1(XVII)$	Transmembrankollagen	Epidermis (Hemidesmosomen)
XVIII	$\alpha 1(XVIII)$	Fragment: Endostatin	In der Basalmembran-Zone weit verbreitet
XIX	$\alpha 1(XIX)$		In der Basalmembran-Zone weit verbreitet

Tab. 3: Kollagen-Typen (Auswahl)

[modifiziert nach Löffler; Biochemie und Pathobiochemie]

1.4.1.1 Kollagen Typ II

Kollagen Typ II gehört zu den fibrillären Kollagenen und ist sowohl im elastischen Knorpel als auch im hyalinen Knorpel zu finden. Im Knorpelgewebe nimmt es den größten Teil, der bis zu 90% betragen kann, ein (Löffler; Biochemie und Pathobiochemie). Das Amino (NH₂)- und Carboxy (COOH)- terminale Ende des Prokollagen II, wird im Rahmen der posttranslationalen Modifikation abgespalten (Ryan und Sandell, 1990).

1.4.1.2 Kollagen Typ X

Kollagen X wird ausschließlich in den hypertrophen Chondrozyten sezerniert und wird daher als ein spezifischer Marker für den Differenzierungszustand dieser Knorpelzellen benutzt. Er gehört zu den nichtfibrillären Kollagenen und wird meist aus hexagonal angeordneten $\alpha 1(X)$ - Fibrillen gebildet (Schmid und Linsenmayer, 1985). Kollagen X beschleunigt die Kalzifizierung von Chondrozyten (Alini *et. al.*, 1994), jedoch ist die genaue Funktion noch nicht bekannt.

1.4.2 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure gehört zu den Glycosaminoglykanen und ist ein großes Polymer aus Glucuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin. Hyalouronan kommt ubiquitär vor und spielt eine übergeordnete Bedeutung für die Knorpelstruktur. Zusammen mit dem Proteoglykan Aggrecan und Linkproteinen bildet sie Aggregate (Abb.12), die für die viscoelastischen Eigenschaften des Knorpels unter Belastung verantwortlich sind (Knudson und Knudson, 2004).

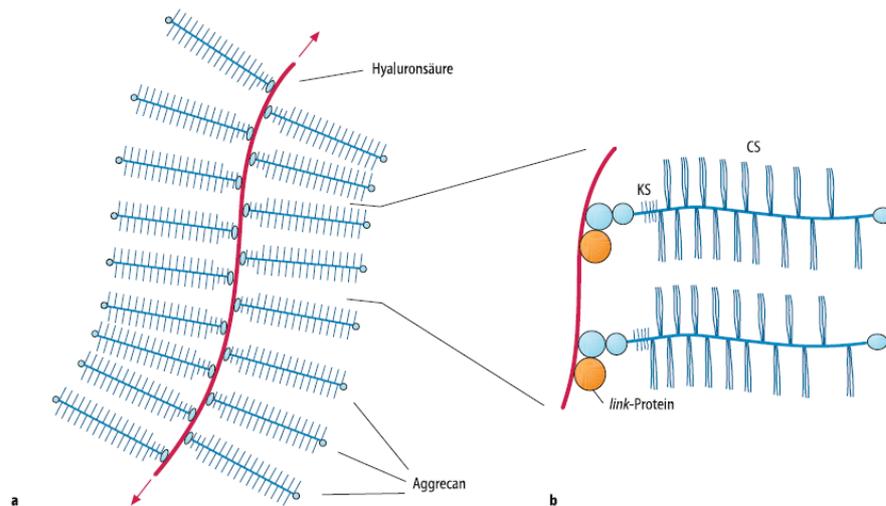


Abb. 12: Schematische Darstellung der Aggregate des Proteoglykans Aggrecan mit Hyaluronsäure
 [Löffler; Biochemie und Pathobiochemie]

Während der embryonalen Entwicklung unterstützt sie die Migration und Kondensation von Mesenchymzellen und ist für Formation und Knochenwachstum verantwortlich (Bastow *et. al.*, 2008). Des Weiteren wird der Hyaluronsäure eine regulatorische Rolle in der Knochenremodelierung zugeschrieben. Eine Regulation der Mineralisation durch Bindung von Hydroxylapatit ist auch denkbar (Coe *et. al.*, 1992).

1.4.3 Proteoglykane

Proteoglykane (Abb.13) zeichnen sich durch den Aufbau aus einer zentralen Core-Protein-Kette aus, von der Glykosaminoglykanketten abgehen. Abhängig von den Glykosaminoglykan-Seitenketten, die aus langen unverzweigten Polysacharidketten aus sich wiederholenden Disacharideinheiten bestehen, können sie nach der Art des Zuckers und der Sulfatierung in Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat, Heparin und Heparansulfat eingeteilt werden. Die große Strukturvielfalt verleiht den Proteoglykanen verschiedene Funktionen in Diffusionsvorgängen, der Wundheilung und vielen anderen Prozessen.

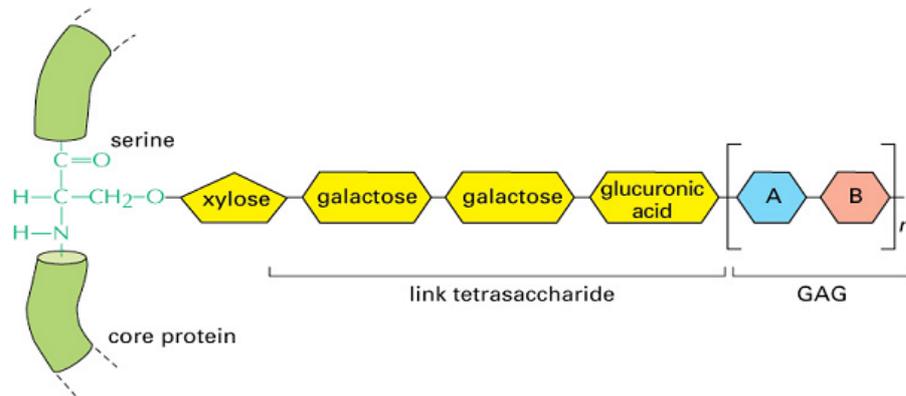


Abb. 13: Aufbau von Proteoglykanen

[Alberts, Molecular biology of the cell]

Des Weiteren können einige Proteoglykane einer gesonderten Gruppe, den transmembranen Proteoglykanen, zugeordnet werden. In allen Zellen kommt mindestens ein Vertreter dieser Gruppe, die neben den Syndecanen auch aus NG2 (Melanoma Chondroitin Sulfat genannt), CD44, Neuropilin-1 und Betaglycan (Couchman, 2010) besteht, vor (Abb.14).

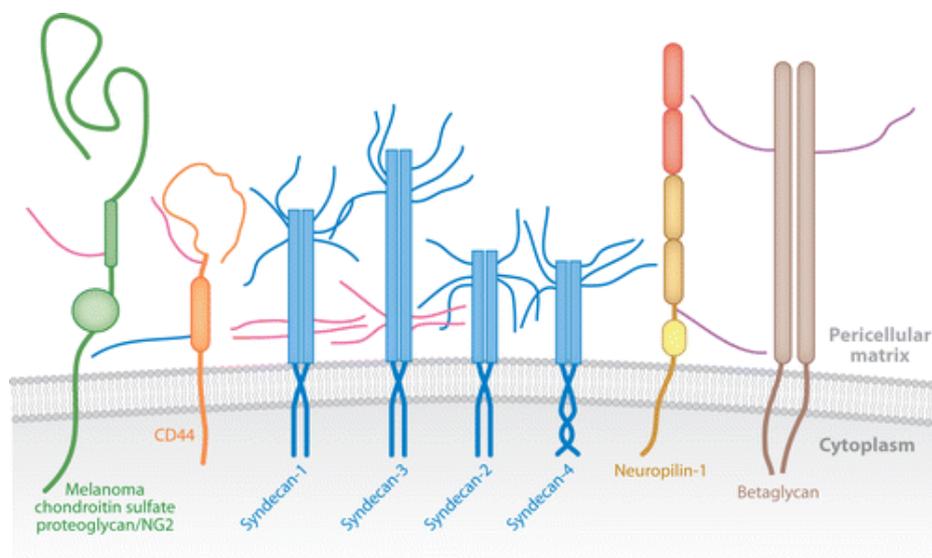


Abb. 14: Transmembranen Proteoglykane

[Couchman, 2010]

Betaglycan, Neuropilin-1 und CD44 können sowohl in der Proteoglykanform als auch als glycosaminoglykanarme Glycoproteine vorkommen und sind Corezeptoren für Wachstumsfaktoren (Couchman, 2010). Die wichtigsten Proteoglykane und deren Funktion sind in Tab.4 zusammengefasst.

Proteoglykan	Core-Protein (kDa)	Typ u. Anzahl der GAG-Ketten	Vorkommen/ Funktion
Perlecan	400- 470	HS/ CS; 3	Basalmembran; Filtrationsbarriere
Agrin	225	HS; 3	Basalmembran; Aggregation von Acetylcholin-Rezeptoren
Aggrecan	220-250	CS/ HS; ~130	Knorpel; Bildung eines hydratisierten Gels
Versican	180-370	CS; ~20	Stroma, hydratisiertes Gel; Modulation v. Zell-Matrix-Interaktionen
Decorin	36	CS/ DS; 1	Bindung an Kollagen I; Fibrillen-Bildung, Bindung an TGF-β
Fibromodulin	42	KS; 4	Bindung an Kollagen I; Fibrillenbildung
Betaglykan	100-110	HS/ CS/DS; 2	Membrangebunden ;Bindung an TGF-β
Syndecan	20-45	HS/ CS; 3	Membrangebunden; FGF-Bindung, Zell-adhäsion
NG2	300	CS, 1	Membrangebunden; Proliferative Zellen, Tumorzellen
CD44	80-200	HS,1	Membrangebunden; Rezeptor für Hyaluronsäure und Andere
Neuropilin-1	130-140	HS/ CS/DS	Membrangebunden; Nervensystem, Endothel- und Tumorzellen

Tab. 4: Proteoglykane

[Löffler; Biochemie und Pathobiochemie; Couchman, 2010; Stallcup,2002]

(GAG-Ketten: HS- Heparansulfat, CS- Chondroitinsulfat, KS-Keratansulfat, DS- Dermatansulfat)

1.4.3.1 Die Syndecanfamilie

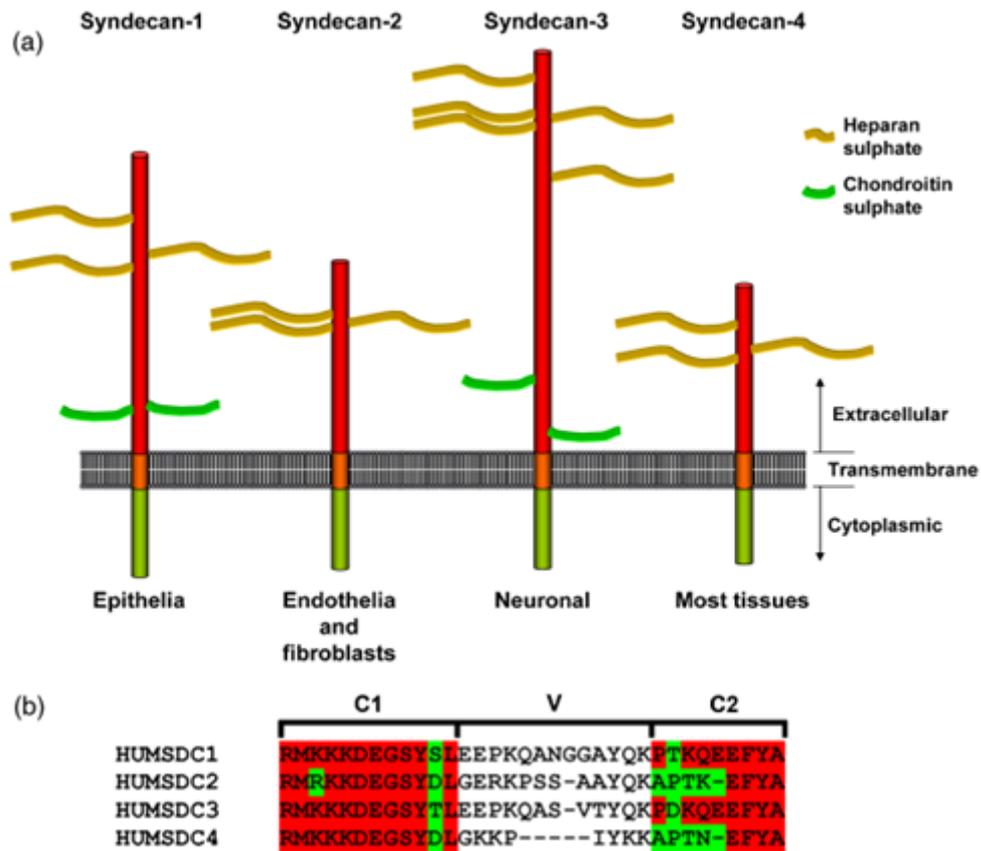


Abb. 15: Die Syndecanfamilie

[Okina *et. al.*, 2009]

Die Syndecane gehören zu den Heparansulfat-Proteoglykanen der Typ I Transmembran-Proteinen. In Säugetieren können vier Vertreter unterschieden werden, dabei handelt es sich um Syndecan-1 (Syndecan), Syndecan-2 (Fibroglycan), Syndecan-3 (N-Syndecan) und Syndecan-4 (Ryudocan oder Amphiglycan), siehe Abbildung 15. Im Gegensatz dazu weist *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur einen Syndecan-Typ auf (Spring *et. al.*, 1994).

Die Heparansulfat-Proteoglykane werden in den meisten Zellen exprimiert. So finden wir Syndecan-1 in den Epithelzellen und dem embryonalen Mesenchym, wo es an die Heparansulfat-Kette Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen I, III, V oder Fibronectin und Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 bindet. Syndecan-2 wird in den

Fibroblasten, Endothelien und Hepatozyten exprimiert, wohingegen Syndecan-3 in neuronalem Gewebe, im Herzen und in der glatten Muskulatur der Aorta zu finden ist. Syndecan-4 wird in multiplen Zelltypen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Fettzellen, Fibroblasten und Neuronalgewebe, in geringer Menge exprimiert (Kim *et. al.*, 1994).

Der Grundaufbau ist in allen vier Vertretern der Syndecanfamilie gleich und besteht aus einem Core-Protein mit einer kurzen zytoplasmatischen, einer langen extrazellulären und einer transmembranen Domäne (Abb.16). Die zytoplasmatische Domäne weist zwei hochkonservierte Domänen (C₁ und C₂) proximal und distal der Membran auf, die in allen Syndecanen des *Homo sapiens* und den Syndecanen der *D. melanogaster* (D.m) und *C. elegans* (C.e) gleich sind (Bass und Humphries, 2002). Die dazwischenliegende variable V Sequenz ist einzigartig für jedes Syndecan. Die Sequenz von dreizehn Aminosäuren, die direkt nach der Transmembranen Domäne folgen, ist für alle Syndecane (nichtvertebrale Vertreter eingeschlossen) gleich. Am C-terminalen Ende weist das Core-Protein eine für alle Syndecane gleiche tetrapeptidale Sequenz auf, deren Funktion nicht geklärt ist (Carey, 1997).

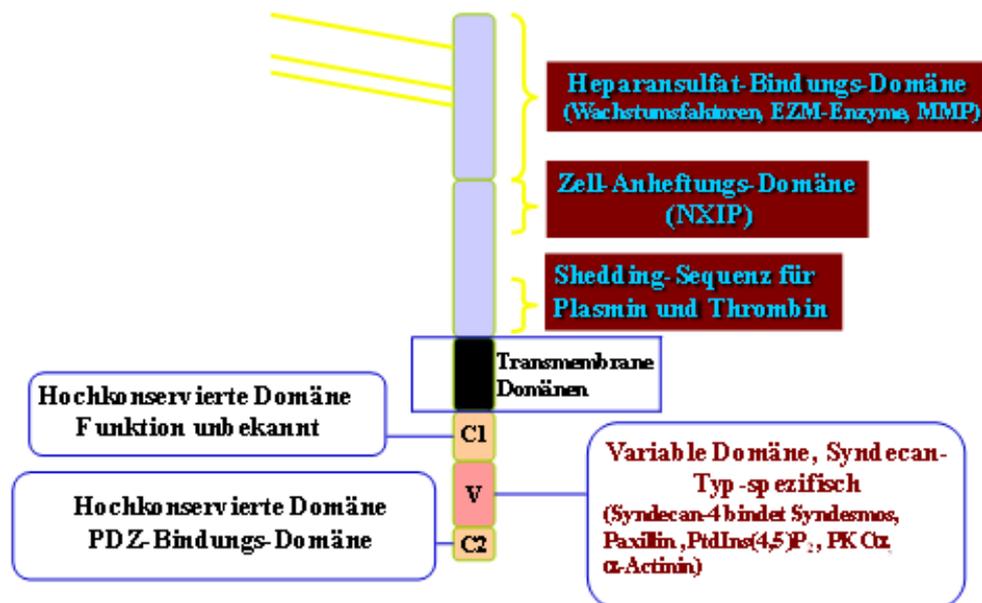


Abb. 16: Aufbau von Syndecanen

[modifiziert nach VanWinkle *et. al.*, 2002]

An der extrazellulären Domäne, die durch Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Thrombin u.a. gesheddet werden können, finden die kovalent gebundenen Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) Halt (Carey, 1997). Die GAG-Ketten der Syndecane bestehen vorwiegend aus Heparansulfat und werden im Golgi-Apparat während der posttranslationalen Modifikation angefügt. Auch kleine Mengen von Chondroitinsulfat-Ketten (Syn-1, Syn-3) können beobachtet werden. Die Anzahl an Disaccharideinheiten variiert zwischen 50 und 150 (Zimmermann und David, 1999). Die transmembrane Domäne besteht aus einer lipophilen Helix, die die Membran durchspannt.

Die Heparansulfat-Domäne ermöglicht eine Bindung an diverse Komponenten der extrazellulären Matrix wie Proteasen oder Wachstumsfaktoren und vermittelt den Syndecanen eine wichtige Rolle in der Zell-Matrix, Zell-Zell-Anheftung, Migration und Proliferation, die leider noch nicht vollständig untersucht werden konnte.

Die Untersuchungen der Expression der Syndecane zeigt erhebliche Unterschiede der Syndecanexpression während der Zellentwicklung und dem Wachstum. Syndecan-3 wird zum Beispiel in Hühner-Embryo-Tibia nur durch proliferierende unreife Chondrozyten exprimiert, während es in hypertrophen Chondrozyten nicht mehr nachgewiesen werden kann. Das lässt eventuell darauf schließen, dass Syndecane während der Knochenentwicklung eine regulierende Funktion ausüben (Carey, 1997).

1.4.3.1.1 Syndecan-4

Syndecan-4 gehört zu den transmembranen Heparansulfat Proteoglykanen. Voruntersuchungen von Echtermeyer haben eine verstärkte Syn-4-Expression in proliferativen und Kollagen X produzierenden Chondrozyten der hypertrophen Zone erwiesen. Dies hat zu der Annahme geführt, dass Syndecan-4 eine Rolle in der Knochenentwicklung spielt. Wie alle Syndecane weist es eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne auf (Abb.17). Die extrazelluläre Domäne enthält drei Anheftungsstellen für GAGs, denen die Bindung von Wachstumsfaktoren, Anti-Koagulationsfaktoren und Zell-Anheftungsfaktoren (Fibronectin) zugeschrieben wird (David, 1992; Kim *et. al.*, 1994).

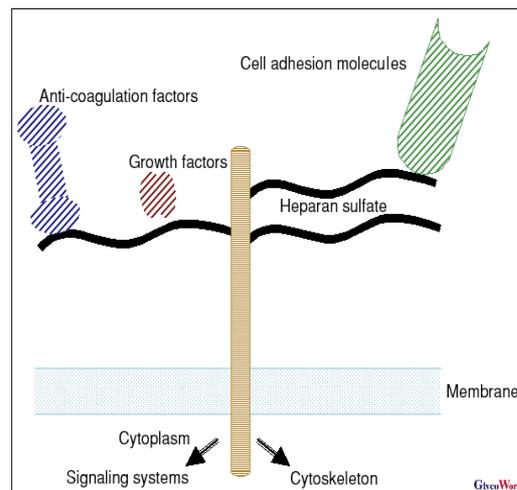


Abb. 17: Grundaufbau von Syn-4

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycogene/GGA02.html>

Syndecan-4 kann in verschiedenen Gewebearten vorgefunden werden. Tumorzellen weisen unabhängig von der Gewebeart eine hohe Syndecan-4 Expression auf (Gulyas und Hjerpe, 2003). Auch während der Wundheilung kommt es zur Induktion der Syndecan-4 Expression (Gallo *et. al.*, 1996). *In vitro* Untersuchungen von Couchman und Woods (1999) und Oh und Woods (2004) haben erwiesen, dass die zytoplasmatische Domäne des Syndecan-4 die Fähigkeit besitzt PKC- α zu binden und zu aktivieren. Dieses konnte *in vivo* bestätigt werden (Keum *et. al.*, 2004). Abbildung 18A zeigt die Interaktionen zwischen den Heparansulfat-Ketten (HS) von Syn-4 und dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)-2 und FGF Rezeptor (FGFR). Dieses ermöglicht die Formation eines Signal-Komplexes mit der Tyrosinkinase. Abbildung 18B zeigt, dass sich fokale Kontakte durch Kooperation zwischen Integrinen und Syndecanen abspielen und so die Kommunikation zwischen EM und dem Zytoskelett ermöglichen. Der Syn-4 wird durch die Aktivierung von Proteinkinase C- α (PKC- α) in die fokalen Kontakte rekrutiert. Die zytoplasmatische Domäne des Syn-4 agiert mit PKC- α und aktiviert deren Kinase-Aktivität durch Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) (Lopes *et. al.*, 2006).

Auch die Formation von Syn-4 in einer Dimeren Form wird durch die Bindung von PIP₂ an die variable Region vermittelt und stabilisiert (Oh und Couchman, 2004; Lopes *et. al.*, 2006).

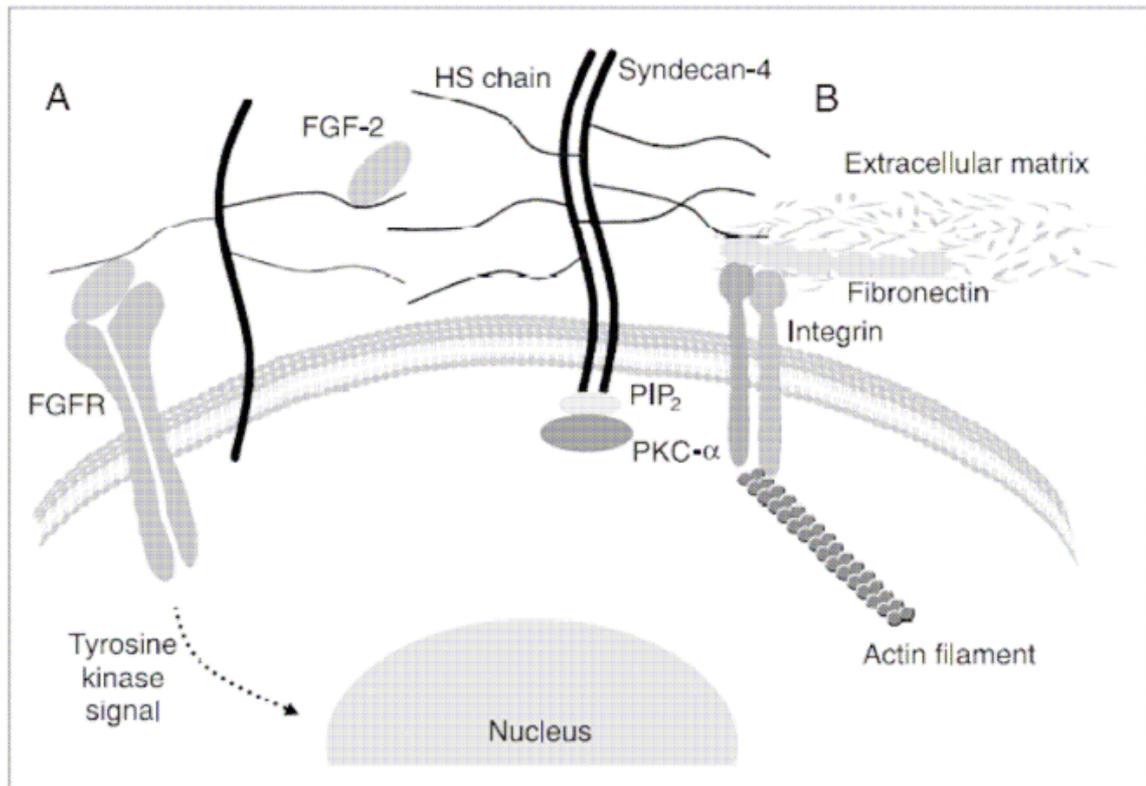


Abb. 18: Syndecan-4-vermittelte Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren

[Lopes *et. al.*, 2006]

A: Syndecan-4 moduliert die Bindung von Wachstumsfaktoren und die Zell-Anheftung

B: Syndecan-4 vermittelte Bindung zwischen Wachstumsfaktoren und Tyrosinkinase Rezeptor

Da Syndecan-4 im Vergleich zu den anderen Syndecanen sehr stark in der Niere exprimiert wird, wurde der Einfluss von dessen Defizienz auf die renale Pathogenese untersucht (Cevikbas *et. al.*, 2008). Hier konnte nachgewiesen werden, dass durch eine unilaterale Nephrektomie (UNX) im Alter von 60 Tagen ausschließlich die männlichen Syndecan-4-Knockout-Mäuse eine glomerulosklerotische Entwicklung zeigen.

Außer der Beeinflussung der Wundheilung (Kapitel 1.1) kann den Syndecanen auch eine Rolle bei der Aktivierung des ADAMTS-4 aus der ADAMTS-Familie der Metalloproteasen zugeschrieben werden (Echtermeyer *et. al.*, 2009). Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Syndecan-4 Expression in Chondrozyten sowohl in humanen arthrotischem Knorpel als auch im Mausmodell der Osteoarthritis spezifisch aktiviert wird. Der Syn-4-Verlust durch eine Knockout-Genmodifikation oder intraartikuläre

Injektion von Anti-Syn-4-Antikörpern bei Mäusen schützt diese vor einem Proteoglykan-Verlust.

Es wurde auch die Expression von Syndecan-4 in langen Knochen von Wild-Typ-Mäusen und Syndecan-4 Knockout-Mäusen (LacZ-Knock-in-Strategie) untersucht. Während der embryonalen Knochenentwicklung wird die Expression von Syndecan-4 in den proliferativen und den hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge induziert (Echtermeyer, unpublizierte Arbeit). Eine Syn-4-Promotor-Aktivität kann vor allem in den proliferativen und hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge vorgefunden werden. Syn-4-Protein konnte zusammen mit Kollagen X in hypertrophen Chondrozyten der Resorptionszone nachgewiesen werden (Echtermeyer, unpublizierte Arbeit). Nach Färbung histologischer Schnitte der Wachstumsfuge eines E18.5 Wild-Typ Maus-Embryos mit Antikörpern gegen Syn-4 und Kollagen X, dem Hypertrophiemarker, konnte dies bestätigt werden (Abb. 19).

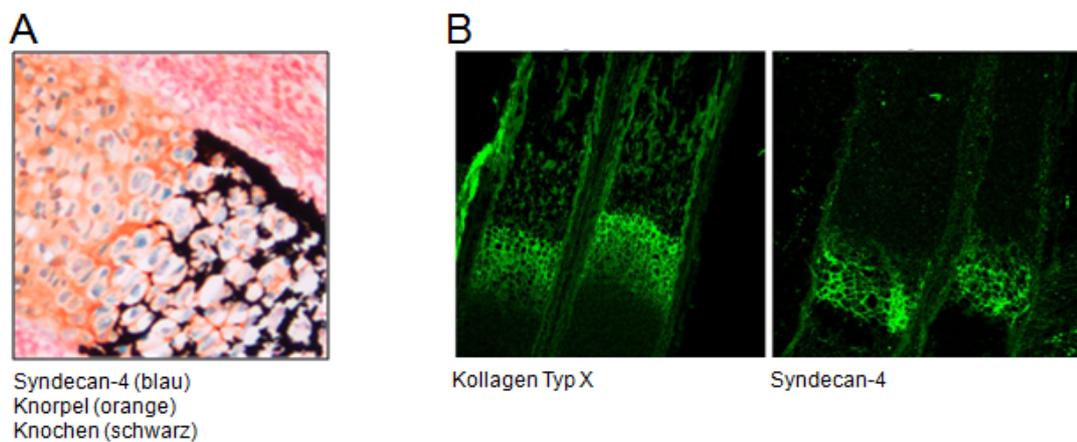


Abb. 19: Expression von Syn-4 in der Wachstumsfuge während Embryonalentwicklung
[Echtermeyer, unpubliziert]

1.5 Einfluss löslicher Faktoren auf die Chondrozytendifferenzierung

Während der Embryogenese durchlaufen die Chondrozyten im Verlauf der enchondralen Ossifikation eine Differenzierungskaskade. Durch Proliferation und Differenzierung

entstehen aus Ruhechondrozyten mit einer niedrigen metabolischen Aktivität hoch aktive, hypertrophe Knorpelzellen. Einen regulatorischen Einfluss auf diesen Prozess haben Umgebungsfaktoren wie Hormone und andere lösliche Faktoren, die im Knorpel oder umgebendem Gewebe vorkommen. Durch deren Bindung an die Anheftungsstellen des Syndecan-4 können viele intrazelluläre Prozesse aktiviert, beschleunigt oder gehemmt werden. Vor allem den parakrin sezernierten Faktoren aus den Familien der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) wird eine Schlüsselfunktion bei der Chondrozytendifferenzierung zugeschrieben (Lopes *et. al.*, 2006). BMPs und FGFs wirken antagonistisch zueinander. Die BMPs werden durch proliferierende und hypertrophe Chondrozyten exprimiert. Deren Aufgabe ist die Proliferation von Chondrozyten zu fördern. Die Differenzierung wird dagegen inhibiert. Auch eine BMPs-Stimulation der Expression von *Ihh* (Indian hedgehog), das für die Proliferation der sich am Gelenkende befindlichen Knorpelzellen verantwortlich ist, kann beobachtet werden. Durch einen regulatorischen Einfluss des *Ihh* auf die Stimulierung von der Expression des Parathormon-related-peptid (PTHrP) kann ein vorzeitiger Übergang des Knorpels in den hypertrophen Zustand verhindert werden. Dieser Prozess kann durch PTHrP reguliert werden oder verläuft in einem direktem Pfad (Kobayashi *et. al.*, 2005; Kronenberg, 2006). Hierbei sind die Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) für das proximal-distale Wachstum verantwortlich. Auch das PTHrP spielt bei der Knochenentwicklung eine Rolle. Durch dessen Einfluss werden die Chondrozyten im proliferierenden Zustand gehalten. Bei ungenügendem PTHrP-Spiegel produzieren die Knorpelzellen *Ihh*, was sich in der Länge der proliferativen Zone widerspiegelt. Ein ausgeglichenes Verhältnis aller Komponenten der extrazellulären Matrix ist entscheidend. Dieser komplexe Regelkreis (Abb.20), an dem Hormone (Wachstumshormon, IGFs, Schilddrüsenhormone) und Wachstumsfaktoren (BMPs, FGFs) beteiligt sind, ist für einen reibungslosen Ablauf der Differenzierungskaskade verantwortlich (Löffler; Biochemie und Pathobiochemie).

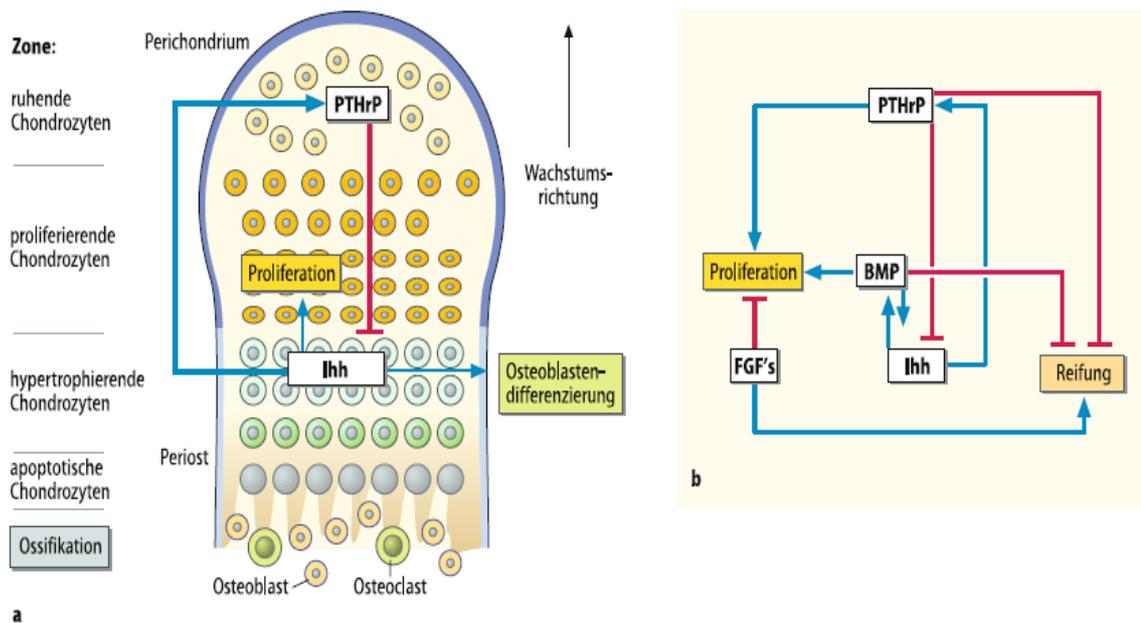


Abb. 20: Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch die Interaktion von PTHrP, Ihh, BMPs und FGFs

[Löffler; Biochemie und Pathobiochemie]

a: Wirkungen von Ihh und negative Rückkopplung zwischen Ihh und PTHrP,

b: Antagonismus zwischen FGFs und BMPs und Beziehung zu Ihh und PTHrP

Untersuchungen von Vortkamp *et. al.* (1996) haben gezeigt, dass ein PTH-ähnliches Peptid, das im Perichondrium vorkommt, die Differenzierung zu Koll X-produzierenden hypertrophen Zellen beim Huhn unterdrückt. Bohme *et. al.* (1995) haben diesen negativen Einfluss durch chondrozyteneigenes TGF- β 2 und FGF-2 beobachtet. Eine zusätzliche Modellierung der Differenzierungskaskade kann auch durch die Freisetzung von Proteasen unterstützt werden. Die Faktoren Ihh, TGF- β , FGF-2, FGF-18 und BMPs sind also für die Spätdifferenzierung von Ruhechondrozyten zu proliferativen Chondrozyten mit verantwortlich.

Neben den oben genannten Faktoren gibt es eine Reihe weiterer Komponenten, die die Differenzierungskaskade beeinflussen könnten. Bassett und Williams (2003) beschreibt die Rolle von Thyroidhormonen in der Knochenentwicklung, wobei T3 die Chondrozyten, Chondroblasten und Osteoklasten reguliert. Des Weiteren beeinflusst auch der Thyroid-Hormon-Rezeptor (TR) das skelettale Knochenwachstum. Die Chondrozyten der proliferativen Zone und der Reservezone synthetisieren TR α 1, - α 2 und - β 1. Diese kön-

nen hingegen in hyperthropen Knorpelzellen nicht gefunden werden. Die Umwandlung der Mesenchymzellen zu Chondrozyten kann durch die Kombination von Glucocorticoiden, Transforming growth Factor β (TGF- β) und T3 indiziert werden. Dieses suggeriert, dass T3 für die Chondrozytendifferenzierung unentbehrlich ist. Die Abb 21 stellt die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Faktoren dar. In einem langen negativen Rückkopplungspfad (rot) sezernieren prehypertrophe Chondrozyten Indian hedgehog (Ihh), was sich auf die perichondrialen Chondrozyten in einer Sekretion von BMPs auswirkt. Hierdurch wird die Osteoblastendifferenzierung stimuliert und die Synthese von PTHrP der periartikulären Region indiziert. PTHrP stimuliert die Proliferation weiterer Chondrozyten und inhibiert die hypertrophe Differenzierung. In einem weiteren kurzen positiven Rückkopplungspfad (violett) wird durch BMP6 aus prehypertrophen und hypertrophen Chondrozyten die Ihh-Expression verstärkt. Dieses stimuliert die Proliferation und weitere Synthese von BMP6. Durch FGF wird die Proliferation, Hypertrophie und Matrix-Synthese der Chondrozyten inhibiert. Auch die Apoptose und vaskuläre Einsprossung (grün) wird gefördert.

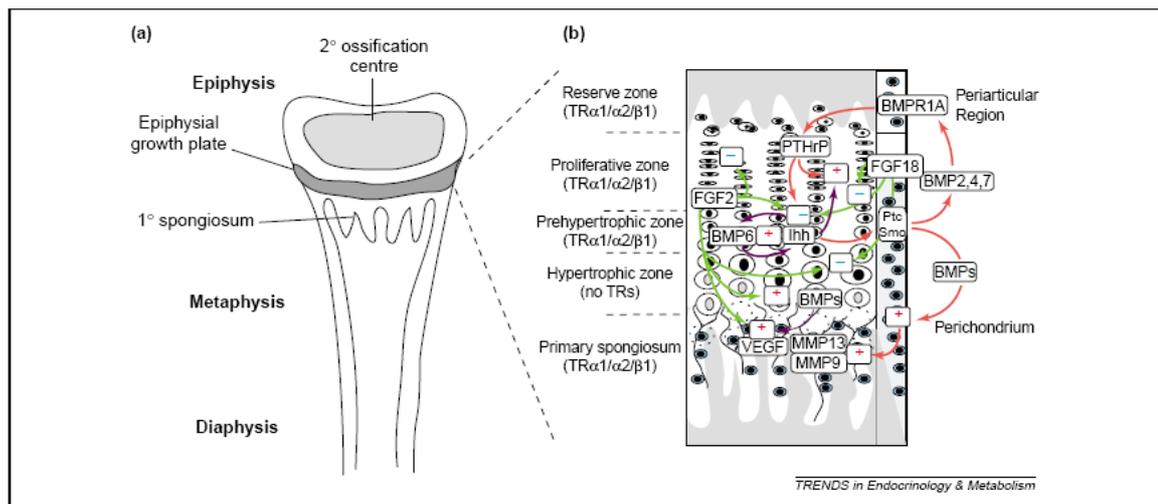


Abb. 21: Regulation der Wachstumsfuge und der enchondralen Ossifikation

[Bassett und Williams, 2003]

Die Heparansulfat-Ketten (HS) der Syndecane binden auch andere lösliche Faktoren. Durch diese Bindung kann die Funktion der löslichen Faktoren durch Aktivierung verstärkt oder durch das Fernhalten vom Rezeptor gehemmt werden. Der Einfluss weiterer Faktoren wie Insulin, IGF-I und Thyroxin soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.5.1 Insulin

Insulin ist ein durch die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse produziertes Proteohormon, das aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer B-Kette (30 Aminosäuren) besteht. Die beiden Ketten sind miteinander durch zwei Disulfidbrücken verknüpft. Eine dritte Disulfidbrücke trägt zur Stabilisierung der Raumstruktur der A-Kette bei. Die Sekretion von Insulin hängt von der extrazellulären Glukosekonzentration ab (Löffler; Biochemie und Pathobiochemie).

Insulin hat im Körper vielfältige Wirkungen. Fettgewebe und Muskulatur sind bei der Aufnahme und Verwertung von Glukose auf die Mithilfe von Insulin angewiesen.

Der Blutzuckerspiegel wird durch Insulin in Folge von Aktivierung von Enzymen der Leber und der Muskelzellen, die für die Verbrennung von Glukose und die Speicherung als Glykogen verantwortlich sind, gesenkt. In den Fettzellen aktiviert es Enzyme, die eine Umwandlung von Glukose in Fett ermöglichen und den Fettabbau hemmen. Des Weiteren hat Insulin durch Stimulation der Proteinbiosynthese auch einen wachstumsfördernden Effekt. Auch eine Rolle bei der Reifung von Chondrozyten wird neben IGF-I auch Insulin zugeschrieben (Bohme *et. al.*, 1992). Hier konnte festgestellt werden, dass durch die Stimulation von unreifen Chondrozyten mit Insulin oder IGF-I der erste Schritt der Reifung, wie die Proliferation oder Expression von größeren Mengen von Komponenten der extrazellulären Matrix, ohne Veränderung im Phänotyp induziert werden kann. Des Weiteren kann Insulin auch zur Hypertrophie führen (Bohme *et. al.*, 1992).

1.5.2 Insulin-like growth factor

Insulin-like growth factor I (IGF I) ist einer der wichtigsten Mediatoren der Wachstumshormon-Wirkung (Somatotropin) und wird auch als Somatomedin bezeichnet.

IGF-I gehört zur Familie der insulinähnlichen Peptide. Das vor allem in der Leber exprimierte Peptid kann auch lokal in anderen Geweben gebildet werden, wie z.B. in Chondrozyten der Wachstumszone im Knochen und im Knorpel. Es besteht aus einer Kette aus 67 Aminosäuren. IGF-I ist hochkonserviert in allen Wirbeltieren nachweisbar,

IGF-Analoga sind bei vielen Wirbellosen vorhanden. Alle IGF's zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu Insulin und binden an Insulinrezeptoren. Im Blut kommen sie an Bindungsproteine gebunden vor. Sie behalten jedoch das C-Peptid bei.

IGF I stimuliert wie oben beschrieben neben Insulin die Chondrozytenproliferation und deren Größenwachstum (Bohme *et. al.*, 1992). Des Weiteren kann Somatotropin über IGF I auch einen direkten Effekt auf die Proliferation der Chondrozyten der Reservezone in der Wachstumsfuge vermitteln und zur Hypertrophie der Chondrozyten führen (Van der Eerden *et. al.*, 2003).

1.5.3 Thyroxin

L-Thyroxin (T4) gehört neben 3,3,5-Triiod-Thyronin (T3) zu den in der Schilddrüse produzierten Thyroidhormonen. Durch eine Iodierung der Thyrosylreste des Thyreoglobulins erfolgt in den Follikeln der Schilddrüse die TSH gesteuerte Biosynthese dieser Hormone. Nach einer proteolytischen Spaltung werden die Hormone in die Blutbahn freigesetzt und proteingebunden (Thyroxin-bindendes Globulin, Transthyrenin und Albumin) weitertransportiert. T3 ist die biologisch aktive Form der Schilddrüsenhormone und wird durch eine selenabhängige, periphere Dejodierung mit Hilfe von 5'-Dejodasen aus dem Prohormon Thyroxin überwiegend gebildet.

Die Konzentration von gebundenem T4 im Blut liegt bei ca. 110 nmol/l.

Den Schilddrüsenhormonen wird eine vielfältige Wirkung zugeschrieben. Sie wirken vor allem auf den Stoffwechsel und regulieren den Energiehaushalt. Durch die Stimulation der Synthese der Wachstumshormone der Hypophyse regulieren sie auch das Wachstum und die Differenzierung (Hirnentwicklung). Auf den Knochen haben Thyroidhormone einen direkten Einfluss. Durch Stimulation der Chondrozyten zur Hypertrophie verändern sie das Längenwachstum (Bassett und Williams, 2003).

2 Fragestellung der Arbeit

Chondrozytenspätdifferenzierung findet physiologisch während der enchondralen Ossifikation statt. Hier durchlaufen die Chondrozyten eine Kaskade von Veränderungen von Ruhechondrozyten, durch proliferative Chondrozyten, bis zu hypertrophen Chondrozyten.

In diesen Differenzierungsvorgängen spielen auch lösliche Faktoren wie FGFs, BMPs, Ihh und PTHrP eine Rolle. Durch deren Bindung an Syndecan-4 können viele intrazelluläre Prozesse aktiviert, beschleunigt oder gehemmt werden.

Basierend auf unpublizierten Voruntersuchungen von Dr. F. Echtermeyer, die eine Expression von Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-4 in der Wachstumsfuge während der Embryonalentwicklung zeigen, war das Ziel dieser Arbeit die genaue Rolle von Syn-4 bei der Chondrozytendifferenzierung zu untersuchen. Dazu wurden Knorpelzellen von Wildtyp- und Syn-4-Knockout-Mäusen miteinander verglichen und ihr Verhalten unter dem Einfluss von verschiedenen Faktoren wie Insulin, IGF-I und Thyroxin untersucht.

Nach Präparation von Wt und Syn-4^{-/-} Maus-Brustkörben wurden die isolierten Chondrozyten in Zellkulturen mit Insulin, IGF-I und Thyroxin stimuliert und deren Differenzierungszustand verglichen. Dieses wurde durch Unterschiede in der Morphologie (photographische Analyse) und Bestimmung spezifischer Proteinmarker (ALP und Kollagen II und X) festgehalten. Des Weiteren wurden Wt und Syn-4^{-/-} Maus-Tibien durch gleiche Faktoren stimuliert und deren Verhalten in Organkultur photographisch dokumentiert und analysiert. Im Detail sollte geklärt werden, ob das Fehlen von Syn-4 eine Verzögerung in der Differenzierung von Chondrozyten verursacht.

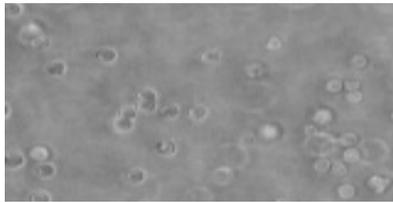
Bei degenerativen Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis kann eine verstärkte Proliferation und Expression von Hypertrophie markern und eine veränderte Produktion von Syn-4 beobachtet werden. Die Vorgänge, die in Zügen der enchondralen Ossifikation stattfinden, sind denen in der Osteoarthrose vergleichbar und führten zu der Annahme, dass eine ungehemmte Differenzierung unter Umständen zu Osteoarthrose führen könnte. Ziel war es, die gewonnen Erkenntnisse in der Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung dieser Krankheit einzusetzen.

3 Materialien und Methoden

Um die Rolle von Syndecan-4 bei der Chondrozytendifferenzierung zu untersuchen, wurden aus 17,5 Tage alten Embryos von Wild-Typ und Syn-4-Knockout- Mäusen Chondrozyten aus den Brustkörben gewonnen und die Tibien freipräpariert. Die durch Kollagenaseverdau gewonnenen Knorpelzellen und Tibien wurden in Zellkultur genommen und mit verschiedenen löslichen Faktoren behandelt.

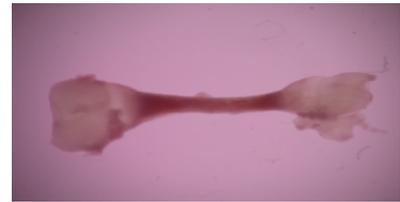


Versuchsmaus



Zellkultur

Chondrozyten in Agarose
E17,5 Brustkorbknorpel



Organkultur

Tibien von E17,5
Mausembryonen

Abb. 22: Darstellung der untersuchten Kulturen

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Materialien

Sofern nicht gesondert angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Appllichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen.

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- Krebs-Ringer Puffer(pH 7,4):
 - Na_2HPO_4 15,7mM
 - KH_2PO_4 1,6mM
 - NaCl 111,2mM
 - KCl 5,4mM
 - MgCl_2 1,3mM
 - NaHCO_3 4mM
 - Glukose 13mM
- DMEM (4,5g/ml Glucose), Biochrom
- Penicillin, Streptomycin , PAA
- Kollagenase B, Roche
- Trypanblau, Sigma
- High melting Agarose, Low melting Agarose, Biozym
- β -Aminopropionitril, Sigma
- Cystein, Sigma
- Natriumpyruvat, Merck
- Ascorbinsäure, Merck
- IGF-I, Sigma
- Insulin, Sigma
- L-Thyroxin, Sigma
- Diethanolamin-HCl, Roth
- p-Nitropphenylphosphat (Sigma 104 Phosphatase Substrat), Sigma
- NaOH

- Pepsin, Sigma
- CH₃COOH
- Tris
- NaCl
- Tris-HCl
- EthanolPolyacrylamid-Lösung, Roth
- SDS, Sigma
- Glycerin
- Bromphenolblau (Frontmarker)
- Dithiothreitol (DTT)
- Molekulargewichtstandard, Biorad
- Methanol
- Eisessig in Aqua dest
- Coomassie R250, Serva
- Isopropanol
- FKS Biochrom KG, Berlin
- Trypsin/EDTA PAA Laboratories, Cölbe
- 24-Well Platten Greiner, Frickenhausen
- 1 ml Kryoröhrchen Nunc, Wiesbaden
- Sterile 15 ml Röhrchen Greiner, Frickenhausen
- Neubauer Zählkammer Brand, Wertheim

3.1.2 Geräte

- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D Eppendorf, Hamburg
- Kühlzentrifuge Centrifuge 5804 R Eppendorf, Hamburg
- Ultrazentrifuge Avanti J-25 Beckman Coulter, Krefeld
- Minischüttler IKA Works Inc., Staufen
- Heizblock Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
- Heizplatte Medax, Kiel
- Präzisionswaage Kern 572 Kern, Balingen-Frommern
- Stereomikroskop Stemi 2000-C Zeiss, Jena

- Mikroskop Olympus BX60 Olympus, Hamburg
- Inverses Mikroskop Axiovert 25 Zeiss, Jena

3.2 Methoden

3.2.1 Chondrozyten-Zellkulturen aus Knorpel von Wildtyp- und Syndecan-4 Knockout-Mäusen

3.2.1.1 Die Chondrozyten- Zellkulturen

3.2.1.1.1 Präparation der Mausbrustkörbe

Materialien:

- Skalpell, Pinzette, Schere
- Kimwipe-Papier
- Krebs-Ringer Puffer
- Kollagenaselösung:
 - DMEM (Biochrom)
 - Penicillin (PAA) 100U/ml
 - Streptomycin (PAA) 100µg/ml
 - Kollagenase B (Roche) 1mg/ml
 - Cystein (Sigma) 1mM

Nach 17,5 Tagen embryonaler Entwicklung wurden Wildtyp- und Syndecan-4 Knockout- Mäuse-Embryos gewonnen. Nach Eröffnung des Bauchraums mittels eines \perp - förmigen Schnittes konnten die Brustkörbe, bestehend aus Knochen und Knorpel, vom restlichen Bewegungsapparat entfernt und entnommen werden. Nach vorsichtiger Reinigung von Muskel, Sehnen und Gefäßresten auf einem Kimwipe-Papier mittels Pinzette und Schere wurden die Proben separat in Krebs-Ringer Puffer (steril) gewaschen. Zur Isolierung primärer Chondrozyten wurden die Proben nach mehrmaligem Waschen unter einer Sterilbank in einem sterilen Krebs-Ringer Puffer über Nacht in Kollagenaselö-

sung aus 1mg/ml Kollagenase B in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit Zusatz von 1mM Cystein bei 37°C und 5% CO₂ verdaut.

3.2.1.2 Die Vorbereitung der Zell-Suspension

Materialien:

- calciumfreies DMEM (Gibco)
- DMEM (Biochrom)
- Swinnex-Filter
- Neubauer-Zählkammer
- Trypanblau (Biochrom)

Nach ca. 24h wurden die Zellen und verbleibende Knochenreste vorsichtig resuspendiert und durch Swinnex-Filter mit drei Lagen Nylon von einer Porengröße von 100 µm filtriert. Nach zweimaliger Waschung mit calciumfreiem DMEM und zweimaliger Zentrifugation bei 600*g für 5 Minuten wurden die Zellen zur Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauer-Kammer in DMEM aufgenommen. Hierfür wurde 20µl Zellsuspension mit 80µl DMEM versetzt (Verdünnung 1:5). 20µl der entstandenen Suspension wurden mit 20µl Trypanblau (Verdünnung 1:2) versetzt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. So konnte die Zellzahl der vier 0,1µl Stichproben durch Auszählen unter dem Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung bestimmt werden. Die Zellzahl sollte ca. $2,1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter betragen. Da jedoch die Kammer einer 24-Well-Schale 200 µl Zellsuspension enthält, betrug die verwendete Zellzahl $0,42 \cdot 10^6$ pro Probe.

Zellzahl pro ml = Mittelwert Zellzahl * Verdünnung (1:10) * Kammerfaktor (10^4)

3.2.1.2.1 Die Agarosekultur der Chondrozyten (modifiziert nach Benya und Shaffer, 1982)

Materialien:

- 24 Well Schalen
- 0,7 ml 1% High melting Agarose in H₂O w/v (Biozym)
- 0,7 ml Agarose- Zell- Suspension:
 - 200µl Zellsuspension (Zellzahl $2,1 \cdot 10^6$ /ml)
 - 175µl 2-fach DMEM (Biochrom)
 - 175µl 2% Low melting Agarose in H₂O w/v (Biozym)
- 3,5µl Zusätze BCP:
 - β- Aminopropionitril (Sigma)
 - Cystein (Sigma)
 - Natriumpyruvat (Sigma)
- Chondrozytenmedium:
 - DMEM, 100 U/ml Penicillin
 - 100 µg/ml Streptomycin
- Zusätze ABCP (200-fache Stammlösung):
 - Ascorbinsäure 5mg/ml (Endkonzentration im Medium: 0,14 mM)
 - β-Aminopropionitril 12mg/ml (Endkonzentration im Medium: 0,23 mM)
 - Cystein 35,1mg/ml (Endkonzentration im Medium: 1mM)
 - Natriumpyruvat 22mg/ml (Endkonzentration im Medium: 1mM)

Alle verwendeten Materialien müssen steril sein oder steril filtriert werden.

In die Kammern der 24 Well Schale wurde 0,7ml 1% Hochtemperatur- Agarose in A. dest. pipettiert. Nach dem Festwerden der Hochtemperatur- Agarose wurde 100µl einer 2% Niedertemperatur- Agarose mit 100µl 2-fach DMEM und Zusätzen von β- Aminopropionitril, Cystein, Natriumpyruvat vermischt und in 200µl der Zellsuspension, die $2,1 \cdot 10^6$ /ml Chondrozyten enthält, versetzt. Anschließend wurde 0,4µl Agarose-Zell-Suspension auf die auf 37°C vorgewärmte mit Hochtemperatur- Agarose beschichtete Kulturschale pipettiert. Nach 10 minütigem Abkühlen und 15 minütiger Ver-

festigung der Agarose bei 4°C wurden die Schalen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach ca.14 h und anschließend alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel mit 400µl Chondrozytenmedium und Zusätzen von Ascorbinsäure, β-Aminopropionitril, Cystein und Natriumpyruvat.

3.2.1.3 Die Chondrozytenkultivierung

Materialien:

- DMEM
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- Zusätze ABCP (200-fache Stammlösung)
- 100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin (alle Sigma)

Zur Kultivierung wurden je Ansatz 400µl des Chondrozytenmediums (DMEM 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) mit 20µl ABCP-Zusätzen zugegeben und alle zwei bis drei Tage gewechselt. Des Weiteren wurden die Wildtyp- und Syn-4-/- Chondrozytenkulturen separat mit 100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin (T₄) über 14 Tage stimuliert. Als Kontrolle blieb eine Probe unstimuliert. In weiteren Versuchen wurden Wildtyp- und Syndecan-4-/-Chondrozytenkulturen über 21 Tage mit 25ng/ml Thyroxin stimuliert.

3.2.2 Die Tibia-Organ-Kulturen

3.2.2.1 Präparation der Maustibien

Materialien:

- DMEM
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- Krebs-Ringer Puffer

Nach Präparation der Brustkörbe wurde das Knie- und Sprunggelenk mit einem Skalpell eröffnet und die Tibia entnommen. Die weitere Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop (Zeiss), wo die Muskeln, die Sehnen und das Periost entfernt wurden. Dieses war jedoch nur bedingt möglich und ein späteres Nachpräparieren war mehrmals notwendig. Die Tibien wurden in Krebs-Ringer Puffer gewaschen und auf in Schalen mit 2ml DMEM-Medium (vergleiche Chondrozytenmedium) als Organkultur kultiviert.

3.2.2.2 Kultivierung der Tibien

Materialien:

- DMEM
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- Zusätze ABCP (200-fache Stammlösung)
- 100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin (alle Sigma)

Nach 12h und alle zwei bis drei Tage wurden den Wildtyp- und Syndecan4^{-/-} Tibien 2ml DMEM mit Penicilin 100U/ml, Streptomycin 100µg/ml + 10µl Zusätze von Ascorbinsäure, β-Aminopropionitril, Cystein, Natriumpyruvat zugefügt. Des Weiteren wurden die Tibien, bis auf einzelne Proben, die als Negativkontrolle dienten, mit 100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin über 14 Tage stimuliert.

3.2.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Chondrozyten die in Zügen der enchondralen Ossifikation die Differenzierungskaskade durchlaufen, sezernieren im hypertrophen Zustand alkalische Phosphatase. So kann dieses Enzym als ein Marker für den hypertrophen Zustand der Knorpelzellen angewendet werden.

Materialien:

- Reaktionslösung:
 - 1M Diethanolamin-HCl (Roth), pH 9,8;
 - 0,2 % w/v p-Nitrophenylphosphat in 1M Diethanolamin (Sigma, 104 Phosphatase Substrat)
- Stopplösung:
 - 2M NaOH
 - 0,2 mM EDTA

Der Reaktionslösung, bestehend aus 450 µl Diethanolamin-HCl Puffer mit 0,2 % p-Nitrophenylphosphat, wurden 50µl des Mediums zugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37⁰C wurde die Reaktion mit 500 µl Stopplösung beendet. Die Menge an abgespaltenem Phosphat des p-Nitrophenylphosphats wurde photometrisch bei E₄₀₅ bestimmt.

3.2.4 Metabolische Markierung

Neben der alkalischen Phosphatase sezernieren die hypertrophen Chondrozyten einen zweiten Marker, Kollagen X. Durch eine metabolische Markierung mit einem radioaktiven Element wurde dieses sichtbar gemacht.

Nach einer 14- bzw. 21-tägigen Kultivierung wurden zum Nachweis der Kollagen II und X –Expression die Ansätze mit ¹⁴C-Prolin metabolisch markiert. Hierzu wurde zu frischem Medium bestehend aus DMEM und Zusätzen (ABCP) 1µCi ¹⁴C-Prolin pro ml Medium hinzugefügt. Nach 24h erfolgte die Präparation der Kollagene aus den Agareschichten und Medien der Chondrozytenkulturen.

3.2.5 Die Kollagenpräparation aus Agarose und Medien (24 Well Kulturschale)

Materialien:

- JA 20.1 Röhrchen, Rührfisch, Eppendorf-Gefäß
- Pepsinlösung:
 - 1mg/ml Pepsin in 0,2M NaCl,
 - 0,5M CH₃COOH
- 1M Tris
- 10M NaOH
- NaCl
- 0,4M NaCl in 0,1M Tris-HCl bei pH 7
- Ethanol

Nach 1 stündigem Einfrieren der Kulturschalen und anschließendem Auftauen wurde das Medium und die obere Agaroseschicht in ein JA 20.1 Röhrchen überführt und mit 5ml Pepsinlösung 72h bei 4°C unter Rühren (Rührfisch) verdaut. In diesem Fall wurden pro 1ml Medium und 0,7ml obere Agaroseschicht 5ml Pepsinlösung eingesetzt. Bei kleineren Ansätzen war eine Reduzierung des Volumens notwendig.

Um die Pepsinverdauung zu beenden wurden nach 72h die Ansätze mit 500µl 1 M Tris neutralisiert und falls notwendig mit 10 M oder 1M NaOH auf pH 7 gebracht. Durch anschließende Zugabe von 17,5mg/ml NaCl erfolgte die eigentliche Kollagenextraktion. Die Ansätze wurden 24h bei 4°C gerührt (Rührfisch) und danach 1 min lang bei 5000U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Rührfisches erfolgte zur Trennung der verbliebenen Agarose vom restlichen Ansatz eine erneute 30 minütige Zentrifugation bei 15000U/min und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues JA 20.1 überführt und es folgte unter Mixen eine Kollagenfällung mit 200mg/ml NaCl für 24h bei 4°C.

Nach 45 minütiger Zentrifugation mit 14000U/min bei 4°C wurde der Überstand abgesaugt und der Pellet in 300µl 0,4 M NaCl in 0,1 M Tris-HCl bei pH 7 aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zufügen von 900µl Ethanol wurde der Ansatz für mindestens 2h bei einer Temperatur von -20°C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14000U/min und 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Kollagenpellet in 70µl Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten lang bei 95°C gekocht. Danach erfolgte die Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE (4,5-15%).

3.2.6 Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Materialien:

- Acrylamid-Stammlösung:
 - 40 % w/v Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in H₂O
- Sammelgel (5 %):
 - ddH₂O 6 ml
 - 40 % Acrylamid-Lösung 1,25 ml
 - 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml
 - 10 % w/v SDS in H₂O 100 µl
 - 10 % w/v APS in 50 µl
 - TEMED 10 µl
- Trenngel (4,5-15% Gradienten-SDS-Polyacrylamidgel):
 - ddH₂O
 - 40% w/v Acrylamid-Lösung in H₂O
 - 1, 5 M Tris-HCl (pH 8,8)
 - 10 % w/v SDS in H₂O
 - 10 % w/v APS in H₂O
 - TEMED
- Laufpuffer:
 - 25 mM Tris (0,1% SDS; 0,2 M Glycin)
- SDS-Probenpuffer:
 - 60 mM Tris/HCl, pH 6,8
 - 2% w/v SDS in H₂O
 - 10% v/v Glycerin in H₂O
 - 0,001% w/v Bromphenolblau in H₂O (Frontmarker)
- mg/ml Dithiothreitol (DTT) in SDS-Puffer
- Molekulargewichtstandard
- Fixierungslösung:
 - 50% v/v Methanol in H₂O
 - 10% v/v Eisessig in H₂O.
- Coomassie-Blau-Färbelösung:

- 0,25% w/v Coomassie R250 in H₂O
- 25% v/v Isopropanol in H₂O
- 10% v/v Eisessig in H₂O
- Entfärbungslösung:
 - 10% v/v Methanol in H₂O
 - 10% v/v Eisessig in H₂O

SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch Hinzufügen eines Molekulargewichtsstandard ist es möglich mit Hilfe einer Eichgrade das Molekulargewicht der Proteine im Versuchsansatz zu ermitteln.

Um gleiche Mengen an Radioaktivität (Counts) aufzutragen, wurde die Radioaktivität der Proben mit einem β -Counter bestimmt. Nach Einbauen des Vertikalgels in die Gelelektrophoresekammer und Füllen mit Laufpuffer wurden die Proben und 10 μ l eines Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Anschließend wurde Spannung angelegt um die Trennung zu starten (max. 20 mA im Sammelgel, 30 mA im Trenngel). Nach erfolgter Trennung wurde das Gel für 20 Minuten mit Fixierlösung, dann 30 Minuten in Coomassie-Blau-Färbelösung und anschließend 30 Minuten in Entfärbungslösung inkubiert.

3.2.7 Fluorographie

Durch die Fluorographie wird das Radioaktivsignal auf den Röntgenfilm übertragen. Hierzu wurde das Gel 3 mal 20 Minuten lang in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert und mindestens über 3 Stunden in 20% Diphenyloxazolin DMSO inkubiert. Anschließend erfolgte eine Wässerung des Gels in Aqua Dest. und eine Trocknung im Geltrockner. Der Röntgenfilm wurde zur Detektion bei -80°C zwischen 7 und 21 Tage exponiert.

4 Ergebnisse

Während der Embryonalentwicklung entsteht aus Mesenchymzellen in den Zügen der enchondralen Ossifikation über Chondrozyten das Knochengewebe des Röhrenknochens. Hier unterlaufen die Chondrozyten eine Differenzierungskaskade, die in Apoptose endet. Die unterschiedlichen Differenzierungsgrade sind mit verschiedenen Expressionszuständen in der extrazellulären Matrix gekennzeichnet (Cancedda *et. al.*, 1995). Im ruhenden Knorpel wird Kollagen II, IX, XI und das Knorpelproteoglycan Aggrecan neben anderen Proteinen produziert. Die Chondrozyten der Proliferationszone, die eine charakteristische Säulenordnung aufweisen, sind durch eine hohe Chondrozytenteilungsrate gekennzeichnet. Die hier sezernierten Kollagene sind denen in ruhenden Chondrozyten gleich. Im Gegensatz dazu produzieren die großen, runden und hypertrophen Chondrozyten der Resorptionszone die alkalische Phosphatase und Kollagen X. In der letzten Stufe der Chondrozytendifferenzierung sprossen Blutgefäße zwischen die hypertrophen Knorpelzellen ein. In diesem Stadium sterben die Knorpelzellen durch Apoptose oder wandeln sich in Osteoblasten um (Cancedda *et. al.*, 2000; van der Eerden *et. al.*, 2003; R. Wilson *et. al.*, 2008). Anschließend erfolgt die Verkalkung.

Unpublizierte Studien (Echtermeyer) zeigen das Syndecan-4 während der Embryonalentwicklung in allen Knorpelanlagen und insbesondere in proliferativen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird. Auch der Gelenkknorpel der an Osteoarthritis erkrankten Patienten zeigt eine Verstärkung der Expression von diesem Proteoglykan im Vergleich zu gesunden Patienten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Syndecan-4 auf die Differenzierungskaskade der Chondrozyten.

Für die Versuchsansätze wurden aus 17,5 Tage alten Embryos von Wild-Typ und Syn-4-Knockout- Mäusen Chondrozyten aus den Brustkörben gewonnen (Abb. 22 links) und die Tibien (Abb.22 rechts) freipräpariert. Die so gewonnenen Knorpelzellen und Tibien wurden *in vitro* mit verschiedenen löslichen Faktoren behandelt.

4.1 Einfluss löslicher Faktoren auf die Spätdifferenzierung der Chondrozyten

Um den Einfluss der löslichen Faktoren Insulin, IGF-I und Thyroxin auf die Chondrozyten der Syn-4-Knockout- Maus im Gegensatz zu den Wild-Typ-Maus-Chondrozyten zu untersuchen, wurden am gleichen Tag die Brustkörbe beider Maustypen freipräpariert, aufbereitet und über 14 oder 21 Tage in Agarose mit DMEM und oben genannten Faktoren (100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin) kultiviert. Als Hypertrophiemarker wurde regelmäßig die alkalische Phosphataseaktivität (ALP) und am Tag 14/21 die Expression von Kollagen X und II bestimmt. Als Kontrollkultur wurden beide Maustypchondrozyten unbehandelt in Agarose und DMEM kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte eine photographische Dokumentation, anhand derer die morphologischen Änderungen in den Kulturen festgehalten werden konnten.

Wie aus der Abbildung 23 zu entnehmen, zeigen nach 14 Tagen Kulturdauer sowohl die Wildtyp- als auch die Syn4-\-Chondrozyten, die mit Thyroxin behandelt wurden, eine Aktivität der alkalischen Phosphatase. Im Gegensatz dazu zeigen weder die Kontrollversuchsansätze noch die mit Insulin oder IGF-I behandelten Ansätze eine ALP-Aktivität.

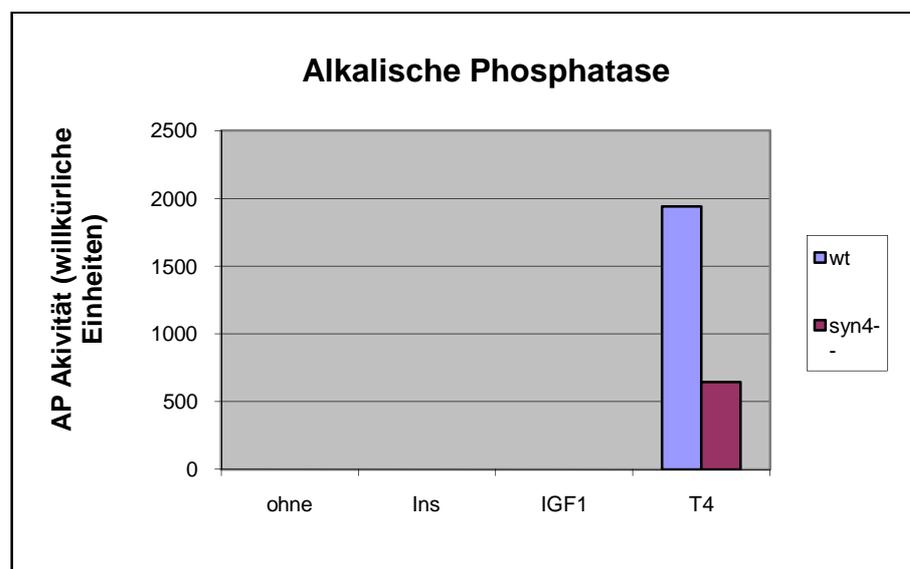


Abb. 23: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4-\-Chondrozyten

Die Versuchsansätze wurden 14 Tage im DMEM mit Zusatz von Insulin, IGF-1, Thyroxin oder als Kontrolle ohne Zusätze kultiviert. Nach 14 Tagen wurde die ALP-Aktivität gemessen

Als weiterer Hypertrophiemarker wurde auch die Expression und Sekretion von Kollagen X im Vergleich zu Kollagen II gemessen. Hierzu wurden die Chondrozytenansätze am Tag 14/21 der Kultivierung mit ^{14}C -Prolin radioaktiv markiert und anschließend die Kollagene aus dem Medium und der Agarose extrahiert. Aus den durch Pepsinverdauung gewonnenen Kollagenen wurde ein Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene erstellt.

Die Abbildung 24 zeigt ein nach 14 Tagen gewonnenes Fluorogramm. Hier zeigt sich eine Kollagen X Bande sowohl bei den mit Thyroxin behandelten Wildtyp- als auch bei den *Syn4*^{-/-} Chondrozyten, wohingegen in dem Kontrollansatz und den Insulin- oder IGF-I- stimulierten Ansätzen nur die Kollagen II Bande sichtbar ist. Auch Kollagen XI-Banden können beobachtet werden.

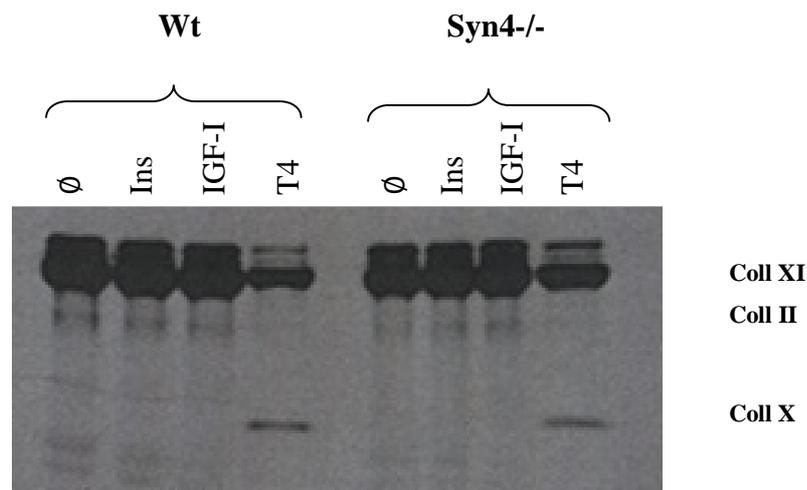


Abb. 24: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene (links die Wildtyp, rechts die *Syn4*^{-/-} Chondrozyten), die Proben wurden 14 Tage im DMEM ohne oder mit Zusatz von Insulin, IGF-I oder Thyroxin kultiviert. T4 stimulierte Chondrozyten produzieren den Hypertrophiemarker Kollagen X nach 14 Tagen

Aufgrund dessen, dass nur die mit Thyroxin behandelten Chondrozyten die Hypertrophiemarker alkalische Phosphatase und Kollagen X sezernieren, wurde der Fokus im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich auf diesen Faktor gerichtet. Die in gleicher Weise wie oben behandelten Chondrozyten aus der Wildtyp und *Syn4*^{-/-} Ansatzreihe wurden mit Thyroxin stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt. Am Tag 4 der Kultur-

dauer kamen die Kulturansätze für 30 Minuten mit fötalem Kälberserum (FKS) in Kontakt, was eine unbeabsichtigte Kulturveränderung zur Folge hatte. Wie aus der Abbildung 25 zu entnehmen, ist in allen Ansätzen (sowohl die unbehandelten als auch die mit Thyroxin stimulierten Chondrozyten) eine ALP-Aktivität zu beobachten. Die mit T₄ stimulierten Knorpelzellen zeigen am Tag 7, 9 und 12 in beiden Ansatzreihen einen Aktivitätsanstieg, der aber am Tag 14 zurückfällt. Die Chondrozyten der Kontrollgruppe zeigen hingegen bis zum Tag 14 der Kulturdauer einen konstanten Aktivitätsanstieg.

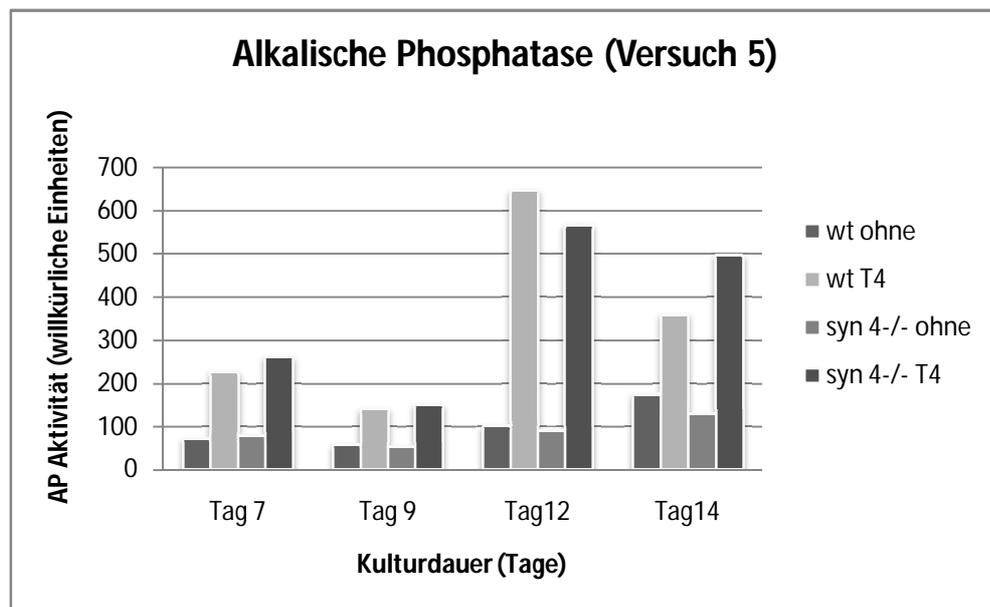


Abb. 25: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4^{-/-}-Chondrozyten

Die Versuchsansätze wurden 14 Tage im DMEM mit Thyroxin oder zur Kontrolle ohne Zusätze kultiviert. Zusätzlich wurde am Tag 4 für 30 Minuten FKS zugeführt. Nach 7, 9, 12 und 14 Tagen wurde die ALP-Aktivität gemessen

Das für diese Versuchsreihe angefertigte Fluorogramm (Abb. 26) zeigt in allen Ansätzen Kollagen X Banden unterschiedlicher Ausprägung. Die Wildtyp-Chondrozyten exprimieren und sezernieren Kollagen X am Tag 9 für Wt T₄, Tag 12 für Wt ohne und Wt T₄.

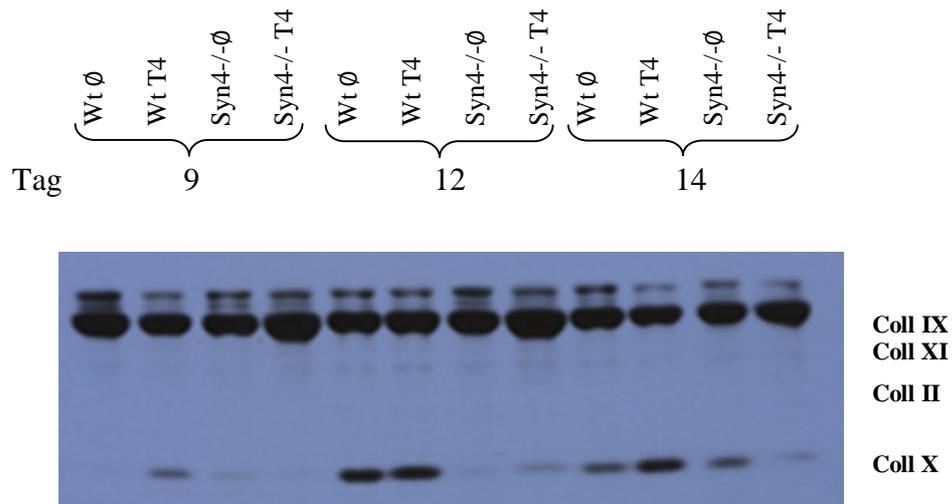


Abb. 26: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene
 Die Versuchsansätze der Wildtyp und Syn4^{-/-} Chondrozyten wurden 14 Tage im DMEM mit Thyroxin oder zur Kontrolle ohne Zusätze kultiviert. Die Kollagenpräparation erfolgte nach Tag 9, 12 und 14. Syn4^{-/-} Chondrozyten zeigen im Vergleich zu WT Chondrozyten in Kultur eine verspätete Koll X Sekretion.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Syndecan-4-defizienten Mäuse eine Verzögerung der Thyroxin-induzierten hypertrophen Differenzierung aufweisen. Um dieses zu bestätigen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit sowohl Wildtyp als auch Syn4^{-/-} Chondrozyten über 21 Tage nur mit Thyroxin stimuliert. Die ALP und die Kollagenpräparation erfolgten nach 12, 14, 16, 19 und 21 Tagen. Die Abbildung 27 zeigt eine höhere ALP-Aktivität der Wildtyp-Chondrozyten am Tag 7, 9, 12, 14 und 16. Am Tag 19 und 21 ist die ALP-Aktivität vergleichbar.

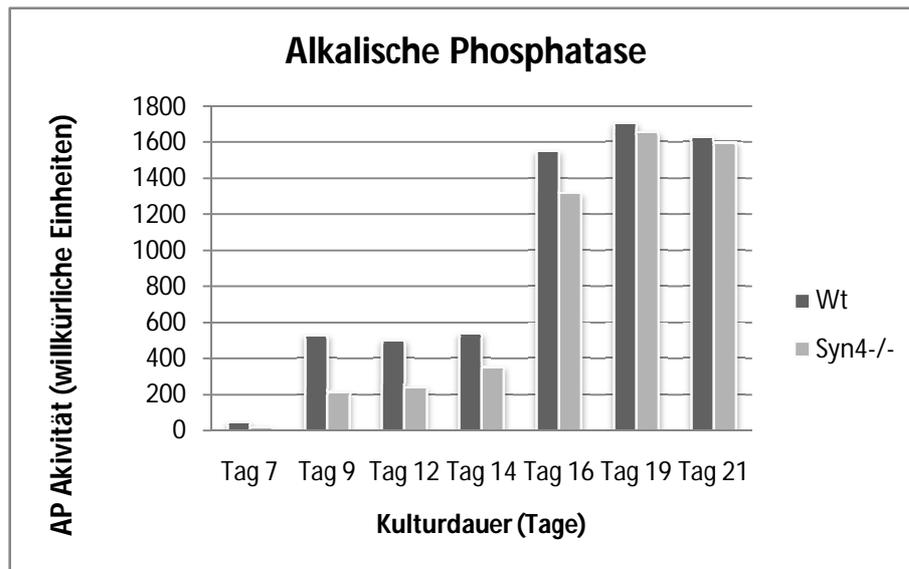


Abb. 27: Aktivität der ALP im Medium der Wildtyp- und Syn4^{-/-}-Chondrozyten

Die Versuchsansätze wurden 21 Tage im DMEM mit Zusatz von Thyroxin kultiviert. Nach 7, 9, 12, 14, 16, 19 und 21 Tagen wurde die ALP-Aktivität gemessen.

Das aus diesem Versuch gewonnene Fluorogramm (Abb.28) zeigt eine Kollagen X Bande, die schon ab Tag 12 für beide Typen sichtbar wird. Für Syn4^{-/-} nimmt die Sichtbarkeit der Kollagen X Bande am Tag 19 deutlich zu. Am Tag 21 ist die Koll X Bande für beide (Syn4^{-/-} und Wt) Versuchsansätze sehr deutlich sichtbar.

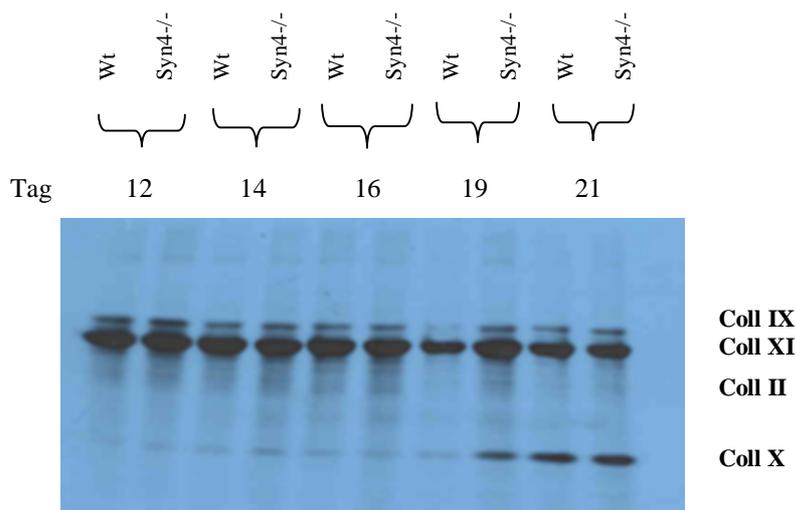


Abb. 28: Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene

Wildtyp und Syn4^{-/-} Chondrozyten in DMEM und stimuliert mit T4 Kollagenpräparation nach

Tag 12, 14, 16, 19 und 21

Um die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zu verdeutlichen, wurde eine Auswertung des Gels nach 3 Woche Exposition auf dem Film mit Image Quant durchgeführt. Das Verhältnis von Kollagen X zu II hat folgende Werte ergeben:

	WT	Syn 4-/-
Tag 19	0,009	0,1203
Tag 21	0,348	0,419

Tab. 5: Verhältnis von Kollagen X zu II nach Auswertung mit Image Quant

Sowohl die Wt als auch die Syn4-/- Chondrozyten zeigen einen Anstieg der Kollagen X Expression, die jedoch für die Knockout-Chondrozyten deutlich ausgeprägter ist. Der Verdacht auf die Verzögerung der durch Thyroxin induzierten hypertrophen Differenzierung konnte so nicht bestätigt werden.

Im Laufe der Versuchsreihe wurden die Zellkulturen bei Wechsel des Mediums photographiert. Durch eine Markierung an der Unterseite jeder Probe wurde darauf geachtet, dass genau die gleichen Ausschnitte der Zellkulturschale photographiert wurden. So konnte durch einen optischen Vergleich die Zellzuwachsrate bestimmt und der Zusammenhang zwischen Änderungen der Hypertrophie-Marker, der Zellzahl und dem Differenzierungszustand beobachtet werden. Dieser Versuch wurde einmalig mit zwei Ansätzen pro Kultur durchgeführt.

Abbildungen 29 bis 32 zeigen, dass nach 14 Tagen in Kultur in allen Ansätzen die Chondrozyten in große, runde Knorpelzellen differenziert sind. Auch die Zellzahl im beobachteten Probenabschnitt hat in allen Ansätzen zugenommen.

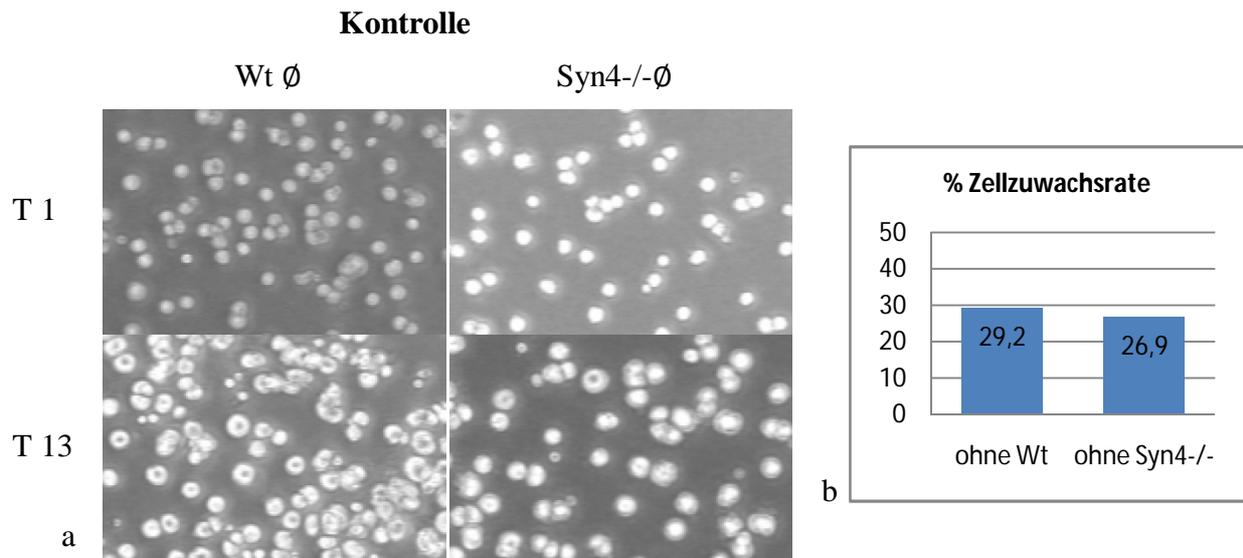


Abb. 29: Zellkultur der Wildtyp und Syn4^{-/-} Chondrozyten, unstimuliert

- a Photographische Aufnahmen von Wildtyp- (links) und Syndecan4^{-/-} Chondrozyten (rechts) am Tag 1(oben) und Tag 13(unten) ohne Stimulation mit löslichen Faktoren
- b Prozentuelle Zellzuwachsrate beider Chondrozytentypen in Kultur über 14 Tage

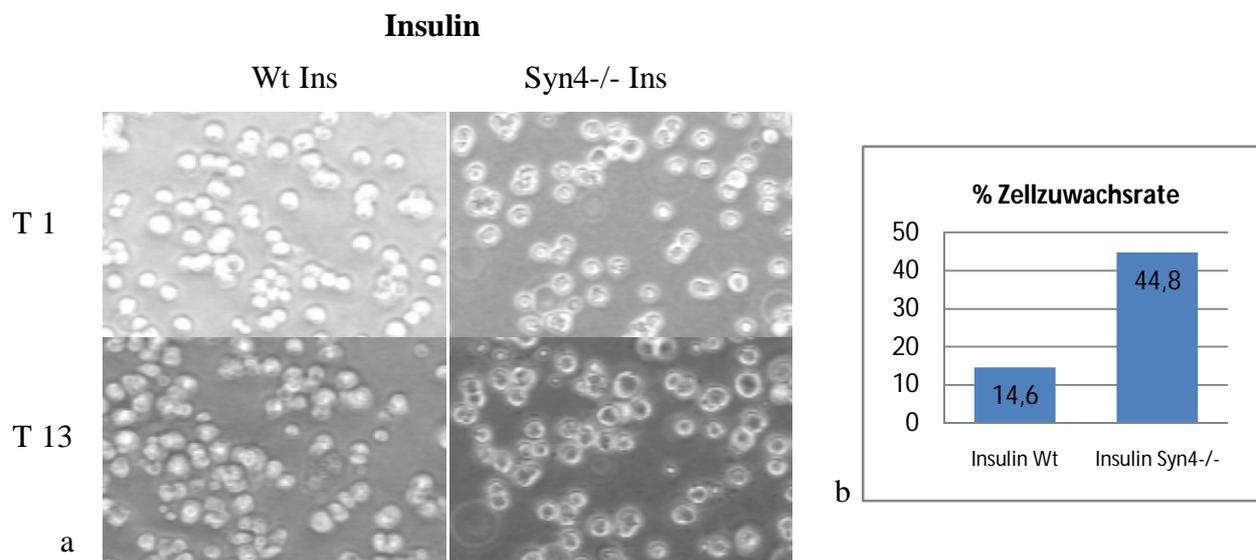


Abb. 30: Zellkultur der Wildtyp und Syn4^{-/-} Chondrozyten, stimuliert mit Insulin

- a Photographische Aufnahmen von mit Insulin stimulierten Wildtyp- (links) und Syndecan4^{-/-} Chondrozyten (rechts) am Tag 1(oben) und Tag 13(unten)
- b Prozentuelle Zellzuwachsrate beider Chondrozytentypen in Kultur über 14 Tage

Insulin-like growth factor I

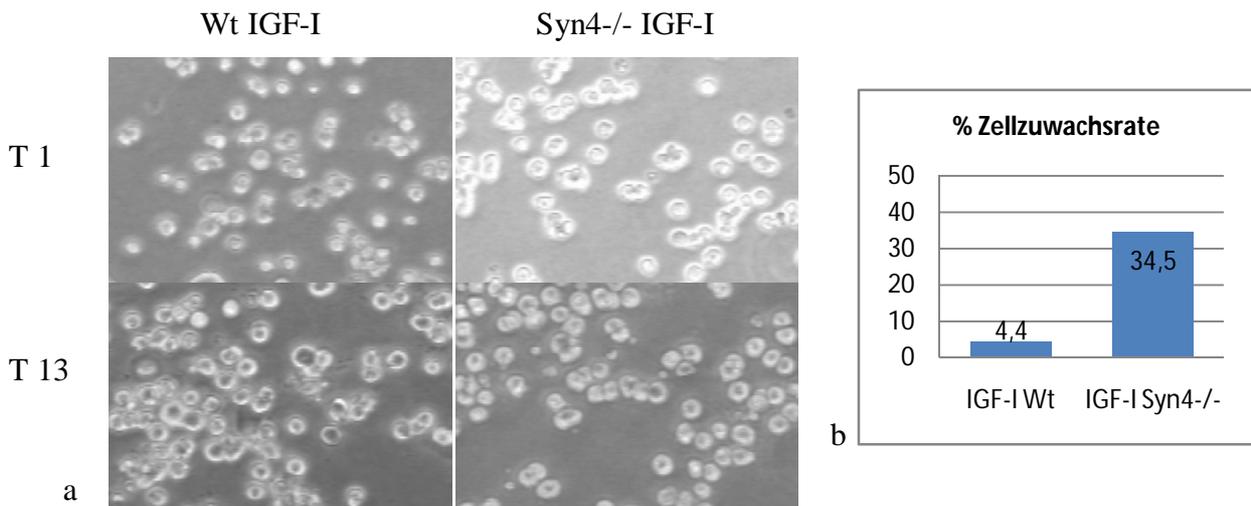


Abb. 31: Zellkultur der Wildtyp und Syn4-/- Chondrozyten, stimuliert mit IGF-I

- a Photographische Aufnahmen von mit IGF-I stimulierten Wildtyp- (links) und Syndecan4-/- Chondrozyten (rechts) am Tag 1(oben) und Tag 13(unten)
- b Prozentuelle Zellzuwachsrate beider Chondrozytentypen in Kultur über 14 Tage

Thyroxin

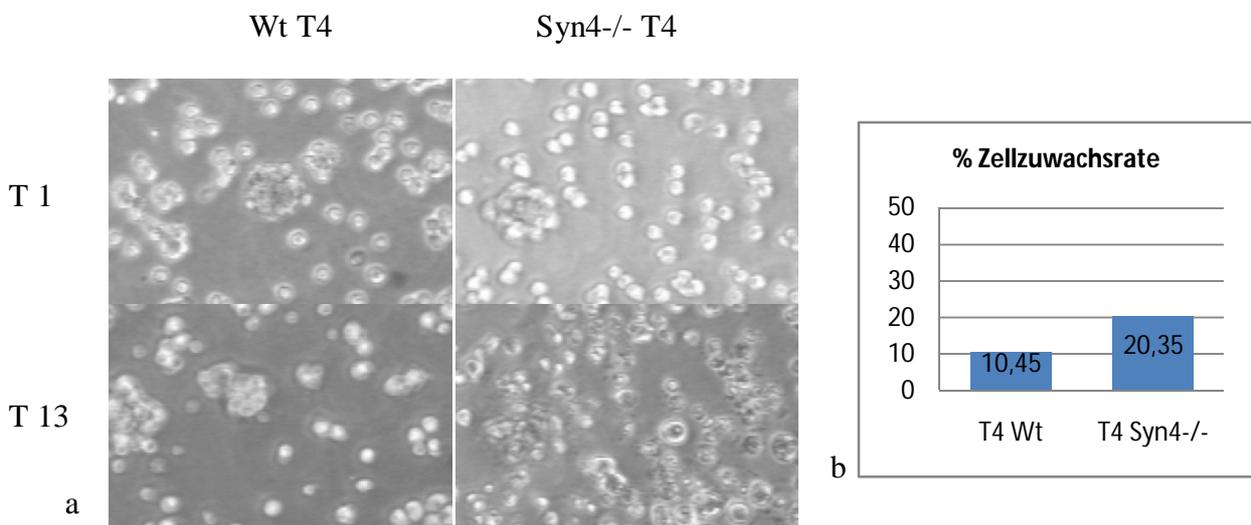


Abb. 32: Zellkultur der Wildtyp und Syn4-/- Chondrozyten, stimuliert mit Thyroxin

- a Photographische Aufnahmen von mit Thyroxin stimulierten Wildtyp- (links) und Syndecan4-/- Chondrozyten (rechts) am Tag 1(oben) und Tag 13(unten)
- b Prozentuelle Zellzuwachsrate beider Chondrozytentypen in Kultur über 14 Tage

Um die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zu verdeutlichen, fasst das Diagramm in Abbildung 33 diese in Abhängigkeit der Zellzuwachsrate von der Anfangs und Endzellzahl zusammen.

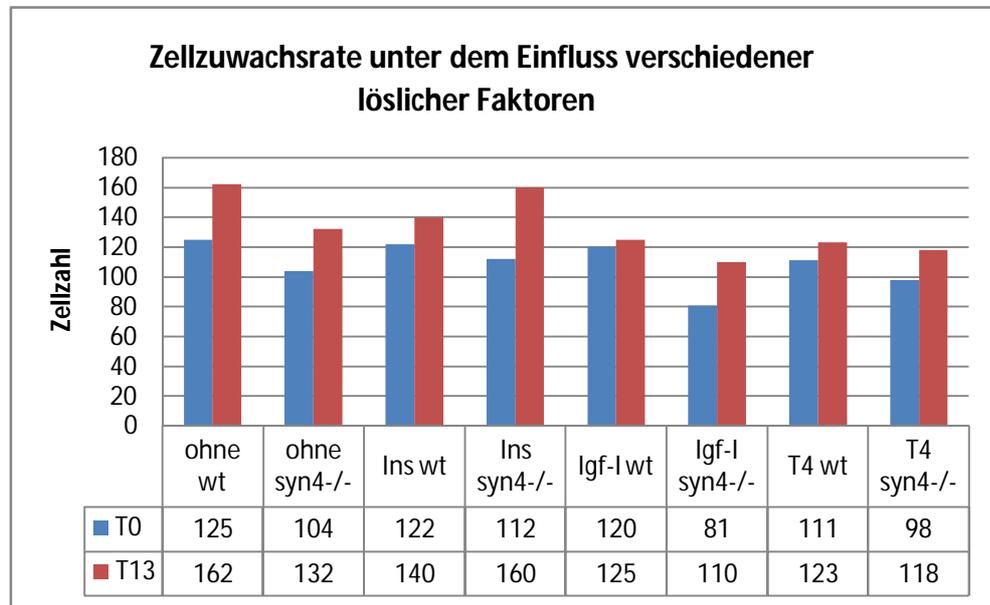


Abb. 33: Zellzuwachsrate unter dem Einfluss verschiedener löslicher Faktoren

Die Zellen wurden 14 Tage in DMEM und Zusätzen unter dem Einfluss verschiedener löslicher Faktoren (Insulin, IGF-I, Thyroxin) kultiviert. Anhand photographischer Aufnahmen wurde die Zellzahl am Tag 0 und Tag 13 bestimmt und graphisch dargestellt

Abbildung 34 fasst noch einmal die prozentuelle Zellzuwachsrate, gebildet aus einem Mittelwert zweier Ansätze, zusammen. Die Zellzuwachsrate ist in den nicht stimulierten Ansätzen (ohne) für Wildtyp- und Syndecan-4-Knockout-Maus-Chondrozyten fast gleich groß. Im Gegensatz dazu haben alle Ansätze der Syndecan-4-Knockout-Maus-Chondrozyten, die mit Insulin IGF-I oder Thyroxin stimuliert wurden, im Vergleich zu Wildtypchondrozyten eine deutliche Zunahme der Zellzuwachsrate, was auf eine stärkere Proliferation hindeutet.

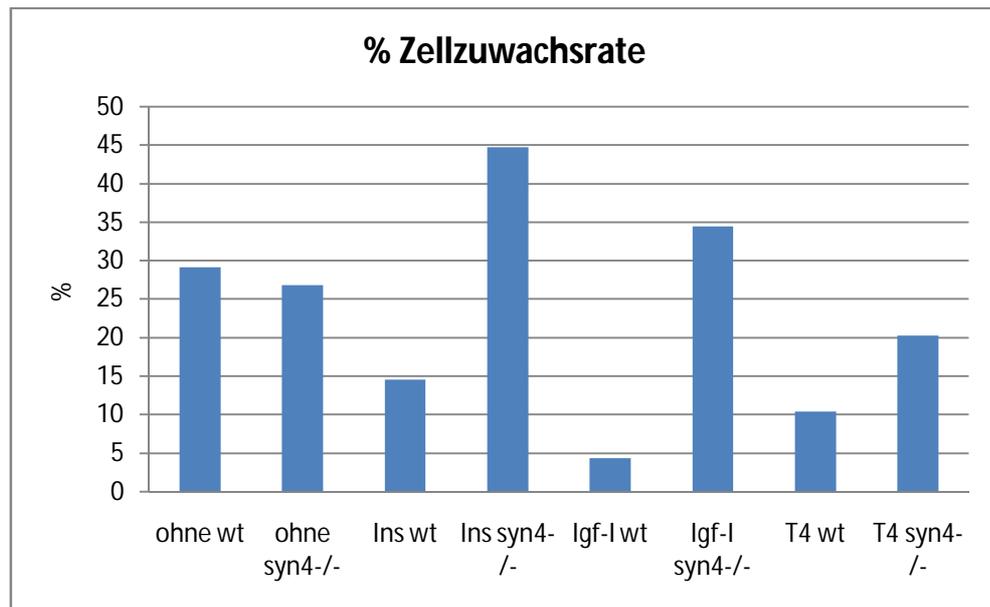


Abb. 34: Prozentuelle Zellzuwachsrate unter dem Einfluss verschiedener löslicher Faktoren

Das Diagramm der Abb. 34 verdeutlicht noch ein mal, dass alle stimulierten Syndecan-4-Knockout-Chondrozyten-Ansätze stärker proliferieren als die Wildtyp-Knorpelzellen, was sich in der prozentuellen Zellzuwachsrate widerspiegelt.

4.2 Einfluss löslicher Faktoren auf das Tibiawachstum.

Um den Einfluss der löslichen Faktoren Insulin, IGF-I und Thyroxin auf das Tibiawachstum der Syn-4-Knockout-Maus-Chondrozyten im Vergleich zu den Wild-Typ-Maus-Chondrozyten zu untersuchen, wurden am gleichen Tag (Tag E 17.5) die Tibien beider Maustypen freipräpariert, aufbereitet und über 14 Tage mit DMEM und löslichen Faktoren (100 ng/ml Insulin, 100 ng/ml IGF-I oder 25ng/ml Thyroxin) in Organkultur kultiviert. Das Wachstum wurde 14 Tage lang photographisch dokumentiert (siehe Abb. 35) und mit Hilfe einer festgelegten Messskala abgelesen (Abb.36). Um die Ergebnisse zu verdeutlichen, wurde die Gesamtlänge, Tibiakopflänge und Tibiakopfbreite gemessen und graphisch dargestellt.

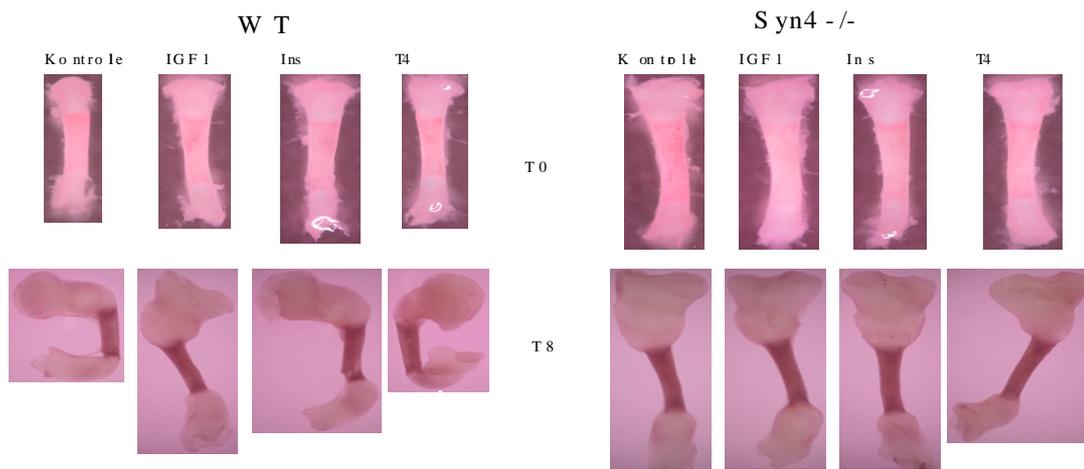


Abb. 35: Photographische Darstellung der Syndecan4 Knockout- und der Wildtyp-Maus Tibien

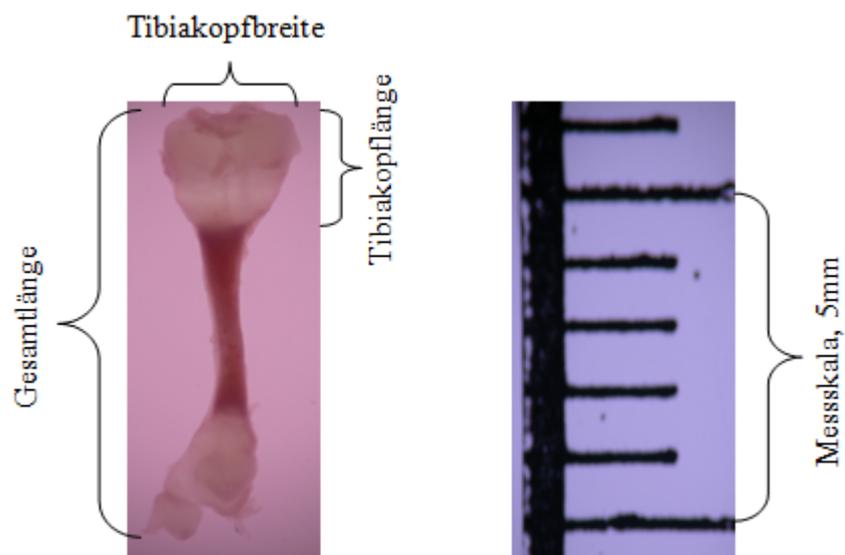


Abb. 36: Darstellung der Tibiaabmessungen

Im Verlauf der Kulturdauer konnte auf der Tibiaoberfläche eine dünne, durchsichtige, periostähnliche Haut beobachtet werden. Diese Haut führte zu einem nicht gradlinigen Verlauf des Wachstums. Es wurde versucht diese Haut nachträglich mit steriler Pinzette zu entfernen, jedoch ist es nie vollständig gelungen. Durch diese Haut wurde das Tibia-wachstum teilweise einseitig behindert und führte dazu, dass die Auswertung des Ver-

suchs erschwert wurde. Aus diesem Grund wurde dieser Versuch nur einmalig durchgeführt.

4.2.1 Gesamtlängenänderung der Wt und Syn4^{-/-} Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.

Die Abbildung 37 und 38 zeigen, dass die Gesamtlängenänderung der Tibien der Wild-Typ-Maus und der Syn4-Knockout-Maus keinen deutlichen Unterschied aufweist. Die Syn4-Knockout-Maus-Tibia-Länge nimmt während der Versuchsdauer prozentuell weniger zu. Jedoch ist der Unterschied vernachlässigbar klein und korreliert mit der Anfangslänge.

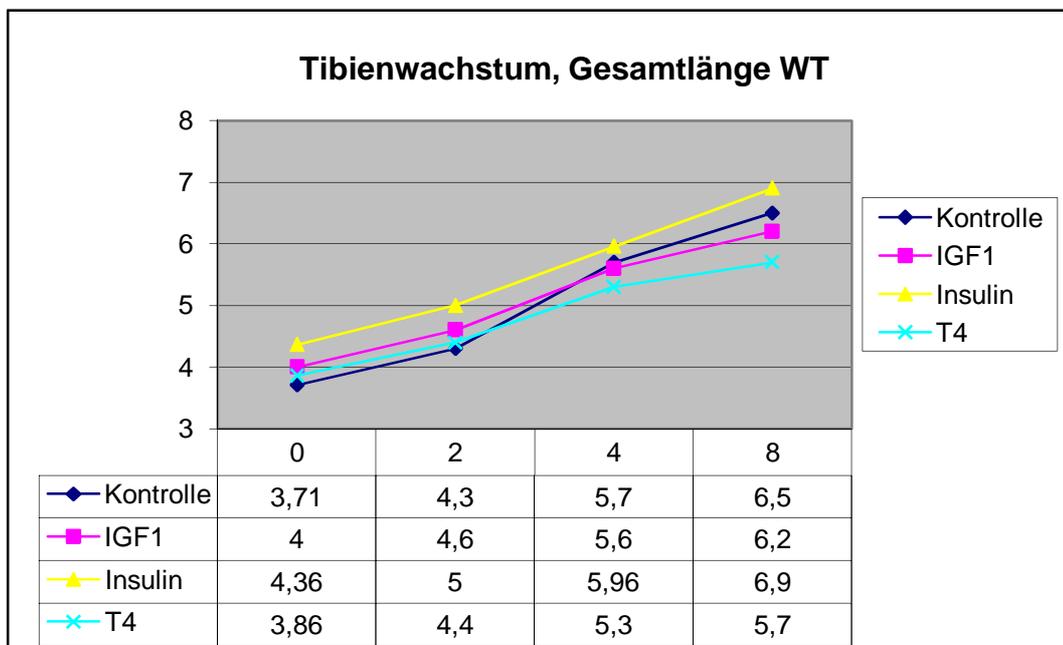


Abb. 37: Gesamtlängenänderung der Wildtyp-Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

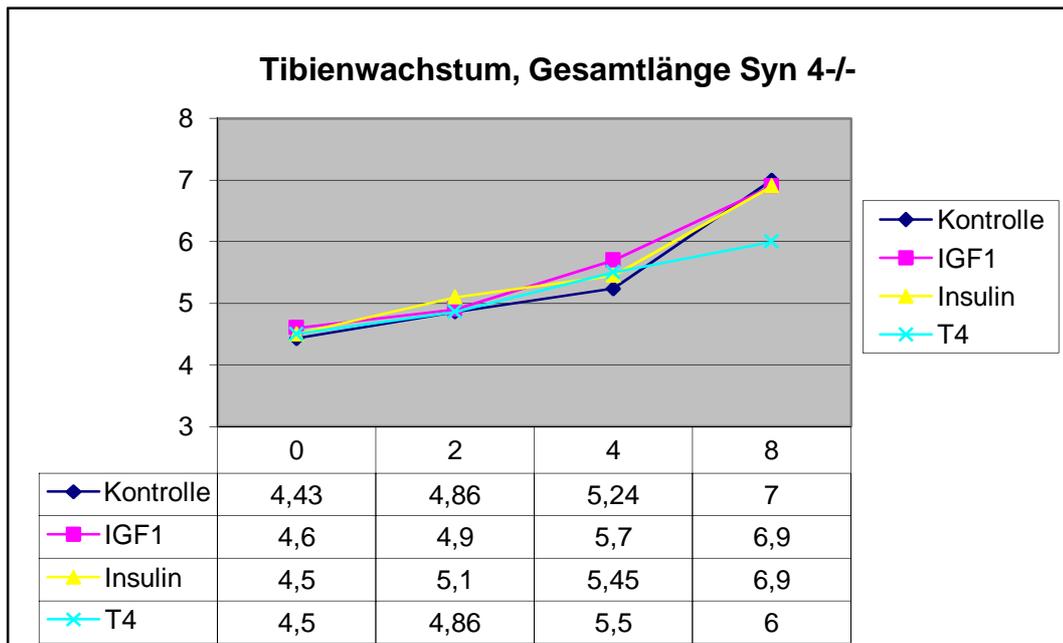


Abb. 38: Gesamtlängenänderung der Syn4-/- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

Die Abb. 39 fasst die graphisch dargestellten Ergebnisse aus Abb. 37 und 38 zusammen. Die prozentuelle Gesamtlängenänderung ist für Wt-Tibien in allen Ansätzen größer, korreliert wieder mit der Anfangslänge der Tibien, die deutlich größer war.

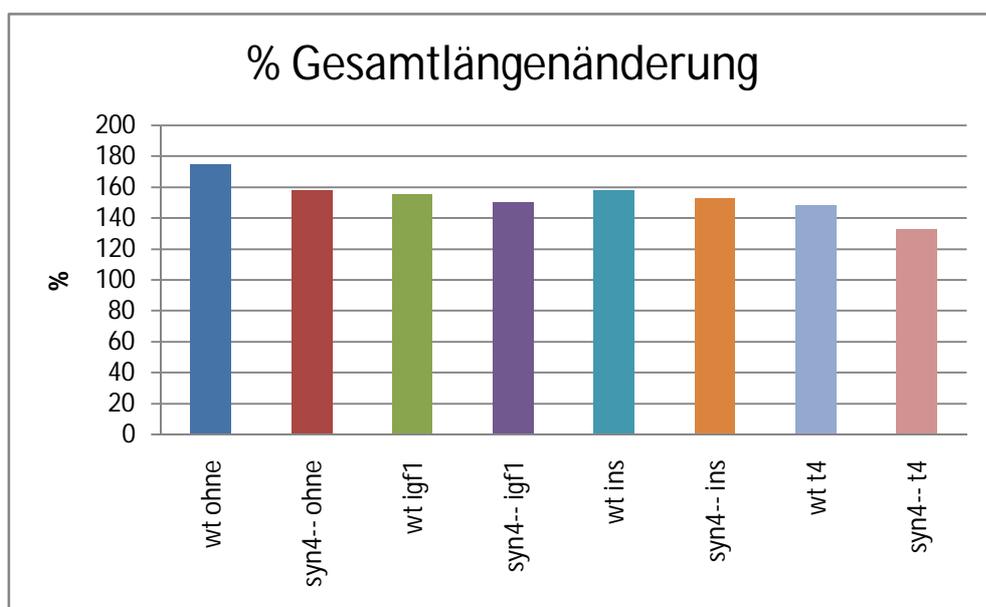


Abb. 39: Prozentuelle Gesamtlängenänderung der Wildtyp und Syn4-/- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

4.2.2 Tibiakopflängenänderung der Wt und Syn4-/- Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.

Die Längenänderung der Tibiaköpfe wurde separat analysiert. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen eine graphische Darstellung der Längenänderung der Tibiaköpfe. Die Tibiakopflänge der Wildtyp-Maus, die nicht stimuliert wurde oder mit Zusatz von Insulin behandelt wurde, zeigt die größte Tibiakopflängenänderung. Im Gegensatz dazu ist die Tibiakopflängenänderung in allen Syndecan-4-/-Ansätzen vergleichbar.

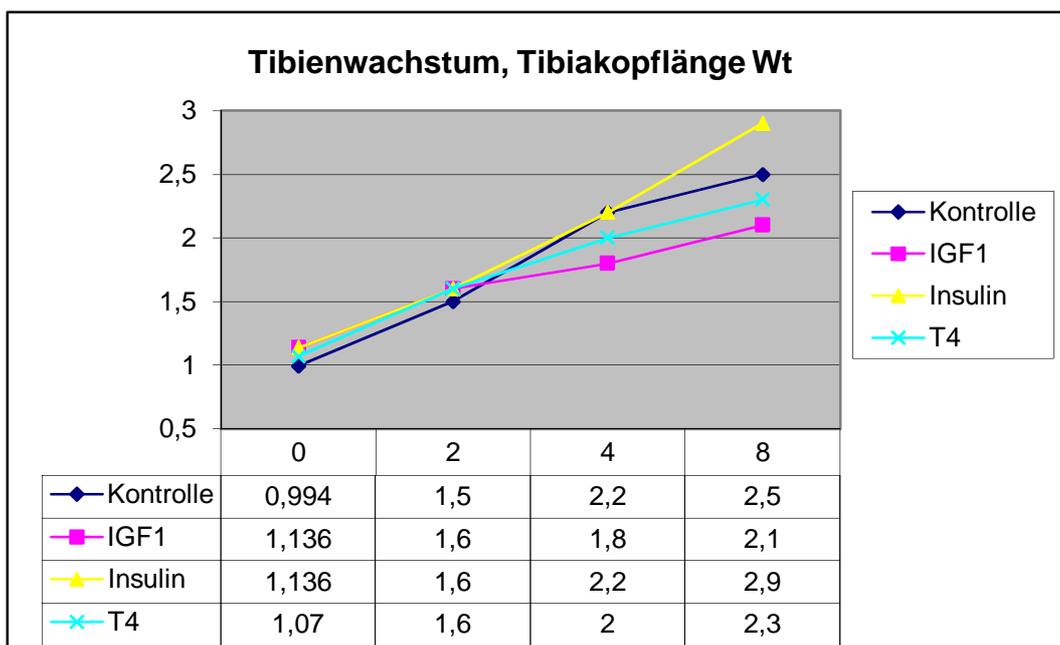


Abb. 40: Kopflängenänderung der Wildtyp- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

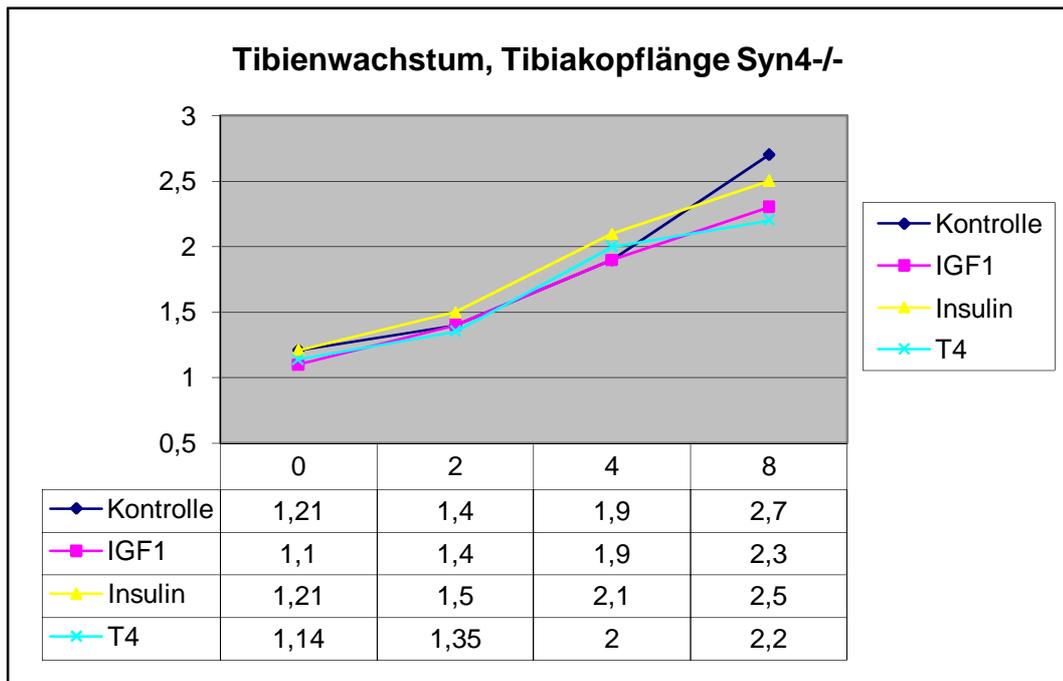


Abb. 41: Kopflängenänderung der Syn4^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

Die Abb. 42 fasst die graphisch dargestellten Ergebnisse der Tibiakopflängenänderung prozentuell zusammen und verdeutlicht, dass die Ergebnisse nicht als signifikant bewertet werden können.

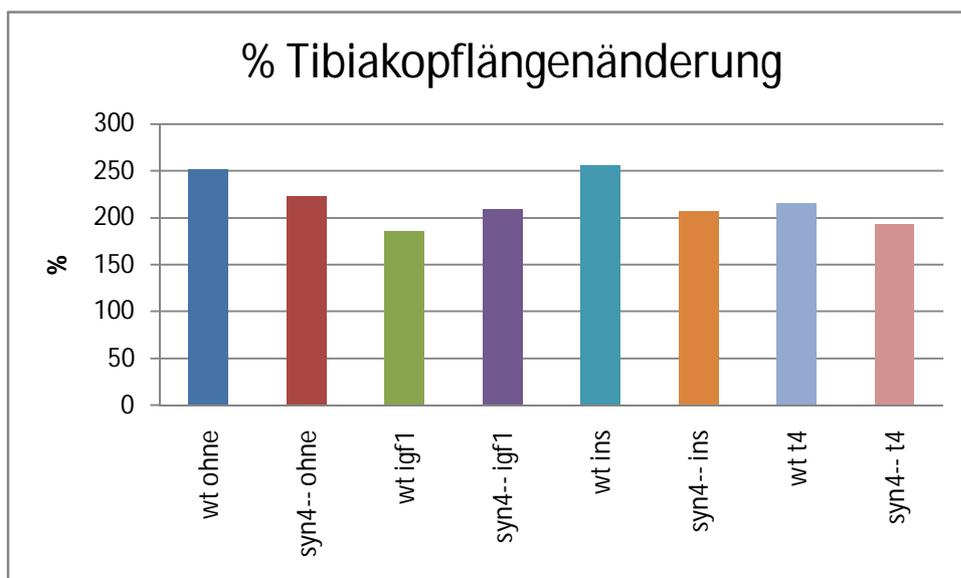


Abb. 42: Prozentuelle Tibiakopflängeänderung der Wildtyp und Syn4^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

4.2.3 Tibiakopfbreiteänderung der Wt und Syn4-/- Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren.

Die Analyse der Tibiakopfbreite für die Wildtyp- und Syndecan-4-Knockout-Maus ist in Abbildung 43 und 44 graphisch dargestellt. Hier zeigt sich für die Syn4-/- Tibiaköpfe, die mit Insulin, IGF-I oder Thyroxin stimuliert wurden, eine deutliche Änderung der Kopfbreite.

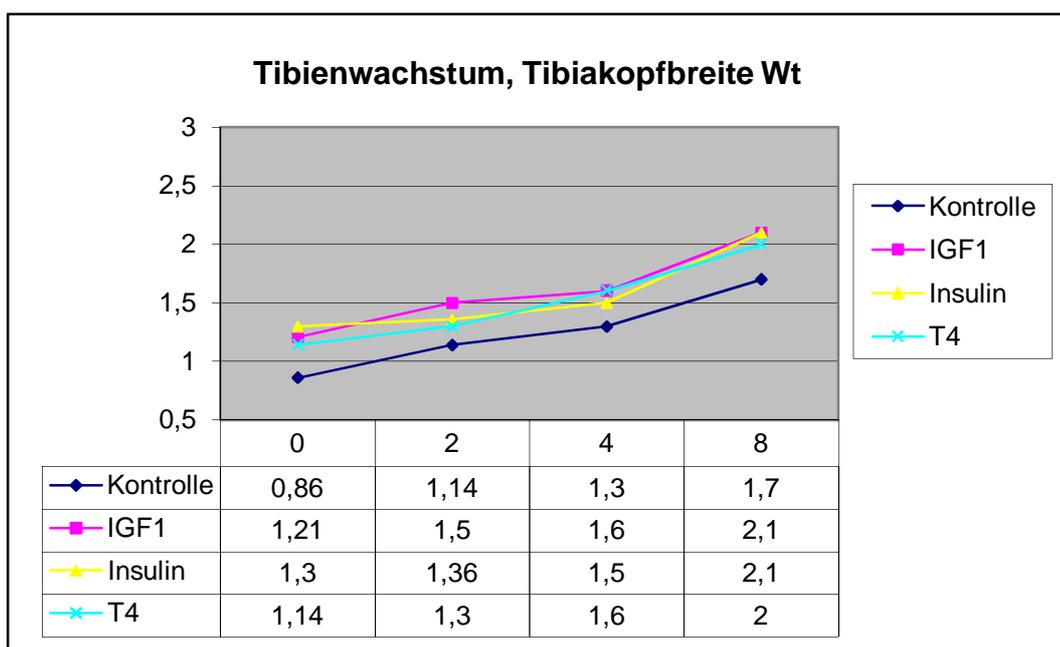


Abb. 43: Tibiakopflängenänderung der Wildtyp- Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

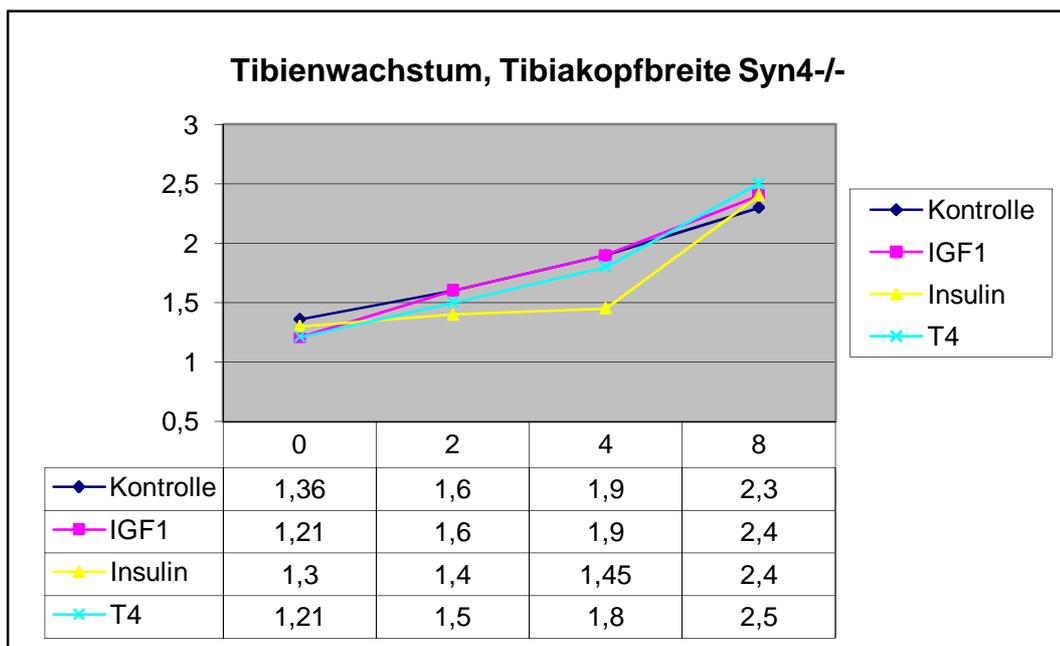


Abb. 44: Tibiakopfbreiteänderung der Syn4^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

Die in Abb. 43 und 44 dargestellten Ergebnisse der stärkeren Änderung der Tibiakopfbreite der Syn-4^{-/-} Maustibien, die mit Insulin, IGF-I oder Thyroxin stimuliert wurden, werden in der Abbildung 45, die die Änderung der Tibiakopfbreite prozentuell darstellt, verdeutlicht.

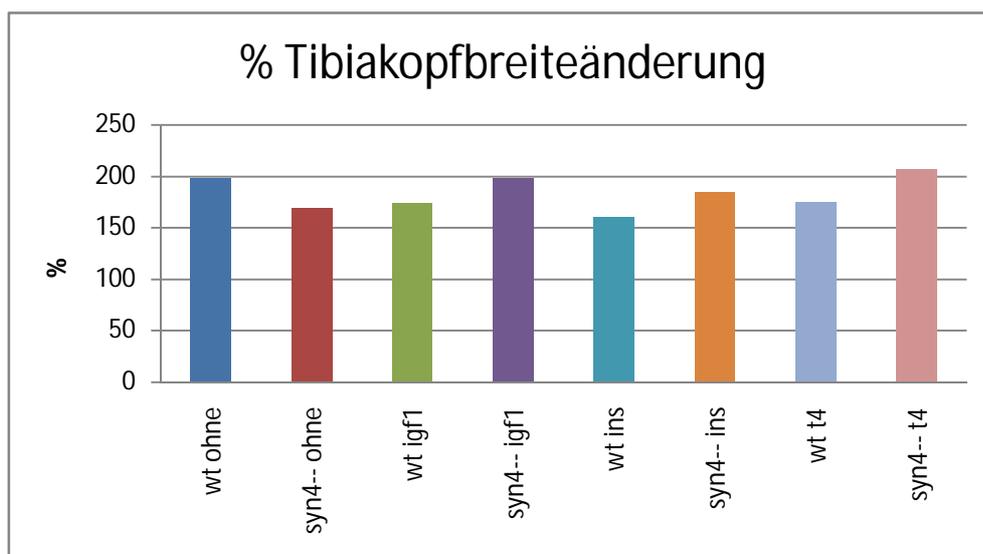


Abb. 45: Prozentuelle Tibiakopfbreitenänderung der Wildtyp und Syn4^{-/-} Maus-Tibien unter dem Einfluss von löslichen Faktoren

4.3 Die Zusammenfassung der Ergebnisse.

- Zunahme der Zellzuwachsrate der Syndecan-4-Knockout-Maus-Chondrozyten die mit Insulin, IGF-I oder T4 stimuliert wurden im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.
- Die Annahme, dass die Thyroxin-induzierte hypertrophe Differenzierung (Synthese von Kollagen Typ X) in Syndecan-4- Defizienten Chondrozyten gegenüber Wildtyp-Chondrozyten verzögert ist, konnte nicht bestätigt werden.
- Keine signifikante Änderung der Gesamtlänge und der Tibienkopflänge zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-/- Maus-Tibien.
- Stärkere Änderung der Tibiakopfbreite der Syn-4-/- Maustibien, die mit Insulin, IGF-I oder Tyroxin stimuliert wurden im Vergleich zu Wildtyp-Tibien.

5 Diskussion

Der Röhrenknochen des menschlichen Skeletts durchläuft von der knorpeligen Anlage bis zum mineralisierten Knochen eine Reihe von Differenzierungsvorgängen. In Zügen der enchondralen Ossifikation, die in drei Phasen verläuft (siehe Kapitel 1.2.1.2), entsteht ein voll funktionsfähiger Knochen. Störungen der Knorpelzeldifferenzierung führen zu Kleinwucherkrankungen. Vergleichbare Vorgänge werden auch bei degenerativen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthrose beobachtet. Diese progressive, primär nicht-entzündliche Gelenkerkrankung, die durch den Abbau des Gelenksknorpels gekennzeichnet ist, ist in der Bevölkerung immer mehr verbreitet und führt zu einer Störung des Gleichgewichts im Knorpelstoffwechsel. Im erkrankten Knorpelgewebe können sowohl proliferierende als auch differenzierte Chondrozyten beobachtet werden (Pfander *et. al.*, 2001; Nerlich *et. al.*, 1993). Einer der Pathomechanismen für die Entstehung der Arthrose kann der Verlust der Mechanismen zur Inhibition der Chondrozytendifferenzierung im Gelenkknorpel sein (Drissi *et. al.*, 2005). Neben einer starken Proliferation und Expression von den Hypertrophie markern kann bei dieser Erkrankung auch eine veränderte Produktion von Syndecan-4 beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde die Rolle von dem Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-4 auf die Chondrozytendifferenzierung untersucht. Den Ausgangspunkt stellte eine unpublizierte Arbeit von Echtermeyer, die eine starke Syndecan-4 Expression in der Wachstumsfuge eines E18.5 Wild-Typ Maus-Embryos gezeigt hat (Kapitel 1.4.3.1.1), dar. Um ein möglichst hohes Differenzierungspotenzial der Zellen zu gewährleisten, wurden für die Versuchsreihe 17,5 Tage alte Maus-Embryos verwendet.

5.1 Einfluss löslicher Faktoren auf die Spätdifferenzierung der Chondrozyten

Um die Frage zu beantworten, ob Syndecan-4 eine Rolle bei der Entstehung von Arthrose spielt, wurden Wildtyp- und Syn-4 -Knockout-Chondrozyten aus Mausembryos gewonnen und unter gleichen Bedingungen mit den gleichen löslichen Faktoren behandelt. Zur Gewährleistung möglichst gleicher Versuchsbedingungen wurden beide Maustypen am gleichen Tag gepaart und nach 17,5 Tagen die Embryos gewonnen. Dadurch konnte aber nicht sichergestellt werden, dass genügend Embryos beider Maustypen für die Versuchsreihe vorliegen.

Nach Stimulation der Chondrozyten beider Maustypen mit DMEM und Zusatz von Insulin, IGF-I oder Thyroxin über 14 Tage in Agarosekultur erreichten nur die mit Thyroxin behandelten Knorpelzellen den hypertrophen Zustand, was sowohl durch die alkalische Phosphatase als auch durch den fluorographischen Nachweis von Kollagen X bestätigt werden konnte. Das Ergebnis dieser ersten Untersuchung hatte den Fokus für weitere Ansatzreihen auf die Stimulation ausschließlich mit Thyroxin gelegt. Bei der zweiten Untersuchung kam es durch den unbeabsichtigten 30 minütigen Kontakt mit FKS am Tag 4 der Kulturdauer zu Kulturveränderung. Die ALP-Aktivität war für beide mit Thyroxin stimulierten Ansatzreihen am Tag 7, 9 und 12 deutlich höher als in den Kontrollansätzen. Am Tag 14 hatte sich dieser große Unterschied relativiert. Die Chondrozyten der Kontrollansatzreihe zeigten hingegen einen konstanten ALP-Aktivitätsanstieg. Das Fluorogramm zeigte, dass die Wildtypchondrozyten deutlich früher Kollagen X exprimieren und sezernieren. In diesem zweiten Versuch konnte bestätigt werden, dass die Differenzierungskaskade nicht nur durch Thyroxin, sondern auch durch Faktoren aus dem FKS beeinflusst werden kann. Da FKS unter anderem T4 und IGF-I enthält, kann die hypertrophe Differenzierung an dem gleichen Faktor liegen.

Das Ergebnis der zweiten Untersuchung deutete darauf hin, dass die Thyroxin-induzierte hypertrophe Differenzierung in den Syndecan-4-defizienten Chondrozyten verzögert ist. Um dieses zu bestätigen wurde die Kulturdauer auf 21 Tage verlängert. Unter sonst gleichen Bedingungen wurden beide Maustypen mit DMEM und Zusatz von Thyroxin oder zur Kontrolle nur mit DMEM kultiviert. Die ALP-Aktivität der Wildtypchondrozyten war zwischen Tag 7 und 16 deutlich höher, am Tag 19 und 21

jedoch mit den Syn-4^{-/-} Chondrozyten vergleichbar. Die Kollagenpräparation erfolgte am Tag 12, 14, 16, 19 und 21. Die Kollagen X-Bande war für beide Typen schon am Tag 12 sichtbar und wurde in den darauffolgenden Tagen immer deutlicher. Durch die Auswertung des Gels mit Image Quant konnte nachgewiesen werden, dass das Verhältnis von Kollagen X zu Kollagen II für die Syndecan-4-Knockout-Chondrozyten ausgeprägter ist. Diese Versuchsreihe hatte bestätigt, dass Syndecan-4 nicht allein für die Hypertrophie-Unterschiede verantwortlich ist. Es ist davon auszugehen, dass die bis heute nicht vollständig untersuchten Faktoren des FKS auch die Differenzierungskaskade beeinflussen können. Da FKS immer einen Cocktail verschiedener Faktoren mit einer großen Menge Thyroxin und IGF-I darstellt, lässt sich nicht ausschließen, dass auch hier T4 für die Differenzierungsveränderungen verantwortlich ist.

Durch die photographische Dokumentation der Zellkulturen bei Wechsel des Mediums konnte durch einen optischen Vergleich die Zellwachstumsrate bestimmt werden. So konnten Rückschlüsse aus der Änderung der Hypertrophie-Marker, der Zellzahl und dem Differenzierungszustand gezogen werden. Nach 14 Tagen der Kulturdauer hatten die Zellen in allen Kulturen das Aussehen verändert. Die Anfangs kleinen und runden Chondrozyten sahen nach 14 Tagen deutlich größer und unregelmäßiger aus. Die Proliferation der Syn 4^{-/-}-Chondrozyten, die mit Insulin, IGF-I und T4 stimuliert wurden, war deutlich höher als die der Wt-Chondrozyten. Der starke Einfluss von Insulin, IGF-I und T4 auf die Chondrozytenproliferation konnte nur bei den Knockout-Maus-Kulturen beobachtet werden.

Für die Verstärkung der Proliferation scheint das Vorhandensein oder Fehlen von Syndecan-4 eine entscheidende Rolle zu spielen. Durch das Fehlen von Syndecan-4 mit dessen Heparansulfatketten wird wahrscheinlich seine regulatorische Wirkung aufgehoben. Dadurch können die löslichen Faktoren ihre volle Wirkung entfalten. Dieses kann zum Beispiel durch den Einfluss von BMPs, Ihh (Lopes *et. al.*, 2006) oder wie in dieser Arbeit beschrieben durch Insulin, IGF-I oder T4 verursacht werden. Auch andere Faktoren sind nicht ausgeschlossen. Wodurch die Verstärkung der Proliferation bei Fehlen des Syndecan-4 genau bedingt war, müsste genauer untersucht werden. Dazu muss analysiert werden, welche Komponenten in der Zellkultur vorhanden sind. Auch die Rolle anderer membrangebundener Proteoglykane ist hier wichtig. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei Fehlen von Syndecan-4 ein anderer Proteoglykan aus der Familie der Syndeca-

ne oder sogar ein anderer transmembraner Proteoglykan wie NG2, CD44, Neuropilin-1 oder Betaglycan dessen Funktion übernimmt und das Fehlen zum Teil kompensiert. Durch verschiedene Untersuchungen an Knockout-Mäusen ist es heute klar, dass das Fehlen von Proteoglykanen nicht zwangsläufig mit Letalität verbunden ist (Couchman, 2010). So sind Syndecan-1 und -4 Knockout-Mäuse voll lebensfähig und fruchtbar. Das gleiche gilt für CD44 und NG2-Knockout-Mäuse. Die Syndecan-3-/- Maus zeigt Veränderungen im Gehirncortex. Zwar sind in dieser Gruppe immer wieder Phänotypunterschiede sichtbar, diese sind jedoch nicht so gravierend, dass die zu Letalität führen würden. Im Gegensatz dazu ist weder die Neuropilin-1- noch die Betaglycan-Knockout-Maus lebensfähig. Dieses führt zu der Annahme, dass bei Fehlen von einem Syndecan die Entwicklung und das Wachstum relativ normal verlaufen (Couchman, 2010). Trotz des unterschiedlichen Vorkommens der Proteoglykane kann das Fehlen von einem Syndecan kompensiert werden, was bedeutet, dass nicht unbedingt das einzelne Proteoglykan wichtig ist, sondern nur dessen Heparansulfat-Ketten. Diese scheinen der entscheidende Faktor bei der Signalübertragung auf zellulärer Ebene zu sein. Welche Rolle dabei die anderen Syndecane, transmembrane Proteoglykane oder sogar Glypikane spielen, ist bis heute ungeklärt und müsste untersucht werden.

Auch der Einfluss von Faktoren des FKS ist bedeutsam. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass beim Fehlen von Syndecan-4 und gleichzeitiger Einwirkung von FKS, die Differenzierung von Wildtyp-Chondrozyten früher eintritt. Im Gegensatz dazu war die Differenzierung der Syn-4-/- Knorpelzellen ohne FKS deutlicher. Dieses könnte bedeuten, dass unter dem Einfluss von FKS, das sehr unterschiedliche wachstumsfördernde Faktoren enthält, das Fehlen von Syndecan-4 nicht vollständig kompensiert werden kann.

Durch die Gewinnung von Zellen aus Mausembryos war keine genaue Kontrolle, ob genügend Embryos für die Ansätze vorlagen, möglich. So musste mehrmals, wenn nicht beide Maustypen Nachkommen erwarteten, die Untersuchung unterbrochen werden. Unsere Syndecan-4-Knockout-Maus-Population wurde aufgrund dieser Gewinnungsmethode reduziert und erfordert für weitere Untersuchungen einen Wiederaufbau. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass nur bei Gewinnung von Knorpelzellen aus neugeborenen Mäusen eine größere Mausezahl und so eine größere Zellzahl erreicht werden kann.

5.2 Einfluss löslicher Faktoren auf das Tibiawachstum

Durch Stimulation der Tibien der Knockout- und Wildtyp-Maus sollte der Einfluss von Insulin, IGF-I und Thyroxin auf das Wachstum beobachtet werden. Die Tibien wurden am gleichen Tag und bei gleichen Bedingungen gewonnen und freipräpariert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit Zusatz der entsprechenden löslichen Faktoren. Das Wachstum wurde bei Wechsel des Mediums über 14 Tage photographisch dokumentiert. Durch eine festgelegte Messskala konnte das Wachstum abgelesen und so die Gesamtlänge, Tibiakopflänge und Tibiakopfbreite gemessen werden. Nur die Auswertung der Tibiakopfbreite ergab einen signifikanten Unterschied. Hier konnte beobachtet werden, dass die Syn 4^{-/-} Tibien, die mit Insulin, IGF-I oder Thyroxin stimuliert wurden, breiter als die stimulierten Wt-Tibien waren. Dieses korreliert mit der Proliferationssteigerung bei den mit Insulin, IGF-I und T₄ stimulierten Syn 4^{-/-}-Chondrozyten.

Bei dieser Versuchsreihe konnte eine dünne, periostähnliche Haut an der Tibiaoberfläche beobachtet werden. Mehrmals wurde versucht, diese mit steriler Pinzette zu entfernen, vollständig ist dieses jedoch nie gelungen. Auf den photographischen Aufnahmen ist diese periostähnliche Haut der Grund für die zunehmende Krümmung der Tibien während der Kulturdauer. Der Einfluss dieser Haut auf das Tibiawachstum ist uns nicht bekannt, kann aber zu Wachstumsverzögerung führen. Das vollständige Entfernen dieser Haut ist mechanisch unmöglich und kann nur durch Lösungsmittel erreicht werden. Da diese eine weitere Kulturveränderung zur Folge hätten, wurde diese Untersuchung beendet.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Syndecane, die zu den Heparansulfat-Proteoglykanen gehören, können in allen menschlichen Zellen gefunden werden. Sie nehmen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung, Zell-Zell-Kontakten, der Wundheilung und vielen anderen Prozessen auf zellulärer Ebene ein. Besonders Syndecan-4 wird in kleinen Mengen in Epithelzellen, Endothelzellen, Fettzellen, Fibroblasten und Neuronalgewebe exprimiert. Während der embryonalen Knochenentwicklung kann dieses Proteoglykan in der Wachstumsfuge beobachtet werden (Echtermeyer, unpubliziert). Bei Patienten, die an Osteoarthritis erkranken, kann des Weiteren genau dieses Proteoglykan in Gelenken verstärkt exprimiert gefunden werden. Um den Einfluss von Syndecan-4 auf die Chondrozytendifferenzierung und dadurch auch auf die Arthrose zu untersuchen, wurden aus Syndecan-4^{-/-} und Wildtyp-Mäusen gewonnene Knorpelzellen und sich im Wachstum befindliche Knochen (Tibia) dem Einfluss löslicher Faktoren unterzogen. Insulin, IGF-I und Thyroxin sollten auf verschiedene Art die Chondrozyten stimulieren, um die Differenzierungsunterschiede bei Vorhandensein oder Fehlen von Syndecan-4 zu verdeutlichen. Syndecan-4 ist nach Stimulation mit Insulin, IGF-I und T4 an der Proliferation beteiligt. In wie fern Syndecan-4 allein an der Differenzierung in den hypertrophen Zellzustand beteiligt ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Hier scheint die Kompensation des Fehlens von Syndecan-4 die entscheidende Rolle zu spielen. Unter dem Zusatz von FKS und Thyroxin ist die Kompensation beeinträchtigt. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist das Verhalten unter dem Einfluss von Thyroxin anders, als unter dem Einfluss von Thyroxin mit löslichen Faktoren des FKS. Eventuell übernimmt ein anderes Syndecan oder ein anderes Heparansulfatproteoglykan, transmembraner Proteoglykan oder Glypican die Rolle von Syndecan-4. Um dieses zu bestätigen, müsste zunächst einmal untersucht werden, ob die Expression der übrigen Syndecane oder anderer transmembranen Proteoglykane in den Chondrozyten ansteigt, wenn Syndecan-4 fehlt. Als Weiteres müsste genauer untersucht werden, welcher Faktor aus dem FKS für diese Unterschiede verantwortlich ist. Denkbar wäre z. B. FGF-2. Um dieses zu prüfen, müsste zu einer mit T4 Stimulierten Wt-Kultur kurz FKS und einer zweiten T4 stimulierten Wt-Kultur kurz FGF-2 hinzugegeben werden. Wenn die Zellen unter dem Einfluss von FKS und von FGF-2 sich gleich verhalten würden, könnte FGF-2 der Faktor aus dem FKS sein, der

die Unterschiede verursacht. Wäre jedoch das Verhalten unterschiedlich, würde dieses auf einen anderen Faktor hindeuten. Um dieses zu bestätigen sind jedoch weitere Versuche notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Alberts B (1994) Molecular biology of the cell, Garland, New York [u.a.], 3 Aufl.
- (2) Alini M, Carey D, Hirata S, Grynblas MD, Pidoux I, Poole AR (1994) Cellular and matrix changes before and at the time of calcification in the growth plate studied in vitro: arrest of type X collagen synthesis and net loss of collagen when calcification is initiated. *J.Bone Miner.Res.* 9 (7): 1077-1087
- (3) Bass MD, Humphries MJ (2002) Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem.J.* 368 (Pt 1): 1-15
- (4) Bassett JH, Williams GR (2003) The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol.Metab.* 14 (8): 356-364
- (5) Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ (2008) Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol.Life Sci.* 65 (3): 395-413
- (6) Bohme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH, Bruckner P (1992) Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J.Cell Biol.* 116 (4): 1035-1042
- (7) Bohme K, Winterhalter KH, Bruckner P (1995) Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp.Cell Res.* 216 (1): 191-198
- (8) Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P (1995) Chondrocyte differentiation. *Int.Rev.Cytol.* 159: 265-358
- (9) Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R (2000) Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int.J.Dev.Biol.* 44 (6): 707-714
- (10) Carey DJ (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem.J.* 327 (Pt 1) (Pt 1): 1-16
- (11) Cevikbas F, Schaefer L, Uhlig P, Robenek H, Theilmeier G, Echtermeyer F, et al. (2008) Unilateral nephrectomy leads to up-regulation of syndecan-2- and TGF-beta-

mediated glomerulosclerosis in syndecan-4 deficient male mice. *Matrix Biol.* 27 (1): 42-52

(12) Coe MR, Summers TA, Parsons SJ, Boskey AL, Balian G (1992) Matrix mineralization in hypertrophic chondrocyte cultures. Beta glycerophosphate increases type X collagen messenger RNA and the specific activity of pp60c-src kinase. *Bone Miner.* 18 (2): 91-106

(13) Couchman JR, Woods A (1999) Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J.Cell.Sci.* 112 (Pt 20) (Pt 20): 3415-3420

(14) Couchman JR (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 26: 89-114

(15) David G (1992) Structural and functional diversity of the heparan sulfate proteoglycans. *Adv.Exp.Med.Biol.* 313: 69-78

(16) Drissi H, Zuscik M, Rosier R, O'Keefe R (2005) Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol.Aspects Med.* 26 (3): 169-179

(17) Echtermeyer F, Baciuc PC, Saoncella S, Ge Y, Goetinck PF (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J.Cell.Sci.* 112 (Pt 20) (Pt 20): 3433-3441

(18) Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, et al. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J.Clin.Invest.* 107 (2): R9-R14

(19) Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, et al. (2009) Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat.Med.* 15 (9): 1072-1076

(20) Gallo R, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS, Bernfield M (1996) Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J.Invest.Dermatol.* 107 (5): 676-683

(21) Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, et al. (2006) The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1068: 498-512

- (22) Gulyas M, Hjerpe A (2003) Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium. *J.Pathol.* 199 (4): 479-487
- (23) Junqueira LCU (2005) *Histologie*, Springer, Berlin [u.a.], Aufl. 6
- (24) Keum E, Kim Y, Kim J, Kwon S, Lim Y, Han I, et al. (2004) Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C-alpha. *Biochem.J.* 378 (Pt 3): 1007-1014
- (25) Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol.Biol.Cell* 5 (7): 797-805
- (26) Knudson CB, Knudson W (2004) Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (427 Suppl) (427 Suppl): S152-62
- (27) Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, et al. (2005) Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J.Clin.Invest.* 115 (7): 1734-1742
- (28) Kronenberg HM (2006) PTHrP and skeletal development. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1068: 1-13
- (29) Löffler G[] (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, Heidelberg [u.a.], 8 Aufl.
- (30) Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB (2006) Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 39 (2): 157-167
- (31) Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K (1993) Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthritis. *Virchows Arch.B.Cell.Pathol.Incl Mol.Pathol.* 63 (4): 249-255
- (32) Oh ES, Couchman JR (2004) Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol.Cells* 17 (2): 181-187
- (33) Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR, Couchman JR (2009) Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scand.J.Med.Sci.Sports* 19 (4): 479-489

- (34) Pfander D, Swoboda B, Kirsch T (2001) Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am.J.Pathol.* 159 (5): 1777-1783
- (35) Ryan MC, Sandell LJ (1990) Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J.Biol.Chem.* 265 (18): 10334-10339
- (36) Schmid TM, Linsenmayer TF (1985) Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J.Cell Biol.* 100 (2): 598-605
- (37) Spring J, Paine-Saunders SE, Hynes RO, Bernfield M (1994) Drosophila syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91 (8): 3334-3338
- (38) Stallcup WB (2002) The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J.Neurocytol.* 31 (6-7): 423-435
- (39) van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr.Rev.* 24 (6): 782-801
- (40) VanWinkle WB, Snuggs MB, De Hostos EL, Buja LM, Woods A, Couchman JR (2002) Localization of the transmembrane proteoglycan syndecan-4 and its regulatory kinases in costameres of rat cardiomyocytes: a deconvolution microscopic study. *Anat.Rec.* 268 (1): 38-46
- (41) Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273 (5275): 613-622
- (42) Welsch U[] (2003) Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.], 2 Aufl.
- (43) Wilson R, Belluoccio D, Bateman JF (2008) Proteomic analysis of cartilage proteins. *Methods* 45 (1): 22-31
- (44) Zimmermann P, David G (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 13 Suppl: S91-S100

8 Lebenslauf

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich mit Ihrem Wissen und Ihrer Erfahrung während meiner Dissertation unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Bruckner (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Rita Dreier für die hervorragende Betreuung und Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge, sowie Dr. Frank Echtermeyer für Seine Unterstützung während der Versuchsphase.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Ehemann für die emotionale und tatkräftige Unterstützung danken, auf die ich mich während des gesamten Studiums verlassen konnte.