

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Prof. Dr. med. Michael Amling

**Molekulare Untersuchungen zur Differenzierung von
artikulären Chondrozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Martin Bonitz

aus Rostock

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 21.12.2017

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thorsten Schinke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Niemeier

Vorwort

Die nachfolgende Dissertation ist in der Zeit zwischen April 2014 und Februar 2016 am Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entstanden. Im Rahmen des Medizinstudiums begab ich mich frühzeitig auf die Suche nach einer experimentellen Doktorarbeit, um einen umfassenden Einblick in die Grundlagenforschung zu erhalten und somit neben dem klinisch geprägten Studium Kompetenzen in der empirischen Wissenschaft erlangen zu können.

Prof. Michael Amling und Prof. Thorsten Schinke unterstützten mich hierbei und gaben mir die Möglichkeit, an einem spannenden orthopädischen Krankheitsbild zu forschen, welches noch weitgehend unverstanden und zugleich hochprävalent ist – der Arthrose. Während am Institut vorrangig Projekte durchgeführt werden, die sich mit regulatorischen Mechanismen und Krankheiten des Knochens befassen, galt es, in meinen Untersuchungen mit Hilfe bereits etablierter Methoden bisherige Arbeiten auf jenem Gebiet fortzuführen und neue Erkenntnisse über den Gelenkknorpel und dessen Interaktion mit anderen gelenkbildenden Geweben zu gewinnen.

Aufbauend auf einer Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe¹ aus dem Jahre 2010 wurden Experimente an einem Mausmodell und an Knorpelzellen von Minipigs durchgeführt, welche im Dezember 2015 publiziert wurden. Jene Publikation dient als Grundlage für diese Dissertation und wird nachfolgend zusammenfassend dargestellt. Zusätzlich werden die weiterführenden Arbeiten kurz erläutert und gemeinsam mit den Ergebnissen der Veröffentlichung in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

Inhaltsverzeichnis

I.	Publikation	5
II.	Einleitung	25
III.	Darstellung der Publikation	28
IV.	Weiterführende Arbeiten & Ausblick	32
V.	Literaturverzeichnis	40
VI.	Zusammenfassung	44
VII.	Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	46
VIII.	Danksagung	47
IX.	Lebenslauf	48
X.	Eidesstattliche Erklärung	49

RESEARCH ARTICLE

Deficiency of Thrombospondin-4 in Mice Does Not Affect Skeletal Growth or Bone Mass Acquisition, but Causes a Transient Reduction of Articular Cartilage Thickness

Anke Jeschke¹*, Martin Bonitz¹*, Maciej Simon^{1,2}, Stephanie Peters¹, Wolfgang Baum³, Georg Schett³, Wolfgang Ruether², Andreas Niemeier², Thorsten Schinke¹, Michael Amling^{1*}

1 Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Hamburg 20246, Germany, **2** Department of Orthopedics, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Hamburg 20246, Germany, **3** Department of Internal Medicine 3 and Institute of Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen 91054, Germany

* These authors contributed equally to this work.

* amling@uke.uni-hamburg.de



click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Jeschke A, Bonitz M, Simon M, Peters S, Baum W, Schett G, et al. (2015) Deficiency of Thrombospondin-4 in Mice Does Not Affect Skeletal Growth or Bone Mass Acquisition, but Causes a Transient Reduction of Articular Cartilage Thickness. *PLoS ONE* 10(12): e0144272. doi:10.1371/journal.pone.0144272

Editor: Jan Peter Tuckermann, University of Ulm, GERMANY

Received: April 28, 2015

Accepted: November 16, 2015

Published: December 2, 2015

Copyright: © 2015 Jeschke et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The work was supported by the following: Deutsche Forschungsgemeinschaft (AM103/21-1, SPP1468-IMMUNOBONE) [<http://www.dfg.de/>]; Seventh Framework Programme under grant agreement n°602300 (SYBIL) [<http://www.sybil-fp7.eu/>]; and IMI-funded project BTCure [<http://www.imi.europa.eu/>].

Abstract

Although articular cartilage degeneration represents a major public health problem, the underlying molecular mechanisms are still poorly characterized. We have previously utilized genome-wide expression analysis to identify specific markers of porcine articular cartilage, one of them being Thrombospondin-4 (Thbs4). In the present study we analyzed *Thbs4* expression in mice, thereby confirming its predominant expression in articular cartilage, but also identifying expression in other tissues, including bone. To study the role of Thbs4 in skeletal development and integrity we took advantage of a *Thbs4*-deficient mouse model that was analyzed by undecalcified bone histology. We found that *Thbs4*-deficient mice do not display phenotypic differences towards wildtype littermates in terms of skeletal growth or bone mass acquisition. Since *Thbs4* has previously been found over-expressed in bones of *Phex*-deficient *Hyp* mice, we additionally generated *Thbs4*-deficient *Hyp* mice, but failed to detect phenotypic differences towards *Hyp* littermates. With respect to articular cartilage we found that *Thbs4*-deficient mice display transient thinning of articular cartilage, suggesting a protective role of Thbs4 for joint integrity. Gene expression analysis using porcine primary cells revealed that Thbs4 is not expressed by synovial fibroblasts and that it represents the only member of the Thbs gene family with specific expression in articular, but not in growth plate chondrocytes. In an attempt to identify specific molecular effects of Thbs4 we treated porcine articular chondrocytes with human THBS4 in the absence or presence of conditioned medium from porcine synovial fibroblasts. Here we did not observe a significant influence of THBS4 on proliferation, metabolic activity, apoptosis or gene expression, suggesting that it does not act as a signaling molecule. Taken together, our data demonstrate that Thbs4 is highly expressed in articular chondrocytes, where its presence in the extracellular matrix is required for articular cartilage integrity.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Osteoarthritis is a highly prevalent disorder characterized by loss of articular cartilage, a unique avascular and hypocellular tissue covering the joints [1,2]. The current treatment options are limited to surgical procedures, such as microfracture, osteochondral implantation, and, in the end-stage, total joint replacement [3,4]. In addition, autologous transplantation of articular chondrocytes after *ex vivo* expansion has emerged as a promising alternative therapeutic approach over the last two decades [5,6]. Since it is commonly accepted however, that any of these treatments only leads to formation of a fibrocartilagenous tissue with inferior quality compared to native articular cartilage, it is of utmost clinical importance to understand the molecular mechanisms controlling the function of articular chondrocytes. This may not only help to optimize ongoing tissue-engineering approaches, but also to identify potential molecular targets for pharmacological stimulation of matrix production by articular chondrocytes.

One potential explanation for the paucity of knowledge regarding specific regulators of articular chondrogenesis is the shortness of articular cartilage in mice, which hinders the identification of unexpected osteoarthritis phenotypes in genetically modified mouse models, unlike it was the case for other skeletal disorders [7]. For the same reason, it is extremely difficult to isolate primary articular chondrocytes from mice, which explains why many experiments related to arthritis have been performed with rib or epiphyseal growth plate chondrocytes. Regardless of these limitations several studies have been performed to identify specific markers of articular cartilage in mice, and there is an increasing number of mouse models displaying an arthritis phenotype [8–14]. Given the potential importance of identifying molecular differences between chondrocytes from articular and non-articular cartilage, we have previously performed genome-wide expression analysis with native tissues and cultured cells of porcine origin [15]. Here it was possible to separate articular and growth plate cartilage from the bone matrix and to culture a sufficient number of chondrocytes from both sources *ex vivo*. The major disadvantage of this approach was related to the use of porcine Gene Chips, which did not provide the same genetic coverage compared to the murine system.

Despite this limitation however, we made at least three important observations [15]. First, we identified common markers of cartilage, but also genes with specific expression in either growth plate or articular cartilage. Second, we found that the molecular differences between the two types of chondrocytes persisted after 10 and 20 days of *ex vivo* culture. Third, we defined 19 markers of articular chondrocytes, thereby raising the question, which of these are relevant regulators of articular cartilage integrity. Here we analyzed the physiological role of *Thbs4*, one of these previously identified markers, by studying the skeletal phenotype of a mouse deficiency model. We found that *Thbs4*-deficient mice do not display defects of skeletal growth or bone mass acquisition, but that articular cartilage thickness is transiently reduced.

Materials and Methods

1. Mouse models

Thbs4-deficient mice on a C57Bl/6 genetic background were purchased from the Jackson Laboratories (#005845). Their genotyping was performed with the primers 5'-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TCT-3', 5'-GGA GAG AGA ATA GCA AGA TCA GCT C-3', and 5'-AAC AAG CAA TGG AAG GCA GAC CCT G-3', giving rise to a 412 bp and a 544 bp fragment for the wildtype and mutant allele, respectively. To evaluate the impact of *Thbs4* in the context of X-linked hypophosphatemic rickets, *Thbs4*-deficient mice were crossed with *Hyp* mice (C57Bl/6 genetic background), which were also obtained from the Jackson Laboratories (#000528). To induce experimental arthritis, *Thbs4*-deficient mice were crossed with

transgenic mice expressing human TNF α (Tg197 on a C57Bl/6 genetic background), which have been described elsewhere [16]. Joint swelling of the foot paws was assessed between 5 and 10 weeks of age using a clinical score graded from 0 (no swelling) to 3 (severe swelling of toes and ankle) as described previously [17]. Grip strength was analyzed on wire (diameter of 3 mm) using a score from 0 (normal grip strength) to -4 (no detectable grip strength) as described [17]. All mice were fed ad libitum and housed in a regular light/dark cycle under SPF-conditions. Animal experiments were approved by the animal facility of the University Medical Center Hamburg Eppendorf and by the “Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz” (Org529).

2. Cell culture

Primary murine osteoclasts were generated by differentiating bone marrow cells for 10 days with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (10 nM) added for the whole period, and M-CSf (20 ng/ml) and Rankl (40 ng/ml) added from day 3 until day 10 [18]. Primary murine osteoblasts were isolated by collagenase digestion of calvariae from newborn mice and differentiated for 20 days in the presence of ascorbic acid (10 mM) and β -glycerophosphate (50 μ g/ml) as described [18]. Porcine synovial tissue was obtained from the right and the left knee of 6 weeks old minipigs. Digestion of the prepared synovial membrane was performed with 1 mg/dl collagenase type 1a solution (Sigma-Aldrich, Germany) for 60–75 min at 37°C. Isolated synovial fibroblasts were seeded and cultured in Synoviocyte Basal Medium (Cell Applications, USA) supplemented with 10% heat-inactivated Synoviocyte Growth Supplement (Cell Application, USA) at normal cell culture conditions. Conditioned medium of these cells was collected for 24 hours in basal medium. To isolate chondrocytes bone-cartilage cylinders were harvested from the medial and lateral condyle of knee joints of 6 weeks old minipigs. The cylinders were separated in articular and growth plate cartilage under the dissecting microscope. Chondrocytes were released by collagenase type 1a solution (Sigma-Aldrich, Germany) as described [15]. The cells were cultured in DMEM/Hams F12 (Biochrom, Germany) supplemented with 10% (v/v) FBS (Lonza, Germany) at 37°C under an atmosphere of 5% (v/v) O₂ and 5% (v/v) CO₂. These experiments were approved by the animal facility of the University Medical Center Hamburg Eppendorf and by the “Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz” (Org356).

3. Expression analysis

RNA from murine tissues, cultured murine osteoclasts and osteoblasts, or porcine chondrocytes and synoviocytes was isolated using the RNeasyMini kit (Qiagen, Germany). DNase digestion was performed according to manufacturer’s instructions. Concentration and quality of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 system (NanoDrop Technology, USA). For RT-PCR expression analysis, 1 μ g of RNA was reversed transcribed using SuperScriptIII (Invitrogen, Germany) according to manufacturer’s instructions. Predesigned TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Germany) were used to quantify expression of all murine genes, as well as for the porcine genes *ACAN*, *FNI*, *COL2A1*, *COL10A1*, *ASPN*, *FRZB*, and *SDC4*. For the other porcine gene the resulting cDNA was used for a PCR reaction with gene-specific primers (*PRG4*: 5'-CAT CTC TCT TTG ACG GTG AGG G-3' and 5'-GCT CCA TAG TGC AGA CTT TCT TGA-3'; *THBS1*: 5'-CCA GCA GCC GTT TCT ATG TTG T-3' and 5'-cct atg tga cga gga tca tgc-3'; *THBS2*: 5'-gac gag ttt ggg tct gtg ga-3' and 5'-cca gcg tag gtt tgg tca ta-3'; *THBS3*: 5'-cag gta cga ctg tgg ac-3' and 5'-ggc act gtg tca ttg cat cg-3'; *THBS4*: 5'-ATC CAG GCG ATC GAA ATT CTG-3' and 5'-AGG TGT CCT ATC GCT GGT TCC T-3'; *THBS5/COMP*: 5'-GGA TGC CTG TGA CAA CTG TC-3' and 5'-AAG GCC CTG AAG TCG GTG AG-3', *MATN3*: 5'-ACC CAC GCG CCC TAT TCT-3' and 5'-CGA GTG

GGT CTG GAG ATG GA-3'; *GAPDH*: 5'-CTT CGT CAA GCT CAT TTC CTG G-3' and 5'-AGT CAG GAG ATG CTC GGT GTG-3') and SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Germany). *GAPDH* expression was used as an internal control. Relative quantification was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method, and results were expressed in linear form using the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ for both RT-PCR assays.

4. Skeletal analysis

After sacrifice the dissected skeletons were fixed in 3.7% PBS-buffered formaldehyde for 18 hours at 4°C, before they were stored in 80% ethanol. All skeletons were analyzed by contact radiography using a Faxitron Xray cabinet (Faxitron Xray Corp., USA) to measure the length of the lumbar spine and femora. For bone histology, the lumbar vertebral bodies L3 to L6 and one tibia of each mouse were dehydrated in ascending alcohol concentrations and then embedded in methylmetacrylate as described previously [18]. Sections of 5 μ m thickness were cut in the sagittal plane on a Microtec rotation microtome (Techno-Med GmbH, Germany). For articular cartilage histology, knee joints were processed in the same way. All sections were stained by toluidine blue and von Kossa/van Gieson staining procedures as described [18]. Histomorphometry was performed according to the ASBMR guidelines [19] using the OsteoMeasure histomorphometry system (Osteometrics Inc., USA). Articular chondrocyte apoptosis was assessed on 5 μ m thin decalcified paraffin sections by *in situ* TUNEL technology (Roche, #11684795910) according to the manufacturer's instructions.

5. Cellular assays

To assess proliferation, metabolic activity and apoptosis, porcine articular chondrocytes were seeded into 96-well plates at a density of 1.000 cells per ml. On the next day cells were incubated for 24 hours with human THBS4 (R&D Systems, #2390-TH) at different concentrations in serum-free medium or in serum-free medium mixed with an equal amount of conditioned medium from porcine synovial fibroblasts. BrdU incorporation, MTT conversion and Caspase 3/7 activities were determined with commercially available systems (GE Healthcare Amersham, #RPM250, Sigma Aldrich, #M2158, and Promega, #G8090, respectively) according to the manufacturer's instructions. To analyze cell adhesion 96-well-microtest plates were coated with 5 μ g/ml THBS4 or 5 μ g/ml THBS5/COMP (R&D Systems, #3134-CP) at 4°C overnight. Porcine articular chondrocytes were washed twice with HBBS/C (Hank's Balanced Salt Solution + 1 mM calcium chloride), pre-treated with tosylphenylalanyl chloromethyl ketone-treated trypsin (0.1 mg/ml) in HBBS/C, before trypsinization was stopped after incubation for 5 min at 37°C. The cells were then washed three times with HBBS/C and resuspended in HBBS/C containing 1% heat inactivated BSA. Were indicated, a monoclonal antibody to integrin β 1 (BD Biosciences, #552828) was added to a final concentration of 16 μ g/ml and incubated with the cells for 30 min at room temperature. Coated wells were washed four times with HBBS/C before addition of 3×10^4 cells per well. After overnight incubation at 37°C under an atmosphere of 5% (v/v) O₂ and 5% (v/v) CO₂ the number of attached cells was quantified. To assess the effects of THBS4 and/or conditioned medium from porcine synovial fibroblasts on gene expression, cells were treated for 6 hours, before RNA was isolated for qRT-PCR expression analysis.

6. Serum analysis of individuals with osteoarthritis

Patients with osteoarthritis were recruited from the Department of Orthopaedics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Patient selection was based on a careful clinical examination and history according to the pattern of osteoarthritis (OA). Only individuals with

primary OA were included. OA secondary to any known cause as well as any other arthropathy were exclusion criteria. All patients had severe, symptomatic primary OA of at least one large joint of the lower or upper extremity (knee, hip or shoulder; index joint) with radiographic joint space narrowing to less than a residual 1/3, and the request for total joint arthroplasty as the primary reason for consultation. Patients with knee or hip OA without signs and symptoms of OA in one or more additional joints were considered to have a relatively confined local disease and were classified as mono-osteoarthritis (mOA). Patients who, in addition to severe OA of the index joint, displayed clinically obvious hand OA of multiple interphalangeal joints and further joints of the lower and or upper extremities were considered to be more severely affected on a systemic level and were classified as poly-osteoarthritis (pOA). As an approach to distinguish between individuals with a presumably rather small total volume of articular cartilage affected locally by OA (mOA) versus individuals with a comparatively larger total volume of articular cartilage affected at multiple sites (pOA), we used these clinical differentiation criteria to build two distinct subpopulations of OA from our routine inpatient and outpatient clinic. Serum concentration of THBS4 was quantified using the antibody-based detection kit (Qayee-Bio, China). After the blood draw, serum samples were kept at room temperature for a maximum of two hours before storage at -70°C until analysis without additional freeze-thaw cycles. All participants provided written informed consent. This study and consent procedure was approved by the local ethics committee (Aerztekammer Hamburg, PV4037).

7. Statistical analysis

All data presented in the manuscript were obtained from the analysis of littermates ($n \geq 5$) and are presented as means \pm standard deviations. Statistical analysis was performed using unpaired, two-tailed Student's *t* test, and *p*-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Given the previously observed predominant expression of *THBS4* in porcine articular cartilage [15], we first addressed the question, whether the same is the case in mice. We therefore isolated RNA from different tissues of 15 weeks old wildtype and *Thbs4*-deficient mice to monitor *Thbs4* expression by qRT-PCR. Here we found, as expected only in wildtype mice, that *Thbs4* is highly expressed in articular cartilage, yet there was also strong expression in other tissues, such as tendon, spleen and cortical bone (Fig 1A). We additionally analyzed, which of the two bone remodeling cell types is the primary source of *Thbs4* expression and performed qRT-PCR with RNA from primary osteoclasts and osteoblasts at different stages of differentiation. Here we found that *Thbs4* was differentially expressed in osteoblast cultures, whereas *Thbs4* transcripts were undetectable in osteoclast cultures (Fig 1B). Since articular cartilage displayed the highest expression of *Thbs4* in wildtype mice, we additionally analyzed if *Thbs4*-deficiency would affect the expression of articular chondrocyte marker genes. Here we did not observe significant differences in the expression of *Col2a1*, *Acan*, *Comp*, *Prg4* and *Sdc4* between wildtype and *Thbs4*-deficient mice, suggesting that *Thbs4* does not play a major role as a regulator of articular cartilage gene expression (Fig 1C). Nevertheless, given the high expression of *Thbs4* in skeletal tissues, we went on to study the skeletal phenotype of *Thbs4*-deficient mice.

We first applied Xray analysis, but failed to detect major differences towards wildtype littermates (Fig 2A). Likewise, quantification of spine and femur length did not reveal a significant difference between wildtype and *Thbs4*-deficient mice at 6 and 26 weeks of age (Fig 2B). We additionally applied non-decalcified histology of tibia sections to analyze for potential differences in the growth plate (Fig 2C). Histomorphometric quantification of the growth plate

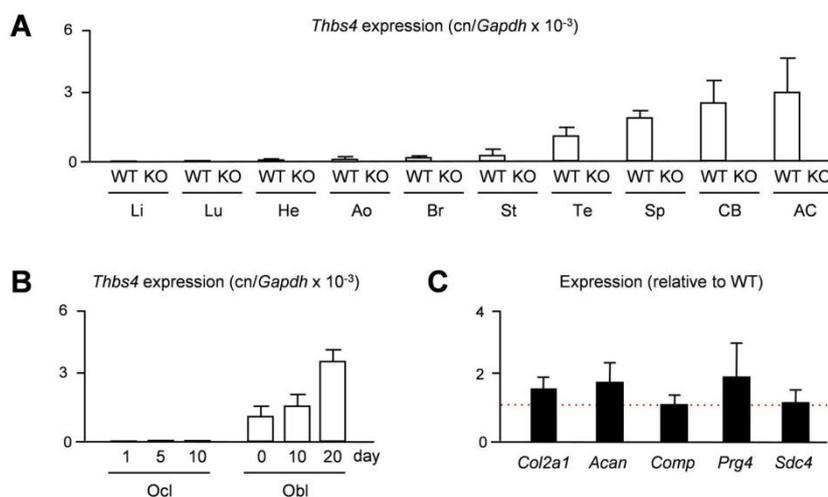


Fig 1. Murine *Thbs4* is highly expressed in skeletal tissues. (A) qRT-PCR monitoring *Thbs4* expression in various tissues of 15 weeks old wildtype (WT) and *Thbs4*-deficient mice (KO). Li, liver; Lu, lung; He, heart; Ao, aorta; Br, brain; St, stomach; Te, tendon; Sp, spleen; CB, cortical bone; AC, articular cartilage. Bars represent mean \pm SD (n = 4). *Thbs4* expression was undetectable in all KO tissues. (B) qRT-PCR monitoring *Thbs4* expression in primary osteoclasts (Ocl) and osteoblasts (Obl) from wildtype mice at different stages of differentiation. Bars represent mean \pm SD (n = 3). (C) qRT-PCR monitoring expression of the indicated genes in articular cartilage of 15 weeks *Thbs4*-deficient mice. The dotted red line indicates the expression in wildtype littermates. Bars represent mean \pm SD (n = 4).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g001

thickness did not reveal statistically significant differences between wildtype and *Thbs4*-deficient mice at 6 and 26 weeks of age (Fig 2D). Likewise, the lengths of the proliferative and hypertrophic zones within the tibia growth plate were not affected by *Thbs4*-deficiency (Fig 2E). We additionally analyzed spine sections in the same groups of mice with respect to a potential bone phenotype (Fig 3A). By quantifying trabecular bone parameters we again found no difference between wildtype and *Thbs4*-deficient littermates (Fig 3B). Collectively, these data suggested that *Thbs4* does not function as a physiologically relevant regulator of skeletal growth, bone formation or remodeling.

Another question to be addressed was based on previously reported findings in *PheX*-deficient *Hyp* mice, a model of X-linked hypophosphatemic rickets [20,21]. These mice display defects of skeletal growth and bone matrix mineralization, which are only partially explained by hypophosphatemia [22,23]. A genome-wide expression analysis revealed that *Thbs4* is markedly over-expressed in cortical bone of these mice, similar to *Fgf23*, whose increased expression in *Hyp* mice is known to cause their renal phosphate loss [24]. Since it was reasonable to speculate that a higher abundance of *Thbs4* in the bone matrix could interfere with mineralization, we generated *Thbs4*-deficient *Hyp* mice and analyzed their skeletal phenotype. Here we found, as expected, that *Hyp* mice displayed a severe skeletal phenotype with pathological enrichment of non-mineralized osteoid, yet this pathology was not affected by *Thbs4*-deficiency (Fig 3C). Subsequent quantification of growth plate thickness and osteoid volume confirmed that the skeletal phenotype of *Hyp* mice was not significantly altered by additional *Thbs4*-deficiency (Fig 3D), thereby demonstrating that increased *Thbs4* expression by *PheX*-deficient osteoblasts is not involved in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemic rickets.

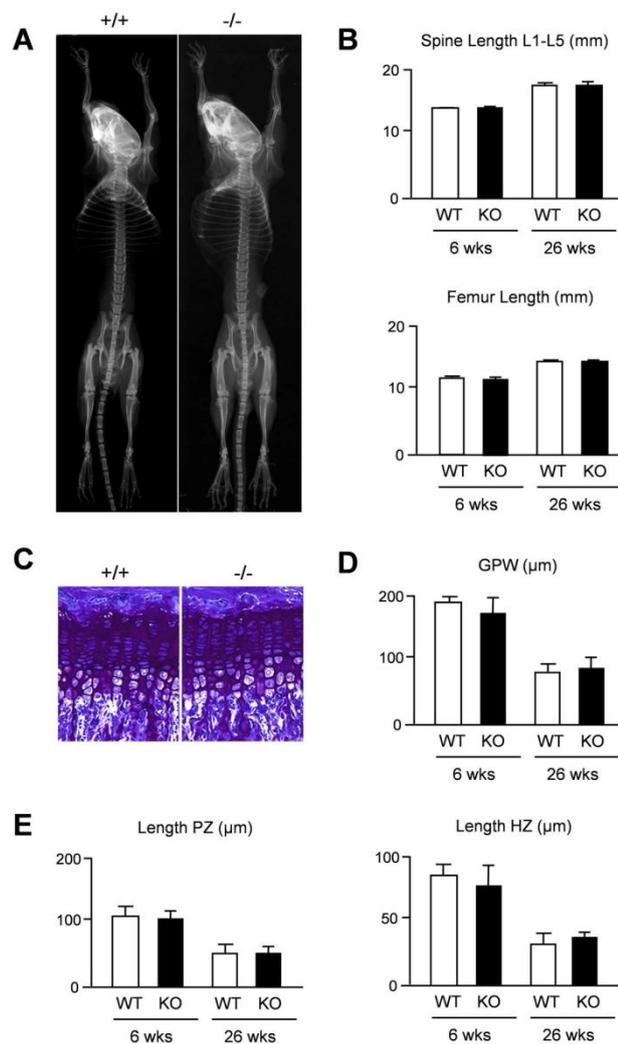


Fig 2. Intact skeletal growth in *Thbs4*-deficient mice. (A) Xray analysis demonstrates absence of gross skeletal abnormalities in 6 weeks old *Thbs4*-deficient mice. (B) Length of lumbar spine and femur in 6 and 26 weeks old wildtype (WT) and *Thbs4*-deficient (KO) mice. (C) Toluidine blue staining of the tibia growth plates from 6 weeks old wildtype (+/+) and *Thbs4*-deficient (-/-) mice. (D) Quantification of the tibial growth plate width (GPW) in wildtype (WT) and *Thbs4*-deficient (KO) mice at 6 and 26 weeks of age. (E) Quantification of the lengths of the proliferative zone (PZ) and hypertrophic zone (HZ) in the same sections. All bars represent mean \pm SD (n = 6 per group).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g002

To assess the articular cartilage phenotype of *Thbs4*-deficient mice we analyzed sections from the knee joints of 6, 26 and 52 weeks old mice and determined the thickness of the articular cartilage layer in three different regions of interest (Fig 4A). Here we found that 26 weeks old *Thbs4*-deficient mice displayed significantly reduced articular cartilage thickness in all regions of interest, both in the femur (Fig 4B) and in the tibia (Fig 4C). This genotype-dependent difference was not observed at the age of 52 weeks, where the articular cartilage thickness

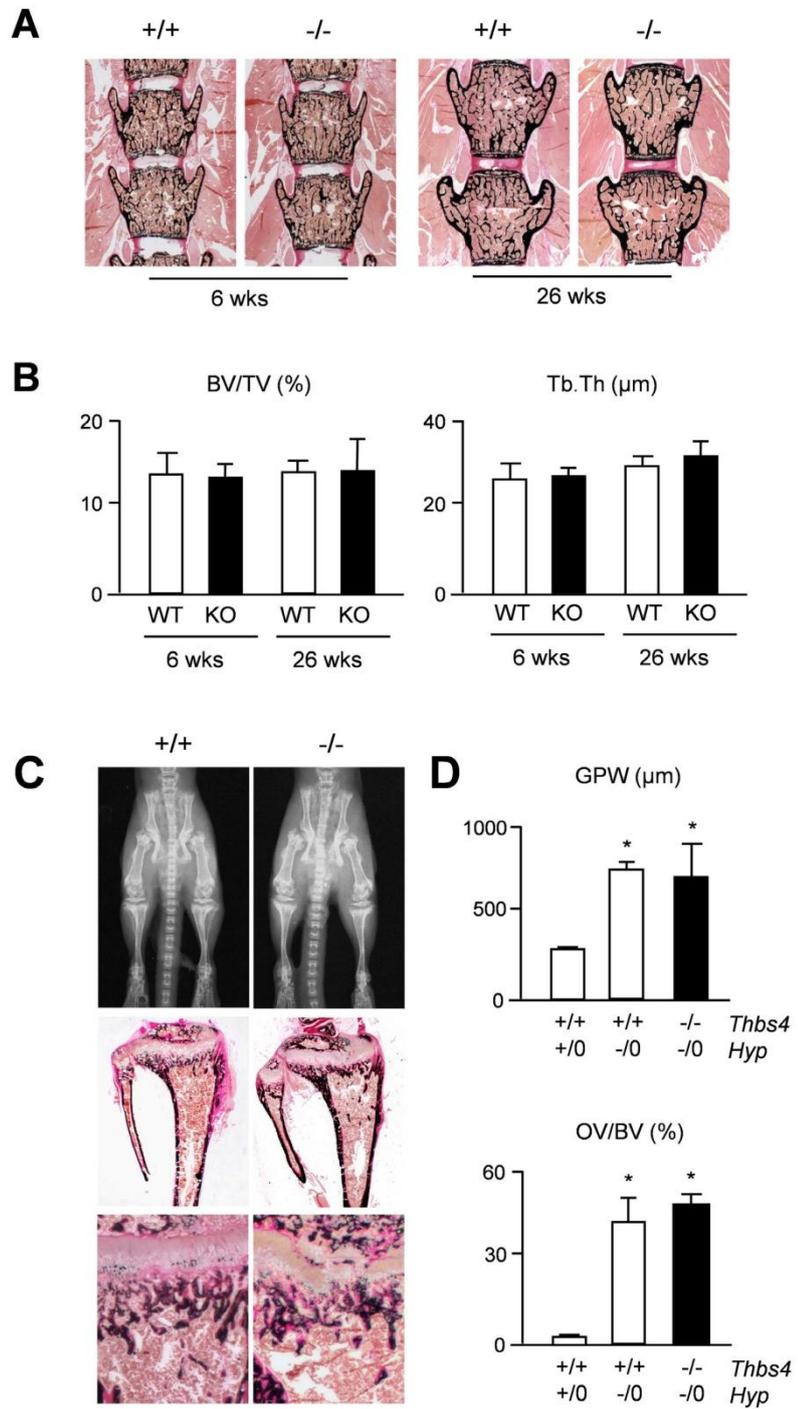


Fig 3. No impact of *Thbs4*-deficiency on bone mass or matrix mineralization on a wildtype or *Hyp* genetic background. (A) Von Kossa/van Gieson staining of spine sections from 6 and 26 weeks old wildtype (+/+) and *Thbs4*-deficient (-/-) mice. (B) Quantification of the trabecular bone volume per tissue volume (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th.) in wildtype (WT) and *Thbs4*-deficient (KO) mice at both ages. Bars represent mean \pm SD (n = 6 per group). (C) Xray analysis (top panels) and von Kossa/van Gieson staining of tibia (middle panels) or spine sections (bottom panels) from 6 weeks old *Hyp* mice with (+/+) or without (-/-) *Thbs4*. (D) Quantification of the growth plate width (GPW) in the tibia (top) or the osteoid volume per bone volume (OV/BV) from mice of the indicated genotypes. Bars represent mean \pm SD (n = 5 per group). Asterisks indicate statistically significant differences towards WT controls (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g003

was similar to 26 weeks old *Thbs4*-deficient mice in both genotypes. We also determined the number of chondrocytes per cartilage area in femur and tibia from the respective mice (Fig 5A). Here we did not observe statistically significant differences, and the same was the case for the percentage of apoptotic cells as assessed by TUNEL assay at the age of 26 weeks (Fig 5B). Finally, in an attempt to obtain a molecular explanation for the transient phenotype of *Thbs4*-deficient mice, we monitored expression of known osteoarthritis susceptibility (OAS) genes [25–28] in articular cartilage from 26 weeks old mice. Whereas *Gdf5* expression was not

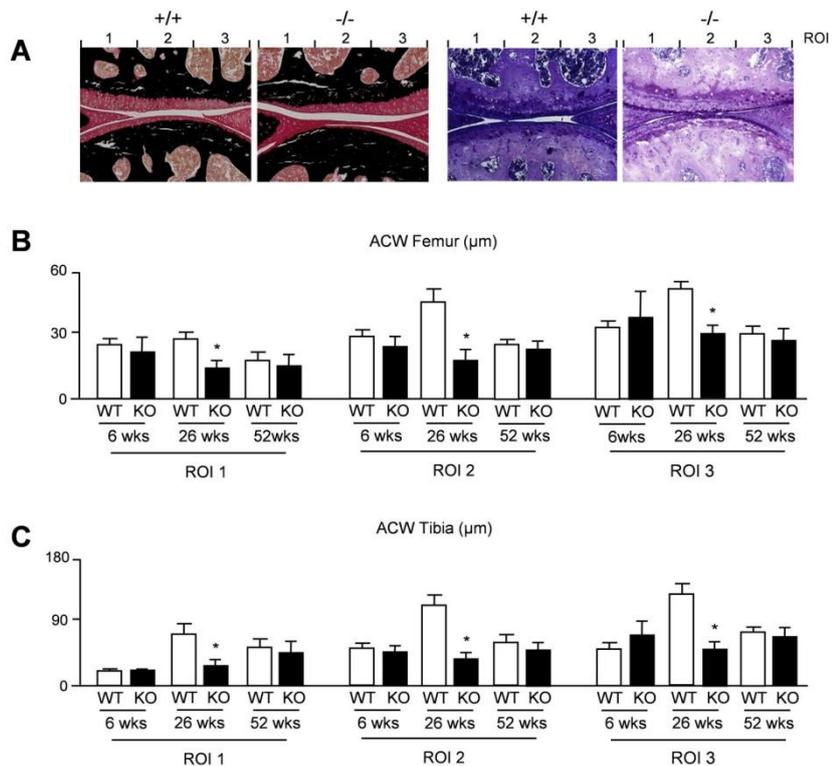


Fig 4. Transient thinning of articular cartilage in *Thbs4*-deficient mice. (A) Von Kossa/van Gieson (left panels) or toluidine blue staining (right panels) of articular cartilage from the knee joints of 26 weeks old wildtype (+/+) and *Thbs4*-deficient (-/-) mice. The three regions of interest for quantification of articular cartilage width are indicated. (B) Quantification of the articular cartilage width (ACW) in femora from wildtype (WT) and *Thbs4*-deficient (KO) mice at 6, 26 and 52 weeks of age. (C) Quantification of the articular cartilage width (ACW) in femur and tibia sections from the same mice. All bars represent mean \pm SD (n = 6 per group). Asterisks indicate statistically significant differences between WT and KO (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g004

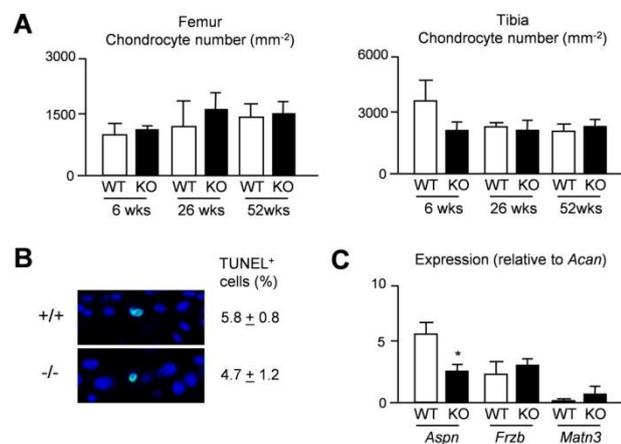


Fig 5. Chondrogenesis is unaffected in articular cartilage in *Thbs4*-deficient mice. (A) Quantification of the chondrocyte number per cartilage area in femur and tibia sections from 6, 26 and 52 weeks wildtype and *Thbs4*-deficient mice. Bars represent mean \pm SD (n = 6 per group). (B) Representative images showing TUNEL-positive cells in articular cartilage from the femora of 26 weeks old wildtype and *Thbs4*-deficient mice. The percentage of TUNEL-positive cells is given on the right. Values represent mean \pm SD (n = 6 per group). (C) qRT-PCR monitoring expression of the indicated genes in articular cartilage of 26 weeks wildtype *Thbs4*-deficient mice. Bars represent mean \pm SD (n = 4). Asterisks indicate statistically significant differences between WT and KO (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g005

detectable by qRT-PCR in samples from either genotype, we found no significant changes between wildtype and *Thbs4*-deficient mice in terms of *Frzb* or *Matn3* expression (Fig 5C). Interestingly however, *Aspn*, encoding a small leucine-rich proteoglycan potentially inhibiting TGF β -dependent matrix synthesis [28,29], was expressed at lower levels in articular cartilage of 26 weeks old *Thbs4*-deficient mice.

To address the question, if *Thbs4*-deficiency would affect the severity of joint destruction in a mouse model of rheumatoid arthritis, we additionally crossed *Thbs4*-deficient mice with mice carrying a transgene causing over-expression of human TNF α [16,17]. Here we found that the presence of the transgene caused progressive joint swelling of the foot paws together with a decline in grip strength until the age of 12 weeks, yet *Thbs4*-deficiency did not significantly affect these two clinical scores (S1A Fig). When we histologically analyzed the knee joints at 12 weeks of age however, we found enhanced destruction of subchondral bone specifically in *Thbs4*-deficient TNF α -transgenic mice (S1B Fig). Taken together, these findings revealed that *Thbs4* has a protective role in articular cartilage, although its deficiency does not affect the proliferation or apoptosis of articular chondrocytes.

Since *Thbs4* is only one member of a protein family, we next compared expression of all five thrombospondin-encoding genes in primary chondrocytes from articular and growth plate cartilage, as well as in synovial fibroblasts. To avoid any cross-contamination of these cell populations we again utilized minipigs, where the two types of cartilage, as well as synovial fibroblasts can be undoubtedly separated. Using qRT-PCR expression analysis we found that *THBS1*, *THBS2*, *THBS3* and *COMP/THBS5* were all expressed in both types of chondrocytes (Fig 6). With the exception of *COMP/THBS5*, we also detected their expression in synovial fibroblasts. In sharp contrast, *THBS4* expression was only detected in articular chondrocytes and not in any of the other cell types.

To analyze a potential impact of *THBS4* on the behavior of articular chondrocytes we also used porcine cells. More specifically, we assessed cellular proliferation (Fig 7A), metabolic

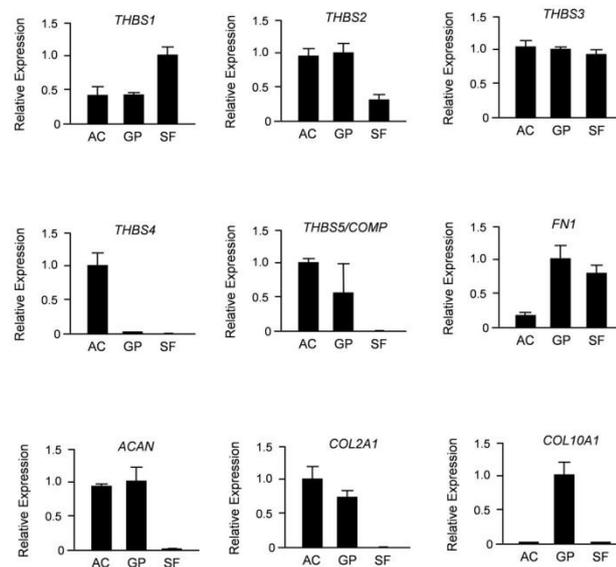


Fig 6. Porcine *THBS4* is specifically expressed in articular chondrocytes. Shown are the results of qRT-PCR expression analyses for all members of the *THBS* family, as well as markers for synovial fibroblasts (*FN1*), chondrocytes (*ACAN*, *COL2A1*) and hypertrophic chondrocytes (*COL10A1*). Primary cells (AC, articular chondrocytes; GP, growth plate chondrocytes; SF, synovial fibroblasts) were derived from 6 weeks old minipigs. Shown is the relative expression (after normalization to *GAPDH*) towards the cell type displaying the highest expression level. All bars represent mean \pm SD (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g006

activity (Fig 7B) and apoptosis (Fig 7C) over 24 hours in primary articular chondrocytes in the presence of increasing concentrations of human THBS4. As a control we performed the same assays with conditioned medium (50% final concentration) from cultured porcine synovial fibroblasts (SF-CM), and again co-administered increasing concentrations of human THBS4. Here we found that THBS4 did not cause a significant influence on any of the parameters. Interestingly however, while SF-CM did not affect proliferation or metabolic activity of the articular chondrocytes, it significantly increased the Caspase-3/7 activity, suggesting a pro-apoptotic influence, which was however unaffected by THBS4. Finally, since COMP/THBS5 has been shown to mediate chondrocyte attachment in an integrin-dependent manner [30], we analyzed if THBS4 would serve a similar function. To address this possibility we coated non-tissue culture plates with THBS4 or COMP, before adding porcine articular chondrocytes in the presence or absence of an antibody against β 1-integrin. After 24 hours we counted the adherent cells and found that they attached to COMP-coated plates in a β 1-integrin-dependent manner (Fig 7D). In contrast, we failed to detect adherent articular chondrocytes on THBS4-coated plates.

As we observed reduced expression of *Aspn* in articular cartilage of 26 weeks old *Thbs4*-deficient, we additionally treated articular chondrocytes for 6 hours with THBS4 and/or SF-CM, before isolating RNA for qRT-PCR expression analysis. When monitoring expression of the OAS genes we observed no significant influences of THBS4, either alone or in the presence of SF-CM (Fig 8A). Importantly however, expression levels of *ASPN*, *FRZB* and *MATN3* (but not of *GDF5*) were remarkably reduced by SF-CM, thus suggesting a direct transcriptional influence by yet unidentified SF-derived molecules. Based on these findings we additionally monitored expression of *COL2A1*, *ACAN*, *THBS4* and *SDC4*, the latter gene encoding a negative

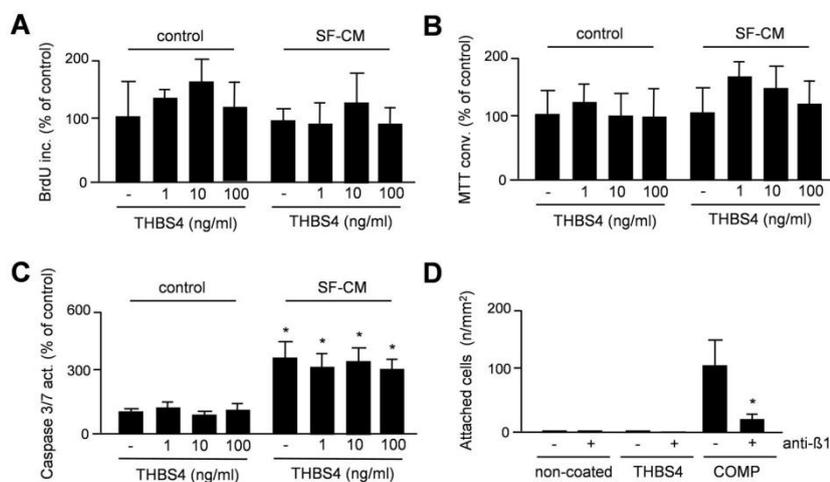


Fig 7. THBS4 does not affect the molecular behavior of porcine articular chondrocytes. (A) BrdU incorporation monitoring cellular proliferation of porcine articular chondrocytes in the presence of increasing concentrations of human THBS4 and/or conditioned medium from porcine synovial fibroblasts (SF-CM), as indicated. Bars represent mean \pm SD (n = 5). (B) MTT conversion monitoring metabolic activity of porcine articular chondrocytes under the same conditions. Bars represent mean \pm SD (n = 5). (C) Caspase-3/7 activity monitoring apoptosis of porcine articular chondrocytes under the same conditions. Bars represent mean \pm SD (n = 5). (D) Cell attachment to non-coated plates or plates coated with THBS4 or THBS5/COMP in the absence or presence of a β 1-integrin antibody. Bars represent mean \pm SD (n = 6). The asterisk indicates a statistically significant of the antibody (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g007

regulator of articular chondrocytes [9]. Again, we failed to detect a significant influence of THBS4, either alone or in the presence of SF-CM (Fig 8B). In contrast, whereas SF-CM caused a transcriptional repression of *ACAN* and *THBS4*, *SDC4* expression was more than 5-fold induced by SF-CM, thus underscoring the suspected influence of SF-derived molecules on gene expression in articular chondrocytes. With respect to THBS4 however, our combined results suggest that it does not act as a signaling molecule directly regulating articular proliferation, differentiation or gene expression.

Discussion

The thrombospondins represent a family of secreted matricellular proteins potentially regulating various processes of tissue remodeling [31]. The five *Thbs* family members can be divided into two subgroups based on their domain structure and mode of multimerization. *Thbs4*, together with *Thbs3* and *Thbs5*, belongs to the second subgroup considered to form a pentameric structure [32]. While mutations of *Thbs5*, better known as cartilage-oligomeric matrix protein (Comp), cause two different forms of skeletal dysplasia, the role of *Thbs3* and *Thbs4* in the skeleton are still poorly defined [33,34]. More specifically, while a transiently accelerated endochondral ossification has been reported for mice lacking *Thbs3*, the skeletal phenotype of *Thbs4*-deficient mice has not been analyzed previously. Interestingly however, two recent studies have identified a specific function of *Thbs4* in myocardial remodeling [35,36], thereby underscoring the relevance of previous findings showing that *Thbs4* expression is specifically induced in hypertrophic or failing hearts [37,38]. More recently, *Thbs4*-deficient mice were found to display an altered composition of extracellular matrices in tendons and skeletal muscles, which also affected the physiological functions of both tissues [39].

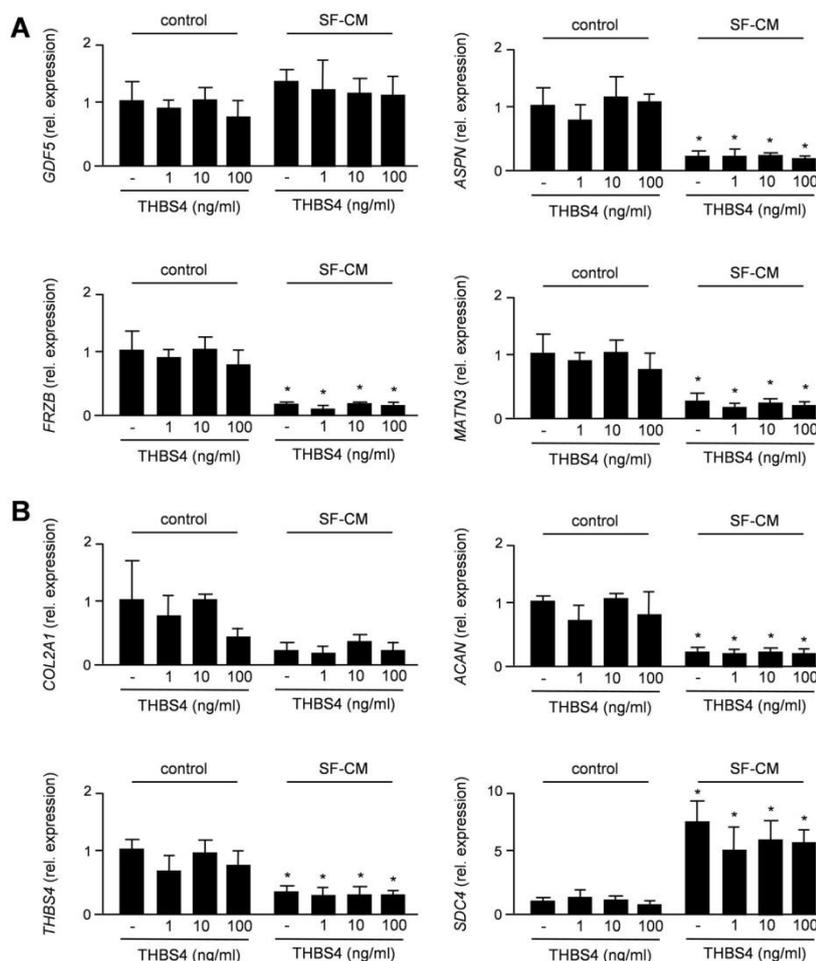


Fig 8. THBS4 does not affect gene expression in porcine articular chondrocytes. (A) qRT-PCR monitoring OAS gene expression in porcine articular chondrocytes treated with human THBS4 and/or SF-CM for 6 hours. (B) qRT-PCR monitoring expression of *COL2A1*, *ACAN*, *THBS4* and *SDC4* expression in the same samples. Bars represent mean \pm SD (n = 4). Asterisks indicate statistically significant differences towards untreated cells ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.g008

Since we have previously identified *Thbs4* as a marker of articular cartilage [15], our main interest was an in-depth skeletal phenotyping of *Thbs4*-deficient mice, thereby also addressing the question, whether its increased expression in bones from *Hyp* mice is relevant for the pathogenesis of X-linked hypophosphatemic rickets [24]. Through the use of undecalcified histology with subsequent histomorphometry we found that *Thbs4*-deficiency has no impact on skeletal growth, bone mass acquisition or skeletal remodeling, and we were able to rule out a contribution of *Thbs4* to the skeletal phenotype of *PheX*-deficient *Hyp* mice. We did however observe a significant reduction of articular cartilage thickness in 26 weeks old *Thbs4*-deficient mice when compared to wildtype littermates, although there was no difference found in 6 or 52 weeks old animals. More specifically, it appeared that the age-related gain of articular cartilage

thickness is abolished in *Thbs4*-deficient mice, whereas the ageing-associated articular cartilage degeneration was not accelerated [40–42]. These data indicate that *Thbs4* has a protective role for articular cartilage integrity and suggest that its absence is partially compensated by other molecules, possibly *Thbs* family members, thereby preventing complete loss of joint surfaces in *Thbs4*-deficient mice. We additionally crossed the *Thbs4*-deficiency into a TNF-transgenic background, which is commonly used to study the impact of specific molecules on the severity of rheumatoid arthritis [16,43,44]. Here we did not observe a significant impact of the *Thbs4*-deficiency on two clinical scores of rheumatoid arthritis, i.e. paw swelling and grip strength, yet loss of subchondral bone was apparently enhanced in *Thbs4*-deficient TNF-transgenic mice, thereby supporting the concept that *Thbs4* has a protective role in articular cartilage.

With respect to the underlying molecular mechanisms we performed experiments with porcine articular chondrocytes, thereby avoiding the principal problem to obtain primary murine articular chondrocytes at sufficient quantity and without contaminating additional cell types. Here we administered recombinant human THBS4 to study its potential effects on different cellular parameters. Using the porcine system additionally allowed us to introduce a control, i.e. conditioned medium from synovial fibroblasts (SF-CM), since these cells appear to secrete factors modulating activities of articular chondrocytes [45]. We found, unexpectedly, that short-term treatment with SF-CM significantly increased Caspase-3/7 activity and *SDC4* expression in articular chondrocyte cultures, while it reduced the expression of genes associated with osteoarthritis and/or encoding components of the cartilage extracellular matrix, including *THBS4*. Albeit interesting and worth being further investigated, the most important finding related to the present study however was that THBS4 administration did not affect any of the tested parameters, and it did not protect against the negative influence of SF-CM. Therefore, although we observed a specific reduction of *Aspn* expression in 26 weeks old *Thbs4*-deficient mice, it is unlikely that this alteration is directly caused by *Thbs4*-deficiency, since our combined analyses essentially rule out that THBS4 acts as a signaling molecule directly regulating transcription in articular chondrocytes. We additionally performed cell adhesion assays, thereby confirming that COMP/THBS5 mediates chondrocyte attachment in an integrin-dependent manner [30], unlike THBS4. Albeit these findings are principally consistent with the lack of differences regarding cellular density in articular cartilage between wildtype and *Thbs4*-deficient mice, they failed to provide a molecular explanation for the observed differences. Therefore, we can only speculate about the causes of the transient reduction of articular cartilage thickness in *Thbs4*-deficient mice. However, since *Thbs4* has been shown to interact with various matrix molecules [46], this phenotype might be related to subtle differences in extracellular matrix integrity, similar to the tendons, where *Thbs4*-deficiency affects collagen fibrillogenesis [39].

The absence of evidence supporting a function of THBS4 as a signaling molecule essentially rules out the possibility that the development of drugs activating THBS4 is a possible approach for the treatment of osteoarthritis. However, since *THBS4*, in contrast to the other THBS family members or additional matrix proteins, such as type-II-collagen or aggrecan, is specifically expressed by articular and not by growth plate chondrocytes, monitoring *THBS4* expression could still be useful for the quality control of tissue-engineered articular cartilage [15]. In the same line of thought, it is reasonable to hypothesize that THBS4 or THBS4 fragments could serve as biomarkers to monitor joint destruction. In fact, while it is obvious that the introduction of disease-specific biomarkers, such as PSA for prostatic hyperplasia, has revolutionized disease management in the last decades, a screening or treatment monitoring for osteoarthritis is still not possible, since specific markers of articular cartilage remain to be identified [47]. We therefore measured THBS4 serum concentrations in individuals with mono-osteoarthritis (S2A Fig) or poly-osteoarthritis (S2B Fig) using a commercially available ELISA against intact

THBS4. Although we found that the latter group displayed higher circulating levels of intact THBS4, the difference towards individuals with mono-osteoarthritis or controls was not significant (S2C Fig). This implies that THBS4 is most likely not a valid biomarker of human osteoarthritis, yet it might be useful to analyze a larger number of individuals, also including cases with other causes of articular cartilage loss (such as rheumatoid arthritis), and to analyze for the presence of THBS4 cleavage products that are potentially generated in specific pathological settings.

Supporting Information

S1 Fig. Loss of subchondral bone in TNF-transgenic *Thbs4*-deficient mice. (A) Quantification of foot paw swelling (left) and grip strength (right) over time in TNF-transgenic mice with (WT) or without (KO) a functional *Thbs4* allele. Values represent mean \pm SD (n = 4 per group). (B) Von Kossa/van Gieson staining of knee joints from 12 weeks old TNF-transgenic mice with (+/+) or without (-/-) a functional *Thbs4* allele. The quantification of the subchondral bone volume is given on the right. Bars represent mean \pm SD (n = 4 per group). Asterisks indicate statistically significant differences between WT and KO (p<0.05). (TIF)

S2 Fig. THBS4 concentrations in sera from individuals with osteoarthritis. (A) Age and gender distribution of individuals with mono-osteoarthritis (n = 20). (B) Age and gender distribution of individuals with poly-osteoarthritis (n = 21). (C) THBS4 concentrations in the sera from patients with mono-osteoarthritis (mOA) or poly-osteoarthritis (pOA). The dotted red line indicates the mean serum concentration measured in 6 control individuals without osteoarthritis. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. George Kolias (Fleming Institute, Vari, Greece) for kindly providing Tg197 TNFtg mice. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (AM103/21-1, SPP1468-IMMUNOBONE), the European Community's Seventh Framework Programme under grant agreement n°602300 (SYBIL), and the IMI-funded project BTCure.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TS GS MA AN AJ MB. Performed the experiments: AJ MB MS SP WB. Analyzed the data: AJ MB MS TS. Contributed reagents/materials/analysis tools: GS WR AN TS MA. Wrote the paper: TS.

References

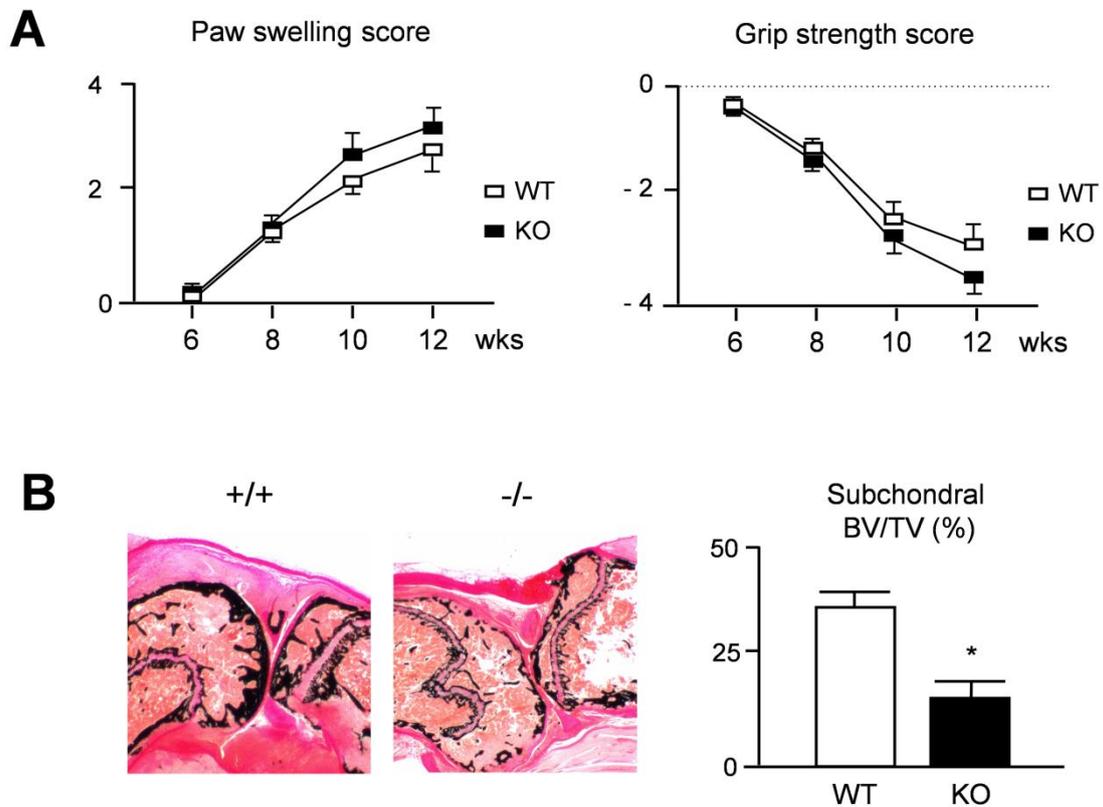
1. Triche R, Mandelbaum BR. (2013) Overview of cartilage biology and new trends in cartilage stimulation. *Foot Ankle Cli*. 18: 1–12.
2. Conaghan PG, Kloppenburg M, Schett G, Bijlsma JW. (2014) Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann Rheum Dis* 73: 1442–1445. doi: [10.1136/annrheumdis-2013-204660](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204660) PMID: [24625626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24625626/)
3. van der Kraan PM. (2012) Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1447–1450. doi: [10.1016/j.joca.2012.07.010](https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.07.010) PMID: [22897882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22897882/)
4. Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. (2008) Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 466: 952–962. doi: [10.1007/s11999-007-0097-z](https://doi.org/10.1007/s11999-007-0097-z) PMID: [18196358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18196358/)
5. Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. (2013) Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg* 21: 303–311. doi: [10.5435/JAAOS-21-05-303](https://doi.org/10.5435/JAAOS-21-05-303) PMID: [23637149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637149/)

6. Paetzold H, Goepfert C, Huber G, Hoenig E, Pörtner R, Schilling AF, et al. (2012) The development of the collagen fibre network in tissue-engineered cartilage constructs in vivo. Engineered cartilage reorganises fibre network. *Eur Cell Mater* 23: 209–221. PMID: [22481225](#)
7. Elefteriou F, Yang X. (2011) Genetic mouse models for bone studies—strengths and limitations. *Bone* 49: 1242–1254. doi: [10.1016/j.bone.2011.08.021](#) PMID: [21907838](#)
8. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, et al. (2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 115: 622–631. PMID: [15719068](#)
9. 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: 1072–1076. doi: [10.1038/nm.1998](#) PMID: [19684582](#)
10. Settle SH Jr, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. (2003) Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol* 254, 116–130. PMID: [12606286](#)
11. Raducanu A, Hunziker EB, Drosse I, Aszódi A. (2009) Beta1 integrin deficiency results in multiple abnormalities of the knee joint. *J Biol Chem* 284: 23780–23792. doi: [10.1074/jbc.M109.039347](#) PMID: [19586917](#)
12. Fang H, Beier F. (2014) Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat Rev Rheumatol* 10: 413–421. doi: [10.1038/nrrheum.2014.46](#) PMID: [24662645](#)
13. Vo N, Niedernhofer LJ, Nasto LA, Jacobs L, Robbins PD, Kang J, et al. (2013) An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints. *J Orthop Res* 31: 831–837. doi: [10.1002/jor.22204](#) PMID: [23483579](#)
14. Schelbergen RF, de Munter W, van den Bosch MH, Lafeber FP, Sloetjes A, Vogl T, et al. (2014) Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* [Epub ahead of print].
15. Hissnauer TN, Baranowsky A, Pestka JM, Streichert T, Wiegandt K, Goepfert C, et al. (2010) Identification of molecular markers for articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1630–1638. doi: [10.1016/j.joca.2010.10.002](#) PMID: [20950698](#)
16. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10: 4025–4031. PMID: [1721867](#)
17. Stock M, Böhm C, Scholtyssek C, Englbrecht M, Fümrohr BG, Klinger P, et al. (2013) Wnt inhibitory factor 1 deficiency uncouples cartilage and bone destruction in tumor necrosis factor α -mediated experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 65: 2310–2322. doi: [10.1002/art.38054](#) PMID: [23784913](#)
18. Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, et al. (2013) Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol* 200: 537–549. doi: [10.1083/jcb.201207142](#) PMID: [23401003](#)
19. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595–610. PMID: [3455637](#)
20. Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, et al. (1997) Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 6: 165–171. PMID: [9063736](#)
21. Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, et al. (1997) Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99: 1200–1209. PMID: [9077527](#)
22. Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L. (1992) Defective bone formation by Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect. *J Bone Miner Res* 7: 215–220. PMID: [1315116](#)
23. Seitz S, Rendenbach C, Barvencik F, Streichert T, Jeschke A, Schulze J, et al. (2013) Retinol deprivation partially rescues the skeletal mineralization defects of PheX-deficient Hyp mice. *Bone* 53: 231–238. doi: [10.1016/j.bone.2012.12.009](#) PMID: [23266491](#)
24. Liu S, Tang W, Fang J, Ren J, Li H, Xiao Z, et al. (2009) Novel regulators of Fgf23 expression and mineralization in Hyp bone. *Mol Endocrinol* 23: 1505–1518. doi: [10.1210/me.2009-0085](#) PMID: [19556340](#)
25. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. (2007) A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39: 529–533. PMID: [17384641](#)

26. Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jónsson HH, Olafsdóttir G, et al. (2003) Genome-wide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet* 72: 1448–1459. PMID: [12736871](#)
27. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, et al. (2004) Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9757–9762. PMID: [15210948](#)
28. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, et al. (2005) An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 37: 138–144. PMID: [15640800](#)
29. Xu L, Li Z, Liu SY, Xu SY, Ni GX. (2015) Asporin and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 933–939. doi: [10.1016/j.joca.2015.02.011](#) PMID: [25689697](#)
30. Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. (2005) Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 280: 32655–32661. PMID: [16051604](#)
31. Stenina-Adognavi O. (2013) Thrombospondins: old players, new games. *Curr Opin Lipidol* 24: 401–409. doi: [10.1097/MOL.0b013e3283642912](#) PMID: [23892609](#)
32. Stenina OI, Topol EJ, Plow EF. (2007) Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1886–1894. PMID: [17569883](#)
33. Posey KL, Yang Y, Veerisetty AC, Sharan SK, Hecht JT. (2008) Model systems for studying skeletal dysplasias caused by TSP-5/COMP mutations. *Cell Mol Life Sci* 65: 687–699. doi: [10.1007/s00018-007-7485-0](#) PMID: [18193163](#)
34. Hankenson KD, Hormuzdi SG, Meganck JA, Bornstein P. (2005) Mice with a disruption of the thrombospondin 3 gene differ in geometric and biomechanical properties of bone and have accelerated development of the femoral head. *Mol Cell Biol* 25: 5599–5606. PMID: [15964815](#)
35. Frolova EG, Sopko N, Blech L, Popovic ZB, Li J, Vasanji A, et al. (2012) Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J* 26: 2363–2373. doi: [10.1096/fj.11-190728](#) PMID: [22362893](#)
36. Lynch JM, Maillat M, Vanhoutte D, Schloemer A, Sargent MA, Blair NS, et al. (2012) A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell* 149: 1257–1268. doi: [10.1016/j.cell.2012.03.050](#) PMID: [22682248](#)
37. Gabrielsen A, Lawler PR, Yongzhong W, Steinbrüchel D, Blagoja D, Paulsson-Berne G, et al. (2007) Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 42: 870–883. PMID: [17343875](#)
38. Mustonen E, Aro J, Puhakka J, Ilves M, Soini Y, Leskinen H, et al. (2008) Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 186–191. doi: [10.1016/j.bbrc.2008.05.164](#) PMID: [18541142](#)
39. Frolova EG, Drazba J, Krukovets I, Kostenko V, Blech L, Harry C, et al. (2014) Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4. *Matrix Biol* 37: 35–48. doi: [10.1016/j.matbio.2014.02.003](#) PMID: [24589453](#)
40. Okamura N, Hasegawa M, Nakoshi Y, Iino T, Sudo A, Imanaka-Yoshida K, et al. (2010) Deficiency of tenascin-C delays articular cartilage repair in mice. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 839–848. doi: [10.1016/j.joca.2009.08.013](#) PMID: [19747998](#)
41. Martin JA, Buckwalter JA. (2001) Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J* 21: 1–7. PMID: [11813939](#)
42. Coles JM, Zhang L, Blum JJ, Warman ML, Jay GD, Guilak F, et al. (2010) Loss of cartilage structure, stiffness, and frictional properties in mice lacking PRG4. *Arthritis Rheum* 62: 1666–1674. doi: [10.1002/art.27436](#) PMID: [20191580](#)
43. Zwerina J, Redlich K, Schett G, Smolen JS. (2005) Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 716–729. PMID: [16127012](#)
44. Schett G, Gravallese E. (2012) Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 8: 656–664. doi: [10.1038/nrrheum.2012.153](#) PMID: [23007741](#)
45. Steinhagen J, Bruns J, Niggemeyer O, Fuerst M, Rütter W, Schünke M, et al. (2010) Perfusion culture system: Synovial fibroblasts modulate articular chondrocyte matrix synthesis in vitro. *Tissue Cell* 42: 151–157. doi: [10.1016/j.tice.2010.03.003](#) PMID: [20427066](#)
46. Narouz-Ott L, Maurer P, Nitsche DP, Smyth N, Paulsson M. (2000) Thrombospondin-4 binds specifically to both collagenous and non-collagenous extracellular matrix proteins via its C-terminal domains. *J Biol Chem* 275: 37110–37117. PMID: [10956668](#)

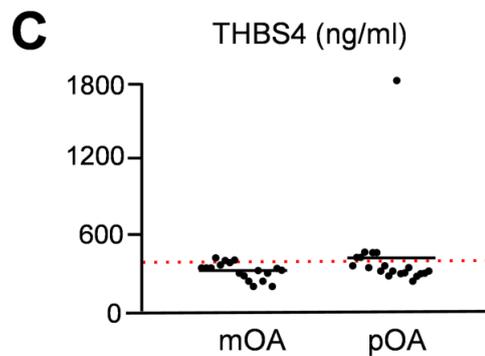
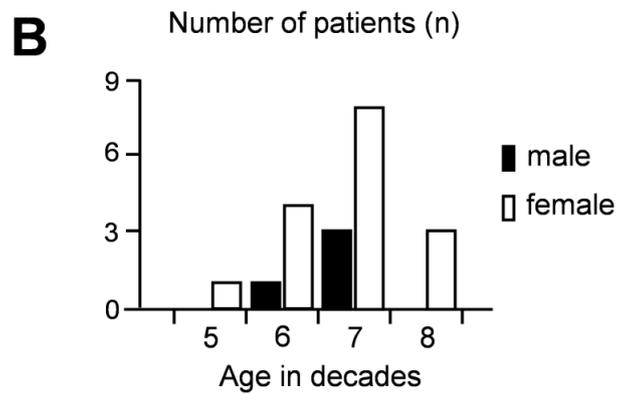
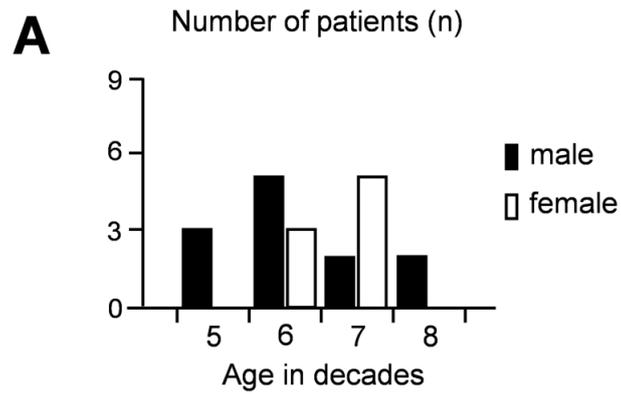
47. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, et al. (2013) Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis* 72: 1756–1763. doi: [10.1136/annrheumdis-2013-203726](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203726) PMID: [23897772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897772/)

Supplemental Figures



S1 Fig. Loss of subchondral bone in TNF-transgenic *Thbs4*-deficient mice. (A) Quantification of foot paw swelling (left) and grip strength (right) over time in TNF-transgenic mice with (WT) or without (KO) a functional *Thbs4* allele. Values represent mean \pm SD ($n = 4$ per group). (B) Von Kossa/van Gieson staining of knee joints from 12 weeks old TNF-transgenic mice with (+/+) or without (-/-) a functional *Thbs4* allele. The quantification of the subchondral bone volume is given on the right. Bars represent mean \pm SD ($n = 4$ per group). Asterisks indicate statistically significant differences between WT and KO ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0144272.s001



S2 Fig. THBS4 concentrations in sera from individuals with osteoarthritis. (A) Age and gender distribution of individuals with mono-osteoarthritis (n = 20). (B) Age and gender distribution of individuals with poly-osteoarthritis (n = 21). (C) THBS4 concentrations in the sera from patients with mono-osteoarthritis (mOA) or poly-osteoarthritis (pOA). The dotted red line indicates the mean serum concentration measured in 6 control individuals without osteoarthritis. doi:10.1371/journal.pone.0144272.s002

II. Einleitung

Die primäre Arthrose ist eine degenerative Erkrankung des Gelenks, die durch die Destruktion des Gelenkknorpels sowie Veränderungen von Synovialmembran und subchondralem Knochen charakterisiert ist. Aufgrund der daraus resultierenden Funktionseinschränkung gilt sie als eine der häufigsten Ursachen für Behinderung und stellt eine besondere sozioökonomische Herausforderung für das Gesundheitssystem dar.²⁻⁴ In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz der Arthrose nach jetzigem Stand 23,8% (Frauen: 27,8%, Männer: 19,7%), während die verursachten Kosten im Jahre 2008 bei 7,62 Milliarden € lagen, was 3% der gesamten Gesundheitskosten entsprach.^{5,6} Als Risikofaktoren werden allen voran ein hohes Alter, Übergewicht, Traumata und ein weibliches Geschlecht aufgeführt.

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung durch Schmerzen und eine Bewegungseinschränkung der betroffenen Gelenke. Dabei können prinzipiell alle Gelenke des Körpers involviert sein, Hüfte und Knie nehmen jedoch eine übergeordnete Rolle ein. Im Frühstadium äußert sich die Arthrose häufig nur unter Belastung schmerzhaft, jedoch nimmt sie einen progredienten Verlauf und führt in späteren Stadien zu Dauerschmerzen und einer erheblich eingeschränkten Mobilität. Dieser Prozess kann mehrere Jahrzehnte andauern und erfolgt interindividuell sehr variabel. Neben der dominierenden Schmerzsymptomatik kommt es häufig zu rezidivierenden Synovitiden, welche sich durch Schwellung des Gelenks präsentieren. Infolge der degenerativen Prozesse kann es zusätzlich zu Veränderungen des subchondralen Knochens kommen, was zur Ausbildung von Osteophyten führen kann.⁷ Ebenso können Strukturen wie Muskeln, Bänder und Menisken Schäden davontragen.⁸

Aufgrund der lang andauernden Latenzphase und der sehr geringen regenerativen Fähigkeiten des Gelenkknorpels sind Diagnostik und Früherkennung der Arthrose von extrem großer Bedeutung.⁹ Allerdings erweist sich die Bildgebung mittels konventioneller Röntgenanalyse als wenig aussagekräftig, auch die Magnet-Resonanztomographie ist wegen hoher Kosten und geringer Sensitivität für die Diagnosefindung ungeeignet: So gibt es Patienten mit strukturellen (radiologisch sichtbaren) Zeichen der Arthrose, während sich diese klinisch unauffällig präsentieren und vice versa.¹⁰⁻¹² Erschwerend kommt das Fehlen von validen laborchemischen Markern hinzu, die

eindeutig mit der Schwere der Gelenkdestruktion korrelieren. Ein solcher Biomarker könnte eine objektive Methode zur Früherkennung (im Sinne eines Screenings), zur Beurteilung der Krankheitsprogression und der Wirksamkeit potentieller Medikamente darstellen.¹³⁻¹⁶

Die therapeutischen Möglichkeiten zur konservativen Behandlung der Arthrose sind stark limitiert und rein symptomatischer Natur. Bis dato gibt es keine zugelassenen Medikamente, die einer kausalen Therapie entsprechen und das Fortschreiten der Erkrankung verhindern können (*Disease modifying osteoarthritis drug*, DMOAD). Zur Linderung der Schmerzsymptomatik werden zumeist nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) eingesetzt, welche bei chronischem Gebrauch bedeutende gastrointestinale, kardiale und renale Nebenwirkungen aufweisen.^{17,18} Begleitend zu einer medikamentösen Therapie ist ein gesunder Lebensstil von großer Bedeutung – insbesondere Risikogruppen gehören diesbezüglich besser aufgeklärt. Eine Gewichtsreduktion bei übergewichtigen Patienten gilt demnach als eine der effektivsten Methoden, um die Symptome zu lindern. Des Weiteren ist eine moderate Bewegung in Form von Gelenkschonendem Sport oder Physiotherapie zu empfehlen.¹⁸⁻²¹

Aufgrund des progredienten Krankheitsverlaufs ist eine operative Therapie indes häufig unausweichlich. Mittels Arthroskopie können einerseits Defekte der Knorpeloberfläche geglättet und beseitigt werden (Débridement), andererseits können verschiedene knochenmarkstimulierende Methoden (Abrasionsarthroplastik, Mikrofrakturierung, Pridie-Bohrung) angewendet werden, um die Neubildung von Knorpel anzuregen – hierbei entsteht ein fibrokartilaginäres Gewebe, welches dem hyalinen Gelenkknorpel jedoch in seinen biomechanischen Eigenschaften qualitativ unterlegen ist. Im Gegensatz dazu werden bei der Osteochondralen Transplantation (*Osteochondral autograft transplantation*, OAT) ganze Knorpel-Knochen-Stanzzyylinder aus einem intakten und minderbelasteten Bereich des Gelenks entnommen und an die Stelle des Defekts transplantiert. Bei großflächigen Schäden greift man dagegen auf die Autologe Chondrozyten-Implantation (ACI) zurück. Bei dieser Methode werden lediglich Knorpelzellen aus einem ebenfalls nicht belasteten Bereich des Gelenks entnommen, daraufhin *in vitro* kultiviert und in einem zweiten Eingriff an den Defektstellen reimplantiert.^{22,23}

Die Ultima Ratio in der Therapie der Arthrose stellt die Versorgung mit einer Totalendoprothese (TEP) dar. Bei diesem Verfahren wird das geschädigte Gelenk in toto entfernt und durch ein künstliches Implantat ersetzt. Allein im Jahre 2014 wurden in Deutschland 409.050 Patienten mit der Hauptdiagnose Arthrose vollstationär behandelt, wobei insgesamt 292.970 TEPs an Knie und Hüfte eingesetzt wurden.^{24,25} Lediglich die Schweiz weist im internationalen Vergleich eine höhere Rate an Implantationen in Relation zur Bevölkerung auf.²⁶

Die eingeschränkten medikamentösen Behandlungsoptionen und die hohe Zahl an chirurgischen Eingriffen sind dabei als Folge eines unverständenen Pathomechanismus zu sehen. Das Gelenk als eigenständiges Organ stellt ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen Knorpel, Knochen, Synovialmembran und Synovialflüssigkeit dar – selbst ein Einfluss von angrenzenden Ligamenten und Muskeln auf die Gelenkhomöostase ist denkbar. Um die Ätiologie der Arthrose zu ergründen, wird es daher von entscheidender Bedeutung sein, die physiologischen Prozesse innerhalb des Gelenks besser zu verstehen. Während sich die aktuelle Literatur mehrheitlich mit Modellen und Geweben beschäftigt, die bereits ein erkranktes Gelenk repräsentieren, fokussierten wir uns auf Mechanismen im physiologischen Zustand.

Zentrale Fragen im Rahmen dieser Arbeit waren, ob synoviale Fibroblasten und deren Produkte einen regulatorischen Einfluss auf Chondrozyten haben und ob sich von den molekularen Unterschieden der Chondrozyten des Gelenks und denen der Wachstumsfuge Rückschlüsse auf die besonderen Eigenschaften des Gelenkknorpels ziehen lassen.

III. Darstellung der Publikation

In einer vorangegangenen Arbeit aus dem Jahre 2010 wurden im Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM) mittels einer genomweiten Expressionsanalyse spezifische Marker von porcinen artikulären Chondrozyten identifiziert.¹ Die zweithöchste Spezifität *in vivo* ließ sich dabei für *THBS4* (Thrombospondin-4) nachweisen.

Die Familie der Thrombospondine stellt eine Gruppe von fünf Glykoproteinen dar, die in verschiedensten Geweben des Körpers an der Organisation der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind – so auch in Knochen und in Knorpel.^{27,28} Obwohl die Interaktion von THBS4 mit verschiedenen fibrillären Kollagenen ebenso wie für Thrombospondin-5 (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*, COMP) beschrieben wird,^{29,30} ist die Bedeutung von THBS4 für die Funktionalität des Skelettsystems noch ungeklärt. Aus diesem Grund wurde ein *Thbs4*-defizientes Mausmodell untersucht und dessen skelettaler Phänotyp im Zuge dieser Publikation analysiert.

Der erste Teil der Analysen zielte allen voran auf die morphometrische Charakterisierung des Skelettsystems der *Thbs4*-defizienten Mäuse ab, da in Wildtypen eine starke Expression von *Thbs4* in artikulärem Knorpel sowie kortikalem Knochen nachgewiesen werden konnte (Fig. 1A). Hierbei konnten jedoch weder per Röntgenuntersuchung noch per Histomorphometrie Veränderungen gegenüber Wildtyp-Tieren festgestellt werden (Fig. 2A-E, 3A, 3B).

Eine andere Fragestellung ergab sich aufgrund der Erkenntnis, dass *Thbs4* im Knochen von *Hyp*-Mäusen überexprimiert wird. *Hyp*-Mäuse weisen eine Deletion innerhalb des *Phex*-Gens auf und zeigen so den Phänotyp der X-chromosomalen hypophosphatämischen Rachitis (*X-linked hypophosphatemic rickets*, XLHR), welcher sich durch skelettale Deformitäten und Wachstumsretardierung manifestiert.^{31,32} Die übermäßige Expression von *Thbs4* wird hierbei als mögliche Ursache für eine verringerte Mineralisation diskutiert,³³ weshalb wir *Thbs4*-defiziente *Hyp*-Mäuse generierten. Der Phänotyp dieser zeigte jedoch weder radiologisch noch histologisch oder histomorphometrisch Unterschiede zu dem der *Hyp*-Mäuse (Fig. 3 C, D). Somit konnten wir nicht nachweisen, dass THBS4 in der Pathogenese der XLHR von entscheidender Bedeutung ist.

Des Weiteren untersuchten wir, ob THBS4 oder dessen Fehlen einen Einfluss auf die Differenzierung oder Morphologie von artikulären Chondrozyten hat. Daher verglichen wir die Dicke der Gelenkknorpelschicht im Knie von 6, 26 und 52 Wochen alten Wildtyp- und Knockout-Mäusen miteinander. Hierbei stellten wir in den 26 Wochen alten *Thbs4*-defizienten Mäusen eine signifikant geringere Knorpelschichtdicke als in den Wildtypen fest, welche sich im Alter von 52 Wochen jedoch wieder angeglichen hatte (Fig. 4A, B, C). Weiterhin verglichen wir in 26 Wochen alten Mäusen die Expression von Genen, für die Mutationen beschrieben sind, welche möglicherweise für die Entstehung von Arthrose prädestinieren (= *susceptibility genes*): *Aspn*,^{34,35} *Frzb*,³⁶ *Gdf5*³⁷ und *Matn3*.³⁸ Hierbei zeigte lediglich *Aspn* eine Abweichung, nämlich eine verringerte Expression in den *Thbs4*-defizienten Mäusen (Fig. 5C), während *Gdf5* weder in den Knockouts noch in den Wildtypen detektiert werden konnte.

Die Beobachtung der unterschiedlich dicken Knorpelschicht in den 26 Wochen alten Mäusen und vielmehr noch die stattgefundenene Kompensation im Alter von 52 Wochen legten die Vermutung nahe, dass im Gelenk komplexe Regulationsmechanismen für den Erhalt der physiologischen Knorpelschicht verantwortlich sind. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde der Fokus fortan auf die Erforschung eben dieser Prozesse gerichtet, was gleichzeitig den Beginn meiner Arbeiten darstellt.

Für alle weiteren Analysen griffen wir als Tiermodell auf 6 Wochen alte Minipigs zurück, da diese für die Kultivierung der gewünschten Zellen viele Vorteile aufweisen: Im Gegensatz zum Mausmodell lässt sich deutlich mehr Gewebe isolieren, die eindeutige Trennung von Knorpel des Gelenks und der Wachstumsfuge wird ermöglicht und ebenso wird die spezifische Extraktion der Synovialmembran erleichtert.

Zu Beginn verglichen wir die Expression aller fünf Thrombospondine in diesen drei Geweben miteinander. Auffällig war hierbei, dass die Expression von *THBS1*, *THBS2* und *THBS3* in Zellen all dieser Gewebe nachweisbar war, während *COMP* nicht in Synoviozyten detektiert werden konnte und *THBS4* spezifisch in Zellen des Gelenkknorpels exprimiert wurde (Fig. 6).

Um eine mögliche regulatorische Funktion von THBS4 auf primäre artikuläre Chondrozyten zu überprüfen, analysierten wir die Zellproliferation (Fig. 7A), die

Stoffwechselaktivität (Fig. 7B) und die Caspase-3/7-Aktivität als Zeichen der Apoptose (Fig. 7C) in den kultivierten Zellen. Hierbei fügten wir verschiedene Konzentrationen an THBS4 zu und nutzten ein durch Synoviozyten konditioniertes Medium (*synovial fibroblast conditioned medium*, SF-CM) als Kontrolle. Während die Zugabe von THBS4 keinen Einfluss auf die drei Parameter hatte, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität durch die Stimulation mit SF-CM. Da COMP eine Rolle für die Adhäsion von Chondrozyten zugeschrieben wird,³⁹ prüften wir außerdem, ob dies für THBS4 ebenfalls zutrifft – konnten dies jedoch nicht zeigen (Fig. 7D).

Im weiteren Verlauf untersuchten wir den Effekt von THBS4 auf die Genexpression der primären Chondrozyten, da wir in *Thbs4*-defizienten Mäusen eine signifikant verringerte Expression von *Aspn* nachweisen konnten. Hierzu behandelten wir die kultivierten Chondrozyten über einen Zeitraum von 6 h mit THBS4 in verschiedenen Konzentrationen. Ebenso untersuchten wir den Einfluss vom SF-CM auf die Expression verschiedener Gene, da für jenes ein pro-apoptotischer Effekt vermutet werden konnte (Fig. 7C). Wie zuvor hatte THBS4 hierbei keinerlei Einfluss auf die Genexpression der Chondrozyten, wohingegen das SF-CM jene modifizierte (Fig. 8A, B). Bis auf *GDF5* wurde die Expression aller *susceptibility genes* durch das konditionierte Medium signifikant reprimiert, ebenso die Expression von *THBS4* und *ACAN*, welches für einen der beiden Hauptbestandteile der EZM des Knorpels, Aggrecan, codiert. Einzig die Expression von *SDC4* wurde durch das SF-CM signifikant induziert, was gerade deshalb von Interesse sein könnte, da Syndecan-4 katabole Prozesse im Knorpel aktiviert und so beispielsweise den Abbau von Aggrecan stimuliert.⁴⁰

Abschließend gingen wir der Frage nach, ob THBS4 aufgrund seiner Spezifität in Gelenkknorpel gegenüber Knorpel der Epiphysenfuge als Biomarker für Arthrose geeignet sein könnte. Hierzu maßen wir die Konzentration von THBS4 im Serum von Patienten mit Monoarthrose, Polyarthrose und Kontrollpersonen ohne Arthrose, wobei sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen ließ (Suppl. Fig. S2C).

In der hier vorgelegten Publikation konnten relevante neue Erkenntnisse über die Bedeutung von Thrombospondin-4 für die Entwicklung und Differenzierung des Skelettsystems gewonnen werden. Während für das extrazelluläre Proteoglykan weder

eine entscheidende Funktion im Knochenstoffwechsel noch eine Bedeutung für die Pathogenese der XLHR nachgewiesen werden konnte, ergaben sich aus den Analysen des Knorpels interessante Ideen und Ansätze.

Histologisch konnte bei 26 Wochen alten *Thbs4*-defizienten Mäusen eine signifikant geringere Knorpelschichtdicke verglichen mit den Wildtypen festgestellt werden. In den Wildtypen war eine Zunahme der Dicke von Woche 6 bis Woche 26 zu beobachten, um anschließend bis Woche 52 wieder abzunehmen. Im Gegensatz dazu blieb sie in den *Thbs4*-defizienten Mäusen über den gesamten Zeitraum beinahe konstant. Eine mögliche Erklärung hierfür ergibt sich aus der signifikant erhöhten Expression von *Aspn* in den Wildtypen im Alter von 26 Wochen. Asporin ist ein extrazelluläres Proteoglykan aus der Familie der *small leucine-rich repeat proteoglycans* (SLRP) und wird verstärkt in arthrotischem Gelenkknorpel exprimiert.⁴¹ Es bindet an *Transforming growth factor beta* (TGF- β) und verhindert so die vermehrte Expression von Bestandteilen der EZM wie Aggrecan und Kollagen-Typ-II,^{34,42} was wiederum die Abnahme der Knorpelschichtdicke in den Wildtypen erklären könnte. Die fehlende Zunahme der Knorpelschichtdicke in den *Thbs4*-defizienten Mäusen dagegen spricht dafür, dass THBS4 zur vollständigen Ausbildung des Gelenkknorpels notwendig ist und hier vor allem in der frühen Entwicklungsphase einen protektiven Faktor darstellt.

Unabhängig davon, wie man die einzelnen Phasen auch interpretiert, scheinen das Knorpelwachstum und dessen Entwicklung streng reguliert zu sein. Trotz einer bis zu doppelt so breiten Knorpelschicht der Wildtypen im Alter von 26 Wochen war sie im Alter von 52 Wochen wieder mit der der *Thbs4*-defizienten Mäuse vergleichbar. Die These wird dadurch unterstützt, dass ein durch synoviale Fibroblasten konditioniertes Medium (SF-CM) bedeutenden Einfluss auf das Genexpressionsmuster der Chondrozyten hat. Besonders auffällig ist hierbei, dass neben der Expression von *Thbs4* auch die der beiden Hauptbestandteile der EZM, Aggrecan und Kollagen-Typ-II, verringert wird und diesem Medium ein potentiell destruktiver Effekt zugeschrieben werden könnte.

IV. Weiterführende Arbeiten & Ausblick

Noch weit in das 20. Jahrhundert hinein galt die primäre Arthrose als eine Erkrankung, die infolge von starker Belastung und Verschleiß der Gelenke zur Zerstörung des artikulierenden Knorpels führt.⁴³ Diese Ansicht hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich gewandelt, so dass man heute in der Pathogenese der Arthrose ein multifaktorielles Geschehen vermutet, welches mit Veränderungen aller beteiligten Gewebe einhergeht.^{8,44,45} Dies ergibt ein großes Netzwerk an Einflussgrößen auf die Gelenkhomöostase, wobei jeder dieser Faktoren potentiell Effektor als auch Rezeptor sein könnte. Die Herausforderung wird darin bestehen, die einzelnen Interaktionen der beteiligten Zelltypen zu charakterisieren, um physiologische Regulationsmechanismen und weiterhin die Ätiologie der primären Arthrose aufzudecken.

Auf Grundlage der oben dargestellten Publikation, in der wir einen Effekt von SF-CM auf die Genexpression und Apoptoserate von artikulären Chondrozyten nachweisen konnten, versuchten wir in weiterführenden Experimenten die Regulation von Chondrozyten durch Synoviozyten näher zu beschreiben. Zunächst untersuchten wir, welchen Effekt das SF-CM auf Chondrozyten der Wachstumsfuge hat. Hier konnten wir ähnliche Tendenzen wie bei artikulären Chondrozyten feststellen. Diese beiden Zelltypen scheinen sich auf molekularer Ebene demnach kaum zu unterscheiden – möglicherweise spielt die Anwesenheit synovialer Sekretionsprodukte eine entscheidende Rolle für die unterschiedliche Differenzierung dieser Zelltypen im Organismus. Um diesen Einfluss besser zu verstehen, kultivierten wir primäre Chondrozyten von Minipigs, stimulierten diese über einen Zeitraum von je 2, 6 und 24 h mit SF-CM und untersuchten die Expression einer Vielzahl relevanter Gene im Zeitverlauf mittels qRT-PCR.

Neben einer signifikant verringerten Expression von *ACAN*, *COL2A1* und allen *susceptibility genes* bis auf *GDF5* nach 24 h (Abb. 1A) zeigte sich bereits nach 6 h eine signifikant verstärkte Expression von *SDC4* (Abb. 1B), wobei sich diese Ergebnisse auch mit humanen Synoviozyten reproduzieren ließen (Abb. 1C). Syndecan-4 ist bekannt dafür, die Synthese der Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3) und der Aggrecanase-2 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5*, ADAMTS5) zu regulieren. Die übermäßige Expression führt somit zu verstärktem Abbau von Aggrecan und Kollagen-Typ-II, während *Sdc4*- und *Adamts5*-defiziente Mäuse vor einem solchen geschützt sind.^{40,46-48} Im Einklang mit der Literatur konnten

wir ebenfalls einen massiven Anstieg der Expression von *MMP3* und *ADAMTS5* nachweisen (Abb. 1D). Zusätzlich wurde durch die Stimulation der Chondrozyten mit SF-CM die Expression von *MMP13* (Matrix-Metalloproteinase 13), *S100A8* (*S100 calcium-binding protein A8*) und *S100A9* (*S100 calcium-binding protein A9*) signifikant induziert, wobei für letztere ein knorpelschädigender Effekt bei begleitender Synovitis beschrieben ist.⁴⁹

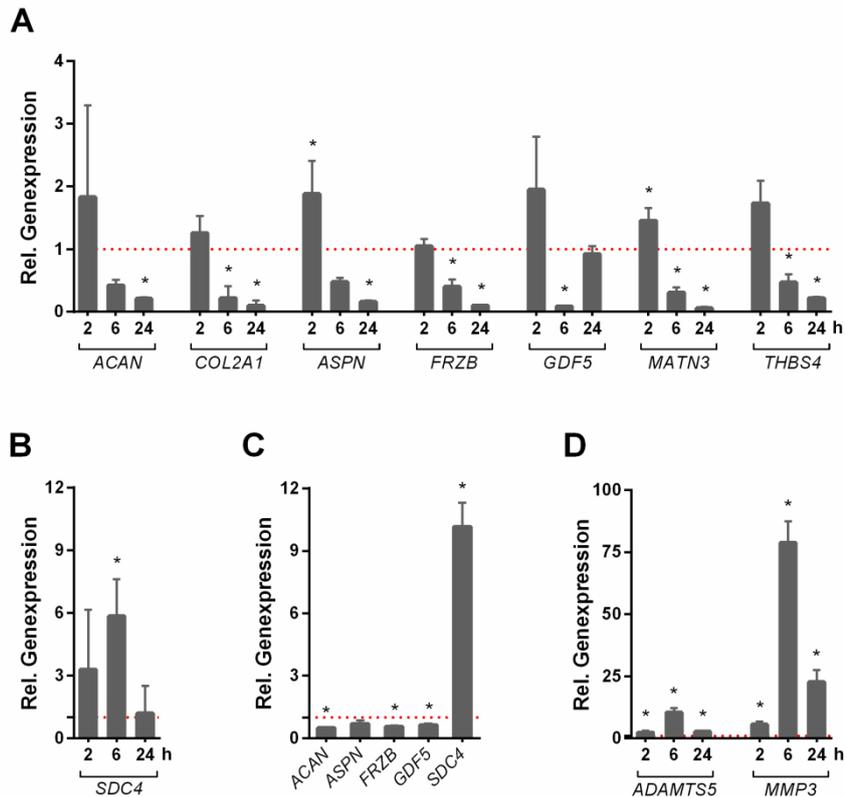


Abbildung 1: Synoviozyten-konditioniertes Medium beeinflusst die Genexpression von artikulären Chondrozyten. (A) Gene, deren Expression in porcinen artikulären Chondrozyten durch Synoviozyten-konditioniertes Medium reprimiert wird. (B) *SDC4*-Expression in porcinen artikulären Chondrozyten nach Zugabe von Synoviozyten-konditioniertem Medium. (C) Genexpression nach 6 h Stimulation mit humanem Synoviozyten-konditioniertem Medium. (D) Expression von *SDC4*-induzierten Genen in porcinen artikulären Chondrozyten nach Zugabe von Synoviozyten-konditioniertem Medium.

Um den möglichen regulierenden Faktor des durch Synoviozyten konditionierten Mediums ausfindig zu machen, wendeten wir Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) an. Mit Hilfe dieser Methode konnten wir die Proteine des Mediums nach ihrer Größe auftrennen und es gelang uns, den oben beschriebenen Effekt zu isolieren. Mittels Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und

Massenspektrometrie versuchten wir, den Effektor zu identifizieren, konnten diesen bisher jedoch nicht endgültig charakterisieren (Abb. 2).

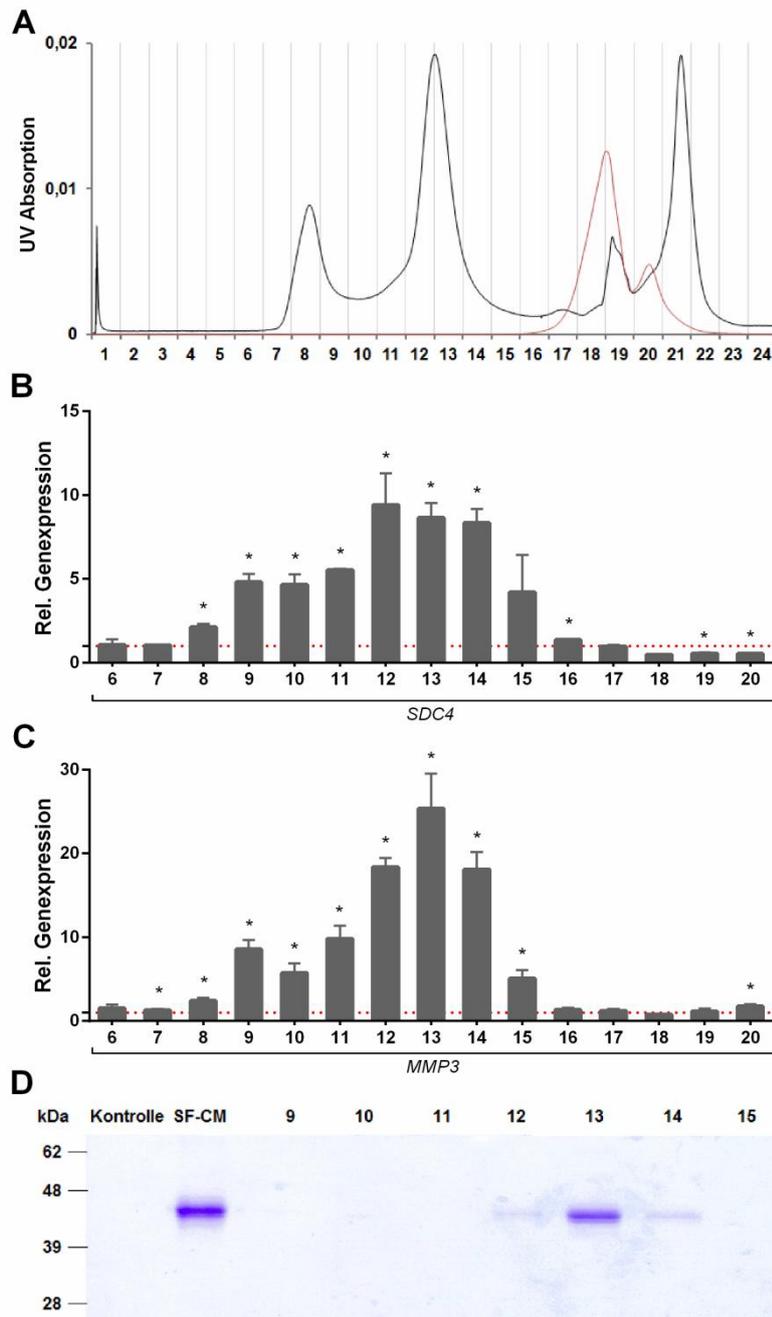


Abbildung 2: *SDC4*- und *MMP3*-Expression in artikulären Chondrozyten wird durch einen Proteinkomplex mit einer Molekülmasse von etwa 40 kDa induziert. (A) Elutionsprofil der Flüssigkeitschromatographie mit Detektion von Proteinen (schwarze Linie) und der Leitfähigkeit (rote Linie). (B) *SDC4*-Expression nach 6 h Stimulation mit den angegebenen Fraktionen der Flüssigkeitschromatographie. (C) *MMP3*-Expression in den selben Proben. (D) Coomassie-Färbung des Gels nach SDS-PAGE der angegebenen Fraktionen der Flüssigkeitschromatographie.

Im weiteren Verlauf werden wir mittels Amicon-Ultrafiltration die Molekülgröße des regulierenden Faktors weiter eingrenzen, um diesen in Zukunft eindeutig identifizieren zu können. Der Nachweis eines solchen Moleküls würde weiterhin neue Ansätze für Diagnostik und Therapie ermöglichen.

Zusätzlich führten wir eine Genchip-Analyse durch, mit der wir uns einen Überblick über alle Gene verschaffen konnten, deren Expressionsrate durch die Stimulation mit SF-CM beeinflusst wurde (Abb. 3A). Unter den mehr als 2300 untersuchten Genen zählten neben bereits untersuchten (*MMP3*, *MMP13*, *S100A8*, *S100A9*) auch viele immunologisch bedeutsame Gene (*IL1RN*, *IL6*, *TNF*) zu den am stärksten induzierten Genen. Während die Expression von *S100A8* und *S100A9* gleichermaßen in artikulären Chondrozyten und Chondrozyten der Wachstumsfuge induziert wurde, konnte für *MMP3* und *MMP13* eine stärkere und deutlich spezifischere Expression in artikulären Chondrozyten nachgewiesen werden (Abb. 3B, C).

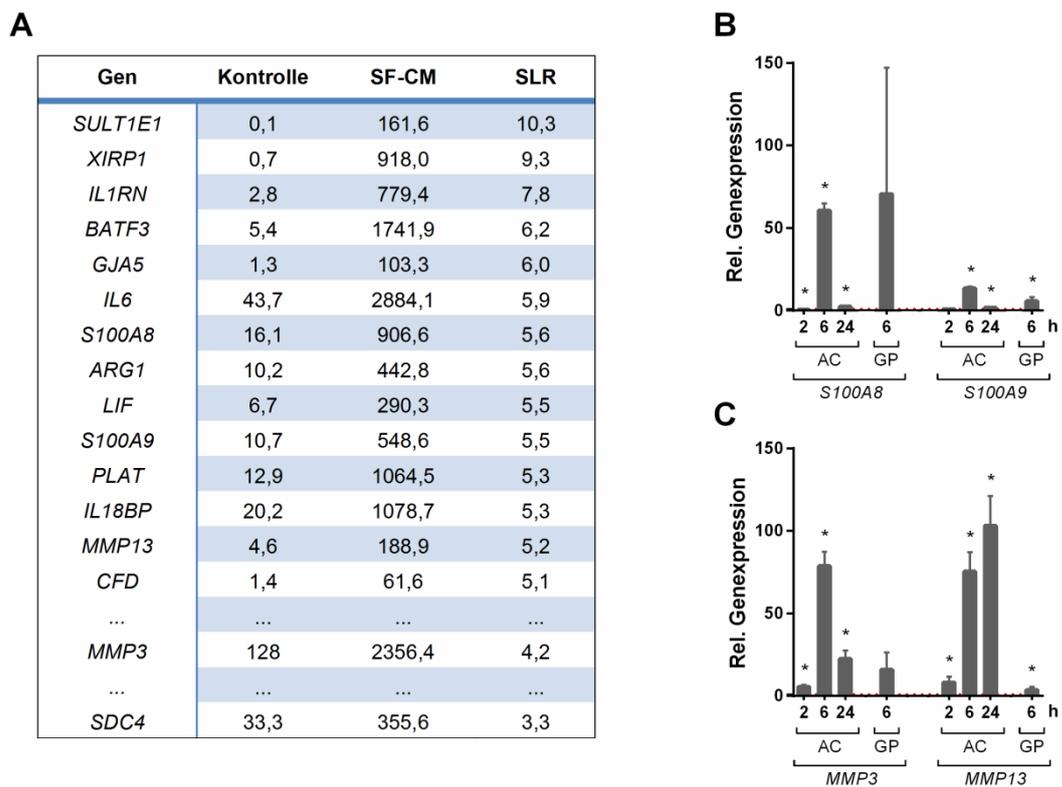


Abbildung 3: *MMP3* und *MMP13* werden durch Synoviozyten-konditioniertes Medium spezifisch in artikulären Chondrozyten induziert. (A) Gene in artikulären Chondrozyten, deren Expression durch 6 h Stimulation mit Synoviozyten-konditioniertem Medium (SF-CM) induziert wird unter Angabe des Signal Log Ratio (SLR). (B) *S100A8/9*-Expression in Chondrozyten des Gelenks (AC) und der Wachstumsfuge (GP) nach 6 h Stimulation mit Synoviozyten-konditioniertem Medium. (C) *MMP3/13*-Expression in den selben Proben.

Diese Ergebnisse legten früh die These nahe, dass synoviale Fibroblasten einen katabolen Effekt auf den artikulären Knorpel haben könnten. Da sich die Synovialflüssigkeit jedoch zugleich aus Produkten der Synoviozyten und Plasmabestandteilen zusammensetzt,⁵⁰ könnten letztere den genannten Effekt möglicherweise kompensieren. Dies überprüften wir, indem wir Chondrozyten mit porciner Synovialflüssigkeit stimulierten. Im Vergleich zum SF-CM zeigte die Synovialflüssigkeit hierbei einen gegensätzlichen Effekt, so dass die Expression von *SDC4* verringert wurde. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt ebenfalls erzielen, wenn wir Chondrozyten mit einem Gemisch aus SF-CM und porcinem Serum stimulierten. Die gleiche Beobachtung konnten wir auch für die Expression von *ADAMTS5* und *MMP3* machen (Abb. 4). Dies spricht folglich dafür, dass die Synoviozyten und ihre Sekretionsprodukte entscheidend für die Regulation von Chondrozyten sind, wobei die Balance zwischen anabolen und katabolen Prozessen gegeben sein muss, um eine physiologische Knorpel- und Gelenkfunktion zu erhalten.

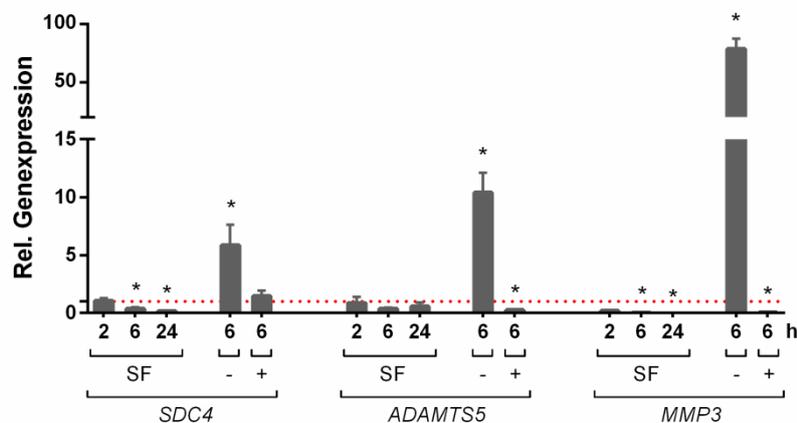


Abbildung 4: Serumbestandteile können den Effekt synovialer Sekretionsprodukte auf artikuläre Chondrozyten kompensieren. Expression von *SDC4*, *ADAMTS5* und *MMP3* nach Stimulation mit porciner Synovialflüssigkeit (SF) und Synoviozyten-konditioniertem Medium ohne Serum (-) und nach Zugabe von porcinem Serum (+) zu einer Endkonzentration von 30%.

Während für die rheumatoide Arthritis bereits ein ähnliches Modell mit Beteiligung der synovialen Fibroblasten beschrieben ist, bei welchem es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren kommt,^{51,52} wird zunehmend auch eine Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der primären Arthrose vermutet.⁵³⁻⁵⁷ Mikrotraumata könnten beispielsweise ursächlich für Läsionen des Gelenknorpels sein, dessen Abbauprodukte von Zellen der Synovialmembran als

fremd erkannt werden und so eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen. Die vermehrte Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren würde im Umkehrschluss erneut Knorpelschäden verursachen und somit einen „Teufelskreis“ erzeugen, der sich in einer progredienten Zerstörung des Gelenks äußert.

Hinweise hierfür liefert beispielsweise die Tatsache, dass die Ausprägung einer Synovitis – einer entzündlichen Schwellung der Synovialmembran – mit der Schwere der Arthrose korreliert.^{58–63} Ebenso werden höhere systemische Konzentrationen von Entzündungsparametern mit einer stärkeren Progredienz der Erkrankung in Verbindung gebracht,^{64,65} wobei Synoviozyten selbst zu einer inflammatorischen Reaktion beitragen, indem sie Zytokine, Komplementfaktoren und weitere immunologisch bedeutsame Mediatoren sezernieren.^{66,67} Infolge der lokalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer verstärkten Aktivierung verschiedener Kollagenasen und Aggrecanasen. Die am besten untersuchten Effektoren sind dabei Interleukin-1 β (IL-1 β), TNF α und Interleukin-6 (IL-6), die ebenso wie Komplementfaktoren destruktiv wirken können.⁶⁸

IL-1 β verringert einerseits die Synthese von Kollagen-Typ-II sowie von Proteoglykanen,^{69,70} andererseits induziert es die Synthese von MMP1, MMP3, MMP13, ADAMTS4 und IL-6.^{71–74} Da es außerdem die Expression von Caspase-3 und -7 verstärkt, scheint es die Apoptoserate in Chondrozyten zu erhöhen.^{75,76} TNF α agiert synergistisch zu IL-1 β und mindert die Synthese von EZM-Molekülen bei gleichzeitiger Induktion von Kollagenasen und Aggrecanasen.^{77,78} Beide vorgenannten steigern dabei die Produktion von IL-6,⁷⁹ welches wiederum STAT3-vermittelt die Synthese von Kollagen-Typ-II mindert,^{80,81} während es in Kombination mit IL-1 β die Expression von MMPs induzieren kann.^{82,83}

Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich bei der Betrachtung von Übergewicht als Risikofaktor für die primäre Arthrose. Lange Zeit nahm man an, dass es durch eine erhöhte mechanische Belastung zur verstärkten Gelenkschädigung käme. Dies mag schlüssig erscheinen, lässt sich jedoch nicht mit der Beobachtung in Einklang bringen, dass Übergewicht das Risiko für Arthrose in der Hand – einem wenig belasteten Gelenk – erhöht.^{84,85} Vielmehr könnten Adipokine der Grund für eine deutlichere Schädigung des Knorpels sein. Dies sind Zytokine, welche in Adipozyten synthetisiert werden und deren Plasmakonzentration dementsprechend von der Masse an Fettgewebe abhängig

ist.⁸⁶ Mehrere Mitglieder der Adipokin-Familie wie Leptin, Resistin und Visfatin scheinen dabei einen Einfluss auf die Sekretion von MMPs und weiteren Zytokinen im Gelenk zu haben.⁸⁷⁻⁹⁰

Das Rätsel um die Pathogenese der Arthrose ist nach wie vor ungelöst. Grund hierfür ist ein komplexes Netzwerk an Faktoren, die an der Aufrechterhaltung der Gelenk-homöostase beteiligt sind. Während sich all diese vermutlich gegenseitig beeinflussen, könnte bereits die Schädigung eines einzelnen Gewebes die Zerstörung aller anderen Gewebe nach sich ziehen. Somit scheint die Hypothese, Arthrose sei eine knorpelspezifische Erkrankung, obsolet. Vielmehr wird es zur Klärung der pathophysiologischen Mechanismen entscheidend sein, das Gelenk als gesamtes Organ zu betrachten und dabei die physiologischen Mechanismen und Interaktionen zwischen den beteiligten Geweben zu verstehen. In der hier vorgelegten Arbeit konnten wir neue Erkenntnisse zur Wechselbeziehung zwischen synovialen Fibroblasten und artikulären Chondrozyten gewinnen. Der Einfluss von synovialen Produkten könnte entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen anabolen und katabolen Prozessen im Gelenkknorpel haben. Hierbei deutet vieles darauf hin, dass synoviale Fibroblasten immunologisch wirksame Stoffe sezernieren und so bereits im physiologischen Zustand zum Umbau der extrazellulären Knorpelmatrix beitragen, indem sie die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen und Aggrecanasen stimulieren. Die Identifikation solcher sezernierter Produkte wird eine zentrale Bedeutung für weiterführende Arbeiten darstellen, da diese neue Ansätze für potentielle Biomarker und krankheitsmodifizierende Therapiemöglichkeiten liefern könnten, welche dringend benötigt werden.^{91,92}

Der mögliche Einfluss von Adipokinen auf die Regulation von Gelenkknorpel ist ein weiteres Indiz für eine Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese der Arthrose. Sollten sich diese Erkenntnisse bestätigen, spräche dies dafür, die Arthrose als eine systemische Erkrankung aufzufassen, in der die Stoffwechsellage des Organismus eine wichtige Rolle spielt. Ähnlich wie bei der Koronaren Herzkrankheit (KHK) könnte ein Metabolisches Syndrom ursächlich für eine schleichende Schädigung der beteiligten Strukturen sein und die Gelenk-homöostase negativ beeinflussen.

Der nächste Schritt in der Arthrose-Forschung muss es sein, das komplexe Geflecht von Faktoren im Gelenk aufzuschlüsseln und es bleibt zu hoffen, dass damit ein ähnlicher

Erfolg verzeichnet werden kann wie mit den TNF α -Inhibitoren für die rheumatoide Arthritis. Der Ansatz, die Regulation von artikulären Chondrozyten durch synoviale Fibroblasten zu untersuchen, erscheint dabei vielversprechend und wird im Zentrum anschließender Arbeiten stehen.

V. Literaturverzeichnis

1. Hissnauer, T. N. *et al.* Identification of molecular markers for articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 1630–1638 (2010).
2. Cross, M. *et al.* The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1323–1330 (2014).
3. Hilgsmann, M. *et al.* A reference case for economic evaluations in osteoarthritis: An expert consensus article from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin. Arthritis Rheum.* **43**, 1–12 (2014).
4. Ma, V. Y., Chan, L. & Carruthers, K. J. Incidence, Prevalence, Costs, and Impact on Disability of Common Conditions Requiring Rehabilitation in the United States: Stroke, Spinal Cord Injury, Traumatic Brain Injury, Multiple Sclerosis, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Limb Loss, and Back Pain. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **95**, 986–995 (2014).
5. Statistisches Bundesamt. Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. (2010). at <www.gbe-bund.de>
6. Robert-Koch-Institut. *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie 'Gesundheit in Deutschland aktuell 2012'*. **32**, (2014).
7. Dieppe, P. A. & Lohmander, L. S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* **365**, 965–973 (2005).
8. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
9. Huey, D. J., Hu, J. C. & Athanasiou, K. a. Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science.* **338**, 917–921 (2012).
10. Guermazi, A., Roemer, F. W., Burstein, D. & Hayashi, D. Why radiography should no longer be considered a surrogate outcome measure for longitudinal assessment of cartilage in knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, 247 (2011).
11. Guermazi, A. *et al.* Prevalence of abnormalities in knees detected by MRI in adults without knee osteoarthritis: population based observational study (Framingham Osteoarthritis Study). *BMJ* **345**, e5339 (2012).
12. Kim, C. *et al.* Association of hip pain with radiographic evidence of hip osteoarthritis: diagnostic test study. *BMJ* **351**, h5983 (2015).
13. van Spil, W. E., DeGroot, J., Lems, W. F., Oostveen, J. C. M. & Lafeber, F. P. J. G. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BIPED criteria. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 605–612 (2010).
14. Rousseau, J. C. & Garnero, P. Biological markers in osteoarthritis. *Bone* **51**, 265–277 (2012).
15. Blanco, F. J. Osteoarthritis year in review 2014: we need more biochemical biomarkers in qualification phase. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 2025–2032 (2014).
16. Bay-Jensen, A. C. *et al.* Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 9–20 (2016).
17. Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. & Rudolphi, K. A. Osteoarthritis — an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 331–344 (2005).
18. McAlindon, T. E. *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 363–388 (2014).
19. Felson, D. T., Zhang, Y., Anthony, J. M., Naimark, A. & Anderson, J. J. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **116**, 535–539 (1992).
20. Richette, P. *et al.* Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 139–144 (2011).
21. Gudbergesen, H. *et al.* Weight loss is effective for symptomatic relief in obese subjects with knee osteoarthritis independently of joint damage severity assessed by high-field MRI and radiography. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 495–502 (2012).
22. Magnussen, R. A., Dunn, W. R., Carey, J. L. & Spindler, K. P. Treatment of Focal Articular Cartilage Defects in the Knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**, 952–962 (2008).
23. Richter, D. L., Schenck, R. C., Wascher, D. C. & Treme, G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sport. Heal. A Multidiscip. Approach* (2015). doi:10.1177/1941738115611350
24. Statistisches Bundesamt. *Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik)*. **49**, (2015).

25. Statistisches Bundesamt. Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle/Sterbefälle, Berechnungs- und Belegungstage, durchschnittliche Verweildauer). (2015). at <www.gbe-bund.de>
26. OECD. *Health at a glance 2013: OECD Indicators*. OECD Publishing (2013). doi:10.1787/health_glance-2013-en
27. Adams, J. C. Thrombospondins: Multifunctional Regulators of Cell Interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 25–51 (2001).
28. Hankenson, K. D., Sweetwyne, M. T., Shitaye, H. & Posey, K. L. Thrombospondins and Novel TSR-containing Proteins, R-spondins, Regulate Bone Formation and Remodeling. *Curr. Osteoporos. Rep.* **8**, 68–76 (2010).
29. Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M. & Heinegård, D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.* **273**, 20397–20403 (1998).
30. Narouz-Ott, L., Maurer, P., Nitsche, D. P., Smyth, N. & Paulsson, M. Thrombospondin-4 Binds Specifically to Both Collagenous and Non-collagenous Extracellular Matrix Proteins via Its C-terminal Domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37110–37117 (2000).
31. Strom, T. M. *et al.* Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 165–171 (1997).
32. Seitz, S. *et al.* Retinol deprivation partially rescues the skeletal mineralization defects of PheX-deficient Hyp mice. *Bone* **53**, 231–238 (2013).
33. Liu, S. *et al.* Novel Regulators of Fgf23 Expression and Mineralization in Hyp Bone. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1505–1518 (2009).
34. Kizawa, H. *et al.* An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* **37**, 138–144 (2005).
35. Jiang, Q. *et al.* Replication of the association of the aspartic acid repeat polymorphism in the asporin gene with knee-osteoarthritis susceptibility in Han Chinese. *J. Hum. Genet.* **51**, 1068–1072 (2006).
36. Loughlin, J. *et al.* Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 9757–9762 (2004).
37. Miyamoto, Y. *et al.* A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* **39**, 529–533 (2007).
38. Jonsson, H. *et al.* The inheritance of hand osteoarthritis in Iceland. *Arthritis Rheum.* **48**, 391–395 (2003).
39. Chen, F. H., Thomas, A. O., Hecht, J. T., Goldring, M. B. & Lawler, J. Cartilage Oligomeric Matrix Protein/Thrombospondin 5 Supports Chondrocyte Attachment through Interaction with Integrins. *J. Biol. Chem.* **280**, 32655–32661 (2005).
40. Echtermeyer, F. *et al.* Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat. Med.* **15**, 1072–1076 (2009).
41. Lorenzo, P. *et al.* Identification and Characterization of Asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J. Biol. Chem.* **276**, 12201–12211 (2001).
42. Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **15**, 597–604 (2007).
43. Radin, E. L., Paul, I. L. & Rose, R. M. Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis. *Lancet* **1**, 519–522 (1972).
44. Brandt, K. D. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1261–1264 (2006).
45. Lories, R. J. & Luyten, F. P. The bone–cartilage unit in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 43–49 (2011).
46. Stanton, H. *et al.* ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434**, 648–652 (2005).
47. Glasson, S. S. *et al.* Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434**, 644–648 (2005).
48. Pap, T. & Bertrand, J. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 43–55 (2012).
49. van Lent, P. L. E. M. *et al.* Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1466–1476 (2012).
50. Bennike, T. *et al.* A Normative Study of the Synovial Fluid Proteome from Healthy Porcine Knee Joints. *J. Proteome Res.* **13**, 4377–4387 (2014).

51. Noss, E. H. & Brenner, M. B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **223**, 252–270 (2008).
52. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–255 (2010).
53. Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J. & Abramson, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* **44**, 1237–1247 (2001).
54. Goldring, M. B. & Otero, M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **23**, 471–478 (2011).
55. de Lange-Brokaar, B. J. E. *et al.* Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 1484–1499 (2012).
56. Berenbaum, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 16–21 (2013).
57. Liu-Bryan, R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression topical collection on osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, 1–12 (2013).
58. Ayral, X., Pickering, E. H., Woodworth, T. G., Mackillop, N. & Dougados, M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis – results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthr. Cartil.* **13**, 361–367 (2005).
59. Hill, C. L. *et al.* Synovitis detected on magnetic resonance imaging and its relation to pain and cartilage loss in knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1599–1603 (2007).
60. Baker, K. *et al.* Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1779–1783 (2010).
61. Sowers, M. Associations of Anatomical Measures from MRI with Radiographically Defined Knee Osteoarthritis Score, Pain, and Physical Functioning. *J. Bone Jt. Surg.* **93**, 241 (2011).
62. Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. *Bone* **51**, 249–257 (2012).
63. Felson, D. T. *et al.* Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 1–7 (2015).
64. Livshits, G. *et al.* Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford study. *Arthritis Rheum.* **60**, 2037–2045 (2009).
65. Stannus, O. P., Jones, G., Blizzard, L., Cicuttini, F. M. & Ding, C. Associations between serum levels of inflammatory markers and change in knee pain over 5 years in older adults: a prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 535–540 (2013).
66. Ruddy, S. & Colten, H. R. Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1284–1288 (1974).
67. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 625–635 (2010).
68. Wang, Q. *et al.* Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat. Med.* **17**, 1674–1679 (2011).
69. Goldring, M. B., Birkhead, J., Sandell, L. J., Kimura, T. & Krane, S. M. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* **82**, 2026–2037 (1988).
70. Nietfeld, J. J., Wilbrink, B., Den Otter, W., Huber, J. & Huber-Bruning, O. The effect of human interleukin 1 on proteoglycan metabolism in human and porcine cartilage explants. *J. Rheumatol.* **17**, 818–826 (1990).
71. Mengshol, J. A., Vincenti, M. P., Coon, C. I., Barchowsky, A. & Brinckerhoff, C. E. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-jun N-terminal kinase, and nuclear factor κ B: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* **43**, 801–811 (2000).
72. Fan, Z., Bau, B., Yang, H., Soeder, S. & Aigner, T. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* **52**, 136–143 (2005).
73. Inoue, K., Masuko-Hongo, K., Okamoto, M. & Nishioka, K. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. *Rheumatol. Int.* **26**, 93–98 (2005).
74. Kobayashi, M. *et al.* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **52**, 128–135 (2005).
75. Héraud, F., Héraud, A. & Harmand, M. F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 959–965 (2000).

76. López-Armada, M. J. *et al.* Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 660–669 (2006).
77. Saklatvala, J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322**, 547–549 (1986).
78. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P. & Fahmi, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 33–42 (2011).
79. Guerne, P. A., Zuraw, B. L., Vaughan, J. H., Carson, D. A. & Lotz, M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J. Clin. Invest.* **83**, 585–592 (1989).
80. Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. **264**, 95–98 (1994).
81. Poree, B. *et al.* Interleukin-6 (IL-6) and/or Soluble IL-6 Receptor Down-regulation of Human Type II Collagen Gene Expression in Articular Chondrocytes Requires a Decrease of Sp1.Sp3 Ratio and of the Binding Activity of Both Factors to the COL2A1 Promoter. *J. Biol. Chem.* **283**, 4850–4865 (2008).
82. Cawston, T. E. *et al.* The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* **41**, 1760–1771 (1998).
83. Rowan, A. D. *et al.* Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum.* **44**, 1620–1632 (2001).
84. Carman, W. J., Sowers, M., Hawthorne, V. M. & Weissfeld, L. A. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am. J. Epidemiol.* **139**, 119–129 (1994).
85. Grotle, M., Hagen, K. B., Natvig, B., Dahl, F. A. & Kvien, T. K. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet. Disord.* **9**, 132 (2008).
86. Considine, R. V *et al.* Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295 (1996).
87. Hui, W. *et al.* Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 455–462 (2012).
88. Yang, W.-H. *et al.* Leptin Induces IL-6 Expression through OBR1 Receptor Signaling Pathway in Human Synovial Fibroblasts. *PLoS One* **8**, e75551 (2013).
89. Koskinen, A., Vuolteenaho, K., Moilanen, T. & Moilanen, E. Resistin as a factor in osteoarthritis: synovial fluid resistin concentrations correlate positively with interleukin 6 and matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3. *Scand. J. Rheumatol.* **43**, 249–253 (2014).
90. Yang, S. *et al.* NAMPT (visfatin), a direct target of hypoxia-inducible factor-2, is an essential catabolic regulator of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 595–602 (2015).
91. Chevalier, X., Eymard, F. & Richette, P. Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 400–410 (2013).
92. Conaghan, P. G., Kloppenburg, M., Schett, G. & Bijlsma, J. W. J. Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1442–1445 (2014).

VI. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war es, artikuläre Chondrozyten auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Dabei galt es, Unterschiede zwischen Gelenkknorpel und Knorpel der Wachstumsfuge sowie den Einfluss synovialer Fibroblasten auf diese zu analysieren.

Den zentralen Bestandteil der Dissertation bildet die dargestellte Publikation, in der die Bedeutung von Thrombospondin-4 für die Regulation von Chondrozyten nachgegangen wurde. Die morphometrische Charakterisierung des Skelettsystems von *Thbs4*-defizienten Mäusen ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Wildtypen, ebenso wenig konnte eine entscheidende Bedeutung von THBS4 in der Pathogenese der X-chromosomalen hypophosphatämischen Rachitis nachgewiesen werden. Allerdings konnte in den Knockout-Mäusen nach 26 Wochen im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant geringere Knorpelschichtdicke und zusätzlich eine verringerte Expression von *Aspn* festgestellt werden.

In folgenden Analysen wurden sechs Wochen alte Minipigs als Tiermodell verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Chondrozyten mittels eines durch Synoviozyten konditionierten Mediums einen signifikanten Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität zur Folge hat. Weiterhin führte die Zugabe des konditionierten Mediums zu einer Minderung der Expression einer Vielzahl von Genen, während die Expression von *SDC4*, *MMP3* und *ADAMTS5* induziert wurde. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie konnten die Proteine des Mediums nach ihrer Größe aufgetrennt und der gezeigte Effekt isoliert werden.

Ein gegensätzlicher Effekt konnte bei der Stimulation der Chondrozyten durch porcine Synovialflüssigkeit beobachtet werden, da jene die Expression von *SDC4*, *MMP3* und *ADAMTS5* reprimiert. Abschließend wurde der Einfluss des konditionierten Mediums auf die Genexpression artikulärer Chondrozyten nach Zugabe von porcinem Serum analysiert. Während das konditionierte Medium allein die Expression von *SDC4*, *MMP3* und *ADAMTS5* induzierte, führte die gleichzeitige Stimulation der Chondrozyten mittels konditionierten Mediums und porcinen Serums zu einer verminderten Expression der genannten Gene und glich so der Stimulation durch porcine Synovialflüssigkeit.

Summary

The aim of this dissertation was to characterize articular chondrocytes at the molecular level. Analyzes were performed to show differences between the articular cartilage and cartilage of the growth plate as well as the influence of synovial fibroblasts on these two.

*The main topic of the dissertation is the above shown publication, which investigated the importance of thrombospondin-4 for the regulation of chondrocytes. The morphometric characterization of *Thbs4*-deficient mice did not reveal any significant differences in wildtypes, nor could a decisive significance of *THBS4* in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemic rickets be demonstrated. In knockout mice, however, a significantly thinner cartilaginous layer and a reduced expression of *Aspn* could be observed after 26 weeks compared to wildtype mice.*

*In the following analyzes, six-week-old minipigs were used as an animal model and it was shown that the stimulation of chondrocytes by a synoviocyte-conditioned medium leads to a significant increase in Caspase-3/7 activity. Furthermore, the addition of the conditioned medium resulted in a decreased expression of a variety of genes while the expression of *SDC4*, *MMP3* and *ADAMTS5* was induced. Using high-performance liquid chromatography the proteins of the medium could be separated according to their size and the shown effect was isolated.*

*An opposing effect could be observed in the stimulation of the chondrocytes by porcine synovial fluid since it repressed the expression of *SDC4*, *MMP3* and *ADAMTS5*. Finally, the influence of the conditioned medium on gene expression of articular chondrocytes after the addition of porcine serum was analyzed. While the conditioned medium alone induced the expression of *SDC4*, *MMP3* and *ADAMTS5*, the simultaneous stimulation of chondrocytes by synoviocyte-conditioned medium and porcine serum led to a reduced expression of the mentioned genes and thus was similar to the stimulation by porcine synovial fluid.*

VII. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die Entwicklung der Fragestellung und Planung der Experimente lagen vorrangig in der Hand von Prof. Thorsten Schinke und den Erstautoren, welche hierbei unterstützend durch die Co-Autoren beraten wurden. Während die knochenspezifischen Untersuchungen überwiegend in den Aufgabenbereich von Dr. Anke Jeschke fielen, waren die knorpelspezifischen Analysen zum größten Teil meine Aufgabe. Die Gewinnung des jeweiligen Probenmaterials und die Kultivierung der Zellen wurden gemeinsam durch die beiden Erstautoren betrieben. Ebenso wie die Färbung verschiedener histologischer Präparate übernahm ich die Isolation der zellspezifischen RNA und die Gewinnung der entsprechenden cDNA als Grundlage für alle Expressionsanalysen. Die Analysen per qRT-PCR wurden ebenfalls von mir durchgeführt. Weiterhin fielen die genannten zellulären Assays in meinen Aufgabenbereich sowie die mittels ELISA durchgeführte Analyse der Serumproben, welche durch Prof. Andreas Niemeier und Dr. Maciej Simon zur Verfügung gestellt wurden. Alle weiterführenden Untersuchungen wie HPLC und SDS-PAGE wurden von mir durchgeführt. Die beschriebene Genchip-Analyse wurde freundlicherweise von ATLAS Biolabs durchgeführt und durch Dr. Benjamin Otto ausgewertet. Alle weiteren Ergebnisse wurden von mir statistisch ausgewertet und gemeinsam mit Prof. Thorsten Schinke interpretiert, welcher zusätzlich das Manuskript verfasst hat. Die Co-Autoren unterstützten das Projekt zu gleichen Teilen in der Planungsphase und durch geleistete Vorarbeiten.

VIII. Danksagung

Allen voran möchte ich meinen Doktorvätern danken. Prof. Michael Amling danke ich für das Vertrauen und die Möglichkeit am IOBM zu promovieren. Prof. Thorsten Schinke danke ich für die außergewöhnlich gute Betreuung, die vielen hervorragenden Ideen und die permanente Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Dr. Anke Jeschke für eine tolle Betreuung, die geduldige Einführung in verschiedenste wissenschaftliche Methoden und ihren unermüdlichen Einsatz danken.

Ein großer Dank gebührt außerdem allen weiteren Mitarbeitern/-innen des IOBM, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Danke für eine tolle Atmosphäre und die vielen positiven Erinnerungen.

Danke an alle, dass ihr dafür gesorgt habt, dass ich jederzeit gerne das Labor aufsuche und Freude an der Forschung gefunden habe.

Danken möchte ich auch denjenigen Freunden, auf die ich mich verlassen kann und die eine tiefgründige Freundschaft zu schätzen wissen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich jederzeit bedingungslos unterstützt und mir dadurch viel Sicherheit gibt. Ich danke meinem Vater für all die weisen Worte bezüglich Wissen- und Gesellschaft – meiner Mutter danke ich für ihre aufopferungsvolle Art und den Beistand in jeder Lebenslage, was mir ungemein viel Kraft gibt.

Vielen Dank euch allen.

IX. Lebenslauf

➤ Allgemeine Daten

Name Martin Bonitz
Geburtsdatum, -ort 07. August 1989 in Rostock
Familienstand Ledig

➤ Schulische Laufbahn

06/2008 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)
Gymnasium Altenholz, Schleswig-Holstein

➤ Studium

10/2008 – 09/2011 Studium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Studiengang: Biologie

Seit 10/2011 Studium an der Universität Hamburg
Studiengang: Humanmedizin

08/2013 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)

➤ Studienbegleitende Tätigkeiten

Seit 04/2013 Studentische Hilfskraft,
Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Seit 04/2014 Dissertationsarbeit und wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Institut für Osteologie und Biomechanik

Hamburg, den 20.10.2016



X. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:



.....