Einfluss des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf Knochen- und Knorpelstrukturen in einem Knockout-Mausmodell

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Zahnmedizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Katharina Szymanski

aus Mülheim an der Ruhr

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Georg Conrads

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**	**I**
B.	**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**	**III**
1	**EINLEITUNG**	**1**
1.1	**Der Bewegungsapparat im demografischen Wandel**	**1**
1.2	**Knochengewebe**	**2**
1.2.1	Aufbau und Funktion	2
1.3	**Zelltypen**	**3**
1.4	**Knochenentwicklung**	**5**
1.4.1	Desmale Ossifikation	6
1.4.2	Chondrale Ossifikation	6
1.5	**Wachstum und Alterung langer Knochen**	**6**
1.6	**Gelenkknorpel**	**7**
1.6.1	Allgemeiner Aufbau und Beispiele	7
1.6.2	Physiologie und Pathologie des Gelenkknorpels	8
1.6.3	Epiphysenfuge	8
1.7	**Alterungsprozesse des Bewegungsapparats**	**9**
1.7.1	Nrf2 als zweiseitiges Schwert	10
1.7.2	Nrf2 in Knochen und Gelenkknorpel	12
1.7.3	Regulation von Nrf2 in verschiedenen Altersstufen	13
1.8	**Stand der Forschung**	**15**
2	**ZIELSETZUNG**	**19**
3	**MATERIAL UND METHODEN**	**21**
3.1	**Nrf2-Knockout-Mausmodell und Präparate**	**21**
3.2	**Geräte und Chemikalien**	**21**
3.3	**Zellkultur und Färbungen**	**25**
3.3.1	Auftauen der Zellen	25
3.3.2	Kultivierung und Zelltrennung	26
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl	26
3.3.4	Zellbehandlung mit Nrf2-Aktivatoren	27
3.3.5	Ermitteln der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue*®Assay	28
3.3.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
3.3.7	Etablierung der TRAP-Färbung auf Methacarn-fixierten Proben	28
3.3.8	Immunhistochemische Färbung CD68	29
3.3.9	Immunhistochemische Färbung TRAP	30
3.4	**Histologische Auswertung von Knochen- und Knorpelgewebe**	**31**
3.4.1	Dicke des Gelenkknorpels	31
3.4.2	Breite der Wachstumsfuge	32
3.4.3	Relative Kortikalisdicke in Femurschaft	33
3.4.4	Ermittlung der Osteozytenzahl in Femurschaft	34
3.4.5	Scoring der Gelenkoberfläche	35
3.5	**Statistische Auswertung**	**35**
4	**ERGEBNISSE**	**37**

4.1 Nrf2-Aktivatoren und Chondrozytenviabilität 37
4.2 Knorpeldicke am distalen Femur 39
4.3 Wachstumsfugenbreite am distalen Femur 41
4.4 Relative Kortikalisdicke in Femurschaft 43
4.5 Osteozytenzahl in Femurschaft 45
4.6 Grading Scoring der Gelenkoberfläche 47
4.7 Beurteilung der TRAP-Färbeprotokolle für Methacarn-fixierte Schnittpräparate 49
5 DISKUSSION 51
5.1 Einfluss von Nrf2-Aktivatoren auf Chondrozytenviabilität 51
5.2 Knorpelprotektive Effekte von Nrf2 am distalen Femur 52
5.3 Einfluss des Nrf2-Knockouts auf Wachstum und Epiphyse 54
5.4 Nrf2 und die Kortikalisqualität im Mausmodell 55
5.5 Osteozytenzahl und andere Knochenzellen in WT- und KO-Maus 57
5.6 TRAP-Färbung und immunhistologische Färbungen 58
5.7 Die Gelenkoberfläche bei Alterung und Nrf2-Knockout 59
5.8 Limitationen 60
5.9 Ausblick 61
6 ZUSAMMENFASSUNG 63
7 LITERATUR 65
8 ANHANG 81
8.1 Radiologische Einteilung der OA nach Kellgren und Lawrence 81
8.2 Grading-System nach Pritzker et al. 81
8.3 Etablierung der TRAP-Färbung 82
8.4 Osteozytenanzahl in männlichen und weiblichen Tieren 83
DANKSAGUNG 85
ERKLÄRUNG § 5 ABS. 1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG 87
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG GEMÄß § 5 ABS. (1) UND § 11 ABS. (3) 12. DER PROMOTIONSORDNUNG 89

A. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Symbol, Abkürzung	Definition
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser (lat.: *aqua bidestillata*)
ARE	Engl.: *antioxidative response element*
C28/I2-Zellen	Humane Chondrozyten-Zelllinie nach Mary Goldring
DMF	Dimethyl-Fumarat
EZM	Extrazelluläre Matrix
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HE(-Färbung)	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Meerrettichperoxidase Engl.: *horseradish peroxidase*
HO-1	heme oxygenase1
KEAP1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
Keap1Ht	Heterozygote Unterdrückung von Keap1
KO	Knockout
µ-CT	Mikro-Computertomographie
MET	Methysticin
Min.	Minute(n)
MMP	Metalloproteinase
n	n-Anzahl der Stichprobenmenge
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEKO	Keap1-null Maus Nrf2-Deletion Ösophagus
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	Engl.: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
OA	Osteoarthrose
PGE2	Prostaglandin E2
pH	Lat.: *potentia hydrogenii*, Potential des Wasserstoffs
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RANK	Engl.: *receptor activator of nuclear factor-κB*
RANKL	Engl.: *Ligand of receptor activator of nuclear factor-κB*
rcf	Engl.: *relative centrifugal force*
ROS	Engl.: *reactive oxygen species*
SFN	L-Sulforaphan
SOX9	Engl.: *SRY (sex determining region Y)-box 9*
Std.	Stunde(n)
TF	Transkriptionsfaktor
TRAP	Engl.: *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Engl.: *Vascular endothelial growth factor*
W	Wochen (Alter der Versuchstiere)
Wnt	Wg für *wingless* und Int-1
WT	Wildtyp

B. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Zellkultivierung von C2/I2-Chondrozyten in Zellmedium; Skala: 100 µm 27
Abbildung 2 Ausschnitt links aus Übersichtsbild distales Femur Maus, HE-Färbung, 2-faches Objektiv, Skala: 1000 µm, rechts Wachstumsfuge 20-faches Objektiv, Breite des Gelenkknorpels an fünf zufälligen Lokalisa-tionen in gleichmäßigen Abständen gemessen, Messlinien senkrecht von Knorpel-Kortikalis-Grenze zum Gelenkspalt ausgerichtet, Skala: 100 µm 31
Abbildung 3 Ausschnitt links aus Übersichtsbild distales Femur Maus, HE-Färbung, 2-faches Objektiv, Skala 1000 µm, rechts Wachstumsfuge 20-faches Objektiv, Höhe der Wachstumsfuge an fünf zufälligen Lokalisationen gemessen, beginnend ca. 30 µm vom oberen Bildrand entfernt in gleichmäßigen Abständen, Ausrichtung der Messung parallel zum Säulenknorpel; Skala: 100 µm 32
Abbildung 4 Übersichtsbild links Femur Maus, Skala: 1000µm, HE-Färbung, rechts Ausschnitt Schaftmitte Femur, Merge-Bild 20-faches Objektiv, gelbe Markierungen stellen drei 33
Abbildung 5 Übersichtsbild links Femur Maus, Merge-Bild, HE-Färbung, Skala: 1000 µm, rechts Schaftmitte Femur, Merge-Bild 20-faches Objektiv, gelb markierte Flächen stellen je Fläche von 65 µm^2 dar, davon sechs Areale in der anterioren und sechs Areale in der posterioren Sagittalebene in regelmäßigen Abständen verteilt, Gesamtlänge festgelegt auf 800µm („1“ und „2“ im Bild); Skala: 200 µm 34
Abbildung 6 Zellviabilität der C28/I2-Chondrozyten bei Stimulation mit L-Sulforaphan (S), Konzentration in µM 37
Abbildung 7 Zellviabilität der C28/I2 Chondrozyten bei Stimulation mit Methysticin (M), Konzentration in µM 38
Abbildung 8 Gelenkknorpeldicke distales Femur Maus, a und b Gendermix; a: 12 W, KO (n=6), WT (n=10); b: 90 W, KO (n=7), WT (n=8), c und d nur weibliche Tiere; c: 12 W, KO (n=6), WT (n=5); d: 90 W, KO (n=3), WT (n=5); Abbildungen e-h: repräsentative histologische Darstellung des Gelenkknorpels (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) Mäusen und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren, Skala: 100 µm 40
Abbildung 9 Wachstumsfugenbreite distales Femur Maus a: 12 W, WT (n=10), KO (n=7), b: 90 W, WT (n=9), KO (n=6); c: weiblich, 12 W, WT(n=5) KO (n=6), d: 90 W, WT (n=5), KO (n=2); Abbildungen e-h: repräsentative histologische Darstellung der Wachstumsfuge (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren; Skala: 100 µm 42
Abbildung 10 Relative Kortikalisdicke, Schaftmitte Femur Längsschnitt HE-Färbung Maus a: 12 W, WT (n=8), KO (n=6), b: 90 W, WT (n=10), KO (n=9); Bilder c-f zeigen repräsentative Darstellungen des distalen Femurs mit Messlinien in Maus, in 12 W jungen WT-(c), KO-(e) und 90 Wochen alten WT-(d) und KO-(f)-Tieren; HE-Färbung; Skala: 100 µm 44

Abbildung 11 Osteozytenzahl in Femurschaft, a und b Gendermix; a: 12 W, WT (n=9), KO (n=7), b: 90 W, Anzahl WT (n=7), KO (n=9), c und d: weiblich; c: 12 W, WT (n=3) KO (n=5); d: 90 W, WT (n=3), KO (n=4); Abb. e-h: Osteozyten in Femurschaft (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren; Skala: 100 µm 46
Abbildung 12 Graph Scoring der Gelenkoberfläche weiblicher Versuchstiere, a: 12 W, WT (n=3), KO (n= 5); 90 W: WT (n=4), KO (n=3); Bilder c-f zeigen repräsentative Darstellung des distalen Femurs, Maus, HE-Färbung, links 12 W alte WT-(c) und -KO-(e)-Mäusen und rechts 90 W alte WT(d)- und KO-Mäuse(f); e: unebene Gelenkoberfläche; d: glatte Gelenkoberfläche; f: vertikale Schäden (mit Pfeil gekennzeichnet) 48
Abbildung 13 TRAP-Färbung distales Femur Maus mit unterschiedlichen pH-Werten (TRAP-Pufferlösung): pH 5,0 (a); pH 3,25 (b) pH 10,0 (c); d: Positivkontrolle TRAP bei Femur in Formalinfixierung mit Gegenfärbung mittels Fast Green, Pfeile zeigen auf TRAP-positive Zellen; a-c: Fixierung in Methacarn 82
Abbildung 14 Osteozytenzahl in Kortikalis des Femurschafts in 90 Wochen alten männlichen und weiblichen Nrf2-KO- und WT-Mäusen 83

1 EINLEITUNG

1.1 Der Bewegungsapparat im demografischen Wandel

Seit Jahrzehnten sind weltweit eine steigende Lebenserwartung und eine anteilige Verschiebung zu den höheren Altersgruppen zu verzeichnen. Diese gehen mit einem stetig höheren Bedarf an medizinischer Versorgung und den damit verbundenen Kosten einher (de Meijer et al. 2013). Der Bereich des Bewegungsapparats stellt hierbei einen bedeutenden Anteil der Behandlungen dar (Sebbag et al. 2019). Aufgrund ihrer Prävalenz sind insbesondere Osteoporose, Arthrose und die rheumatoide Arthritis als einige der häufigsten Vertreter zu nennen (Fuchs et al. 2013). Daneben zeigen Frakturgeschehnisse wie Oberschenkel- und Oberschenkelhalsbrüche mit steigendem Alter eine steigende Tendenz. Dies ist mit Veränderungen in Knochen- und Knorpelstrukturen zu erklären, die mit dem Alter zunehmen. Veränderungen in Knochen- und Gelenkstrukturen, wie die Minderung in der Knorpelelastizität und Muskelstärke, äußern sich in einem höheren Verletzungsrisiko (Peters et al. 2018).

Unabhängig vom Alter spielen andere Risikofaktoren wie Adipositas, das Geschlecht, genetische Prädisposition und Lebensstil eine entscheidende Rolle für Erkrankungen des Bewegungsapparats. Im Hinblick auf die Arthrose sind Frauen insgesamt deutlich häufiger betroffen als Männer (Prieto-Alhambra et al. 2014). Dies gilt auch für die Osteoporose, die häufigste Erkrankung des Bewegungsapparats (Franceschi et al. 2018). Inwiefern Unterschiede in der hormonellen Steuerung eine Rolle spielen, ist noch nicht umfassend erforscht, jedoch gibt es hierzu neue Darstellungen und Ansätze (Ibáñez et al. 2014, Yin et al. 2020).

Eine reduzierte Beweglichkeit führt im Alter nicht selten zu einer Abnahme der körperlichen Aktivität, weiterhin zu einer Reduktion der Muskelkraft und durch fehlende mechanische Belastung schließlich zum Knochenabbau. Neben der biomechanischen Komponente werden in aktuelleren Studien Muskel- und Knochengewebe als kommunizierende Entität angesehen. So beeinflussen durch Osteoblasten und Osteozyten sezernierte Osteokine die Muskelstruktur und umgekehrt übermittelt das Muskelgewebe durch Botenstoffe dem Knochen Signale bei anabolischen und katabolischen Vorgängen (Gomarasca et al. 2020). Auch Zellen des Knorpel- und Fettgewebes modulieren durch Abgabe bestimmter Faktoren Knochen- und Muskelgewebe (Brotto & Johnson 2014).

1.2 Knochengewebe

1.2.1 Aufbau und Funktion

Knochen ermöglichen in Synergie mit Muskeln und Sehnen Bewegung, Stützfunktion und Schutz der inneren Organe. Auf molekularer Ebene dienen Knochen als Mineralreservoir, v. a. für Calcium und Phosphat und als Speicherorgan für verschiedene Wachstumsfaktoren und Fett. Außerdem erfüllt der Knochen endokrine Funktionen, indem Osteocalcin exprimiert und kontrolliert wird. Dieses übt Einfluss auf die Insulin-Sekretion und somit auf den Energie-Stoffwechsel aus (N. K. Lee et al. 2007).

Im Knochenmark findet nach der Geburt die Neubildung von Blutzellen statt. Dabei handelt es sich um multipotente hämatopoetische Stammzellen, die zeitlebens undifferenziert vorliegen und zu verschiedenen Differenzierungslinien bestimmt werden können (Morrison et al. 1997).

Die Enden der langen Röhrenknochen, wie Femur oder Tibia, werden Epiphyse und der Schaft in der Mitte Diaphyse genannt. Zwischen Epi- und Diaphyse befindet sich während des Wachstums eine aus hyalinem Knorpel bestehende Wachstumsplatte. Die Region zwischen der Wachstumsplatte und dem Übergang zum Schaft wird als Metaphyse bezeichnet. Von der makroskopischen Beschaffenheit her wird der Knochen in Kortikalis und Spongiosa unterschieden. Die Kortikalis stellt die äußere Schicht dar, während das Knocheninnere in Knochenbälkchen, den Trabekeln organisiert und von Knochenmark durchdrungen ist. Die Ernährung des Knochens erfolgt über die *Arteria nutricia,* die durch die Kortikalis eintritt und über Mikrogefäße das Knochenmark und die Spongiosa ernährt. Die vom Knochenmark zur Kortikalis verlaufenden Gefäßäste, die die Mikrogefäße speisen, werden Havers-Gefäße genannt und verlaufen in den Havers-Kanälen. Die Verbindungen unter diesen heißen im menschlichen Knochen Volkmann-Kanäle (Lüllmann-Rauch & Asan 2019).

Die inneren Knochenwände, einschließlich der Oberfläche der Spongiosa-Trabekel, sind mit Endost bedeckt. Dieses besteht aus nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und einer Zelllage aus *lining cells*. Diese enthält flache Osteoblasten, die über Processus und *gap junctions* mit den anliegenden Knochenzellen in Verbindung stehen (Miller et al. 1989, Aarden et al. 1994). Die äußere Knochenoberflä-

che, das Periost, besteht aus einer Schicht straffen Bindegewebes aus elastischen Fasern *(Stratum fibrosum)*. Am Knochen direkt angrenzend liegt die innere Schicht *(Stratum osteogenicum)*, die aus den gleichen Zellen wie das Endost besteht. Von hier gehen das Dickenwachstum und sämtliche Umbau- und Reparaturmaßnahmen aus (Lüllmann-Rauch & Asan 2019).

1.3 Zelltypen

Das Knochengewebe befindet sich zeitlebens in einem ständigen Umbauprozess, bei dem verschiedene Zelltypen und Faktoren als Gegenspieler fungieren.

Osteoblasten erfüllen die Funktion des Aufbaus der Knochenmatrix. Sie stammen von mesenchymalen Stammzellen ab, die durch den Einfluss von lokalen Wachstumsfaktoren und dem Wnt-Signalweg zu Osteoprogenitor-Zellen bestimmt werden (Lüllmann-Rauch & Asan 2019, Cao & Chen 2005). Aktive Osteoblasten sehen im histologischen Bild „annähernd kubisch“ aus und befinden sich auf den freien knöchernen Oberflächen an der mineralisierten Knochenmatrix. Dazwischen liegt eine von den Osteoblasten hergestellte Lage aus nicht mineralisierten Kollagenfibrillen, auch Osteoid-Schicht genannt, die die Grundstruktur für neue Knochenlamellen darstellt (Y. Tanaka et al. 2005).

Neben der Bildung der Knochenmatrix und der Kontrolle der Knochenmineralisation produzieren Osteoblasten verschiedene Matrixproteine wie Runx2, die wichtig für eine ausgeglichene Knochenhomöostase sind. Diese werden u. a. hormonell über Rezeptoren für Östrogen, Parathyroid-Hormon, Parathyroid-related Protein und Vitamin D kontrolliert, die sich auf der Zelloberfläche der Osteoblasten befinden. Die alkalische Phosphatase, ein membrangebundenes Glykoprotein, das von Osteoblasten sezerniert wird, kommt als Marker für Knochenumbauprozesse zum Einsatz (Sharma et al. 2014).

Über die Hälfte der Osteoblasten werden über apoptotische Prozesse abgebaut, einige gehen wieder in den inaktiven Zustand im Endost über, wieder andere werden in der weiteren Lebensdauer in die Knochenmatrix eingemauert und funktionieren weiter als Osteozyten.

Osteozyten gehen aus dem Übergang aus Osteoblasten hervor. Diese Transformation steht im Zusammenhang mit spezifischen Genen. Diese sind in der frühen Phase der Differenzierung das Dentin-Matrix-Protein-1 (DMP1) und das

Matrix-Extrazellular-Phosphoglykoprotein (MEPE) (S. M. Woo et al. 2011). Nachdem sie den Großteil an Zytoplasma und Zellorganellen als Osteoblasten verlieren, entwickeln sie als Osteozyten einen sternenförmigen Zellkörper mit 50 oder mehr Ausläufern *(Processus)* pro Zelle, über die sie mit anderen Osteozyten und Osteoblasten an der Knochenoberfläche verbunden sind (Rochefort et al. 2010). In dieser Phase der Differenzierung, die durch die dendritischen Ausläufer charakterisiert ist, werden Sclerostin und *fibroblast growth factor 23* (FGF23) exprimiert (S. M. Woo et al. 2011). Ihre Zellkörper liegen in Lakunen, in denen sich eine schmale, nicht mineralisierte Zone, gefüllt mit Kollagenfibrillen und interstitieller Flüssigkeit befindet. Zusammen mit den *Canaliculi* der Ausläufer bilden sie das *lacunar-canalicular*-Netzwerk. Auf diese Weise stehen alle Osteozyten über Diffusion sowohl in direkter Nähe als auch zum Endost über *gap junctions* in Verbindung (Civitelli 2008). Signale von außen wie mechanische Kräfte in der Form von Kompression oder Dehnung werden über das Osteozyten-Netzwerk weitergeleitet. Diese beeinflussen die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten und steuern auf diese Weise Knochenumbauprozesse. Neben mechanischen Stimuli werden auch metabolische Signale verarbeitet, wie z. B. der Östrogen-Entzug, bei dem eine Erhöhung des Osteozyten-Abbaus *(Osteolyse death)* beobachtet wurde (Tomkinson et al. 1998). Außerdem haben Osteozyten eine regulierende Wirkung auf Osteoblasten, aktivierend über Stickstoff (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2) und hemmend durch die Sekretion von Sclerostin (Rochefort et al. 2010, Poole et al. 2005).

Osteoklasten sind für den Abbau mineralisierter Knochenmatrix verantwortlich und haben eine Lebensspanne von mehreren Wochen. Es handelt sich histologisch um große, mehrkernige Zellen, die durch die Fusion einkerniger Vorläuferzellen aus der hämatopoetischen Linie entstehen. Sie kommen auch in anderen Geweben wie dem Dentin oder im Knorpel, in der Form von Odontoklasten und Chondroklasten vor (Lüllmann-Rauch & Asan 2019). Im aktiven Zustand befinden sie sich in direkter Nähe zur mineralisierten Knochenmatrix und bilden Howship'sche Lakunen, in denen die Knochenmatrix resorbiert wird. Ihre Differenzierung hängt in erster Linie von der Signalübertragung durch den *macrophage colony stimulating factor* (m-csf) ab, der auch für die erhöhte Exprimierung von *receptor activator of nuclear factor-κB* (RANK) zuständig ist (Crockett et al. 2011). Dieser Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vor-

läuferzellen und der differenzierten Osteoklasten. Dessen zugehöriger, aktivierender Ligand RANKL ist auf der Oberfläche der Osteoblasten (Fumoto et al. 2014), Osteozyten (Nakashima et al. 2011) und Adipozyten-Vorläuferzellen vorzufinden (Takeshita et al. 2014). Für die Quantifizierung und Auswertung von Osteoklasten wird sich die Anfärbung der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) zunutze gemacht. Dabei handelt sich um ein Enzym, das besonders von Osteoklasten und Chondroklasten exprimiert wird und mit einer histologischen Färbung sichtbar gemacht werden kann (Minkin 1982).

Zellen im Knochenmark wie multipotente hämatopoetische Stammzellen, Progenitorzellen und mesenchymale Stammzellen sind im Innern der Röhrenknochen lokalisiert. Von den mesenchymalen Stammzellen leiten sich Osteoblasten und Adipozyten ab, von den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen dagegen alle im Blut physiologisch vorkommenden Zelltypen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Monozyten differenzieren sich weiter zu Makrophagen, Osteoklasten und dendritischen Zellen (Löffler et al. 2004). Neben der Blutbildung und der Rolle als lymphatisches Organ findet im Knochenmark die Reifung der B-Lymphozyten und der Abbau der Erythrozyten statt. Es wird zwischen roten Arealen der Blutbildung und dem gelben Fettmark unterschieden. Beim ausgewachsenen Menschen befinden sich die blutbildenden Areale v. a. in Schädel, Wirbelsäule und Thorax. In den Knochen der Extremitäten überwiegt das aus Adipozyten bestehende gelbe Fettmark. Adipozyten gehören im weiteren Sinne zu den Knochenzellen und beeinflussen den Knochenumbau (Veldhuis-Vlug & Rosen 2018). Sie sezernieren z. B. Stammzellfaktoren, Zytokine wie RANKL und Adipokine und werden als potenzielles therapeutisches Ziel für Krankheiten wie Osteoporose und Leukämie erforscht (Zhou et al. 2017).

1.4 Knochenentwicklung

Am Anfang jeder Knochenentwicklung steht die Mesenchymverdichtung. Danach folgt je nach Art des Knochens eine der zwei Alternativen der weiteren Entwicklung. Die meisten Knochen im menschlichen Körper entstehen durch enchondrale Ossifikation, deren Entwicklungsdauer lokalisationsabhängig ist.

1.4.1 Desmale Ossifikation

Die Knochenbildung erfolgt bei der desmalen Ossifikation direkt vom Mesenchym zum „Bindegewebsknochen“. Typische Beispiele für die desmale Ossifikation sind Knochen der Schädelkalotte, des Viscerocraniums und des Schlüsselbeins. Hierbei differenzieren Mesenchymzellen zu Osteoprogenitorzellen und sodann zu Osteoblasten (Lüllmann-Rauch & Asan 2019).

1.4.2 Chondrale Ossifikation

Bei der chondralen Ossifikation, auch Ersatzknochen oder indirekte Osteogenese genannt, differenzieren sich die Mesenchymzellen zuerst zu Chondroblasten, die ein Knorpelmodell erstellen, um dann durch Knochengewebe ersetzt zu werden. Innerhalb der chondralen Ossifikation unterteilen sich die Entwicklungswege in enchondrale und perichondrale Ossifikation. Unterschieden wird hier je nach Ort der Ossifikation. Die perichondrale Ossifikation verläuft um das Knorpelmodell herum, die enchondrale Ossifikation findet im Innern des Knorpelmodells statt. Es wird eine äußere knorpelige Haut namens Perichondrium gebildet, die nach und nach durch knöchernes Periost ersetzt wird. Auf zellulärer Ebene ist die perichondrale Ossifikation mit der desmalen zu vergleichen. Die enchondrale Ossifikation verläuft im Innern des Knorpelmodells mit der Ausbildung einer knorpeligen Wachstumsplatte (Lüllmann-Rauch & Asan 2019). Sobald das Knorpelmodell durch Chondrozyten und deren Sezernierung von Komponenten extrazellulärer Matrix (EZM) gebildet wird, dringt eine Mischung aus Zellen zunächst ins Zentrum und dann an jedem Ende ein, um ein primäres und sekundäres Ossifikationszentrum zu bilden. Diese dehnen sich immer weiter aus und ersetzen Knorpel durch Knochenstruktur, mit Ausnahme des Gelenkknorpels. Das Knorpelgewebe, das an der enchondralen Ossifikation beteiligt ist, befindet sich einerseits in der Wachstumsfuge, andererseits in der Epiphysenregion (Mackie et al. 2008). Beide unterliegen der vollständigen Ossifikation und zeigen mit Wachstumsabschluss keine knorpeligen Bestandteile.

1.5 Wachstum und Alterung langer Knochen

Beim menschlichen langen Röhrenknochen wird in der achten Embryonalwoche die perichondrale Knochenmanschette ausgebildet. In der Diaphyse beginnt daraufhin die enchondrale Ossifikation mit der Bildung des primären Knochenkerns.

In der Schaftregion, den Epiphysen, beginnt sie dagegen in der postnatalen Phase. Hier werden die sekundären Knochenkerne gebildet, auch sekundäre Ossifikationszentren genannt, mit Ausnahme der distalen Femur-Epiphyse und der proximalen Tibia-Epiphyse. Die sekundären Knochenkerne werden in der Zeit vor oder nach der Geburt des Kindes gebildet und auch als Reifezeichen bezeichnet. Die versorgenden Gefäße bestehen schon lange vorher und befinden sich in den schon vorhandenen Knorpelkanälen (Lüllmann-Rauch & Asan 2019).

1.6 Gelenkknorpel

1.6.1 Allgemeiner Aufbau und Beispiele

Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und EZM, deren wichtigste Bestandteile Wasser, Ionen, Proteoglykane, Kollagenfibrillen und Glykosaminoglykane sind. Diese sind u. a. für das Aufrechterhalten des Wassergehalts und seine einzigartige biomechanische Eigenschaft, der Druckelastizität, verantwortlich. Das Gewebe zeichnet sich einerseits durch seine feste Konsistenz, andererseits durch seine Verformbarkeit aus (S. L. Woo & Buckwalter 1988). Abgesehen vom Primordialskelett, das über Gefäße versorgt wird, erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen bei Chondrozyten über die EZM durch Diffusion. Je nach Zusammensetzung und zusätzlichen Bestandteilen der EZM wird in drei Grundtypen des Knorpels unterschieden, die an unterschiedliche mechanische Anforderungen angepasst sind. Hyaliner Knorpel kommt z. B. als Gelenkknorpel, Rippenknorpel, in den Atemwegen und in Wachstumsplatten vor und ist im menschlichen Körper der am häufigsten vertretene Knorpeltyp. Elastischer Knorpel ist in der Ohrmuschel, der Epiglottis, am Kehlkopf und in den kleinsten Bronchien zu finden. Der Faserknorpel ist durch seine dicken Kollagenfasern gekennzeichnet und erfüllt eine abfedernde Funktion z. B. an den *Disci intervetrebrales*, an der *Symphysis pubica*, den *Menisci* des Kniegelenks und den Gelenkflächen des Kiefergelenks (Lüllmann-Rauch & Asan 2019). Hyaliner und elastischer Knorpel sind meistens von Perichondrium umschlossen, einer bindegewebigen Knorpelhaut, die Funktionen bezüglich des Wachstums und der Reparatur des Knorpels erfüllt (Duynstee et al. 2002). Eine Ausnahme bildet hier der Gelenkknorpel, der nicht von Perichondrium bedeckt ist und an dieser Stelle näher betrachtet werden soll.

1.6.2 Physiologie und Pathologie des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel erfüllt als hyaliner Knorpel eine abfedernde Funktion, die im Bereich des Knie-, Hüft- und Fußgelenksbereich aufgrund der besonderen Belastung durch das eigene Körpergewicht eine wichtige Rolle spielt. Um eine Bewegung ohne viel Reibung und Übertragung von Lasten zu ermöglichen, bedarf es einer glatten und geschmeidigen Oberfläche (Sophia Fox et al. 2009). Beim Erwachsenen erfolgt die Versorgung des Gelenkknorpels über Diffusion durch die Synovialflüssigkeit. Deren Untersuchung kann Auskunft über die Zusammensetzung und das Vorkommen bestimmter Zytokine wie IL-6 und IL-13 geben und den Zustand des Gelenkknorpels beschreiben (Tsuchida et al. 2014). Genau wie Knochengewebe ist das Knorpelgewebe nicht statisch, sondern kann sich auf biomechanische Krafteinflüsse einstellen. Chondrozyten können dabei mit einer Regulation von Entzündungsmediatoren reagieren, die auch in anderen Gelenkgeweben vorliegen. Art und das Ausmaß der Belastung spielen dabei eine richtungsgebende Rolle. Eine fehlende Belastung führt zu einem Verlust mechanischer Eigenschaften führen, wohingegen eine dynamische Druckbelastung die Synthese der EZM-Elemente aktiviert (Buckwalter & Mankin 1998). Wichtige Entzündungsmediatoren im Knorpelgewebe sind Stickstoffmonoxid (NO) und PGE2 (Jang & Murrell 1998). Entzündliche Abnutzungserscheinungen der Gelenkoberfläche können sich durch offene bzw. leere Chondrozyten, Lakunen oder die Ablagerung oberflächlicher Materialien und Unterbrechungen in der Gelenkoberfläche äußern (Otterness et al. 1994). Die Einteilung der Osteoarthrose (OA) erfolgt nach wie vor nach den radiologischen Zeichen nach Kellgren wie in 8.1 dargestellt (Kellgren & Lawrence 1957). Entsprechend dieser Bewertung wird die Ausprägung der OA nach dem Vorhandensein von Osteophyten, Knöchelchen *(ossicles)*, subchondralem, sklerosiertem Gewebe, Formveränderungen der Knochenenden und der Verengung des Gelenkspalts eingeteilt. Bei der histologischen Beurteilung der Gelenkknorpeloberfläche können andere Grading-Methoden hinzugezogen werden, wie die Einteilung nach Pritzker et al., dargestellt in 8.2 (Pritzker et al. 2006).

1.6.3 Epiphysenfuge

Die Wachstumsfuge, auch Epiphysenfuge genannt, stellt den Ausgangspunkt für das Längenwachstum langer Röhrenknochen dar. Sie befindet sich zwischen E-

piphyse und Metaphyse und besteht aus hyalinem Knorpel. Das primäre Ossifikationszentrum befindet sich in der Diaphyse und das sekundäre in der Epiphysenfuge (Gerber et al. 1999, Carlevaro et al. 2000). Histologisch lässt sie sich in vier Zonen einteilen: die Germinativ-Zone mit ruhenden Zellen (Reservezone), den Säulenknorpel (Proliferationszone), die hypertrophe Zone (Knorpelumbauzone) und die Mineralisations- bzw. Ossifikationszone.

Die gleichzeitige Angiogenese mithilfe des Faktors VEGF ist essenziell für ein regelrechtes Wachstum (Maes et al. 2004). Die hierfür notwendige Bildung von Kanälen in der Knorpelmatrix wird durch verschiedene Metalloproteinasen (MMPs) bewerkstelligt. Die MMPs 9, 13 und 14 spielen dabei eine wichtige Rolle (E. R. Lee et al. 2009, Ortega et al. 2004, Stickens et al. 2004). Die Gefäßkanäle werden zunächst Kollagen Typ II und Aggrecan durch MMPs gebildet. Anschließend werden durch die von Osteoklasten und Chondroklasten sezernierte TRAP die Anteile der mineralisierten Knorpelmatrix aufgelöst (McCormick 2001, Holmbeck et al. 1999).

1.7 Alterungsprozesse des Bewegungsapparats

Der Bewegungsapparat erfährt im Laufe der Zeit physiologische Alterungsprozesse. Die Gelenkstrukturen sind von diesen Veränderungen besonders betroffen, weshalb sich der Begriff des Altersgelenks etabliert hat. Typisch für das Altersgelenk sind schmerzfreie Bewegungen sowie das Fehlen von klinischen und radiologischen Zeichen (Franceschi et al. 2018).

Es finden Veränderungen der Zusammensetzung der Knorpel-EZM statt, aber auch in Bezug auf die Verteilung der Chondrozyten und die makroskopische Beschaffenheit der Knorpeloberfläche (Buckwalter et al. 2000). Während die Gesamtanzahl der Chondrozyten im Alter weitestgehend konstant bleibt, verringert sich ihre Zelldichte in der oberflächlichen Region und nimmt in den tieferen Schichten zu. Auch verändert sich im Alter ihre Zellantwort auf Faktoren wie Zytokine. Die Größe der Proteoglykan-Aggregate in der EZM nimmt ab und das Verhältnis der gebundenen Keratinsulfatketten und Chondroitinsulfatketten verschiebt sich zugunsten der ersteren (Hardingham & Bayliss 1990). Chondroitinsulfatketten stellen essenzielle Faktoren für die Druckelastizität des Gelenkknorpels dar. Außerdem findet eine Reduktion der Kollagenquervernetzungen und der Wasserkonzentration der EZM statt (Buckwalter et al. 1993). Die Hyaluronan-

Konzentration nimmt dagegen zu. Dies ist nicht auf eine erhöhte Produktion, sondern auf die Anhäufung teilweise abgebauten Hyaluronans zurückzuführen (Martin & Buckwalter 2001, Martin et al. 1997). Die klinisch beobachteten Anzeichen, die mit den oben beschriebenen Veränderungen einhergehen, sind Einbußen in der Zugsteifigkeit *(tensile stiffness)* und Kraft. Dies führt zu einer erhöhten Verletzungsgefahr und gilt als Risikofaktor für das Auftreten pathologischer Prozesse (Kempson 1982). An der Entstehung und Heilung dieser Vorgänge wie der Arthritis, Osteoporose (OA) und bei Frakturgeschehen spielen entzündliche Prozesse eine tragende Rolle. Ein stetiges Ungleichgewicht von *reactice oxygen species* (ROS) und antioxidativen Agenzien wie Nrf2 kann zu einem chronischen Entzündungszustand führen und damit beispielsweise eine Arthritis begünstigen (Mateen et al. 2016).

Im Falle von Frakturverletzungen stellt darüber hinaus der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ein wesentliches Element dar. In Nrf2-KO-Mäusen zeigte dieser Faktor eine verringerte Konzentration, was vermuten lässt, dass Nrf2 eine vielseitige Rolle in der Knochenregeneration und –heilung spielt. In einer Studie von Tohidnezhad et al. konnte anhand von humanem Zellmaterial gezeigt werden, dass beim Einsatz von *platelet released growth factor* (PRGF) die Exprimierung von VEGF in Osteoblasten erhöht und der Nrf2-ARE-Signalweg bis zu 50 % verstärkt aktiv ist (Tohidnezhad et al. 2014). Umgekehrt konnte bei einer Aktivierung von heme oxygenase-1 (HO-1) über Nrf2 eine erhöhte Konzentration von VEGF-Proteinen festgestellt werden, die wiederum positiv zur Gefäßbildung beitrage.

Die Rolle des Transkriptionsfaktors (TF) Nrf2 stellt bei oxidativem Stress eine der potenziellen Stellschrauben dar und soll im Zusammenhang auf die histologische Knochen- und Knorpelmorphologie in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden.

1.7.1 Nrf2 als zweiseitiges Schwert

Der TF Nrf2 wird vor allem mit der körpereigenen Reaktion auf oxidativen Stress und Xenobiotika assoziiert. Er kommt in zahlreichen Zelltypen vor und zeigt zytoprotektive Effekte durch die Aktivierung von Phase-II-Proteinen. Nrf2 gehört zur Familie der Leucin-Zipper-Proteine, die eine Proteindomäne mit dimerisierender Funktion enthalten. Positiv geladenen Aminosäuren des TF binden in Gabelform

an den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA (Toki et al. 1997). Zu dieser Familie gehören Nrf1 und Nrf2, die in allen Zellen exprimiert werden, der TF Nrf3, der in Plazenta und Leber vorkommt und NF-E2, der ausschließlich in Erythrozyten auftritt (Chénais et al. 2005, Andrews 1998). Die Regulation von Nrf2 hängt von verschiedenen intra- und extrazellulären Faktoren ab, deren Feinabstimmung eine physiologische Funktion ermöglicht. Im ruhenden Zustand liegt Nrf2 gebunden an Keap1 vor, ein Aktin-bindendes, im Zytosol vorkommendes Protein (Itoh et al. 1999). Bei Kontakt mit reaktiven Stoffwechselprodukten oder Initiatoren *(inducers)* entgiftender Enzyme wird das homodimere Protein modifiziert und setzt das gebundene Nrf2 frei. Es erfolgt die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, wo es mit Cofaktoren wie den *Small Maf*-Proteinen ein Heterodimer bildet, an das *antioxidative response element (ARE)* bindet und zytoprotektive Gene transkribiert (Jeyapaul & Jaiswal 2000). Hierzu gehört die Expression der Phase-II-Proteine wie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH) - Quinone-Dehydrogenase, HO-1, Ferritin-Leichtkette und Glutathione S-Transferase Phosphat (Yin et al. 2021). Neben äußeren schädigenden Ereignissen wie Verletzungen entstehen die reaktiven Sauerstoff-Metabolite in den Mitochondrien der Zellen bei der Reduktion von Sauerstoff und können bei erhöhter Konzentration oxidativen Stress bewirken (Lippross et al. 2014, Yeler et al. 2005). Eine Akkumulation von ROS geht mit Alterung, Fettleibigkeit, Menopause und Arthritis einher und stellt für Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Knochenstoffwechselerkrankungen einen Risikofaktor dar (Cerqueni et al. 2021). Entgegen früheren Annahmen liegt ROS damit nicht nur als zufälliges Nebenprodukt der Energiegewinnung durch den Citratzyklus in den Mitochondrien vor. In der Form von molekularem Sauerstoff fungiert ROS als Elektronenakzeptor, der am Ende der Atmungskette zu Wasser reduziert wird. Eine physiologische Konzentration von ROS ist für eine Aktivierung von Nrf2 und die Knochenhomöostase unabdingbar (Mandal et al. 2011, Rana et al. 2012). Während eine kontrollierte Aktivierung von Nrf2 bei oxidativem Stress einer Entzündungsreaktion entgegenwirkt, führt eine gesteigerte Aktivierung in Tumorzellen zur Resistenz gegen Chemotherapie und kann das Wachstum von Tumorzellen fördern. In einer Studie von Nobunao Wakabayashi et al. wurde in Mäusen das Keap1-Gen unterdrückt, mit dem Effekt einer fehlenden Hemmung von Nrf2 und einer daraus resultierenden Aktivierung (Wakabayashi et al. 2003). Die Mäuse starben noch vor der Ent-

wöhnungsphase wegen einer Verengung des Ösophagus. Bei näherer Untersuchung konnten in dieser Region und im Magen hyperkeratotische Läsionen festgestellt werden. Diese können mit der fehlenden Regulation von Nrf2 als proliferierend wirkendem TF in Verbindung gebracht werden. Bei der Untersuchung von Lungentumor-Zelllinien mit fehlender KEAP1-Funktion konnten Sánchez-de-Diego et al. eine verstärkte Proliferation und Migration bei gleichzeitiger erhöhter Expression von Nrf2 feststellen (Gong et al. 2020). Der duale Charakter von Nrf2 ist somit bei Entzündungsreaktionen sowie in onkogenen Prozessen zu finden.

1.7.2 Nrf2 in Knochen und Gelenkknorpel

Als einer der Regulatoren bei oxidativem Stress spielt Nrf2 in der Aufrechterhaltung von Knochensubstanz und -funktion eine wichtige Rolle. Sein dualer Charakter wird auch hinsichtlich der Knochen- und Knorpelzellen erkennbar.

In einer Studie von Sánchez-de-Diego et al. wurde die Bedeutung von Nrf2 für die Genexpression von Osteozyten näher untersucht (Sánchez-de-Diego et al. 2021). Dabei konnte beobachtet werden, dass während der Differenzierung der Vorläuferzellen (IDG-SW3-Zellen) die Nrf2-Gen-Expression stufenweise ansteigt. Bei den sieben Wochen alten Dmp1/Nrf2-KO-Mäusen wurde außerdem eine Reduktion in der Kortikalis- und Trabekel-Anatomie gemessen. Gleichzeitig wurde eine verminderte Expression von Nrf2-Ziel-Genen (Nqo1, Gclc), Osteozyten-Genen (Dmp1, Mepe, Sost) sowie des *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) und Osterix (Osx) beobachtet. Trotz reduzierter Osteozyten-Genexpression war keine Veränderung in der Osteozyten-Anzahl pro Kortikalisfläche zu verzeichnen.

Der Einfluss von Nrf2 auf die Struktur des Gelenkknorpels und die Regulierung von SOX9 wurde in der Studie von Kubo et al. untersucht (Kubo et al. 2022). Die Expression von SOX9 in Chondrozyten war in Nrf2-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant reduziert. Die Gelenkknorpeldicke am distalen Femur war bei den alten Tieren in der Nrf2-KO Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zur WT-Gruppe und zeigte mehr Anzeichen von Knorpel-Degeneration. Knorpelprotektive Effekte mittels des Nrf2-Aktivators Sulforaphan (SFN) konnten in Studien von Davidson et al. und Su-Jin Moon et al. beobachtet werden (Davidson et al. 2013, Moon et al. 2021). SFN ist ein natürlich vorkommendes Phase-II-Enzym, das in Kohlgemüse vorkommt und entzündlichen, kanzerogenen, bakteriellen

und viralen Prozessen vorbeugen kann (Ruhee & Suzuki 2020, O'Mealey et al. 2017, Wang et al. 2017, Nazmy et al. 2017). Als in der Natur vorkommendes Isothiocyanat wurden seine unterstützenden Eigenschaften auch bezüglich Krebs- und Nierenerkrankungen erforscht (Wang et al. 2017, Liebman & Le 2021, Lozanovski et al. 2014). SFN gilt als bekannter Nrf2-Aktivator, indem es an seinen Antagonisten Keap1 bindet und somit die Akkumulation von Nrf2 in der Zelle und dessen Translokation in den Zellkern, die Bindung an das ARE-Element und die Produktion von Phase-II-Proteinen favorisiert (Lu et al. 2023, Dinkova-Kostova et al. 2002, Baird et al. 2013). Die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs mittels Methysticin (MET) wurde bereits in Studien beschrieben (Fragoulis et al. 2017, Liessem-Schmitz et al. 2018). MET ist ebenfalls ein natürlicher Nrf2-Aktivator, gewonnen aus der Pflanze Kava *(Piper methysticum)*, die zur Familie der Pfeffergewächse *(Piperaceae)* gehört. Die biologischen Effekte werden auf Kavalactone zurückgeführt. Seine Wirkung über den Nrf2/ARE-Signalweg hinsichtlich des Gelenkknorpels wurde in der Studie von Kubo et al. untersucht (Kubo et al. 2022). Bei MET-Gabe wurde eine signifikant stärkere Aktivität der SOX9-Promoterregion festgestellt. Die Chondrozytenproliferation blieb in In-vitro-Versuchen dabei unverändert. Die Nrf2-KO-Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant stärkere Gelenkknorpeldegeneration in der Form von Fissuren und Erosionen als osteoarthritischen Zeichen. MET und SFN haben außerdem eine aktivierende Wirkung auf antioxidative Gene des Nrf2/ARE-Signalwegs in Osteozyten. Unter der Einwirkung von oxidativem Stress in der Form von H_2O_2 wurde außerdem eine niedrigere Zelltod-Rate bei SFN-Gabe beobachtet (Dittmar et al. 2024).

1.7.3 Regulation von Nrf2 in verschiedenen Altersstufen

Der eng regulierte Knochenumbau zeigt als dynamischer Prozess je nach Anforderung, Alter, Genetik, hormonellen Faktoren und Geschlecht eine gewisse Variation. Experimentelle Änderungen des Nrf2-Signalwegs korrelieren mit unterschiedlichen Veränderungen, je nach Gewebe und Alter der Versuchstiere.

In einer Studie von Kim et al. wurde beim Vergleich von Nrf2-KO- und WT-Mäusen das Augenmerk auf Knochenzellen gelegt (Kim et al. 2015). Hier war die größte Diskrepanz zwischen den beiden Genotypen im Alter von drei Wochen zu beobachten. Die Anzahl der Osteoblasten pro definierte Knochenlänge war in der

Nrf2-KO-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp um das Zwölffache reduziert. Ab einem Alter von sechs Wochen war kein Unterschied mehr in der Anzahl der Osteoblasten festzustellen. Dabei handelte es sich um aus der *Calvaria* isolierte, primäre Zellen. Auch beim Vergleich der Osteoblasten- und Osteoklasten-Proliferation war kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Nrf2-KO-Gruppe festzustellen. Anhand dieser Studie lässt sich die Bedeutung der Nrf2-Regulation für die Knochenzellen im jungen Alter erkennen. Die Relevanz einer korrekten Regulierung von Nrf2 für das Überleben bei Jungtieren wurde unter 1.7.1 in der genannten Studie von Nobunao Wakabayashi et al. dargestellt (Wakabayashi et al. 2003).

Die Konzentration von ROS nimmt im Alter und bei einer Verminderung von Geschlechtshormonen zu. Diese Folgerung geht aus einer Studie von Almeida et al. hervor (Almeida et al. 2007). Hier korrelierte eine verminderte Konzentration von Sexualhormonen bei weiblichen und männlichen Mäusen mit vermehrtem oxidativem Stress und einem Ungleichgewicht im Knochenumbau zu mehr katabolischen Prozessen und einer erhöhten Knochenfragilität.

In einer Studie mit sechs bis acht Wochen alten Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach Entfernung der Ovarien Thiol-Antioxidantien wie Glutathione und Thioredoxin sowie deren reduzierende Enzyme in reduzierter Konzentration im Knochenmark vorlagen und diese mit einer Gabe von 17-β Estradiol wieder auf ein physiologisches Niveau anstiegen. Gleichzeitig blieb die Konzentration dieser Antioxidantien in anderen Organen wie Leber oder Milz trotz Ovarektomie weitestgehend unverändert. Die Osteoklasten-Anzahl pro Fläche auf der Femur-Oberfläche nahm zu und das Knochenvolumen des Femurs zeigte reduzierte Werte (Lean et al. 2003).

Auch bezüglich Frakturen besteht ein Zusammenhang zwischen Knochenumbau und dem Nrf2-Signalweg. Während der Frakturheilung konnte eine erhöhte Expression von Nrf2 festgestellt werden. Reparatur und Heilung des Knochens laufen im Knockout-Mausmodell bei der Nrf2-KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe verlangsamt ab (Lippross et al. 2014).

1.8 Stand der Forschung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zum Thema von Nrf2 und den qualitativen Eigenschaften des Bewegungsapparats durchgeführt.

Dazu wurden unterschiedliche Nrf2-Aktivatoren auf ihre mögliche Wirkung auf Knorpel- und Knochengewebe erforscht. SFN wurde im Zuge der Osteoarthritis untersucht und schien einen positiven Einfluss auf B-Zellen und die Produktion von Zytokinen zu haben (Moon et al. 2021). In der In-vitro-Studie von Dittmar et al. zeigte sich nach MET-Gabe eine Steigerung von Proliferation und Stoffwechsel in Chondrozyten, während bei SFN-Gabe positive Effekte in Osteozyten unter oxidativem Stress beobachtet wurden (Dittmar et al. 2024).

Der Zusammenhang zwischen Nrf2 und Knochengewebe wurde in einem Knockout-Mausmodell von Lippross et al. beschrieben, in dem eine verspätete Frakturheilung und ein verringertes Kallusvolumen des Femurs in der KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe beobachtet wurde (Lippross et al. 2014). In der Studie von Ibáñez et al. wurde bei sechs bis neun Monate alten ovarektomierten KO-Mäusen eine niedrigere Knochendichte und eine erhöhte Knochenfragilität festgestellt (Ibáñez et al. 2014). Auch in der Studie von Sun et al. wurde bei 16 Wochen alten KO-Mäusen eine signifikant niedrigere Knochendichte und eine reduzierte Knochenbildungsrate im Vergleich zur WT-Gruppe festgestellt (Weitzmann & Pacifici 2006). In der Studie von Park et al. wurden eine erhöhte Osteoklasten-Differenzierung, eine gehemmte Osteoblasten-Differenzierung, gleichzeitig jedoch auch ein verbesserter Knochenanbau bei der Nrf2-KO-Gruppe beobachtet (C. K. Park et al. 2014). In einer späteren Studie von demselben Autor wurde die Bedeutung von Nrf2 auf MYC und somit auf die Osteoklastogenese dargestellt (P. S. U. Park et al. 2020).

In der Studie von Pellegrini et al. wurde ein Nrf2-Knockout-Modell mit 12 und 60 Wochen alten Mäusen zur Untersuchung herangezogen (Y. X. Sun et al. 2015). Es konnte beobachtet werden, dass bei der Deletion von Nrf2 weder bei männlichen noch bei weiblichen Mäusen eine kompensatorische Erhöhung der Faktoren Nrf1 oder Nrf3 stattfand. Gegensätzliche Effekte zeigten sich bezüglich der Knochendichte, die bei der weiblichen KO-Gruppe reduziert, bei der männlichen KO-Gruppe jedoch im Vergleich zur jeweiligen WT-Gruppe erhöht war. In der Studie von Yin et al. wurde durch heterozygote Unterdrückung des Keap1-Gens

(Keap1 Ht) eine moderate Aktivierung von Nrf2 bewirkt (Yin et al. 2020). Die µCT-Messungen ergaben bei den männlichen Keap1-Ht-Tieren ein signifikant erhöhtes Trabekel-Volumen am distalen Femur im Vergleich zur WT-Gruppe. Hinsichtlich der Knochenformations- und Mineralisationsrate am distalen Femur waren bei beiden Geschlechtern keine Unterschiede in der µCT zu beobachten. Die TRAP-Färbung zeigte bei den männlichen Keap1-Ht-Mäusen eine signifikant niedrigere Osteozytenzahl am distalen Femur im Vergleich zur WT-Gruppe. In den weiblichen Gruppen waren keine Unterschiede feststellbar. Eine Färbung der neugeborenen männlichen Gruppen mit Alcianblau und Alizalin zeigte eine frühere Mineralisation des Knochens bei der Keap1-Ht-Gruppe, verglichen mit der männlichen WT-Gruppe.

In der Studie von Sánchez-de-Diego et al. wurde die Bedeutung von Nrf2 für Osteozyten und die Knochenhomöostase untersucht (Sánchez-de-Diego et al. 2021). Hierfür wurden primäre Zellen aus Mäusen isoliert, an denen ein Osteozyten-spezifischer Nrf2-Knockout durchgeführt wurde. Im Alter von acht Wochen wurde entweder eine Ovarektomie oder eine Sham-Operation durchgeführt, ähnlich wie in der oben genannten Studie von Sun et al. (W. Sun et al. 2022). Ein Teil der Tiere wurde mit Dimethyl-Fumarat (DMF) behandelt, um dessen aktivierenden Effekt auf Nrf2 und Osteoporose zu untersuchen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Finalisierung und anschließenden Gewebeentnahme 16 Wochen alt. Die µCT-Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Ovarektomie- und Kontrollgruppe bezüglich der Knochenparameter. Auch zwischen den Gruppen mit und ohne DMF-Behandlung wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Die relative Trabekeldichte war bei den Tieren nach Ovarektomie signifikant niedriger als in der respektiven Sham-Gruppe und konnte nach DMF-Behandlung signifikant erhöht werden. Histologisch konnte eine höhere Osteoklasten-Anzahl in der Gruppe nach Ovarektomie festgestellt werden, die in den Tieren nach DMF-Behandlung reduziert werden konnte. Die n-Anzahl der Versuchstiere wurde als zwischen sieben und elf angegeben.

In der Arbeitsgruppe von Kubo et al. wurden Knocheneigenschaften von weiblichen Nrf2-KO und -WT-Mäusen u. a. mittels µCT-Messungen und immunhistologischer Färbungen verglichen. Die älteren 90 Wochen alten Mäuse zeigten in der KO-Gruppe reduzierte Werte bezüglich der Knochendichte, der Kortikalisdicke, der kortikalen Fläche und des relativen Knochenvolumens (Kubo et al. 2022a).

Die vorläufigen Daten zur immunhistologischen Auswertung ergaben erhöhte Werte von Osteoklasten und weniger Aromatase-positive Osteozyten in der älteren KO-Gruppe als in der WT-Gruppe. In den jungen adulten Gruppen waren hingegen keine signifikanten Unterschiede feststellbar, was auf einen altersabhängigen Effekt eines Mangels von Nrf2 hinweist.

2 ZIELSETZUNG

Das vorliegende Projekt widmet sich den möglichen Effekten von Nrf2 auf Knochen- und Knorpelstrukturen im Femur im Rahmen eines Nrf2-Knockout-Mausmodells. Das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Finalisierung betrug 12 und 90 Wochen. In meinem Projekt sollte die histologische Struktur von Knochen und Knorpel junger und alter WT- und Nrf2-KO-Mäuse untersucht werden. Die histologische Beurteilung soll zur Verifizierung vorliegender µCT-Daten dienen, die im Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen auf Grundlage derselben Mausgruppen analysiert worden sind.

Vorab wurden Versuche an immortalisierten Chondrozyten der C28/I2-Zelllinie durchgeführt, um die knorpelprotektiven Effekte der Nrf2-Aktivatoren SFN und MET zu untersuchen.

Für die histologische Analyse wurden Schnitte angefertigt, um anschließend anatomische Strukturen und Zelltypen in den unterschiedlichen Tiergruppen auszuwerten. Anhand von Übersichtsfärbungen wurden hier in Schaftmitte des Femurs die relative kortikale Knochendicke, die Osteozyten-Anzahl und in der Gelenkspaltregion die Dicke des Gelenkknorpels und die Breite der Wachstumsfuge ausgewertet.

Hypothese: Es wird davon ausgegangen, dass die Nrf2-Aktivatoren SFN und MET einen positiven Effekt auf die Chondrozytenvialibität haben. Weiterhin wird vermutet, dass Knochenstrukturen wie die Kortikalis des Femurs in den Nrf2-KO-Gruppen insgesamt schwächer ausgebildet sind und möglicherweise eine geringere Osteozyten-Anzahl in dieser Region aufweisen. Außerdem wird mit einer geringeren Knorpeldicke gegenüber der WT-Gruppe gerechnet, da diese anatomischen Strukturen in vorangegangenen Studien eine erhöhte Fragilität aufwiesen (Y. X. Sun et al. 2015, Kubo et al. 2022, Kubo et al. 2022a).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Nrf2-Knockout-Mausmodell und Präparate

Die für die Versuchsproben verwendeten Mäuse (Mausstamm 57BL/J6) waren als Nrf2-WT ($Nrf2^{+/+}$) und als Nrf2-KO ($Nrf2^{-/-}$) gekennzeichnet und nach dem Protokoll von Kaimin Chan erzeugt (Chan et al. 1996). Sie wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Fragoulis und Herrn Beckmann zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse waren bei Tötung 12 und 90 Wochen alt und wurden bis zu diesem Zeitpunkt unter den gleichen Voraussetzungen im Tierlabor des Uniklinikums Aachen aufgezogen. Die Belichtung folgte einem Zyklus von 12 Std. hell, 12 Std. dunkel und die Mäuse, je zu fünf Tieren in einem Käfig, hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Bestimmung der Mäuse zur 12 Wochen und 90 Wochen alter WT- und Nrf2-KO-Gruppe erfolgte zufällig. Die Finalisierung der Mäuse wurde gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes und der *European Animal Research Association (killing notification protocol No. 40108A4)* durchgeführt.

Die histologischen Präparate wurden vom Institut für Anatomie und Zellbiologie in Aachen zur Verfügung gestellt. Hier fanden auch die Gewebeentnahme, Fixierung und Entkalkung statt. Die Fixierung und Einbettung der Gewebeproben erfolgte mithilfe von Methacarn und Paraffin. Von den hergestellten Paraffinblöcken wurden in longitudinaler Ausrichtung Serienschnitte des Femurs angefertigt und im Institut aufbewahrt. Diese wurden für die histologischen Übersichtsfärbungen und die Etablierung von immunhistologischen Färbungen genutzt.

3.2 Geräte und Chemikalien

Für den Zweck von Reproduzierbarkeit der Versuche und Auswertungen werden im Folgenden die verwendeten Mengen- und Herstellerangaben sowie Materialien, Chemikalien, Geräte und Programme aufgelistet.

Verbrauchsmaterialien	**Hersteller**
Eppendorfgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-One International AG, Frinkenhausen (Österreich)

Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen 10,6 cm	Greiner Bio-One International AG, Frinkenhausen (Österreich)
Pipettenspitzen	G. Kisker-Products für Biotechnology, Steinfurt
Serologische Pipetten	Vitalis, Baar (Schweiz)
6-, 12- und 96-Well-Platte	Greiner Bio-One International AG, Frinkenhausen (Österreich)
96-Well EIA/RIA Platte	Costar Corning Incorporated, New York (USA)
Zellkulturflaschen T-25, T,-75	Greiner Bio-One International AG, Frinkenhausen (Österreich)

Chemikalien	**Hersteller**
AEC	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alkohol 96 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aqua dest.	-
Aquatex	Sigma-Aldrich, Artikel-Nr.: 108562
Blockierung A	ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit
Depex	Serva, Heidelberg, Deutschland
Eosin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Laborchemie, Lohmar, Deutschland
Glyceringelatine	Sigma-Aldrich, Ref.: 1086350100
Hämatoxilin	Merck, Sigma-Aldrich, Deutschland
HRP-Polymer C	ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylgrün	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt

Puffer und Lösungen	Hersteller
TRAP-Färbelösung:	
40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat	Merck, Sigma-Aldrich, Deutschland
4 ml N-N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
240 mg Fast Red Violett LB Salt	Merck, Sigma-Aldrich, Deutschland
2 ml Triton X	Merck, Darmstadt, Deutschland
200 ml TRAP-Puffer: pH = 3,25; 5,0; 10	s.u.
TRAP-Puffer: pH = 3,25; 5,0; 10	
3,28 g Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
46,01 g Natriumtartrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Puffer: pH = 7,6	50 mM Trizma base: pH 7,6
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20 pure	Serva, Heidelberg

Verwendete Antikörper

Spezifität (anti-)	Spezies	Verdünnung	Hersteller
CD68	Maus	1:100	SantaCruz, Heidelberg
TRAP	Kaninchen	1:400	SantaCruz, Heidelberg

Zellkultur und Zusätze	Hersteller
Cell Titer-Blue® Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Medium:	
Dulbecco's modified eagle's medium 470ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

10 % fetales Kälberserum (FKS) 12,5ml	GIBCO Invitrogen GmbH, Darmstadt
1 % Penicillin und Streptomycin (PeSt) 5ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Fluka Analytical Sigma-Aldrich Chemie GmbH
VE-Wasser	-
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 3 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zelllinie C28/I2	Merck, Darmstadt, Deutschland

Geräte	**Hersteller**
Absauganlage	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Elektronische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Feinwaage	ALC-Feinwaage, Sartorius AG, Göttingen
Infinite® M200	Tecan Trading AG, Männedorf (Schweiz)
Inkubator	New Brunswick Scientific, CO2-Inkubator, Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank	Bosch, Reutlingen
Laborwaage	BL1500 Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskop	Eclipse TS 100, Nikon GmbH, Düsseldorf
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mikrotom	pfm Slide Schlittenmikrotom, pfm AG Köln
Mikroskop	Biorevo BZ-9000 microscope, Keyence
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik, Friedrichsdorf
pH-Meter	pH 522, WTW GmbH, Weilheim

Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler IKA M53 Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sterilbank	Holten Lamin Air, Jouna GmbH, Unterhaching
Sterilbank	SterilGard Class II Typ A/B3, The Baker Company, Maine (USA)
Stickstofftank	Taylor Wharton GmbH, Mildstedt
Thermocycler	2720 Thermo Cycler, Applied Biosystems, Darmstadt
Tiefkühltruhe -30°C	Bosch, Reutlingen
Tiefkühltruhe -70°C	GFL, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	AquaLine AL25, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Cetrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	UNIVERSAL 32R, Hettich AG, Bäch, Schweiz

Programme	**Hersteller**
Graphpad Prism	Dotmatics, Version 9.5.0
ImageJ	Version 1.54b Wayne Rasband, National Institutes of Health
Mendeley Reference Manager	2.84.0 © 2023 Mendeley Ltd.
Photoshop	Adobe, Version CS2
Word 2021, Excel	Microsoft Corporation

3.3 Zellkultur und Färbungen

3.3.1 Auftauen der Zellen

Bei der Herkunft der Zellen handelte es sich um die humane Chondrozyten-Zelllinie C28-I/2 nach Mary Goldring, die zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Reparaturmechanismen des Knorpels dienen (Goldring et al.

1994). Die Zellen wurden bei -196 °C in Stickstoff gelagert und bei 37 °C aufgetaut. Daraufhin wurden sie mit 5 ml Kulturmedium in ein 15 ml Falkonröhrchen gegeben und fünf Min. bei 1500 rcf *(relative centrifugal force)* zentrifugiert. Dies wurde zwei Mal wiederholt, um das Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig zu lösen. Anschließend wurde erneut frisches Kulturmedium ins Falkonröhrchen hinzugegeben, mit einer Pipette resuspendiert, in eine T-75-Kulturflasche pipettiert und bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

3.3.2 Kultivierung und Zelltrennung

Die Zellkultivierung erfolgte bei 37 °C im Inkubator, bei einem CO_2-Partialdruck von 5 % und unter 95 % gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Das Kulturmedium bestand aus DMEM-F12 Medium, 10%igem fetalen Kälber-Serum (FKS) und 1%igem Penicillin und Streptomycin. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald die Zellen 80 % bis 85 % der Konfluenz erreichten, wurden diese passagiert bzw. getrennt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde sodann verworfen und der Zellpellet vom Flaschenboden abgelöst. Das Ablösen erfolgte über eine enzymatische Reaktion mithilfe von 500 µl Trypsin/EDTA zwei Min. lang im Inkubator. Diese wurde daraufhin unter dem Lichtmikroskop auf ihre vollständige Abtrennung überprüft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Der Zellpellet wurde für 5 Min. bei 1250 rcf zentrifugiert, mit neuem Medium verdünnt und auf Kulturflaschen für die weitere Kultivierung verteilt.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der definierten Zellmenge wurden eine Neubauer-Zählkammer, ein Lichtmikroskop und der Farbstoff Trypanblau eingesetzt. Dieser Farbstoff diffundiert lediglich die Membran toter Zellen, indem er mit seinen Anionen eine Bindung mit den Kationen der Proteine des Zytoplasmas eingeht. Die hellen, vitalen Zellen werden unter dem Lichtmikroskop somit erkennbar und können ausgezählt werden. Hierfür wurde die Mischung aus 50 µl Zellsuspension und 50 µl Trypanblau mittels Kapillarröhrchen in die Neubauer-Zählkammer überführt. Die Fläche unter dem Deckglas der Zählkammer ist in vier große Quadrate untereilt, welche in weitere 16 kleine Quadrate unterteilt ist. Das Volumen der großen Quadrate beträgt jeweils 0,1 mm^3 bzw. 0,1 µl. Mit der folgenden Formel kann

grundsätzlich die Zellanzahl/ml bzw. die Zellanzahl in der Neubauer-Zählkammer berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellanzahl}}{\text{ml}} = \frac{(\text{Zellanzahl aus vier Großquadraten})}{4 * 10^4}$$

Die Formel wird dahingehend korrigiert, als dass die Zellzahl mit der Verdünnung durch das Trypanblau angepasst wird:

$$\text{Gesamtzellanzahl} = \left(\frac{\text{Zellanzahl}}{\text{ml}}\right) * \left(\text{Volumen der Zellsuspension(ml)}\right) * (\text{Verdünnungsfaktor})$$

3.3.4 Zellbehandlung mit Nrf2-Aktivatoren

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und gezählt, um in der 96-Well-Platte pro Well 10 000 Zellen auszusäen (1000 Zellen/ml). Die ersten 18 bis 24 Std. wurden die Zellen im Vollmedium im Inkubator kultiviert. 24 Std. vor der Stimulation wurde die FKS-Menge auf 5 %, 2 % und 1 % reduziert. Daraufhin erfolgte 18 Std. lang über Nacht die Zellbehandlung mit den Nrf2-Aktivatoren SFN bzw. MET. Für die Stimulation der Chondrozyten-Zellkultur wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen von SFN (2,5 µM, 5 µM, 10 µM) und MET (6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM) gearbeitet. Als Nährmedium wurde 1%iges FKS eingesetzt. Daneben wurden Proben ohne Stimulation und eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Abschließend erfolgte eine zweistündige Stimulation mit H_2O_2 (30 %).

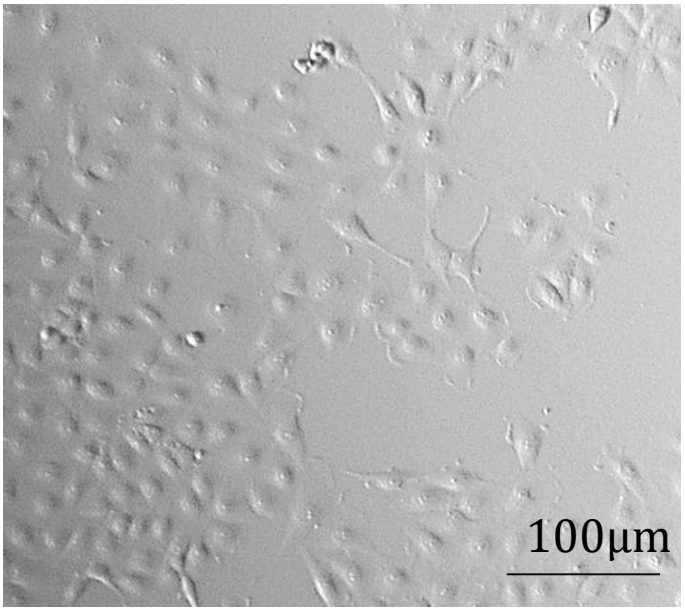


Abbildung 1 Zellkultivierung von C2/I2-Chondrozyten in Zellmedium; Skala: 100 µm

3.3.5 Ermitteln der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue*®Assay

Um die Mitochondrien-Aktivität der Zellen nach der Behandlung von Nrf2-Aktivatoren mit und ohne H_2O_2 auszuwerten, wurde das *CellTiter-Blue*® Reagenz eingesetzt, das einen blauen Redoxfarbstoff enthält. Dieser wird von stoffwechselaktiven Zellen zu pinkfarbenen fluoreszierten Resorufin umgewandelt. Die Messung des dabei entstehenden Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe des Infinite® M200. Mit diesem Gerät, auch Platten-Reader genannt, können u. a. die Fluoreszenz-Spektren und die zeitaufgelöste Fluoreszenz gemessen werden. Vorliegend wurde die Messung bei einer Extension von 560 nm und einer Emission von 590 nm durchgeführt.
Zwei Std. nachdem zu den Zellen 72 µl des 1:5 mit Phenolrot freiem und das mit DMEM verdünnte *CellTiter-Blue* Reagenz pipettiert wurde, wurden die fluorometrischen Signale mithilfe des Platten-Readers ermittelt. Drei Wells wurden für Kontrollzwecke mit dem in DMEM verdünnten Reagenz befüllt und als *Backround* von den ermittelten Rohdaten abgezogen.

3.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte zweimal je zehn Min. in Xylol getaucht und anschließend zweimal je fünf Min. in Isopropanol. Danach folgten je fünf Min. in Alkohol (96 %, 70 %). Die Schnitte wurden ein bis zwei Min. in Aqua dest. gespült, bevor sie zehn Min. lang in Hämatoxylin gefärbt wurden. Für die darauffolgende Bläuung der Gewebeschnitte wurden diese acht Min. unter fließendes Leitungwasser gestellt. Weiterhin wurden die Schnitte ein bis drei Min. in Eosin gefärbt und in destilliertem Wasser abgespült. Für das Entfernen überschüssiger Farbe folgte das Eintauchen der Schnitte für eine Min. in 70%igem Alkohol. Hier schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe an, die aus je zwei Min. im 80%- und 96%igem Alkohol und zweimal je fünf Min. in Isopropanol bestand. Zum Schluss wurden die Schnitte zweimal je zehn Min. in Xylol gegeben, bevor sie mit Depex eingedeckelt wurden.

3.3.7 Etablierung der TRAP-Färbung auf Methacarn-fixierten Proben

Mithilfe der TRAP-Färbung sollte die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP 5b) in Osteoklasten angefärbt werden. Die Tartrat-resistente-saure-Phosphatase ist ein Enzym, das eine Reihe von Phosphatase-Estern und Anhydriden

hydrolysiert. Die intensive Farbe ist auf die Bindung von Metall-Ionen zurückzuführen, hier in der Form von Eisen-III-Atomen (Jemtland et al. 1998). TRAP spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Knochenentwicklung und den Knochenumbau (Roberts et al. 2007).

Auch bei der TRAP-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie zweimal je 10 Min. in Xylol und zweimal je zwei Min. in unterschiedliche Konzentrationen einer absteigenden Alkoholreihe getaucht (100 %, 96 %, 80 %, 70 %). Für die Reaktion mit TRAP wurden die Schnitte zunächst zehn Min. in TRAP-Puffer platziert, um sie danach zwei Std. bei 37 °C in der TRAP-Färbelösung im Inkubator zu färben. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Hierfür wurden die Schnitte zehnmal kurz in das Hämatoxylin eingetaucht und zum Schluss mit Aqua dest. abgespült. Zum Eindeckeln wurde Glyceringelatine (Kaiserglycerin) verwendet. Diese Färbung wurde in drei Varianten getestet, indem der TRAP-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt wurde (3,25; 5; 10). Die verschiedenen TRAP-Puffer wurden auch jeweils für die Herstellung der TRAP-Färbelösungen benutzt. Der Versuchsablauf blieb dabei erhalten.

3.3.8 Immunhistochemische Färbung CD68

Die immunhistochemische Färbung wurde anhand des Protokolls für das Zyto-Chem-Plus HRP Polymer-Kit durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte zweimal je zehn Min. in Xylol, zweimal je fünf Min. in Ethanol und fünfzehn Min. in 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Der darauffolgende Waschschritt fand zweimal je zehn Min. in einer Lösung aus Tris und Tween statt. Die Blockierung „A“ wurde 15 Min. lang auf die Schnitte gegeben und zehn Min. mit Tris gewaschen. Daraufhin wurde der primäre Antikörper auf den Proben gleichmäßig verteilt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate als erstes zweimal je fünf Min. mit Tris-Puffer gewaschen, und danach das Verstärkungs-Reagenz „B“/2 für zwanzig Min. auf den Proben aufgetragen. Es folgten zwei Waschschritte je fünf Min. mit Tris-Puffer und das Aufbringen des HRP-Polymers (C) für dreißig Min. Anschließend wurden die Schnitte erneut zweimal je fünf Min. mit Tris-Puffer gewaschen, um sodann für wenige Min. vollständig mit AEC bedeckt zu werden. Dieses wurde entfernt, indem die Schnitte zweimal je fünf Min. in Aqua bidest. gegeben wurden. Abschließend wurden die

Proben zehn Min. lang in Leitungswasser gewässert und mit Aquatex eingedeckelt.

3.3.9 Immunhistochemische Färbung TRAP

Für die immunhistochemische Färbung mit TRAP wurde ein Protokoll für Streptadivin-Biotin-Paraffin-Schnitte herangezogen. Die Gewebeschnitte wurden hierfür zwei Mal fünf Min. in Xylol (I, II) und sodann in Wasserstoffperoxid (3 %) gegeben. Es folgten zwei Waschschritte in Tris-Puffer und eine Blockierung mit Kaninchen-Serum für 15 Min. Die Proben wurden erneut in Tris-Puffer gewaschen, bevor der primäre Antikörper aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der Primärantikörper bestand aus einem polyklonalen Antikörper Rabbit gegen Maus, der TRAP-1 detektiert.

Am Folgetag wurde erneut mit zwei Waschschritten begonnen, um anschließend den sekundären Antikörper auf die Gewebeproben zu pipettieren und sie nach 30 Min. zweimal in Tris zu waschen. Danach wurde auf die Schnittpräparate AEC gegeben und diese sodann für 30 Min. bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Die Gegenfärbung erfolgte nach zweimaligem Eintauchen in Aqua bidest. mit Hämalaun. Abschließend wurden die Femur-Präparate gewässert und mit Aquatex eingedeckelt.

3.4 Histologische Auswertung von Knochen- und Knorpelgewebe

3.4.1 Dicke des Gelenkknorpels

Zur histologischen Auswertung der Dicke des Gelenkknorpels am distalen Femur wurden Bilder mithilfe eines Nikon-Mikroskops angefertigt und mit dem Programm Photoshop Distanzen im Bild markiert und ausgemessen. Dabei wurden je Maus drei Schnitte herangezogen, auf denen das distale Femur in sagittaler Ebene möglichst mittig abgebildet ist. Der zum Gelenkspalt angrenzende Bereich des Gelenkknorpels wurde in drei bis fünf Bildern pro Schnitt in 20-facher Vergrößerung mit Markierung der Skala festgehalten. Anschließend wurden je Bild mithilfe des Programms Photoshop drei bis fünf tangential platzierte Markierungen in gleichmäßigen Abständen voneinander gesetzt, um eine zufällige Verteilung der Markierungen zu gewährleisten, siehe Abbildung 2. Für die Ausmessung wurde das Verhältnis der Skala und absoluter gemessener Länge im Bild herangezogen. Es wurde darauf geachtet, dass die Bilder immer in der gleichen Größe aufgerufen (1 cm = 31,25 µm) und in der gleichen Belichtung fotografiert wurden.

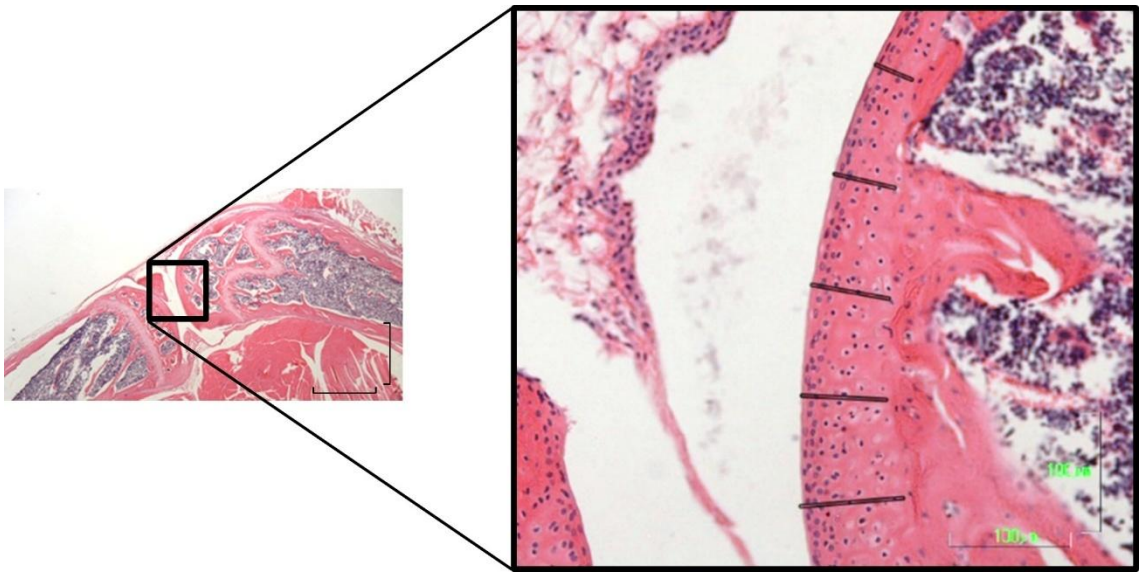


Abbildung 2 Ausschnitt links aus Übersichtsbild distales Femur Maus, HE-Färbung, 2-faches Objektiv, Skala: 1000 µm, rechts Wachstumsfuge 20-faches Objektiv, Breite des Gelenkknorpels an fünf zufälligen Lokalisa-tionen in gleichmäßigen Abständen gemessen, Messlinien senkrecht von Knorpel-Kortikalis-Grenze zum Gelenkspalt ausgerichtet, Skala: 100 µm

3.4.2 Breite der Wachstumsfuge

Bei der Messung der Breite der Wachstumsfuge in der distalen Femur-Region wurde wie bei der Auswertung des Gelenkknorpels wie in 3.4.1 beschrieben vorgegangen. Auch hier wurden pro Maus je drei Schnitte und pro Bild drei bis fünf Areale in gleichmäßigen Abständen voneinander platziert. Auf diese Weise wurde immer ein Durchschnittswert der gesamten fotografierten Wachstumsfuge ermittelt. Die Enden der Markierungen trafen senkrecht auf die Knorpel-Knochen-Grenze, wie in Abbildung 3 gezeigt. Dies entsprach meist einer parallelen Ausrichtung zum Säulenknorpel, besonders bei den Schnitten jüngerer Tiere. Die Ausmessung der Markierungen erfolgte anhand von Bildern in 20-facher Vergrößerung, die zuvor mit dem Nikon-Mikroskop aufgenommen und im Programm Photoshop markiert wurden.

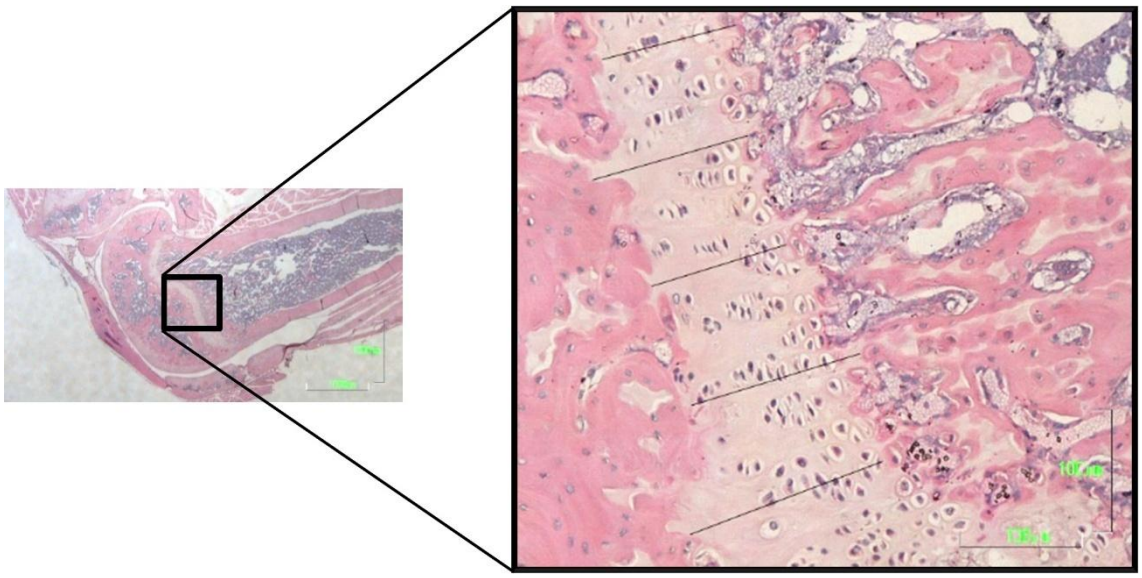


Abbildung 3 Ausschnitt links aus Übersichtsbild distales Femur Maus, HE-Färbung, 2-faches Objektiv, Skala 1000 µm, rechts Wachstumsfuge 20-faches Objektiv, Höhe der Wachstumsfuge an fünf zufälligen Lokalisationen gemessen, beginnend ca. 30 µm vom oberen Bildrand entfernt in gleichmäßigen Abständen, Ausrichtung der Messung parallel zum Säulenknorpel; Skala: 100 µm

3.4.3 Relative Kortikalisdicke in Femurschaft

Das auszuwertende Bildmaterial wurde hierfür mit dem Keyence-Mikroskop aufgenommen, da für die Ausmessung ein größerer Bereich aus vielen Bildern für ein *Merge*-Bild zusammengesetzt wurde. Diese *Merge*-Bilder zeigen einen ca. 1000 µm langen Abschnitt des waagerecht abgebildeten Femurknochens, der möglichst mittig im Schaftbereich gewählt war, wie in Abbildung 4 dargestellt. Pro Maus wurden je drei Schnitte gewählt, die in sagittaler Ebene mittig positioniert wurden. Dies wurde mithilfe der Übersichtsbilder in 2-facher Vergrößerung kontrolliert. In der Mitte der Femurschafts wurden drei Lokalisationen auf einer Gesamtlänge von 800 µm entlang der Kortikalis zufällig gewählt, um die Dicke des Femurknochens zu messen. Dazu wurde die insgesamte Dicke des Röhrenknochens samt Knochenmark gemessen und zur korrespondierenden reinen Kortikalisdicke ins Verhältnis gesetzt. Damit erhält man pro Präparat drei relative Werte, die sich je durch eine absolute Zahl darstellen lassen und sich auf diese Weise pro Maus ein Gesamtdurchschnittswert ergibt.

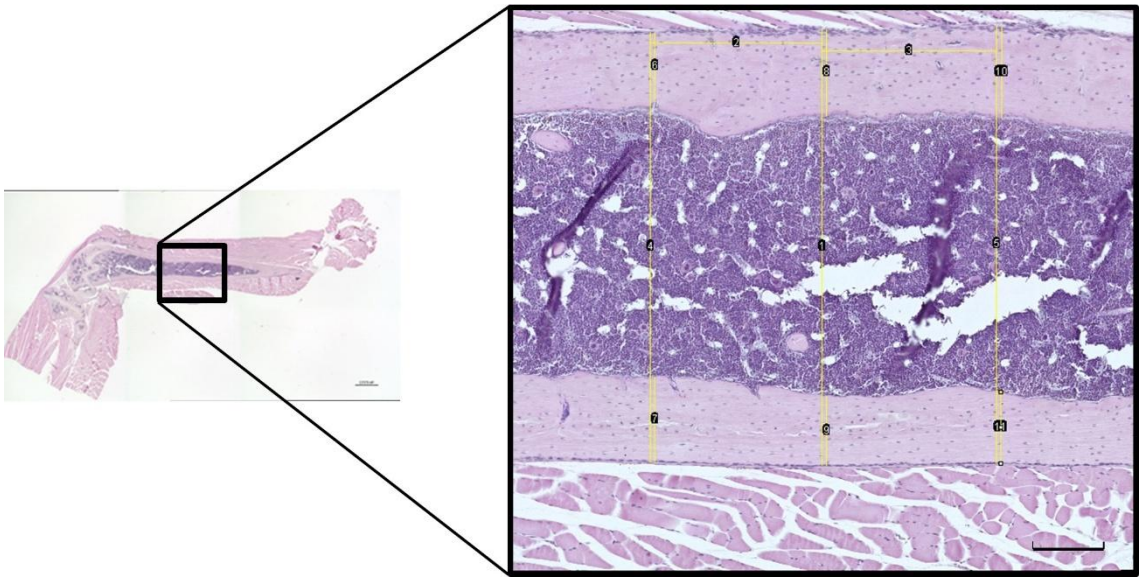


Abbildung 4 Übersichtsbild links Femur Maus, Skala: 1000µm, HE-Färbung, rechts Ausschnitt Schaftmitte Femur, Merge-Bild 20-faches Objektiv, gelbe Markierungen stellen drei Messpunkte dar, 4= distal, 1= zentral, 5= proximal des Femurs, relative Kortikalisdicke wurde im Verhältnis zur Gesamtdicke des Femurs gemessen; Skala: 200 µm

3.4.4 Ermittlung der Osteozytenzahl in Femurschaft

Für die Ermittlung der durchschnittlichen Osteozytenzahl pro Fläche wurde der gleiche Bereich in Schaftmitte markiert wie für die Messung der relativen Kortikalisdicke, beschrieben unter 3.4.3. Pro Versuchstier wurden drei Schnitte gewählt wie unter 3.4.3 dargestellt und mit dem Keyence-Mikroskop fotografiert. Auf einer Länge von 1000 µm wurden pro Schnitt in dieser Region zwölf gleich große Flächenmarkierungen in regelmäßigen Abständen voneinander entlang des Femurknochens platziert.

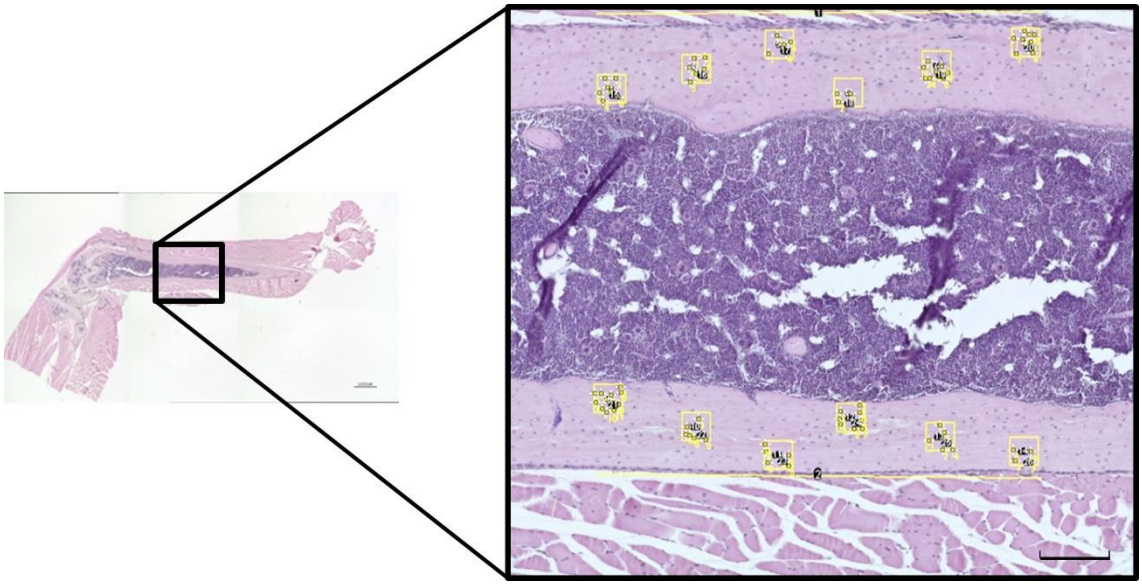


Abbildung 5 Übersichtsbild links Femur Maus, Merge-Bild, HE-Färbung, Skala: 1000 µm, rechts Schaftmitte Femur, Merge-Bild 20-faches Objektiv, gelb markierte Flächen stellen je Fläche von 65 µm² dar, davon sechs Areale in der anterioren und sechs Areale in der posterioren Sagittalebene in regelmäßigen Abständen verteilt, Gesamtlänge festgelegt auf 800µm („1“ und „2“ im Bild); Skala: 200 µm

Die Größe der Fläche betrug jeweils (65 ± 1) µm². Als Osteozyten wurden nur vdiejenigen Zellen als positiv gewertet, deren dunkelblauer Zellkern eindeutig angeschnitten war. Zellkerne, die nur teilweise angeschnitten oder sich nur partiell in der definierten Fläche befanden, wurden mitgezählt, wenn sie die obere und die rechte Begrenzung der Fläche überschritten. Zellkerne, die am unteren und linken Rand der gekennzeichneten Areale angrenzten wurden nicht mitgezählt. Es wurden auch die eindeutig erkennbaren Lakunen ohne erkennbaren Zellkern gezählt und separat ausgewertet. Die Markierung und Zählung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ.

3.4.5 Scoring der Gelenkoberfläche

Für die Bewertung der Gelenkoberfläche wurde ein Scoring-System von 0 bis 3 herangezogen, dargestellt in Tabelle 1. Dabei entspricht 0 einer glatten Gelenkoberfläche, 1 einer kontinuierlichen Oberfläche mit Unebenheiten, 2 einer diskontinuierlichen Gelenkoberfläche und 3 dem Auftreten von vertikalen Einbrüchen. Aufgrund der begrenzten Anzahl männlicher Tiere wurden hier ausschließlich weibliche Nrf2-KO und WT-Tiere im Alter von 12 und 90 Wochen miteinander verglichen. Das Scoring-System orientiert sich am Grading-System von Pritzker et al. (Pritzker et al. 2006). Dabei wurde auf die Grade 4 bis 6 verzichtet, da Erosionen (Grad 4) und deformierter Knochen (Grad 6) nicht mit Sicherheit feststellbar waren und ein vollständiger Verlust von Gelenkknorpel (Grad 5) bei keinem der Tiere zutreffend war. Zu diesem Grading-System liegen auch Beispielbilder in HE-Färbung vor, die als Referenz hinzugezogen worden sind. Je Versuchstier wurde die gesamte Gelenkfläche fotografiert und pro Bild in 20-facher Vergrößerung je nach Auftreten der Kriterien ein Grad von 0 bis 3 zugeordnet, um einen Mittelwert pro Schnitt und Maus zu erhalten.

Tabelle 1 Scoring für die Bewertung der Gelenkoberfläche am distalen Femur Maus

Grad	Befund
0	Ohne Befund, glatte Oberflächenbeschaffenheit der Gelenkoberfläche
1	Gelenkoberfläche mit Unebenheiten
2	Diskontinuierliche Gelenkoberfläche
3	Vertikale Einbrüche in Gelenkoberfläche

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde mithilfe von *Graphpad Prism 9* durchgeführt *(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)*. Die Mittelwerte pro Maus wurden dabei vorher mit Microsoft Excel ermittelt und anschließend entweder mithilfe des t-tests oder der *two-way* Analyse (ANOVA) auf Signifikanz überprüft. Auch die Standardabweichungen wurden mit *Graphpad Prism 9* bestimmt und je als Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert

(SEM) in den Graphen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit * und # gekennzeichnet und entsprechen einem p-Wert < 0,05.

4 ERGEBNISSE

4.1 Nrf2-Aktivatoren und Chondrozytenviabilität

Die Zellen der humanen C28/I2-Chondrozyten wurden zuvor aufgetaut, kultiviert und getrennt. Das Kulturmedium bestand aus DMEM-F12 Medium, 10%igem fetalem Kälber-Serum (FKS) und 1%igem Penicillin und Streptomycin. Die Stimulation der C28/I2-Chondrozyten-Zellkultur erfolgte mit drei verschiedenen Konzentrationen von SFN: 2,5 µM, 5 µM und 10 µM. Daneben wurden Proben ohne SFN-Stimulation und eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Nach 18 Std. wurde zu der Hälfte der Proben 400 µl H_2O_2 dazugegeben. Daraufhin folgte die Färbung der Zellen mittels CellTiter-Blue®Assay und die Messung mithilfe des Infinite® M200 bei einer Extension von 560 nm und einer Emission von 590 nm.

Bei den Zellen der Kontrollgruppe ergab die Behandlung mit H_2O_2 ohne Aktivator-Zugabe, wie in Abbildung 6 links dargestellt, eine Reduzierung der Zellviabilität. Die Zellen, die mit einer SFN-Konzentration von 2,5 µM behandelt wurden, zeigten eine signifikant verbesserte Zellviabilität im Vergleich zu den mit H_2O_2 behandelten C28/I2-Chondrozyten ohne SFN-Gabe. Eine höhere Konzentration der SFN-Gabe (5 µM und 10 µM) führte zu keiner weiteren Verbesserung der Zellviabilität.

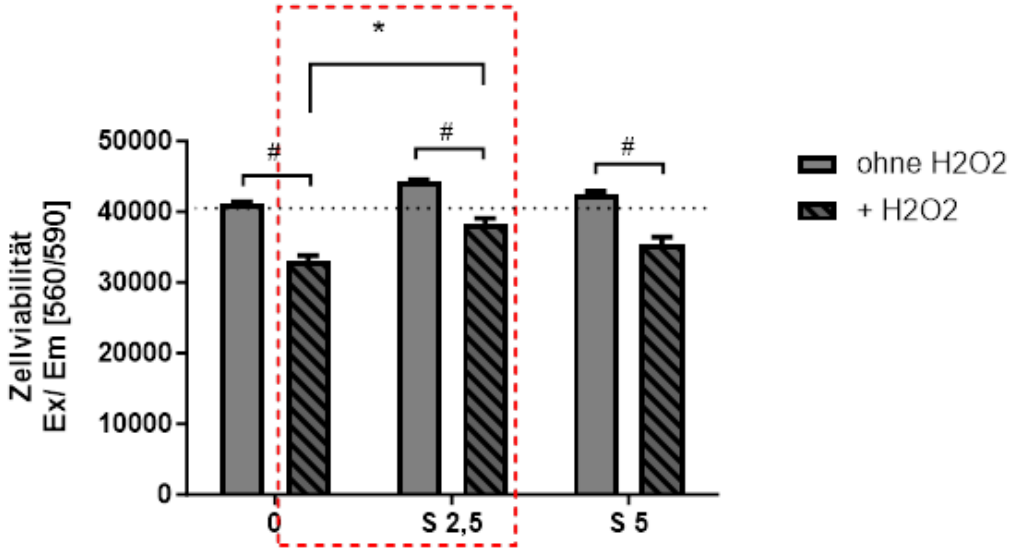


Abbildung 6 Zellviabilität der C28/I2-Chondrozyten bei Stimulation mit L-Sulforaphan (S), Konzentration in µM

Vor der Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator MET wurden die humanen C28/I2-Chondrozyten aufgetaut, kultiviert und getrennt. Das Kulturmedium bestand aus DMEM-F12 Medium, 10%igem FKS und 1%igem Penicillin und Streptomycin. Die Stimulation der C28/I2-Chondrozyten-Zellkultur erfolgte mit drei verschiedenen Konzentrationen von MET: 6,5 µM, 12,5 µM und 25 µM. Daraufhin folgte die Färbung der Zellen mittels CellTiter-Blue®Assay und die Messung mithilfe des Infinite® M200 bei einer Extension von 560 nm und einer Emission von 590 nm.

Die Hälfte der Zellproben wurde nach MET-Zugabe H_2O_2 ausgesetzt und eine Negativkontrolle wurde durchgeführt. Auch hier war bei der Zugabe von H_2O_2 jeweils eine signifikante Abnahme der Zellviabilität zu erkennen. Ähnliche Effekte zeigten sich bezüglich der Konzentration des Nrf2-Aktivators. Bei einer Konzentration des MET von 6,25 µM war eine signifikante Zunahme der Zellviabilität messbar, wie in Abbildung 7 dargestellt. Zwischen den Zellen mit H_2O_2-Behandlung war bei einer Stimulation mit dieser Konzentration eine signifikant erhöhte Zellviabilität im Vergleich zur nicht-stimulierten Zellgruppe mit reiner H_2O_2-Gabe zu erkennen. Erhöhte man die MET-Konzentration auf 12,5 µM, befand sich die Zellviabilität etwa auf dem Niveau der nicht stimulierten Zellen. Bei einer Konzentration von 25 µM befand sie sich unter dem Wert der nicht stimulierten Zellen.

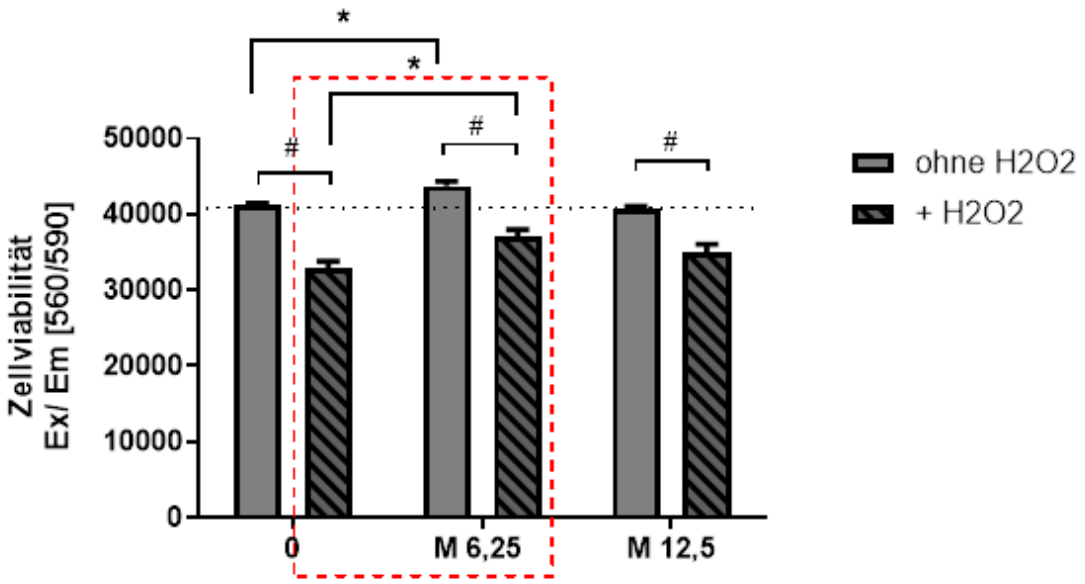


Abbildung 7 Zellviabilität der C28/I2 Chondrozyten bei Stimulation mit Methysticin (M), Konzentration in µM

4.2 Knorpeldicke am distalen Femur

Die Knorpeldicke wurde mithilfe von HE-Übersichtsfärbungen gemessen, mit drei Schnitten pro Versuchstier, mindestens drei gleich großen Bildern pro Schnitt und fünf Messungen pro Bild. Gemessen wurde jeweils der Abstand vom äußeren, distalen Rand des Gelenkknorpels bis zur Grenze der subchondralen Kortikalis. Die Messungen wurden in gleichmäßigen Abständen über jedes Bild verteilt. Bei der Auswertung der durchschnittlichen Knorpeldicke am distalen Femur konnte zwischen der Nrf2-KO- und der WT-Gruppe insgesamt kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Wie in der graphischen Darstellung in Abbildung 8 a dargestellt, ist zu erkennen, dass sich die jungen 12 Wochen alten Tiergruppen nahezu auf demselben Niveau bezüglich der Knorpeldicke befinden. Diese beträgt bei der Nrf2-KO-Gruppe durchschnittlich ((92,25 ± 7,54) µm; n=6) und bei der WT-Gruppe ((89,44 ± 11,16) µm; n=10). Auch bei den älteren, 90 Wochen alten Mäusen ist mit ((80,73 ± 16,58) µm; n=7) in der Nrf2-KO-Gruppe und ((80,9 ± 14,16) µm; n=8) bei den WT-Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen der Nrf2-KO- und der WT-Gruppe zu verzeichnen.

Wenn man die wenigen männlichen Tiere ausschließt und die weiblichen Tiergruppen isoliert betrachtet, ergibt sich ein sehr ähnliches Bild, wie in Abbildung 8 c, d gezeigt. Die gemessene Knorpeldicke am distalen Femur betrug bei den 12 Wochen alten WT-Tieren durchschnittlich ((94,55 ± 11,3) µm; n=5) und bei den Nrf2-KO-Mäusen in derselben Altersgruppe durchschnittlich ((92,25 ± 7,54) µm; n=6). Bei den 90 Wochen alten weiblichen Versuchstieren liegen die gemessenen Durchschnittswerte der Knorpeldicke am distalen Femur unter denen der Jungtiere, wie in Abbildung 8 b gezeigt. Die Durchschnittswerte betragen hier ((81,18 ± 13,94) µm; n=5) in der WT-Gruppe und ((76,25 ± 20,21) µm; n=5) in der Nrf2-KO-Gruppe. Zwischen den Altersgruppen und Geno-Typen ist somit kein signifikanter Effekt in der Knorpeldicke histologisch feststellbar.

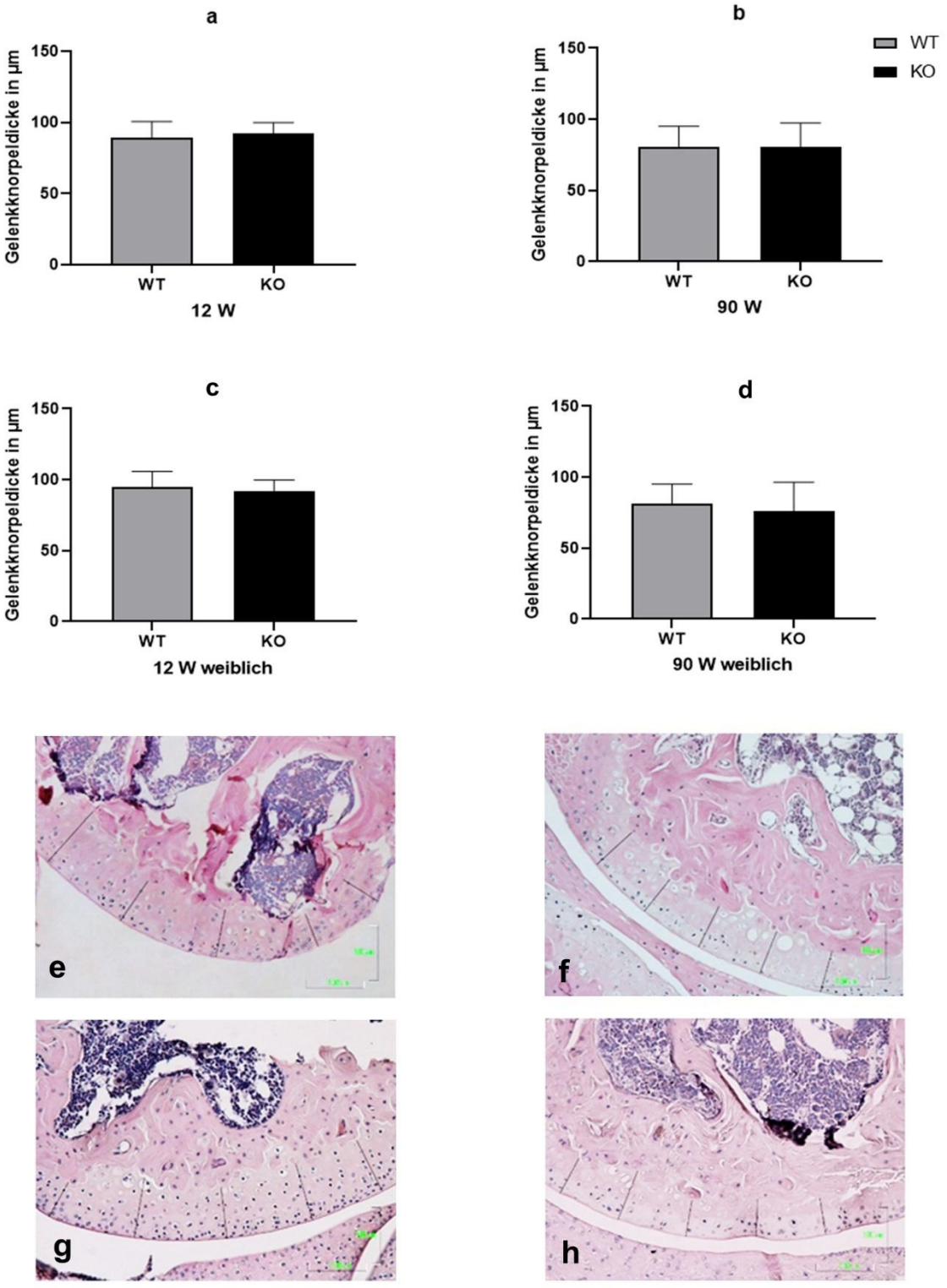


Abbildung 8 Gelenkknorpeldicke distales Femur Maus, a und b Gendermix; a: 12 W, KO (n=6), WT (n=10); b: 90 W, KO (n=7), WT (n=8), c und d nur weibliche Tiere; c: 12 W, KO (n=6), WT (n=5); d: 90 W, KO (n=3), WT (n=5); Abbildungen e-h: repräsentative histologische Darstellung des Gelenkknorpels (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) Mäusen und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren, Skala: 100 µm

In Abbildung 8 e - h wird repräsentativ je ein histologisches Bild des distalen Femurs pro Alters- und Genotyp-Gruppe gezeigt. Die schwarzen Markierungen stellen dabei die Messungen der Knorpeldicke am distalen Femur dar. Gemessen wurde bis zur Grenze zwischen Knorpel und Spongiosa. Die Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung mit einem Nikon-Mikroskop dargestellt. Hierbei erscheinen die Messlinien der 12 Wochen alten Tiere länger (Abbildung 8 e und f) als die der 90 Wochen alten Tiere (Abbildung 8 g und h). Innerhalb der jeweiligen Altersgruppe ist zwischen linkem und rechtem Bild kein Unterschied erkennbar. Abbildung 8 e und g zeigen hierbei Versuchstiere der WT-Gruppe und Abbildung 8 f und h Nrf2-KO-Tiere. Diese Beobachtungen spiegeln sich in den Ergebnissen der Graphen der Abbildung 8 a und b wider.

4.3 Wachstumsfugenbreite am distalen Femur

Die Messung der Breite der Wachstumsfuge am distalen Femur erfolgte anhand von HE-gefärbten Längsschnittpräparaten. Pro Versuchstier wurden drei Schnittpräparate mit mindestens drei Bildern pro Schnitt und mindestens fünf Messungen pro Bild angefertigt. Die Messlinien wurden möglichst parallel zum hyalinen Säulenknorpel und senkrecht zur Knorpel-Kortikalis-Grenze ausgerichtet. Abbildung 9 a und b zeigen die Gendermix-Gruppen, Abbildung 9 c und d die Gegenüberstellung der weiblichen Gruppen. Hierbei ist zu erkennen, dass bei den älteren 90 Wochen alten Tieren in der Abbildung 9 b kein Unterschied in der Breite der Epiphysenfuge feststellbar ist, mit durchschnittlich ((76,34 ± 10,28) µm; n=9) in der WT-Gruppe und ((78,53 ± 12,13) µm; n=6) in der KO-Gruppe. Diese Werte liegen beide unter dem Niveau der 12 Wochen alten Mäuse, wie in Abbildung 9 a dargestellt, deren Wachstumsfugenbreite ((108,9 ± 16,57) µm; n=10) in der WT-Gruppe und ((132,86 ± 16,75) µm; n=7) in der Nrf2-KO-Gruppe beträgt. Damit liegt zwischen der WT- und der KO-Gruppe bei den 12 Wochen alten Tieren ein signifikanter Unterschied in der Epiphysenfugenbreite am distalen Femur vor ($p < 0.05$). Die Graphen in Abbildung 9 c und d zeigen dieselben Altersgruppen und Genotypen mit ausschließlich weiblichen Tieren. Die Ergebnisse blieben dabei weitestgehend unverändert.

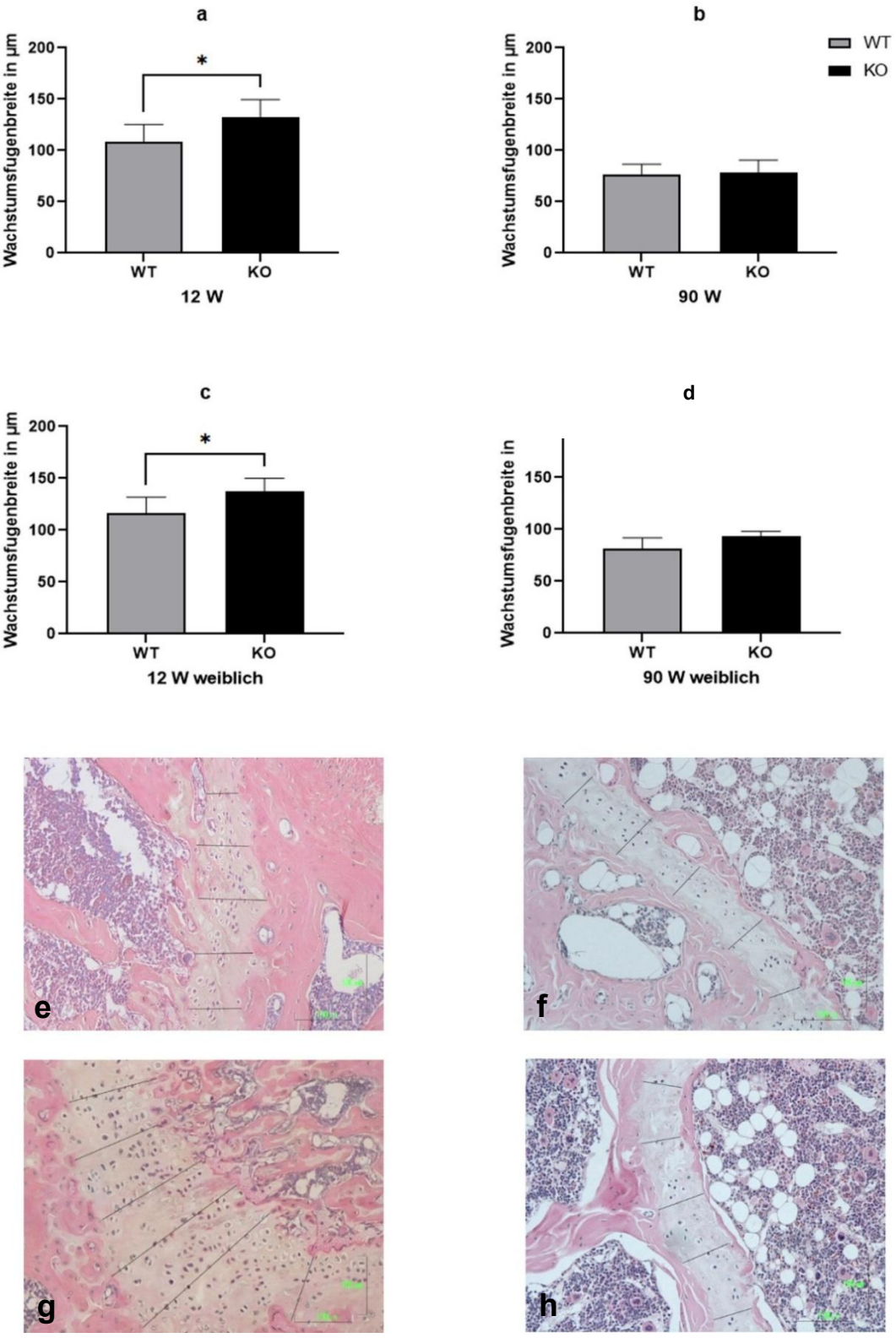


Abbildung 9 Wachstumsfugenbreite distales Femur Maus a: 12 W, WT (n=10), KO (n=7), b: 90 W, WT (n=9), KO (n=6); c: weiblich, 12 W, WT(n=5) KO (n=6), d: 90 W, WT (n=5), KO (n=2); Abbildungen e-h: repräsentative histologische Darstellung der Wachstumsfuge (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren; Skala: 100 µm

4.4 Relative Kortikalisdicke in Femurschaft

Die Kortikalisdicke wurde an drei ventral und dorsal gegenüberliegenden Punkten in Schaftmitte des Femurs gemessen. Dabei handelte es sich um in Paraffin gelagerte Längsschnitte des Femurs, die in parallel geschnittener Form vorlagen. Anschließend wurde für jeden der drei Messpunkte der Gesamtquerschnitt des Femurs an denselben Lokalisationen gemessen. Die sich gegenüberliegenden Kortikalisstärken wurden je zum Gesamtquerschnitt des Femurs, wie in 3.4.3 beschrieben, ins Verhältnis gesetzt. Damit stellt die Zahl auf der y-Achse in Abbildung 10 a und b das durchschnittliche Verhältnis der Kortikalisdicke zum Gesamtquerschnitt in Schaftmitte dar.

Abbildung 10 a und b zeigt die Ergebnisse der Gendermix-Gruppen. Zwischen der WT- und KO-Gruppe konnte anhand histologischer Auswertungen kein signifikanter Unterschied in der relativen Kortikalisdicke festgestellt werden, weder in der jungen (Abbildung 10 a) noch in der älteren (Abbildung 10 b) Altersgruppe. Die durchschnittliche relative Kortikalisdicke liegt bei den 12 Wochen alten Mäusen mit (0,357 ± 0,06; n=6) in der KO-Gruppe leicht über dem Wert der WT-Gruppe (0,339 ± 0,03; n=8), ist jedoch durch die hohen Standardabweichungen vernachlässigbar. Ähnlich verhält es sich mit den Ergebnissen der 90 Wochen alten Gruppen. Auch hier nähern sich die Werte der durchschnittlichen Kortikalisdicke einander stark an, mit (0,292 ± 0,06; n=9) in der Nrf2-KO-Gruppe und (0,279 ± 0,075; n=10) in der WT-Gruppe.

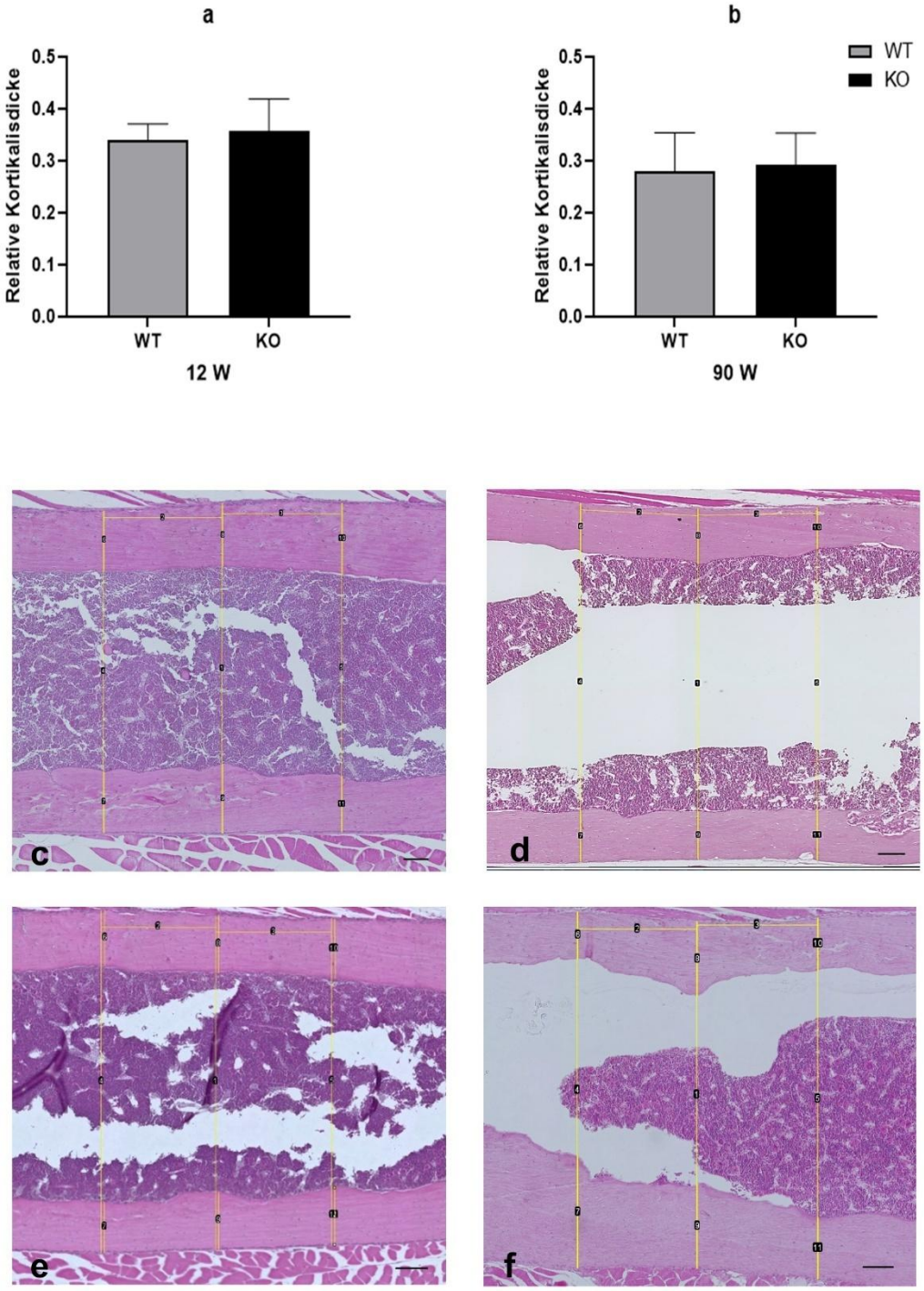


Abbildung 10 Relative Kortikalisdicke, Schaftmitte Femur Längsschnitt HE-Färbung Maus a: 12 W, WT (n=8), KO (n=6), b: 90 W, WT (n=10), KO (n=9); Bilder c-f zeigen repräsentative Darstellungen des distalen Femurs mit Messlinien in Maus, in 12 W jungen WT-(c), KO-(e) und 90 Wochen alten WT-(d) und KO-(f)-Tieren; HE-Färbung; Skala: 100 µm

4.5 Osteozytenzahl in Femurschaft

Die im Osteoid eingebetteten Osteozyten wurden in der Kortikalis der Schaftmitte ausgezählt. Die auszuwertende Fläche wurde immer gleich definiert und je ventral und dorsal des Femurs mithilfe des Programms ImageJ platziert. Die Osteozytenzahl pro Fläche der 12 und 90 Wochen alten WT- und KO-Tiere wurde, wie in 3.4.4 beschrieben, ermittelt. In den Graphen von Abbildung 11 a und b ist der Mittelwert der Osteozytenzahl auf 100 μm^2 je Gruppe und mit dazugehöriger Standardabweichung dargestellt. In den Gendermix-Gruppen der 12 Wochen alten Tiere betrug der Mittelwert der durchschnittlichen Osteozytenzahl pro Flächeneinheit (mm^2) in der WT-Gruppe 62940 ± 11120 (n=9) und in der KO-Gruppe 61751 ± 13782 (n=7). Bei den 90 Wochen alten Mäusen lag der Mittelwert der Osteozytenzahl pro Fläche in der WT-Gruppe bei 55557 ± 8534 (n=7) und in der KO-Gruppe bei 57831 ± 17160 (n=9) Osteozyten pro Fläche. Auch wenn die Mittelwerte der durchschnittlichen Osteozytenzahl pro 100 μm^2 der älteren Altersgruppe leicht unter denen der jüngeren Gruppen lagen, war zwischen den jeweiligen WT- und KO-Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Bei den weiblichen 90 Wochen alten Mäusen wurde ein Mittelwert von (60086 ± 7199; n=3) bei den WT- und (68835 ± 13237; n=4) Osteozyten bei den KO-Tieren ermittelt. In Abbildung 11 e bis h sind repräsentativ Bilder mit Markierungen aus dem Programm ImageJ gezeigt, auf denen die eingezeichneten Areale von je 65 μm^2 pro Präparat zu erkennen sind. Abbildung 11 e und g zeigen die 12 Wochen alten WT- und KO-Tiere, und Abbildung 11 f und h Mäuse der 90 Wochen alten WT- und KO-Tiere. Da bezüglich der Osteozytenzahl pro Fläche mehr männliche auswertbare Präparate zur Verfügung standen, wurde eine weitere Unterteilung in männliche und weibliche Tiere vorgenommen, die im Anhang unter 8.4, in Abbildung 14 einen Ausblick auf geschlechterspezifische Tendenzen vermuten lässt.

Betrachtet man die Anzahl leerer Lakunen in den jungen Tieren mit Mittelwerten von ((4,4 ± 5,2) %; n=8) in der WT-Gruppe und ((5,6 ± 5,6) %; n=9) in der KO-Gruppe, scheint die Anzahl leerer Lakunen von ((14,3 ± 8,9) %; n=11) in der WT-Gruppe und ((16,8 ± 8,7) %; n=7) in der KO-Gruppe mit steigendem Alter zuzunehmen. Bei der Auswertung leerer Lakunen wurden, wie in Abbildung 11 c und d dargestellt, zwischen WT- und KO-Gruppe innerhalb der Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

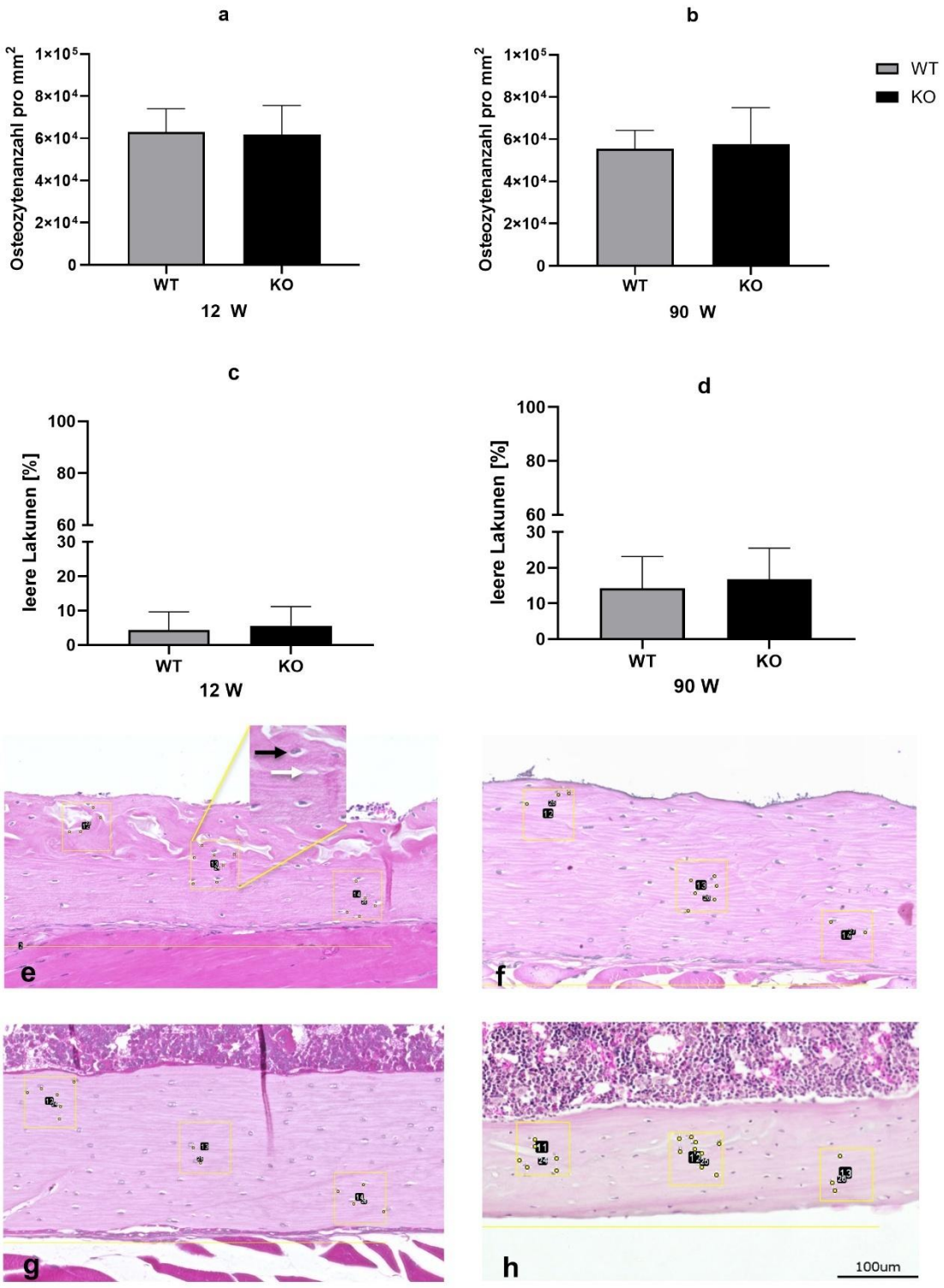


Abbildung 11 Osteozytenzahl in Femurschaft, a und b Gendermix; a: 12 W, WT (n=9), KO (n=7), b: 90 W, Anzahl WT (n=7), KO (n=9), c und d: weiblich; c: 12 W, WT (n=3) KO (n=5); d: 90 W, WT (n=3), KO (n=4); Abb. e-h: Osteozyten in Femurschaft (HE-Färbung) in 12 W jungen WT-(e), KO-(g) und 90 Wochen alten WT-(f) und KO-(h) Tieren; Skala: 100 µm

4.6 Grading Scoring der Gelenkoberfläche

Die Abbildung 12 a und b stellt die Ergebnisse des Scorings der Gelenkoberfläche am distalen Femur graphisch dar. Auf der x-Achse sind jeweils die jungen 12 und 90 Wochen alten Tiergruppen und auf der y-Achse die entsprechenden Scoringwerte abgebildet. Links befinden sich jeweils die jungen 12 Wochen alten Tiergruppen mit eins als höchstem Scoring-Wert und rechts die alternden, 90 Wochen alten Gruppen mit zwei als höchstem Scoring-Wert. Die Gelenkoberfläche wurde auf einer Skala von null bis drei von glatt und ohne pathologischen Befund (0), über uneben (1) und diskontinuierlich (2), bis hin zum Vorhandensein von vertikalen Schäden (3) eingeteilt. Diese Kriterien, auch der Tabelle 1 aus 3.4.5 zu entnehmen, orientieren sich am Grading-System nach Pritzker et al., dargestellt im Anhang unter 8.2. In den jungen 12 Wochen alten Mäusen liegt der Mittelwert des Scorings in der KO-Gruppe (0,68 ± 0,23; n=5) deutlich über dem der WT-Gruppe (0,32 ± 0,13; n=3). Dies würde gemäß dem Scoring auf ein vermehrtes Auftreten von Strukturschäden in der Gelenkoberfläche der Nrf2-KO Tiere hinweisen. Dagegen befinden sich die Ergebnisse der alternden Tiergruppen auf einem ähnlichen Niveau ohne beobachtbare Unterschiede mit Mittelwerten von (0,91 ± 0,62; n=4) in der WT- und (0,87 ± 0,46; n=3) in der KO-Gruppe. Insgesamt liegen damit die Scoring-Werte der älteren Tiere über denen der jüngeren Tiere, was auf ein vermehrtes Auftreten pathologischer Zeichen des Gelenkknorpels im Alter hinweist.

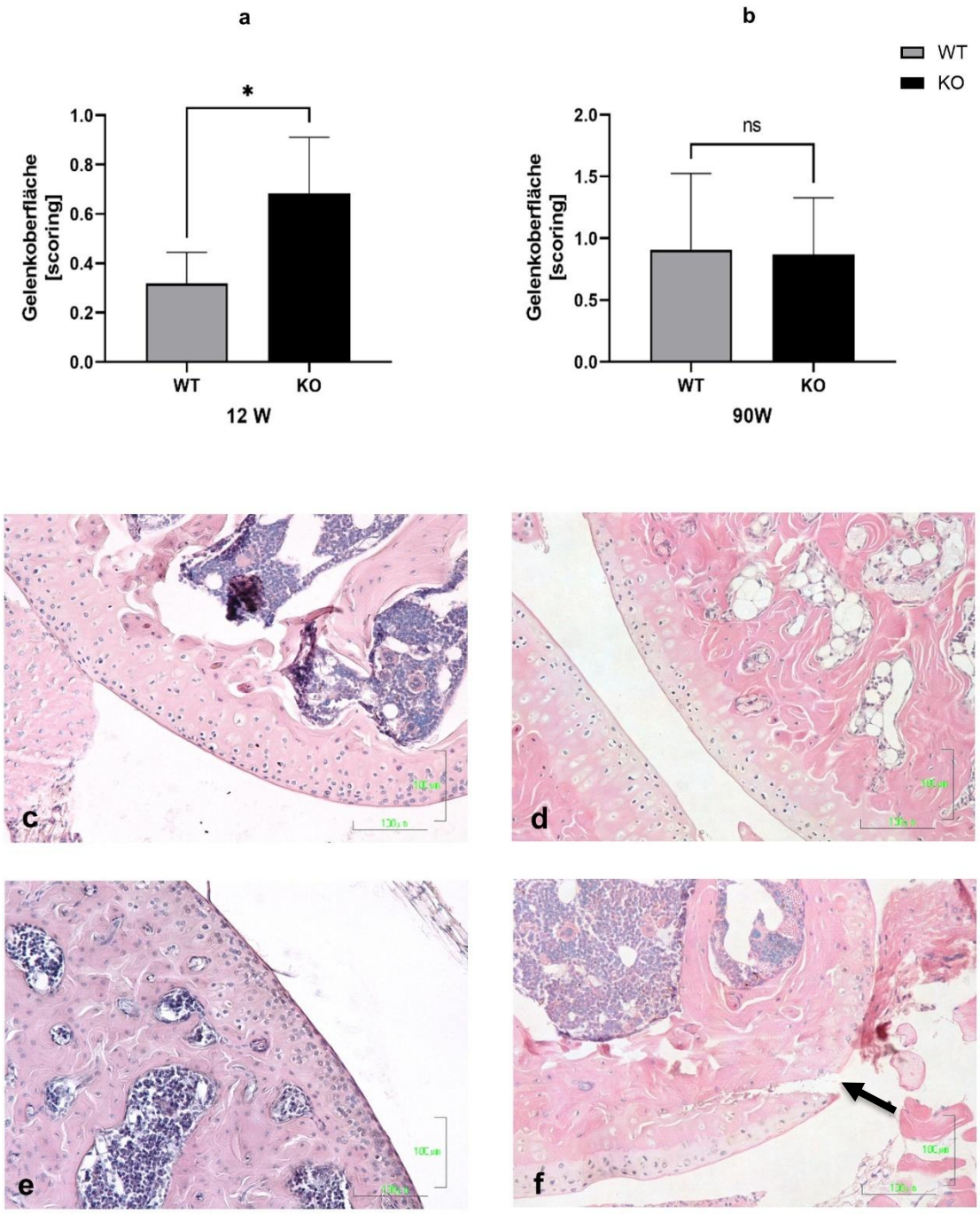


Abbildung 12 Graph Scoring der Gelenkoberfläche weiblicher Versuchstiere, a: 12 W, WT (n=3), KO (n= 5); 90 W: WT (n=4), KO (n=3); Bilder c-f zeigen repräsentative Darstellung des distalen Femurs, Maus, HE-Färbung, links 12 W alte WT-(c) und -KO-(e)-Mäusen und rechts 90 W alte WT(d)- und KO-Mäuse(f); e: unebene Gelenkoberfläche; d: glatte Gelenkoberfläche; f: vertikale Schäden (mit Pfeil gekennzeichnet); Skala: 100 µm

4.7 Beurteilung der TRAP-Färbeprotokolle für Methacarn-fixierte Schnittpräparate

Mit der enzymatischen TRAP-Färbung wird die Tartrat-resistente saure Phosphatase in Osteoklasten angefärbt. Für die TRAP-Färbung wird eine TRAP-Pufferlösung benötigt, die nach Protokoll einen pH-Wert von 5,0 aufweisen soll (Maurer et al. 2012). Vorliegend wurden, wie in 3.3.7 beschrieben, die Longitudinalschnitte der WT- und KO-Mäuse gefärbt. Im ersten Schritt wurde mit einer TRAP-Pufferlösung gearbeitet, die einen pH-Wert von 5,0 aufwies. In der vorliegenden Versuchsreihe konnte mit dieser Färbemethode kein positiver TRAP-Nachweis in der Kortikalis durchgeführt werden. Da auch bei mehrfacher Wiederholung eine Färbung von TRAP nicht feststellbar war, wurde eine Positiv-Kontrolle herangezogen. Diese bestand in einem murinen Femur-Längsschnitt, der zuvor in Formalin fixiert wurde. Das TRAP-Protokoll blieb dabei erhalten. Lediglich die Gegenfärbung erfolgte mit Fast Green. Die ausbleibende Färbung bei unseren Präparaten könnte auf die Fixierung mit Methacarn zurückzuführen sein. Das gleiche Färbeprotokoll wurde mit einem pH-Wert der TRAP-Pufferlösung von 3,25 und 10 an den Femur-Gewebsschnitten wiederholt.

Der Versuchsaufbau für den immunhistologischen Nachweis von TRAP erfolgte nach dem Protokoll für Streptadivin-Biotin-Paraffin-Schnitte. Für die Färbung gegen CD68 wurde das ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit verwendet. In beiden Färbungen konnten keine eindeutigen Ergebnisse beobachtet werden. Eine Positiv-Kontrolle der immunhistologischen TRAP-Färbung wurde mit Formalin-fixierten Schnitten anhand des gleichen Protokolls durchgeführt.

5 DISKUSSION

5.1 Einfluss von Nrf2-Aktivatoren auf Chondrozytenviabilität

Vor dem Versuch mit C28/I2-Zellen sollte die ideale Konzentration des FKS, bzw. des Mangelmediums bestimmt werden, bei der die Zellviabilität erhalten bleibt, Zellproliferation jedoch nicht stattfindet. Als Nährmedium wurde eine Konzentration von 1 % FKS festgelegt.

Beim Zellkultur-Versuch sollte untersucht werden, ob Nrf2-Aktivatoren einen Einfluss auf die Chondrozytenviabilität haben und inwieweit sie diese unter oxidativem Stress verbessern. Im In-vitro-Modell wurde eine H_2O_2-Behandlung durchgeführt, um oxidativen Stress hervorzurufen, der mit dem Nrf2-ARE-System stark gekoppelt ist.

Bei der Stimulation mit SFN mit einer Konzentration von 2,5 µM konnte eine signifikant erhöhte Viabilität der Chondrozyten beobachtet werden. Da H_2O_2 ein gängiges Substrat für die Auslösung von oxidativem Stress darstellt, könnte vermutet werden, dass die Zugabe von SFN einen protektiven Effekt auf die Knorpelzellen hatte (Ransy et al. 2020). In einer Studie von Lu et al. konnte durch die SFN-Gabe eine verminderte Degeneration der Wirbelsäulen-Bandscheibe und eine gleichzeitige Aktivierung des Nrf2-HO-1 Signalwegs beschrieben werden (Lu et al. 2023). Eine Studie von Davidson et al. bestätigte ebenfalls den protektiven Effekt von Nrf2-Aktivatoren auf Chondrozyten (Davidson et al. 2013). Die Chondrozyten wurden dabei aus den Gelenken von an OA erkrankten Patienten isoliert und kultiviert. Außerdem konnte in dieser Studie bei SFN-Gabe eine verringerte Expression der Metalloproteinasen MMP-1 and MMP-13 festgestellt werden. Dies würde darauf hindeuten, dass SFN neben dem Nrf2-ARE-Signalweg auch auf andere Weise protektiv auf Knorpelzellen wirkt.

Auch bei der Gabe von MET, einem weiteren Nrf2-Aktivator, war eine erhöhte Zellviabilität der Knorpelzellen im In-vitro-Versuch erkennbar. Der signifikante Effekt war auch hier bei der niedrigsten Konzentration zu beobachten. Bei einer Erhöhung der MET-Konzentration blieb die Zellviabilität auf dem ursprünglichen Niveau oder darunter. In den bekannten Studien finden sich einige Beispiele zu zellprotektiven, Nrf2-aktivierenden Eigenschaften in Bezug auf neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer (Fragoulis et al. 2017, Bian et al. 2020,A. Tanaka

et al. 2010). Fraglich ist, ob dies gleichermaßen auf Knorpelgewebe wie vorliegend die C28/I2-Zellen zutrifft. In der Studie von Kubo et al. wurde die SOX9-Aktivität in C28/I2-Zellen mit und ohne MET verglichen (Kubo et al. 2022). Die hierbei untersuchte Stoffwechsel- und Proliferationsrate der Chondrozyten zeigte keine Veränderung bei einer MET-Gabe von 100 µM. Wie im vorliegenden Versuch gezeigt, könnte die Stoffkonzentration ausschlaggebend für die unterschiedlichen Ergebnisse gewesen sein. Andere MET-Konzentrationen zeigten in dieser Arbeit ebenfalls keinen Effekt auf die Chondrozytenviabilität, siehe Anhang. Eine unterschiedliche Lot- und Artikelnummer könnten die Ergebnisse ebenfalls beeinflusst haben. In der Studie von Dittmar et al. wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung von SFN und MET auf den Nrf2/ARE-Signalweg beobachtet (Dittmar et al. 2024). Diese Effekte wurden bei In-vitro-Versuchen in Osteozyten beschrieben und würden knochenprotektive Eigenschaften von Nrf2 und seinen antioxidativen Marker bestätigen. Die protektive Wirkung von SFN und MET auf Knorpelzellen sollte in folgenden Versuchen weiter untersucht werden.

5.2 Knorpelprotektive Effekte von Nrf2 am distalen Femur

Die Knorpeldicke *(cartilage thickness)* am distalen Femur gilt als Parameter für potenziellen Verschleiß oder OA. Bei der OA werden weiterhin die radiologischen Kriterien nach Kellgreen und Lawrence genutzt, dargestellt unter 8.1 (Kellgren & Lawrence 1957). Der Schweregrad richtet sich hierbei nach der Ausprägung und dem Vorhandensein von Osteophyten, subchondralen, sklerosierten Gewebe, deformierten Knochenenden und eines sich verengenden Gelenkspalts. Diese weitestgehend auf radiologischen Kriterien beruhende Klassifikation aus dem Jahre 1957 wurde später durch klinische Befunde erweitert, mit dem Hinweis auf die Notwendigkeit histologischer Untersuchungen (Altman et al. 1986). In den vorliegenden Auswertungen wurde die Knorpeldicke am distalen Femur bei 12 und 90 Wochen alten KO- und WT-Mäusen gemessen und miteinander verglichen. In beiden Altersgruppen konnte zwischen der KO- und WT-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Unterdrücken des Nrf2-Gens sich nicht zwingend auf die histologische Knorpelmorphologie auswirkt oder OA begünstigt. An den gleichen Tieren wurde im Rahmen einer erweiterten Studie durch Kubo et al. die Knorpeldicke mithilfe von

Safranin-O-Färbungen gemessen. Hierbei wurde der distale Femur- und der proximale Tibia-Knorpel ausgewertet. Auch hier war in den jungen Gruppen kein signifikanter Unterschied zwischen junger WT- und Nrf2-KO-Gruppe zu beobachten. In den älteren adulten Tiergruppen zeigte sich in den Auswertungen von Kubo et al. jedoch eine stärkere Knorpeldicke in den WT-Mäusen im Vergleich zu den Nrf2-KO-Tieren (Kubo et al. 2022). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden hier Femur- und Tibia-Knorpeldicke in einem Beitrag ausgewertet. Die unterschiedliche Anatomie des Knorpels, dessen unterschiedliche mechanische Belastung und die daraus resultierendem Abnutzungserscheinungen könnten in die Ergebnisse eingeflossen sein.

Die Einbuße der Knorpelschicht in der *Articulatio femoro-tibialis* stellt klinisch in Verbindung mit der Kellgren-Lawrence-Skala ein wichtiges Kriterium für OA dar. In einer Studie von Omoumi et al. konnte mittels CT-Messungen an 535 Patienten ein signifikanter Unterschied in der Knorpeldicke zwischen gesunder und OA-Gruppe im posterioren Anteil des medialen Kondylus beschrieben werden. Dieser war bei der OA-Gruppe stärker ausgebildet als in der gesunden Gruppe. Andere Areale des distalen Femurs zeigten keine Unterschiede in der Knorpeldicke zwischen gesunder Gruppe und OA-Gruppe (Omoumi et al. 2015). In anderen Studien konnte durch lokale, spezifische Messungen von Knorpelverlust und -zunahme *(swelling)* ein sensibleres Vorgehen als die Durchschnittsgrößen der Knorpeldicke ermöglicht werden (Favre et al. 2013, Buck et al. 2010). In weiteren Studien wäre eine Differenzierung der Messungen in Areale der Knorpeloberfläche mit unterschiedlichen Messzeitpunkten denkbar.

Außerdem scheint zumindest beim Menschen eine Variabilität in der Knorpeldicke hinsichtlich des Geschlechts zu bestehen (Misir et al. 2021). Die limitierte Anzahl männlicher Tiere in diesem Projekt lässt hierzu keine Rückschlüsse zu. Bei einer ungleichen Verteilung männlicher und weiblicher Tiere kann keine konkrete Aussage über die anatomischen Durchschnittsgrößen getroffen werden. Im Gegensatz zur Wachstumsfuge, die von beiden Seiten von Spongiosa umgeben ist, befindet sich der Gelenkknorpel auf der Außenseite des Gelenkkopfes. Dies kann die Schrumpfung und Verformung des Materials bei Entzug von Wasser beeinflussen. Aus diesem Grund sind alternative Messverfahren von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verifizierbarkeit von µCT-Daten mithilfe von Histologie-Methoden überprüft. Bezüglich der Knorpeldicke am distalen Femur

konnten die Ergebnisse anhand der Auswertung von longitudinalen Serienschnitten nicht verifiziert werden. Im Zuge der Fixierung spielen Schrumpfung sowie Art der Fixierung eine Rolle, hier mit Methacarn durchgeführt. Dieses wird üblicherweise für DNA- und Proteinstrukturen verwendet und könnte ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst haben. Während man in der Literatur auf Studien trifft, die je für und gegen knorpeldegenerative Effekte bei Nrf2-Knockout sprechen, weisen andere Studien stark auf den protektiven Charakter von Nrf2 für Knorpel hin (Cai et al. 2015, W. Sun et al. 2022). Bei einem Tierversuch mit OA-Mäusen zeigte die histologische Beurteilung eine stärkere Knorpelschädigung bei KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen, was für den chondroprotektiven Charakter von Nrf2 spricht (Cai et al. 2015). Umgekehrt hat die Aktivierung des Nrf2/HO-1 Signalwegs in humanen Chondrozyten eine antiinflammatorische Wirkung. In der Studie von Sun et al. konnte in In-vitro-Versuchen mittels des Aktivators *Caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) eine knorpelprotektive Funktion gegen OA dargestellt werden (W. Sun et al. 2022).

5.3 Einfluss des Nrf2-Knockouts auf Wachstum und Epiphyse

Auffallend ist, dass nur bei den jungen WT-Tieren eine schmalere Wachstumsfuge im Vergleich zu den KO-Tieren gemessen wurde. Bei den älteren adulten Mäusen konnte dagegen kein Unterschied zwischen WT- und Nrf2-KO-Gruppe in der Breite der Wachstumsfuge festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass ein Knockout von Nrf2 bei jungen Tieren mit einem verspäteten Verschmälern der Wachstumsfuge korreliert und möglicherweise auch mit einem verspäteten Längenwachstum. Die Länge des Femurs derselben Tiere wurde in der erweiterten Studie von Yusuke Kubo et al. mithilfe von µCT gemessen und verglichen. Dabei konnte in den gleichen Tieren weder in den jungen noch in den älteren Altersgruppen ein signifikanter Unterschied in der Femurlänge zwischen WT- und KO-Mäusen beobachtet werden. Um dies weiter zu untersuchen, könnte in späteren Studiendesigns mit jüngeren Tieren gearbeitet werden, die sich noch im Wachstum befinden, da die 12 Wochen alten Tiere schon als ausgewachsen gelten. Dank früherer Studien ist bekannt, dass eine Deregulation von Nrf2 zu nichtlebensfähigen Mäusen führt. Diese weisen bei einer Keap1-Deletion eine überschießende Aktivierung von Nrf2 und eine deutliche Reduktion in der Körpergröße, Femurlänge und Knochendichte auf. Sie werden auch als *Nrf2-deficient*

in oesophagus and Keap1-null-Mäuse (NEKO-Mäuse) bezeichnet (Yoshida et al. 2018, Wakabayashi et al. 2003).

In der Studie von Yin et al. wurde hingegen eine milde Aktivierung von Nrf2 durch die teilweise, heterozygote Unterdrückung von Keap1 bewirkt. Das Alter der Versuchstiere betrug bei Gewebeentnahme 18 Wochen. Zwischen den heterozygoten Keap1$^{(+/-)}$-Mäusen und der WT-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Femurlänge beobachtet werden (Yin et al. 2021). Da das Längenwachstum mit dem Verschmälern der Wachstumsfuge gekoppelt ist, sind hier noch weitere Untersuchungen jüngerer Tiere für eine konkrete Aussage notwendig.

Bezüglich der Knochendichte und des Knochenanbaus scheint ein Nrf2-Knockout im Laufe des Wachstums geschlechtsspezifische Effekte zu haben, wie in einer Studie von Pellegrini et al. dargestellt (Pellegrini et al. 2017). Während die femorale Knochendichte bei den weiblichen KO-Mäusen signifikant verringert war, so war sie bei den männlichen KO-Tieren erhöht. Eine reduzierte Knochendichte bei weiblichen KO-Tieren konnte auch von Kubo et al. beobachtet werden. Die µCT-Messungen zeigten eine signifikant geringere Knochendichte der 90 Wochen alten Versuchstiere im Vergleich zur WT-Gruppe (Kubo et al. 2022b). Dies weist auf die Bedeutung eines geschlechtsspezifischen Effekts von Nrf2 hin, welcher im Wachstum und im Alter unterschiedliche Auswirkungen haben könnte.

5.4 Nrf2 und die Kortikalisqualität im Mausmodell

Bei der relativen Kortikalisdicke handelt es sich um das Verhältnis der Dicke der Kortikalis zum Gesamtquerschnitt des knöchernen Femurs in Schaftmitte.

Im erweiterten Projekt von Yusuke Kubo und Abraham Herrera wurde bei den gleichen Tieren bei der älteren Nrf2-KO-Gruppe eine signifikant reduzierte Kortikalisdicke im Vergleich zur WT-Gruppe festgestellt, mit stärkeren Effekten in der Metaphysen-Region (Kubo et al. 2022b, Maenz et al. 2020). In den histologischen Messungen war, abgesehen von einer tendenziell reduzierten relativen Kortikalisdicke in der älteren KO-Gruppe, kein signifikanter Unterschied zu beobachten. In den jungen Tiergruppen wurden weder in der µCT durch Abraham Herrera noch in den histologischen Messverfahren signifikante Unterschiede zwischen

KO- und WT-Gruppe festgestellt. Die Ergebnisse der µCT konnten mit dem histologischen Verfahren somit teilweise verifiziert werden. Zu beachten ist auch, dass sich die histologischen Ergebnisse auf die Schaftmitte des Femurs beziehen.

Bei den zwei Methoden handelt es sich um zwei sehr unterschiedliche Messverfahren, wobei in der µCT der Querschnitt des Schafts und bei der Histologie der Longitudinal-Schnitt des Femurschafts zur Auswertung herangezogen wurde. Darüber hinaus können bei der histologischen Ausmessung eventuell Abweichungen durch die unterschiedliche Schnitttiefe der Präparate aufgetreten sein. Eine weitere mögliche Erklärung für die teils unterschiedlichen Ergebnisse könnte die geringe Anzahl männlicher Versuchstiere gewesen sein. In einer Studie von Sánchez-de-Diego et al. wurden bei einem Osteozyten-spezifischen postnatalen Nrf2-Knockout unterschiedliche Effekte bezüglich der Kortikalisdicke bei männlichen und weiblichen Tieren beobachtet (Sánchez-de-Diego et al. 2021). In den weiblichen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Schaftmitte mittels µCT. Dies würde mit meinen histologischen Messungen der weiblichen jungen Tiergruppen übereinstimmen. Bei den männlichen Tieren konnte in der Studie von Sánchez et al. eine reduzierte Kortikalisdicke in der KO-Gruppe festgestellt werden. Das Alter der jungen adulten Tiere in unserem Projekt betrug 12 Wochen, die Tiere in der Studie von Sánchez et al. waren sieben Wochen alt.

In der Studie von Yin et al. wurden verschiedene Knochen- und Knorpelparameter von WT-Mäusen mit Mäusen mit einem heterogenen Keap1-Knockout (Keap1-Ht) verglichen (Yin et al. 2021). Mit der teilweisen Ausschaltung von Keap1 sollten die Effekte einer Aktivierung von Nrf2 untersucht werden. Die Knochenformationsrate zwischen den weiblichen WT- und Keap1-Ht Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede. In den männlichen Gruppen war die Knochenformationsrate in der Keap1-Ht-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe erhöht. Hier wurden weder in der der Kortikalisdicke noch in der Femurlänge signifikante Unterschiede zwischen WT- und Keap1-Ht-Gruppe festgestellt. Die Analyse dieses Parameters ergab in dieser Studie keine geschlechtsspezifischen Effekte.

In der Studie von Yoshida et al., die acht bis zehn Wochen alte Keap1-Null- und WT-Mäuse auf ihre Knochenstruktur untersuchte, wurde ebenfalls die Kortikalisdicke und -dichte mithilfe der µCT ermittelt (Yoshida et al. 2018). Die NEKO-

Mäuse wiesen insgesamt eine reduzierte Körpergröße und geringere Knochendichte im Vergleich zum gleichaltrigen Wildtyp auf. Die Effekte der reduzierten Kortikalisdicke wurden hier ebenfalls im Metaphysenbereich beobachtet. Betrachtet man den Femurschaft isoliert, wie bei den vorliegenden histologischen Messungen in Schaftmitte, konnte kein signifikanter Unterschied der Kortikalisdicke zwischen NEKO-Maus bzw. KO-Maus und WT-Maus festgestellt werden.

5.5 Osteozytenzahl und andere Knochenzellen in WT- und KO-Maus

In dieser Studie konnten bei den gemischtgeschlechtlichen Gruppen zwischen WT- und KO-Tieren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Osteozytenzahl pro Fläche festgestellt werden. Bei den männlichen KO-Tieren ließ sich tendenziell eine reduzierte und bei den weiblichen KO-Tieren eine leicht erhöhte Osteozytenzahl beobachten, wie im siehe Anhang unter 8.4, Abbildung 14 dargestellt. Aufgrund hoher Standardabweichungen und geringer n-Anzahl dienen diese Beobachtungen als Ausblick.

In der Studie von Sánchez-de-Diego wurde ebenfalls die Osteozytenzahl pro Knochenareal in der Kortikalis des Femurs von Nrf2-KO- und WT-Mäusen ausgewertet. Die Anzahl der Osteozyten pro Knochenareal zeigte keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen KO- und Kontrollgruppe noch zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Sánchez-de-Diego et al. 2021). Dies würde mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmen. Trotz des Alters der Mäuse von sieben Wochen in der Studie von Sánchez-de-Diego et al. und eines Osteozyten-spezifischen Nrf2-Knockouts wurden die gleichen Resultate erzeugt (Chan et al. 1996). In der Studie von Pellegrini et al. wurden bei Nrf2-KO-Mäusen geschlechterspezifische Unterschiede in der Knochendichte des Femurs und der Phase-II-Protein-Expression beschrieben (Pellegrini et al. 2017). Die Untersuchungen der Mäuse wurden im Alter von drei bis 15 Monaten durchgeführt. Dies würde die Relevanz von geschlechterabhängigen Effekten im Hinblick auf oxidativen Stress und die Knochenhomöostase unterstreichen. Steroidhormone wie Östrogen und Testosteron scheinen an der Knochenhomöostase beider Geschlechter direkt beteiligt zu sein (Khosla & Monroe 2018).

Der *estrogen-related receptor α* in Osteoblasten und in Osteoklasten könnte hier eine maßgebliche Rolle für die Regulation und Aufrechterhaltung des Knochenumbaus spielen (Feng et al. 2022). In diesem erweiterten Projekt konnte bei den 90 Wochen alten weiblichen Nrf2-KO-Mäusen im Vergleich zur WT-Gruppe eine reduzierte Aromatase-Expression in Osteozyten beobachtet werden (Kubo et al. 2022b). Da Aromatase ein Enzym für die Synthese von Östrogen ist, kann ein Zusammenhang von Östrogen und dem Nrf2-Signalweg in Bezug auf die Knochenhomöostase diskutiert werden.

5.6 TRAP-Färbung und immunhistologische Färbungen

Die TRAP-Färbung stellt eine typische Färbung für Osteoklasten dar, die auch im Zusammenhang mit Makrophagen und Metalloproteinasen einsetzbar ist (Tsuboi et al. 2003, Walsh et al. 2003). Vorliegend wurden Färbereihen an longitudinalen Femur-Schnitten durchgeführt. Die wiederholten Färbungen der Methacarn-fixierten Präparate ergaben bei einem pH-Wert von 5,0 keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich mehrkerniger Zellen. Bei einem niedrigeren pH-Wert soll einer Studie zufolge die Enzymgruppe der Metallphosphatasen eine erhöhte Reaktionsrate zeigen (Merkx et al. 1999). Daher wurde das Färbeprotokoll mit einem TRAP-Puffer-pH von 3,25 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein in Formalin-fixiertes Femur-Präparat herangezogen. Bei beiden pH-Werten konnten keine mehrkernigen Zellen sichtbar gemacht werden wie im Anhang unter 8.3, Abbildung 13 a, b und c gezeigt. Bei der Positiv-Kontrolle in Formalinfixierung konnten Osteoklasten wie in Abbildung 13 d in der Kortikalis rot angefärbt werden. Daher kann diskutiert werden, ob Methacarn als Fixierung im vorliegenden Fall für die TRAP-Färbung hinderlich gewesen sein könnte. In einem Vergleich für Fixierungen von Femurblöcken von Ratten stellte sich die Methacarn-Fixierung gegenüber der Formalinfixierung als überlegen heraus (Al-Maawi et al. 2022). In diesem Teil-Projekt wurden außerdem immunhistologische Färbungen mit den Antikörpern TRAP und CD68 durchgeführt. CD68 wird als Marker für Monozyten und Makrophagen und in der Analyse von Entzündungs- und Tumorgewebe eingesetzt. Im Gegensatz zu der Studie von Al-Maawi et al. ergaben die immunhistologischen Färbungen in meinen Versuchen keine eindeutigen Ergebnisse. Dies könnte auch an anderen Faktoren wie der Lagerung oder der Aufbereitung der Schnittpräparate liegen. Es bleibt zu untersuchen, ob Methacarn als Fixierung für

immunhistologische Versuche und TRAP-Färbungen von Knochenpräparaten gleichermaßen geeignet ist. Einen Nachteil der Fixierung mit Formalin könnte das *cross linking* von Proteinen darstellen. Dieses könnte die spätere Reaktion von Antikörper und Epitop erschweren (Buesa 2008). Da diesem aber mithilfe des Wässerns entgegengewirkt werden kann und auch bei verlängerter Zeit die Reaktivität nicht verschlechtert, scheinen die Vorteile der Fixierung mit Formalin gegenüber unseren Versuchen mit Methacarn zu überwiegen (Suzuki et al. 2012).

5.7 Die Gelenkoberfläche bei Alterung und Nrf2-Knockout

Die Kriterien für das Scoring der Gelenkoberfläche am distalen Femur wurden, wie im Anhang unter 8.2 dargestellt, an ein Grading-System von Pritzker et al. angelehnt (Pritzker et al. 2006). Dieses wurde für die histologische Schweregradeinteilung bei Zeichen von Osteoporose konzipiert und stellt eines mehrerer Grading-Systeme dar. In unserer Bewertung der Gelenkoberfläche wurde bei den älteren adulten Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen KO- und WT-Tieren bezüglich des Scorings festgestellt, wie in Abbildung 12 b gezeigt. Bei den jungen adulten Versuchstieren hingegen konnte ein erhöhter Scoring-Mittelwert bei den KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet werden, was für Einbußen in der Knorpelqualität bei Nrf2-Knockout sprechen könnte, dargestellt in Abbildung 12 a. Die insgesamt höheren Scoring-Mittelwerte der älteren adulten Tiere im Vergleich zu den jungen Tieren sprechen dafür, dass unabhängig eines Nrf2-Knockouts die Qualität der Gelenkoberfläche infolge von Alterungsprozessen abnimmt. In einer Studie von Tang et al. wurden beim Scoring der Gelenkoberfläche von Wirbelkörpern von drei und neun Monate alten Mäusen in der Nrf2-KO-Gruppe signifikant stärkere Abnutzungserscheinungen im Knorpel festgestellt (Tang et al. 2019). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten in den älteren Tiergruppen höhere Scoring-Werte in der KO-Gruppe beobachtet werden (Kubo et al. 2022). Hier wurde die Gelenkoberfläche von Femur und Tibia in das Scoring einbezogen. Nach Glasson et al. würden sich beide anatomischen Areale für einheitliche Scoring-Ergebnisse eignen, das mediale Tibia-Plateau zeige jedoch eine bessere Konstanz für reproduzierbare Ergebnisse (Glasson et al. 2010). Weiterhin könnten Artefakte aufgrund von Fixierung und eine subjektive Bewertung wie z. B. die Fehlinterpretation von anatomischen und histologischen Be-

sonderheiten, wie Bänderansätzen eine Rolle gespielt haben. Da der Gelenkknorpel eine heterogene Oberfläche darstellt, könnten die Ergebnisse zudem durch die unterschiedliche Schnitttiefe die Ergebnisse beeinflusst worden sein. Nach der Empfehlung von Pritzker et al. sollten beim histologischen Scoring von Knorpel immer die Präparate zur Auswertung genutzt werden, die das größte Ausmaß der Läsion beinhalten (Pritzker et al. 2006). Dies konnte bei unserer Auswahl an verwertbaren Schnittpräparaten nicht immer gewährleistet werden. Es handelte es sich um ein Screening von Tieren ohne größere Läsionen, die auf erste pathologische Anzeichen aufgrund von Nrf2-Knockout untersucht wurden.

5.8 Limitationen

Bei der vorliegenden Arbeit war die Anzahl an auswertbaren Präparaten pro Tiergruppe begrenzt. Dies war auf verschiedene Gründe zurückzuführen. Zum einen sollten hier v. a. die weiblichen Tiere untersucht werden, um als Teilprojekt die µCT-Ergebnisse der Arbeitsgruppe zu verifizieren. Folglich fehlte es an verwertbaren Präparaten in den männlichen Tiergruppen. Dies schränkte die Möglichkeit eines Vergleichs zwischen den Geschlechtern ein. Ein weiterer limitierender Faktor war die Fixierung der Schnittpräparate mit Methacarn. Während sie bei den HE-Färbungen zu keinen feststellbaren Qualitätsabstrichen führte, schien sie bei den immunhistologischen Analysen (CD68, TRAP) und der TRAP-Färbung nicht vorteilhaft zu sein. Es wurden zahlreiche Serienschnitte pro Versuchstier angefertigt, um die Auswertung je Maus in der gleichen Schichttiefe oder Ebene vornehmen zu können. Dieses Vorhaben wurde durch die schwierige Schneidbarkeit des Knochens eingeschränkt. Trotz sorgfältiger Lagerung der Präparate in gleicher Position könnten diesbezüglich Abweichungen zu Ungenauigkeiten in der Schnittebene geführt haben. Dies spielt insbesondere bei der Auswertung der Kortikalisdicke in Schaftmitte des Femurs eine Rolle, weshalb hier die relative Kortikalisdicke im Verhältnis zum Gesamtquerschnitt analysiert wurde.

Andere Fehlerquellen können in der Messdurchführung selbst oder der Auszählung der Zellen liegen. Um diese so gering wie möglich zu halten, wurden die auszuwertenden Areale und ihre Verteilung und Abstände zum Bildrand definiert, um eine möglichst reproduzierbare Auswertung zu gewährleisten. Möglicherweise können diese Art von Zellzählung zukünftig durch definierte Kriterien wie

Helligkeit, Farbe, Form und Lokalisation in der Form von *Scripts* oder Programmen automatisiert werden.

5.9 Ausblick

Im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Uniklinik Aachen werden Versuchsreihen mit einem Nrf2-Knockout-Mausmodell durchgeführt, deren Proben mit Formalin fixiert wurden. Erste Versuche der TRAP-Färbung konnten an diesen Schnittpräparaten bereits durchgeführt werden, sodass die Osteoklastenanzahl und -aktivität im Knochen näher untersucht werden kann. Für Untersuchungen des Knorpelgewebes hat Gabriele Zylenas eine immunhistologische Färbung mit SOX9 an denselben Präparaten durchgeführt. Auf diese Weise wird die Expression dieses TF in Chondrozyten bei Nrf2-KO-Tieren dargestellt. Der Fokus liegt hier auf weiblichen Tieren und Gendermix-Gruppen im Alter von 12 und 90 Wochen. SOX9 erfüllt neben vielen anderen Funktionen die Rolle eines zentralen Faktors in der Chondrogenese und beim Erhalt des adulten Knorpelgewebes (Lefebvre 2019). Im Rahmen zukünftiger Projekte könnte ein zellspezifischer Nrf2-Knockout in In-vitro-Versuchen, wie in C28/I2-Zellen, genutzt werden. In Safranin-O- oder Alcian-Blau gefärbten Schnitten könnten weiterhin Knorpelgewebe und EZM bei Nrf2-KO-Tieren untersucht werden, um geschlechterspezifische Unterschiede zu erforschen. Eine weitere Beurteilung der Gelenkoberfläche wäre hier denkbar, da hierfür eine andere Scoring-Methode vorliegt (McAlindon et al. 2014). Dank ihr können nicht nur kleine, vertikale Fissuren unter polarisiertem Licht sichtbar gemacht werden, sondern auch der Proteoglykan-Gehalt des Gelenkknorpels untersucht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) ist an der Reaktion bei oxidativem Stress maßgeblich beteiligt, indem er die Expression von antioxidativen Enzymen reguliert. In Bezug auf den Bewegungsapparat wird er auf seine knochen- und knorpelprotektiven Eigenschaften untersucht.

Vor den histologischen Auswertungen am Nrf2-Knockout-Mausmodell wurde ein Versuch an immortalisierten Chondrozyten der C28/I2-Zelllinie mithilfe der Nrf2-Aktivatoren Sulforaphan und Methysticin durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Chondrozytenviabilität durch Nrf2-Aktivatoren positiv beeinflusst wurde. Zudem schienen diese für Chondrozyten eine protektive Wirkung bei oxidativem Stress zu haben. Im Rahmen eines Nrf2-Knockout-Mausmodells sollten mögliche altersabhängige Effekte näher untersucht werden. Hierfür wurden Femurknochen von jeweils 12 und 90 Wochen alten weiblichen und männlichen Nrf2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen entkalkt, entparaffiniert und für die Anfertigung der Präparate aufbereitet. Daraufhin wurden HE-Färbungen der acht Tiergruppen vorgenommen, um je die Gelenkknorpeldicke und die Wachstumsfugenbreite am distalen Femur sowie die Kortikalisdicke und die Osteozytenzahl in Schaftmitte in Serienschnitten auszuwerten. Mithilfe eines Scorings wurde die Gelenkoberfläche am distalen Femur der weiblichen Tiere bewertet. Außerdem wurden TRAP-Färbungen mit unterschiedlichen pH-Werten der in Methacarn fixierten Präparate angefertigt.

Es wurde angenommen, bei den Nrf2-KO-Mäusen insgesamt reduzierte anatomische Größen im Vergleich zum Wildtyp vorzufinden. Entgegen der Hypothese waren am distalen Femur keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Knorpeldicke von Nrf2-KO- und WT-Mäusen zu beobachten. Das Scoring der Gelenkoberfläche wies in der jungen KO-Gruppe auf ein vermehrtes Vorkommen pathologischer Befunde hin. Die Wachstumsfuge der jungen adulten KO-Gruppe wies höhere Werte als die der respektiven WT-Gruppe auf. Die Ergebnisse der relativen Kortikalisdicke zeigten insgesamt eine Tendenz reduzierter Mittelwerte bei den alternden Mausgruppen. Im Hinblick auf die Osteozytenzahl konnten unterschiedliche, geschlechterabhängige Tendenzen beobachtet werden. Nrf2 scheint insgesamt knorpel- und knochenprotektive Effekte zu haben, die von alters- sowie geschlechterspezifische Faktoren mitbestimmt werden könnten.

7 LITERATUR

Aarden, E. M., Burger, E. H., & Nijweide, P. J. (1994). Function of osteocytes in bone. [Review] [75 refs]. *Journal of Cellular Biochemistry*, *55*(3).

Al-Maawi, S., Valenzuela, P., Dohle, E., Heselich, A., Sader, R., & Ghanaati, S. (2022). Comparison of Different Fixation Methods for Combined Histological and Biomolecular Analysis of Fixed and Decalcified Bone Samples. *Methods and Protocols*, *5*(4). https://doi.org/10.3390/mps5040064

Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Roberson, P. K., Kousteni, S., O'Brien, C. A., Bellido, T., Parfitt, A. M., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., & Manolagas, S. C. (2007). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(37). https://doi.org/10.1074/jbc.M702810200

Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T. D., Greenwald, R., & Hochberg, M. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis and Rheumatism*, *29*(8).

Andrews, N. C. (1998). Molecules in focus the NF-E2 transcription factor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *30*(4). https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00135-0

Baird, L., Llères, D., Swift, S., & Dinkova-Kostova, A. T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(38). https://doi.org/10.1073/pnas.1305687110

Bian, T., Corral, P., Wang, Y., Botello, J., Kingston, R., Daniels, T., Salloum, R. G., Johnston, E., Huo, Z., Lu, J., Liu, A. C., & Xing, C. (2020). Kava as a clinical nutrient: Promises and challenges. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 10). https://doi.org/10.3390/nu12103044

Brotto, M., & Johnson, M. L. (2014). Endocrine crosstalk between muscle and bone. In *Current Osteoporosis Reports* (Vol. 12, Issue 2). https://doi.org/10.1007/s11914-014-0209-0

Buck, R. J., Wyman, B. T., Hellio Le Graverand, M. P., Hudelmaier, M., Wirth, W., & Eckstein, F. (2010). Osteoarthritis may not be a one-way-road of cartilage loss - comparison of spatial patterns of cartilage change between osteoarthritic and healthy knees. *Osteoarthritis and Cartilage*, *18*(3). https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.11.009

Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. In *Instructional course lectures* (Vol. 47).

Buckwalter, J. A., Martin, J., & Mankin, H. J. (2000). Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. In *Instructional course lectures* (Vol. 49).

Buckwalter, J. A., Woo, S. L. Y., Goldberg, V. M., Hadley, E. C., Booth, F., Oegema, T. R., & Eyre, D. R. (1993). Soft-tissue aging and musculoskeletal function. In *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* (Vol. 75, Issue 10). https://doi.org/10.2106/00004623-199310000-00015

Buesa, R. J. (2008). Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*, *12*(6). https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.07.004

Cai, D., Yin, S., Yang, J., Jiang, Q., & Cao, W. (2015). Histone deacetylase inhibition activates Nrf2 and protects against osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s13075-015-0774-3

Cao, X., & Chen, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, *357*(1), 1–8.

Carlevaro, M. F., Cermelli, S., Cancedda, R., & Cancedda, F. D. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: Auto-paracrine role during endochondral bone formation. *Journal of Cell Science*, *113*(1). https://doi.org/10.1242/jcs.113.1.59

Cerqueni, G., Scalzone, A., Licini, C., Gentile, P., & Mattioli-Belmonte, M. (2021). Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, *130*, 112433.

Chan, K., Lu, R., Chang, J. C., & Kan, Y. W. (1996). NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24). https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13943

Chénais, B., Derjuga, A., Massrieh, W., Red-Horse, K., Bellingard, V., Fisher, S. J., & Blank, V. (2005). Functional and placental expression analysis of the human NRF3 transcription factor. *Molecular Endocrinology*, *19*(1). https://doi.org/10.1210/me.2003-0379

Civitelli, R. (2008). Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 473, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.04.005

Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I., & Helfrich, M. H. (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. In *Osteoporosis International* (Vol. 22, Issue 1). https://doi.org/10.1007/s00198-010-1272-8

Davidson, R. K., Jupp, O., De Ferrars, R., Kay, C. D., Culley, K. L., Norton, R., Driscoll, C., Vincent, T. L., Donell, S. T., Bao, Y., & Clark, I. M. (2013). Sulforaphane represses matrix-degrading proteases and protects cartilage from destruction in vitro and in vivo. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(12). https://doi.org/10.1002/art.38133

de Meijer, C., Wouterse, B., Polder, J., & Koopmanschap, M. (2013). The effect of population aging on health expenditure growth: A critical review. In *European Journal of Ageing* (Vol. 10, Issue 4). https://doi.org/10.1007/s10433-013-0280-x

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18). https://doi.org/10.1073/pnas.172398899

Dittmar, M. C., Tohidnezhad, M., Fragoulis, A., Bücker, A., Stein, M., Pufe, T., & Kubo, Y. (2024). Pharmacological effects of methysticin and L-sulforaphane through the Nrf2/ARE signaling pathway in MLO-Y4 osteocytes: in vitro study. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, *254*, 152260.

Duynstee, M. L. G., Verwoerd-Verhoef, H. L., Verwoerd, C. D. A., & Van Osch, G. J. V. M. (2002). The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *110*(4). https://doi.org/10.1097/00006534-200209150-00011

Favre, J., Scanlan, S. F., Erhart-Hledik, J. C., Blazek, K., & Andriacchi, T. P. (2013). Patterns of femoral cartilage thickness are different in asymptomatic and osteoarthritic knees and can be used to detect disease-related differences between samples. *Journal of Biomechanical Engineering*, *135*(10). https://doi.org/10.1115/1.4024629

Feng, C., Xu, Z., Tang, X., Cao, H., Zhang, G., & Tan, J. (2022). Estrogen-Related Receptor α: A Significant Regulator and Promising Target in Bone Homeostasis and Bone Metastasis. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 13). https://doi.org/10.3390/molecules27133976

Fragoulis, A., Siegl, S., Fendt, M., Jansen, S., Soppa, U., Brandenburg, L. O., Pufe, T., Weis, J., & Wruck, C. J. (2017). Oral administration of methysticin improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *12*. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.024

Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., & Salvioli, S. (2018). The continuum of aging and age-related diseases: Common mechanisms but different rates. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 5, Issue MAR). https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061

Fuchs, J., Rabenberg, M., & Scheidt-Nave, C. (2013). Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* (Vol. 56, Issues 5–6). https://doi.org/10.1007/s00103-013-1687-4

Fumoto, T., Takeshita, S., Ito, M., & Ikeda, K. (2014). Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *29*(4). https://doi.org/10.1002/jbmr.2096

Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., & Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, *5*(6). https://doi.org/10.1038/9467

Glasson, S. S., Chambers, M. G., Van Den Berg, W. B., & Little, C. B. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis and Cartilage*, *18*(SUPPL. 3). https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.025

Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L. F., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., Arbiser, J. L., & Apperley, J. F. (1994). Interleukin-1β-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, *94*(6). https://doi.org/10.1172/JCI117595

Gomarasca, M., Banfi, G., & Lombardi, G. (2020). Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 94). https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.010

Gong, M., Li, Y., Ye, X., Zhang, L., Wang, Z., Xu, X., Shen, Y., & Zheng, C. (2020). Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF2 pathway activation. *Cell Communication and Signaling*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12964-020-00568-z

Hardingham, T., & Bayliss, M. (1990). Proteoglycans of articular cartilage: Changes in aging and in joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *20*(3 SUPPL. 1). https://doi.org/10.1016/0049-0172(90)90044-G

Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Gehron Robey, P., Poole, A. R., Pidoux, I., Ward, J. M., & Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, *99*(1). https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80064-1

Ibáñez, L., Ferrándiz, M. L., Brines, R., Guede, D., Cuadrado, A., & Alcaraz, M. J. (2014). Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/726590

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes and Development*, *13*(1). https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76

Jang, D., & Murrell, G. A. C. (1998). Nitric oxide in arthritis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 24, Issue 9). https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00459-0

Jemtland, R., Lee, K., & Segre, G. V. (1998). Heterogeneity among cells that express osteoclast-associated genes in developing bone. *Endocrinology*, *139*(1). https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5664

Jeyapaul, J., & Jaiswal, A. K. (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of γ-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochemical Pharmacology*, *59*(11). https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00256-2

KELLGREN, J. H., & LAWRENCE, J. S. (1957). Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *16*(4). https://doi.org/10.1136/ard.16.4.494

Kempson, G. E. (1982). Relationship between the tensile properties of articular cartilage from the human knee and age. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *41*(5). https://doi.org/10.1136/ard.41.5.508

Khosla, S., & Monroe, D. G. (2018). Regulation of bone metabolism by sex steroids. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 8, Issue 1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031211

Kim, J. H., Singhal, V., Biswal, S., Thimmulappa, R. K., & DiGirolamo, D. J. (2015). Nrf2 is required for normal postnatal bone acquisition in mice. *Bone Research*, *2*. https://doi.org/10.1038/boneres.2014.33

Kubo, Y., Beckmann, R., Fragoulis, A., Conrads, C., Pavanram, P., Nebelung, S., Wolf, M., Wruck, C. J., Jahr, H., & Pufe, T. (2022). Nrf2/ARE Signaling Directly Regulates SOX9 to Potentially Alter Age-Dependent Cartilage Degeneration. *Antioxidants*, *11*(2). https://doi.org/10.3390/antiox11020263

Kubo, Y., Gonzalez, J. A. H., Beckmann, R., Weiler, M., Pahlavani, H., Saldivar, M. C., Szymanski, K., Rosenhain, S., Fragoulis, A., Leeflang, S., Slowik, A.,

Gremse, F., Wolf, M., Mirzaali, M. J., Zadpoor, A. A., Wruck, C. J., Pufe, T., Tohidnezhad, M., & Jahr, H. (2022a). Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2) deficiency causes age-dependent progression of female osteoporosis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12891-022-05942-1

Kubo, Y., Gonzalez, J. A. H., Beckmann, R., Weiler, M., Pahlavani, H., Saldivar, M. C., Szymanski, K., Rosenhain, S., Fragoulis, A., Leeflang, S., Slowik, A., Gremse, F., Wolf, M., Mirzaali, M. J., Zadpoor, A. A., Wruck, C. J., Pufe, T., Tohidnezhad, M., & Jahr, H. (2022b). Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2) deficiency causes age-dependent progression of female osteoporosis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12891-022-05942-1

Lean, J. M., Davies, J. T., Fuller, K., Jagger, C. J., Kirstein, B., Partington, G. A., Urry, Z. L., & Chambers, T. J. (2003). A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(6). https://doi.org/10.1172/JCI200318859

Lee, E. R., Lamplugh, L., Kluczyk, B., Leblond, C. P., & Mort, J. S. (2009). Neoepitopes reveal the features of type II collagen cleavage and the identity of a collagenase involved in the transformation of the epiphyses anlagen in development. *Developmental Dynamics*, *238*(6). https://doi.org/10.1002/dvdy.21960

Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., & Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, *130*(3). https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047

Lefebvre, V. (2019). Roles and regulation of SOX transcription factors in skeletogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 133). https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.007

Liebman, S. E., & Le, T. H. (2021). Eat your broccoli: Oxidative stress, nrf2, and sulforaphane in chronic kidney disease. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 1). https://doi.org/10.3390/nu13010266

Liessem-Schmitz, A., Teske, N., Scheld, M., Nyamoya, S., Zendedel, A., Beyer, C., Clarner, T., & Fragoulis, A. (2018). Nrf2 Signaling in Sodium Azide-Treated Oligodendrocytes Restores Mitochondrial Functions. *Journal of Molecular Neuroscience*, *66*(2). https://doi.org/10.1007/s12031-018-1159-2

Lippross, S., Beckmann, R., Streubesand, N., Ayub, F., Tohidnezhad, M., Campbell, G., Kan, Y. W., Horst, F., Sönmez, T. T., Varoga, D., Lichte, P., Jahr, H., Pufe, T., & Wruck, C. J. (2014). Nrf2 Deficiency Impairs Fracture Healing in Mice. *Calcified Tissue International*, *95*(4). https://doi.org/10.1007/s00223-014-9900-5

Löffler, H., Rastetter, J., & Haferlach, T. (2004). Atlas der klinischen Hämatologie. In *Atlas der klinischen Hämatologie*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18514-4

Lozanovski, V. J., Houben, P., Hinz, U., Hackert, T., Herr, I., & Schemmer, P. (2014). Pilot study evaluating broccoli sprouts in advanced pancreatic cancer (POUDER trial) - study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-204

Lu, X., Xu, G., Lin, Z., Song, J., Zhang, Y., Wang, H., Lu, F., Xia, X., Ma, X., Zou, F., & Jiang, J. (2023). Sulforaphane Delays Intervertebral Disc Degeneration by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in Nucleus Pulposus Cells via Activating Nrf-2/HO-1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2023*. https://doi.org/10.1155/2023/3626091

Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie. In *Taschenlehrbuch Histologie*. https://doi.org/10.1055/b-006-163361

Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 40, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.009

Maenz, S., Brinkmann, O., Hasenbein, I., Braun, C., Kunisch, E., Horbert, V., Gunnella, F., Sachse, A., Bischoff, S., & Schubert, H. (2020). The old sheep: a convenient and suitable model for senile osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *38*(5), 620–630.

Maes, C., Stockmans, I., Moermans, K., Van Looveren, R., Smets, N., Carmeliet, P., Bouillon, R., & Carmeliet, G. (2004). Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(2). https://doi.org/10.1172/JCI200419383

Mandal, C. C., Ganapathy, S., Gorin, Y., Mahadev, K., Block, K., Abboud, H. E., Harris, S. E., Ghosh-Choudhury, G., & Ghosh-Choudhury, N. (2011). Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochemical Journal*, *433*(2). https://doi.org/10.1042/BJ20100357

Martin, J. A., & Buckwalter, J. A. (2001). Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *56*(4). https://doi.org/10.1093/gerona/56.4.B172

Martin, J. A., Ellerbroek, S. M., & Buckwalter, J. A. (1997). Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: The role of growth factor binding proteins. *Journal of Orthopaedic Research*, *15*(4). https://doi.org/10.1002/jor.1100150403

Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., & Fatima, N. (2016). Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, *11*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925

Maurer, T., Zimmermann, G., Maurer, S., Stegmaier, S., Wagner, C., & Hänsch, G. M. (2012). Inhibition of osteoclast generation: A novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. *Mediators of Inflammation*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/171209

McAlindon, T. E., Bannuru, R. R., Sullivan, M. C., Arden, N. K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S. M., Hawker, G. A., Henrotin, Y., Hunter, D. J., Kawaguchi, H., Kwoh, K., Lohmander, S., Rannou, F., Roos, E. M., & Underwood, M. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*(3). https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.01.003

McCormick, K. M. (2001). Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Developmental Dynamics*, *222*(1). https://doi.org/10.1002/dvdy.1168

Merkx, M., Pinkse, M. W. H., & Averill, B. A. (1999). Evidence for nonbridged coordination of p-nitrophenyl phosphate to the dinuclear Fe(III)-M(II) center in bovine spleen purple acid phosphatase during enzymatic turnover. *Biochemistry*, *38*(31). https://doi.org/10.1021/bi9904454

Miller, S. C., De Saint-Georges, L., Bowman, B. M., & Jee, W. S. S. (1989). Bone lining cells: Structure and function. In *Scanning Microscopy* (Vol. 3, Issue 3).

Minkin, C. (1982). Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified Tissue International*, *34*(1). https://doi.org/10.1007/BF02411252

Misir, A., Gunay, A. E., Oguzkaya, S., Uzun, E., Kizkapan, T. B., Yildiz, K. I., & Ozcamdalli, M. (2021). A comprehensive coronal and axial bone dimension and cartilage thickness evaluation of the distal humerus: Age and sex differences. *Cartilage*, *13*(1_suppl), 464S-472S.

Moon, S. J., Jhun, J., Ryu, J., Kwon, J. Y., Kim, S. Y., Jung, K. A., Cho, M. La, & Min, J. K. (2021). The anti-arthritis effect of sulforaphane, an activator of Nrf2, is associated with inhibition of both B cell differentiation and the production of inflammatory cytokines. *PLoS ONE*, *16*(2 February). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245986

Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E., & Weissman, I. L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*, *124*(10). https://doi.org/10.1242/dev.124.10.1929

Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M., & Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, *17*(10). https://doi.org/10.1038/nm.2452

Nazmy, E. A., El-Khouly, O. A., Atef, H., & Said, E. (2017). Sulforaphane protects against sodium valproate–induced acute liver injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *95*(4). https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0447

O'Mealey, G. B., Berry, W. L., & Plafker, S. M. (2017). Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox Biology*, *11*. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.007

Omoumi, P., Michoux, N., Roemer, F. W., Thienpont, E., & Vande Berg, B. C. (2015). Cartilage thickness at the posterior medial femoral condyle is increased in femorotibial knee osteoarthritis: A cross-sectional CT arthrography study (Part 2). *Osteoarthritis and Cartilage*, *23*(2). https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.08.017

Ortega, N., Behonick, D. J., & Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 14, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.003

Otterness, I. G., Bliven, M. L., Milici, A. J., & Poole, A. R. (1994). Comparison of mobility changes with histological and biochemical changes during lipopolysaccharide-induced arthritis in the hamster. *American Journal of Pathology*, *144*(5).

Park, C. K., Lee, Y., Kim, K. H., Lee, Z. H., Joo, M., & Kim, H. H. (2014). Nrf2 is a novel regulator of bone acquisition. *Bone*, *63*. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.01.025

Park, P. S. U., Mun, S. H., Zeng, S. L., Kim, H., Bae, S., & Park-Min, K. H. (2020). NRF2 Is an Upstream Regulator of MYC-Mediated Osteoclastogenesis and Pathological Bone Erosion. *Cells*, *9*(9). https://doi.org/10.3390/cells9092133

Pellegrini, G. G., Cregor, M., Mcandrews, K., Morales, C. C., Mccabe, L. D., Mccabe, G. P., Peacock, M., Burr, D., Weaver, C., & Bellido, T. (2017). NRF2 regulates mass accrual and the antioxidant endogenous response in bone differently depending on the sex and age. *PLoS ONE*, *12*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171161

Peters, A. E., Akhtar, R., Comerford, E. J., & Bates, K. T. (2018). The effect of ageing and osteoarthritis on the mechanical properties of cartilage and bone

in the human knee joint. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-24258-6

Poole, K. E. S., van Bezooijen, R. L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., Löwik, C. W., & Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal*, *19*(13). https://doi.org/10.1096/fj.05-4221fje

Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M. K., Cooper, C., Diez-Perez, A., & Arden, N. K. (2014). Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: Influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *73*(9). https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203355

Pritzker, K. P. H., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J. P., Revell, K., Salter, D., & van den Berg, W. B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, *14*(1). https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014

Rana, T., Schultz, M. A., Freeman, M. L., & Biswas, S. (2012). Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(12). https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.536

Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H2O2 to cause oxidative stress, the catalase issue. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23). https://doi.org/10.3390/ijms21239149

Roberts, H. C., Knott, L., Avery, N. C., Cox, T. M., Evans, M. J., & Hayman, A. R. (2007). Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: A role for TRAP in bone collagen metabolism. *Calcified Tissue International*, *80*(6). https://doi.org/10.1007/s00223-007-9032-2

Rochefort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. In *Osteoporosis International* (Vol. 21, Issue 9). https://doi.org/10.1007/s00198-010-1194-5

Ruhee, R. T., & Suzuki, K. (2020). The integrative role of sulforaphane in preventing inflammation, oxidative stress and fatigue: A review of a potential

protective phytochemical. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 6). https://doi.org/10.3390/antiox9060521

Sánchez-de-Diego, C., Pedrazza, L., Pimenta-Lopes, C., Martinez-Martinez, A., Dahdah, N., Valer, J. A., Garcia-Roves, P., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2021). NRF2 function in osteocytes is required for bone homeostasis and drives osteocytic gene expression. *Redox Biology*, *40*, 101845.

Sebbag, E., Felten, R., Sagez, F., Sibilia, J., Devilliers, H., & Arnaud, L. (2019). The world-wide burden of musculoskeletal diseases: A systematic analysis of the World Health Organization Burden of Diseases Database. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *78*(6). https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215142

Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: An overview. In *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (Vol. 29, Issue 3). https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y

Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, *1*(6). https://doi.org/10.1177/1941738109350438

Stickens, D., Behonick, D. J., Ortega, N., Heyer, B., Hartenstein, B., Yu, Y., Fosang, A. J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., & Werb, Z. (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*, *131*(23). https://doi.org/10.1242/dev.01461

Sun, W., Xie, W., Huang, D., Cui, Y., Yue, J., He, Q., Jiang, L., Xiong, J., Sun, W., & Yi, Q. (2022). Caffeic acid phenethyl ester attenuates osteoarthritis progression by activating NRF2/HO-1 and inhibiting the NF-κB signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, *50*(5). https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5190

Sun, Y. X., Li, L., Corry, K. A., Zhang, P., Yang, Y., Himes, E., Mihuti, C. L., Nelson, C., Dai, G., & Li, J. (2015). Deletion of Nrf2 reduces skeletal mechanical properties and decreases load-driven bone formation. *Bone*, *74*. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.066

Sun, Y. X., Xu, A. H., Yang, Y., & Li, J. (2015). Role of Nrf2 in bone metabolism. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 22, Issue 1). https://doi.org/10.1186/s12929-015-0212-5

Suzuki, Y., Imada, T., Yamaguchi, I., Yoshitake, H., Sanada, H., Kashiwagi, T., & Takaba, K. (2012). Effects of prolonged water washing of tissue samples fixed in formalin on histological staining. *Biotechnic and Histochemistry*, *87*(4). https://doi.org/10.3109/10520295.2011.613410

Takeshita, S., Fumoto, T., Naoe, Y., & Ikeda, K. (2014). Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(24). https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547919

Tanaka, A., Hamada, N., Fujita, Y., Itoh, T., Nozawa, Y., Iinuma, M., & Ito, M. (2010). A novel kavalactone derivative protects against H2O2-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *18*(9). https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.034

Tanaka, Y., Nakayamada, S., & Okada, Y. (2005). Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, *4*(3). https://doi.org/10.2174/1568010054022015

Tang, Z., Hu, B., Zang, F., Wang, J., Zhang, X., & Chen, H. (2019). Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration. *Cell Death and Disease*, *10*(7). https://doi.org/10.1038/s41419-019-1701-3

Tohidnezhad, M., Wruck, C. J., Slowik, A., Kweider, N., Beckmann, R., Bayer, A., Houben, A., Brandenburg, L. O., Varoga, D., Sönmez, T. T., Stoffel, M., Jahr, H., Lippross, S., & Pufe, T. (2014). Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone*, *65*. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.04.029

Toki, T., Itoh, J., Kitazawa, J., Arai, K., Hatakeyama, K., Akasaka, J. I., Igarashi, K., Nomura, N., Yokoyama, M., Yamamoto, M., & Ito, E. (1997). Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, *14*(16). https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201024

Tomkinson, A., Gevers, E. F., Wit, J. M., Reeve, J., & Noble, B. S. (1998). The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(8). https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.8.1243

Tsuboi, H., Matsui, Y., Hayashida, K., Yamane, S., Maeda-Tanimura, M., Nampei, A., Hashimoto, J., Suzuki, R., Yoshikawa, H., & Ochi, T. (2003). Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *62*(3). https://doi.org/10.1136/ard.62.3.196

Tsuchida, A. I., Beekhuizen, M., 't Hart, M. C., Radstake, T. R. D. J., Dhert, W. J. A., Saris, D. B. F., Van Osch, G. J. V. M., & Creemers, L. B. (2014). Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s13075-014-0441-0

Veldhuis-Vlug, A. G., & Rosen, C. J. (2018). Clinical implications of bone marrow adiposity. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 283, Issue 2). https://doi.org/10.1111/joim.12718

Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., Harada, T., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature Genetics*, *35*(3). https://doi.org/10.1038/ng1248

Walsh, N. C., Cahill, M., Carninci, P., Kawai, J., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Hume, D. A., & Cassady, A. I. (2003). Multiple tissue-specific promoters control expression of the murine tartrate-resistant acid phosphatase gene. *Gene*, *307*(1–2). https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00449-9

Wang, D. X., Zou, Y. J., Zhuang, X. Bin, Chen, S. X., Lin, Y., Li, W. L., Lin, J. J., & Lin, Z. Q. (2017). Sulforaphane suppresses EMT and metastasis in human lung cancer through miR-616-5p-mediated GSK3β/β-catenin signaling pathways. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(2). https://doi.org/10.1038/aps.2016.122

Weitzmann, M. N., & Pacifici, R. (2006). Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 116, Issue 5). https://doi.org/10.1172/JCI28550

Woo, S. L., & Buckwalter, J. A. (1988). AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *6*(6). https://doi.org/10.1002/jor.1100060615

Woo, S. M., Rosser, J., Dusevich, V., Kalajzic, I., & Bonewald, L. F. (2011). Cell line IDG-SW3 replicates osteoblast-to-late-osteocyte differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(11). https://doi.org/10.1002/jbmr.465

Yeler, H., Tahtabas, F., & Candan, F. (2005). Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochemistry and Function*, *23*(2). https://doi.org/10.1002/cbf.1199

Yin, Y., Corry, K. A., Loughran, J. P., & Li, J. (2020). Moderate Nrf2 activation by genetic disruption of Keap1 has sex-specific effects on bone mass in mice. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10.

Yin, Y., Corry, K. A., Loughran, J. P., & Li, J. (2021). Author Correction: Moderate Nrf2 Activation by Genetic Disruption of Keap1 Has Sex-Specific Effects on Bone Mass in Mice. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-87424-3

Yoshida, E., Suzuki, T., Morita, M., Taguchi, K., Tsuchida, K., Motohashi, H., Doita, M., & Yamamoto, M. (2018). Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo. *Genes to Cells*, *23*(5). https://doi.org/10.1111/gtc.12579

Zhou, B. O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J. J., Naveiras, O., & Morrison, S. J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*, *19*(8). https://doi.org/10.1038/ncb3570

8 ANHANG

8.1 Radiologische Einteilung der OA nach Kellgren und Lawrence

Grad	Radiologischer Befund
0	Keine
I	Fragliche Verschmälerung Gelenkspalt, mögliche Osteophyten
II	Mögliche Verschmälerung Gelenkspalt, definitive Osteophyten
III	Definitive Verschmälerung Gelenkspalt, multiple Osteophyten, Sklerose, mögliche Verformung Tibia und Femur
IV	Starke Verschmälerung Gelenkspalt, ausgeprägte Osteophyten, ausgeprägte Sklerose, definitive Verformung Tibia und Femur

8.2 Grading-System nach Pritzker et al.

Grad	Merkmal	Zusätzliche Befunde
0	Intakte Oberfläche	Normale Dicke
1	Oberfläche intakt, aber uneben	Oberflächen-Fibrillation, oberflächliche Proliferation, Zell-Vergrößerung
2	Diskontinuierliche Oberfläche (diffuse oberflächliche Fibrillation oder Abrasionen)	Säulenknorpel: Desorientierung der Anordnung
3	Vertikale Fissuren (einfach oder verzweigt)	Neuformation von Kollagen
4	Erosionen (Knorpel-Verlust)	Formation von knorpeligen Zysten

5	Vollständiger Knorpel-Verlust	Keine Verformung von Knochen
6	Verformter Knochen (Osteophyten peripher oder zentral)	Verformung von Gelenkflächen, Mikrofrakturen

8.3 Etablierung der TRAP-Färbung

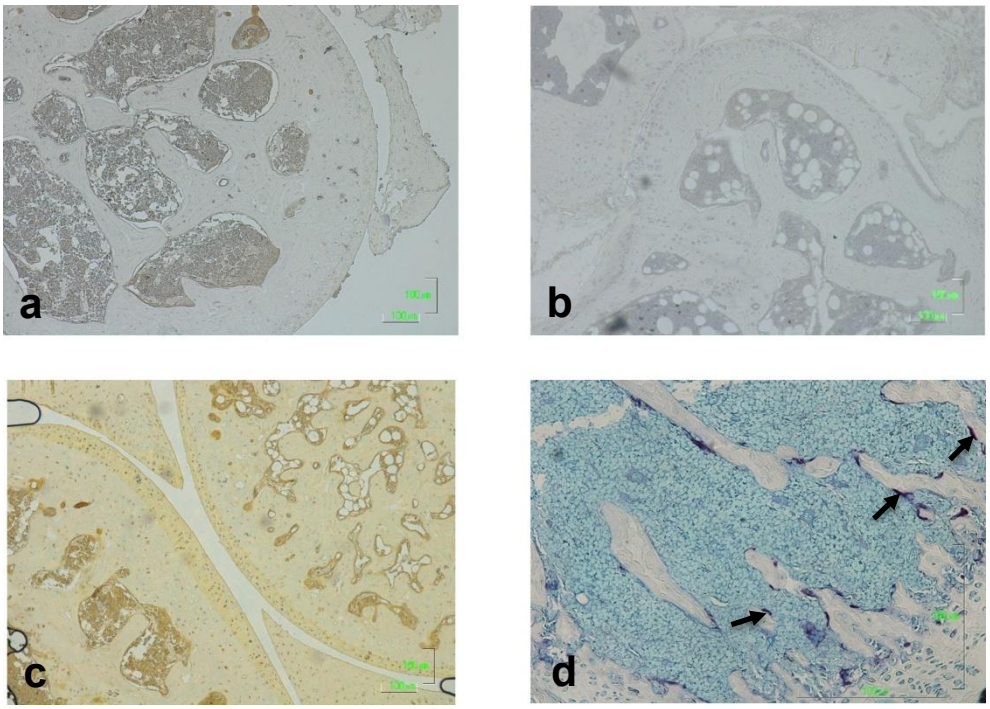


Abbildung 13 TRAP-Färbung distales Femur Maus mit unterschiedlichen pH-Werten (TRAP-Pufferlösung): pH 5,0 (a); pH 3,25 (b) pH 10,0 (c); d: Positivkontrolle TRAP bei Femur in Formalinfixierung mit Gegenfärbung mittels Fast Green, Pfeile zeigen auf TRAP-positive Zellen; a-c: Fixierung in Methacarn; Skala: 100 µm

8.4 Osteozytenanzahl in männlichen und weiblichen Tieren

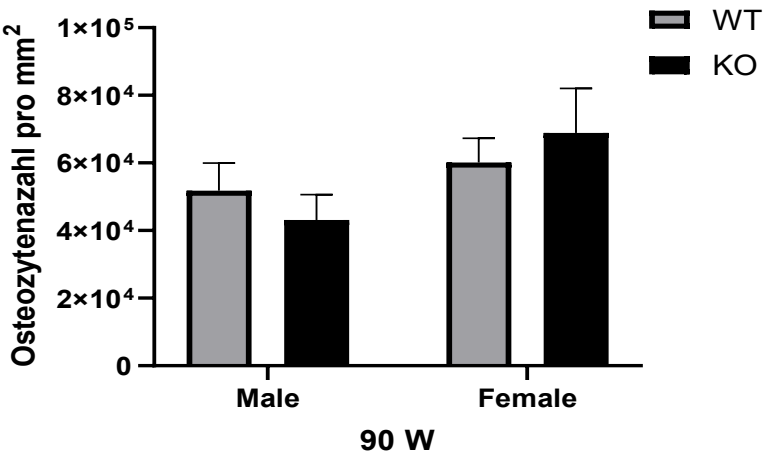


Abbildung 14 Osteozytenzahl in Kortikalis des Femurschafts in 90 Wochen alten männlichen und weiblichen Nrf2-KO- und WT-Mäusen

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich im Zuge der Versuche und der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben. Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit und die hilfreichen Anregungen bedanken. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad, die diese Arbeit praktisch betreut hat. Danke dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Ideen und bei der praktischen Durchführung der Versuche hatte. Ein Dank gebührt den medizinisch-technischen Assistentinnen Susanne Echterhagen, Michaela Nicolau und Angela Rüben für die freundliche Unterstützung bei Fragen im Labor. Einen Dank möchte ich auch Dr. rer. nat. Nicole Böttcher aussprechen, die mir die Arbeitsweise mit dem Programm ImageJ nähergebracht hat. Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir während der gesamten Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit fortan motivierend zur Seite stand.

ERKLÄRUNG § 5 ABS. 1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer, Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe, Institut für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikums Aachen, hinterlegt sind.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG GEMÄß § 5 ABS. (1) UND § 11 ABS. (3) 12. DER PROMOTIONSORDNUNG

Hiermit erkläre ich, **Katharina Szymanski** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Einfluss des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf Knochen- und Knorpelstrukturen in einem Knockout-Mausmodell“** dargestellten Ergebnisse erhoben habe:
Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Doktorandin Katharina Szymanski	Prakt. BetreuerIn PD Dr. rer. nat. Tohidnezhad	Doktor-vater Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe	Arbeiten aus früheren Prüfungen gelten als Fremdleistung *	Summe (%)
Studienüberwachung		50	50		100
Studiendesign/Konzeption	75	10	15		100
Durchführung: In-vitro-Zellkultur/-Behandlung	100				100
Durchführung: Viabilitäts-Assays	100				100
Durchführung: Histologische Färbungen	100	-			100
Durchführung: Immunhistologische Färbungen	100				100
Datenauswertung	100				100
Statistische Auswertung	80	20			100
Bereitstellung von Materialien		10	90		100
Interpretation der Datenauswertung	50	20	30		100

Hier ggf. auch Experimente oder statistische Auswertungen aufführen, die nicht selbstständig gemacht, sondern von den entsprechenden Personen übernommen wurden.

_____
Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Katharina Szymanski.

_____
Unterschrift des Doktorvaters